



HAL
open science

Caractérisation de la régulation négative de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur purinergique P2Y2 dans le cadre du traitement des maladies liées à un excès d'inflammation

Emie Gutierrez-Mateyron

► **To cite this version:**

Emie Gutierrez-Mateyron. Caractérisation de la régulation négative de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur purinergique P2Y2 dans le cadre du traitement des maladies liées à un excès d'inflammation. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ044 . tel-04721014

HAL Id: tel-04721014

<https://theses.hal.science/tel-04721014v1>

Submitted on 4 Oct 2024

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.

Caractérisation de la régulation négative de
l'inflammasome NLRP3 par le récepteur
purinergique P2Y2 dans le cadre des maladies
liées à un excès d'inflammation

*Characterisation of the negative regulation of the NLRP3 inflammasome
by the P2Y2 purinergic receptor in inflammation-related diseases*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué
Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Radiothérapie Moléculaire et
Innovation Thérapeutique (Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy,
Inserm)** sous la direction de **Jean-Luc PERFETTINI**, Dr et **Angelo PACI**, PU-PH.

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 18 septembre 2023, par

Emie GUTIERREZ-MATEYRON

Composition du jury

Bénédicte PY Dr, Inserm, Université de Lyon	Rapporteuse & Examinatrice
Cédric RÉBÉ Dr, Inserm, Université de Dijon	Rapporteur & Examineur
Nathalie CHAPUT-GRAS PU-PH, Inserm, Université Paris-Saclay	Présidente
Karim BENIHOUD Pr, CNRS, Université Paris-Saclay	Examineur

Caractérisation de la régulation négative de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur purinergique P2Y2 dans le cadre des maladies liées à un excès d'inflammation

*Characterisation of the negative regulation of the NLRP3 inflammasome
by the P2Y2 purinergic receptor in inflammation-related diseases*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué
Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Radiothérapie Moléculaire et
Innovation Thérapeutique (Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy,
Inserm)** sous la direction de **Jean-Luc PERFETTINI**, Dr.

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 18 septembre 2023, par

Emie GUTIERREZ-MATEYRON

Composition du jury

Bénédicte PY Dr, Inserm, Université de Lyon	Rapporteuse & Examinatrice
Cédric RÉBÉ Dr, Inserm, Université de Dijon	Rapporteur & Examineur
Nathalie CHAPUT-GRAS PU-PH, Inserm, Université Paris-Saclay	Présidente
Karim BENIHOUD Pr, CNRS, Université Paris-Saclay	Examineur

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier mes deux directeurs de thèse, Jean-Luc PERFETTINI et Angelo PACI, pour m'avoir donné ma chance et l'opportunité de réaliser ma thèse dans leur équipe. Je remercie particulièrement Jean-Luc de m'avoir encadrée durant ces trois années, de m'avoir fait participer à d'autres projets, notamment un projet de recherche sur la COVID-19 alors que nous étions en pleine pandémie et qu'il était nécessaire d'apporter des réponses. Je le remercie également de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de mettre l'immunologie au cœur de mon projet, bien que l'équipe travaille habituellement sur les cancers. Je souhaite aussi remercier Angelo pour m'avoir fait confiance et présentée à l'école doctorale, ainsi que d'avoir toujours été réactif dès que je le sollicitais.

J'aimerais exprimer ma gratitude envers Bénédicte PY et Cédric RÉBÉ d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de m'accorder de leur temps. Je remercie également Nathalie CHAPUT-GRAS et Karim BENIHOUD de me faire l'honneur d'examiner ma thèse. Merci à Karim pour m'avoir fait découvrir l'immunologie à travers ses cours à l'Université Paris-Saclay durant ma licence et mon master. J'étais persuadée jusque-là de me diriger exclusivement vers la cancérologie (merci au Professeur Simon SAULE) mais sa passion pour l'enseignement, sa faculté à intégrer les étudiants dans les projets pédagogiques comme la publication d'une nouvelle lors du Master 1, ont définitivement motivé mon désir de réaliser une thèse dans le domaine de l'immunologie. Je souhaite également remercier Cécile DELARASSE et Sahil ADRIOUCH pour leur participation à l'examen de ma thèse en tant qu'invités. Je les remercie tous les deux pour avoir été mes jurés de comité de mi-thèse, rôle qu'ils ont parfaitement rempli en m'apportant toute leur expertise, en me redonnant confiance en moi et en mon projet au travers des échanges scientifiques riches que nous avons eus.

Je tiens particulièrement à remercier mes amies et collègues Aurélia DEVA-NATHAN, Déborah LÉCUYER et Désirée TANNOUS. J'aimerais vous exprimer toute ma reconnaissance pour le soutien indéfectible dont vous avez fait preuve durant ces 3 années, tant sur le plan scientifique, qu'humain. Cette aventure n'aurait pas eu la même saveur sans vous. Je n'oublierai pas tous ces moments de vie partagés ensemble, la joie de vous retrouver chaque matin, les nombreux échanges que nous avons eus qui m'ont fait grandir professionnellement et personnellement. Je suis aujourd'hui riche de vous connaître, riche d'avoir découvert vos cultures, vos coutumes, vos différences, toute cette diversité qui fait notre force. J'ai adoré chaque instant passé avec vous, je vous remercie de m'avoir tant fait rire, souvent jusqu'aux larmes. Je retiendrai ta sagesse Aurélia, ton altruisme Désirée et ta persévérance Déborah, 3 qualités que je m'efforcerai d'honorer. Merci également à Yara BOU-GHOSN, j'ai adoré partager cette dernière année avec toi et je te souhaite vraiment que la thèse se déroule bien, je serai toujours là si tu en as besoin. Je remercie aussi Awatef ALLOUCH pour l'aide que tu m'as apportée et le temps que tu m'as accordé lorsque j'en avais besoin. Merci à Cassandre VEDEL, Trang Tranh CAO-PHAM, Ali MOSTEFA-KARA et Arianna MARINELLO pour les discussions scientifiques que nous avons eues.

Je souhaite également remercier Nathalie VIOLA et Winchygn LIU pour leur soutien tout au long de ma thèse. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir toujours accordé du temps lorsque je vous sollicitais, d'avoir rendu mes journées plus légères dans des moments moins

faciles. Je remercie l'équipe d'Éric DEUTSCH aussi. Lydia MEZIANI pour ton écoute, tes conseils scientifiques, ton expertise, tu as été un exemple pour moi durant ces 3 années. Je remercie Paul BERGERON et Michele MONDINI pour nos nombreuses discussions non scientifiques, votre bonne humeur, et merci Michele d'avoir veillé à ce que nous ne tombions jamais en hypoglycémie. Je remercie également Céline CLEMENSON avec qui j'ai adoré partager la hotte de culture primaire. Merci à Pierre-Antoine LAURENT pour nos échanges et ton soutien, je n'oublierai pas l'aide que tu m'as apportée lorsque ma grand-mère est tombée malade.

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes ayant travaillé sur ce projet, ainsi que tous ceux avec qui j'ai eu la chance de collaborer à travers les différents projets auxquels j'ai participé. En particulier, les plateformes d'animalerie et de cytométrie de l'Institut Gustave Roussy.

Je remercie mes amies et amis de m'avoir accompagnée pendant cette étape de ma vie. Merci à mes amies de toujours, Marine SEVERAC et Laura CULARD, pour votre soutien indéfectible depuis tant d'années. Je souhaite également remercier Clara LEGAUX, Agathe GUERIN, Thomas REGNAULT ainsi que mes amis à Paris, Lyon et Toulouse de m'avoir supportée durant ma thèse et de toujours m'encourager.

Enfin, je voudrais remercier ma famille. Un grand merci à mon compagnon, Grégoire qui m'a soutenu tout au long de ces 3 années et plus encore. Je te remercie d'avoir été si patient, de m'avoir motivée lorsque c'était nécessaire, de m'encourager tous les jours, d'être l'épaule sur laquelle je peux me reposer depuis tant d'années. Tu es pour moi une source de motivation et d'énergie, un exemple de persévérance. Je te remercie de m'avoir fait grandir, de participer chaque jour à mon équilibre et à mon épanouissement, merci pour ton amour. Je tiens à remercier mon père Thierry et ma mère Véronique sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Papa, merci d'être toujours présent à mes côtés et de me permettre de m'accomplir grâce à ton soutien infailible et ton amour. Maman, je ne sais par où commencer. Je te remercie d'avoir été la maman aimante, câline, présente, dévouée que j'ai eu la chance d'avoir jusqu'à mes 17ans et qui m'accompagne tous les jours depuis. Je te remercie de m'avoir toujours encouragée depuis mon plus jeune âge, d'avoir toujours cru en nous, d'avoir toujours tout fait pour notre bonheur, c'est une réussite Maman. Merci de m'avoir tant donné et transmis, toute ta force, ta combativité sans limite et d'avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui. Tu es un exemple, mon modèle, tu ne cesseras jamais de l'être. Tu me guides et me guideras toujours de là où tu es. Merci pour ton amour qui résonne encore en moi et me porte tous les jours. Merci à mes sœurs, Nina et Florie. Ma sœur jumelle, Nina, sans qui je ne serai pas là. C'est toi qui m'as aidée à faire mon dossier pour venir à l'Université Paris-Saclay, toi qui m'as d'ailleurs toujours soutenue à chaque étape de ma vie. Merci pour tout l'amour que tu me portes, pour ton soutien qui dépasse l'entendement, merci de croire si fort en moi, de me venir en aide même lorsque je ne te le demande pas, merci d'être là, toujours. Merci à ma grande-sœur Florie pour m'avoir également soutenue pendant ces années de thèse et bien au-delà, merci pour ton amour qui est si important. Je tiens aussi à remercier mes grands-parents, Papou, Viviane, Papi et Loulou. Enfin, je remercie mes beaux-parents, Jean-Pierre et Sylvie, ainsi que mon beau-frère Arthur et ma belle-sœur Nanou pour leurs encouragements pendant mes études, leur soutien moral et leur amour.

Table des matières

Liste des tables	8
Listes des figures	9
Liste des annexes.....	10
Liste des abréviations	11
Introduction	19
1 Les inflammasomes.....	19
1.1 Les généralités sur les inflammasomes.....	19
1.1.1 La composition des inflammasomes canoniques.....	19
1.1.1.1 Les récepteurs cytoplasmiques engagés dans les inflammasomes.....	19
1.1.1.1.1 Les récepteurs NOD-like (NLRs).....	21
1.1.1.1.1.1 Les généralités sur les récepteurs NLRs.....	21
1.1.1.1.1.2 Les fonctions des récepteurs NLRs.....	23
1.1.1.1.2 Les récepteurs de type AIM2 (ALRs).....	24
1.1.1.1.3 Les récepteurs RIG-I-like (RLRs).....	26
1.1.1.1.4 La pyrine	26
1.1.1.1.5 Le récepteur CARD8.....	27
1.1.1.2 La protéine adaptatrice ASC.....	28
1.1.1.2.1 Les généralités sur la protéine ASC.....	28
1.1.1.2.2 Les fonctions de la protéines ASC	29
1.1.1.3 La caspase-1	31
1.1.1.3.1 La structure et le mécanisme d'activation de la caspase-1	31
1.1.1.3.2 Les fonctions de la caspase-1	33
1.1.2 Les inflammasomes non canoniques.....	34
1.1.3 Les conséquences de l'activation des inflammasomes.....	35
1.1.3.1 Les cytokines pro-inflammatoires.....	36
1.1.3.1.1 Synthèse, maturation et sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18	36
1.1.3.1.2 Les fonctions de l'IL-1 β et de l'IL-18.....	38
1.1.3.2 La pyroptose.....	39
1.2 L'inflammasome NLRP3	41
1.2.1 L'assemblage de l'inflammasome NLRP3	42
1.2.2 L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3	43
1.2.2.1 Le signal 1 : le signal d'amorçage ou de priming	44
1.2.2.2 Le signal 2 : le signal d'activation de l'inflammasome NLRP3	47
1.2.2.2.1 Activation par un flux ionique.....	47
1.2.2.2.2 Activation par les mitochondries et les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	49
1.2.2.2.3 Activation par la rupture des lysosomes.....	52
1.2.2.2.4 Activation par la dissociation du réseau trans-golgi.....	53
1.2.3 Les activations non canonique et alternative de l'inflammasome NLRP3.....	54
1.3 Les modulations physiologiques de l'inflammasome NLRP3	55
1.3.1 Les modifications post-traductionnelles (MPTs)	56
1.3.1.1 Les MPTs de NLRP3	56
1.3.1.2 Les MPTs des autres acteurs de l'inflammasome	61

1.3.2	La régulation par des partenaires protéiques d'interaction	62
1.3.2.1	La protéine kinase 7 apparentée à NIMA (NEK7)	62
1.3.2.2	Les protéines à pyrine (POPs) et les protéines à CARD (COPs)	64
1.3.2.3	Les autres partenaires d'interaction protéiques	67
1.3.3	Les autres mécanismes de régulation	68
1.3.3.1	La localisation subcellulaire	68
1.3.3.2	Le priming prolongé.....	69
1.3.3.3	Les microARN (miRs).....	70
1.4	Les modulations physiopathologiques de l'inflammasome NLRP3	71
1.4.1	Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans un contexte physiopathologique... 71	71
1.4.1.1	Les maladies auto-inflammatoires.....	71
1.4.1.1.1	Les cryopyrinopathies.....	71
1.4.1.1.2	Les autres inflammasomopathies impliquant l'inflammasome NLRP3	73
1.4.1.2	Les maladies multifactorielles.....	73
1.4.1.2.1	Les maladies du système nerveux central (SNC)	73
1.4.1.2.2	Les maladies périphériques.....	73
1.4.1.2.3	Les cancers.....	74
1.4.1.3	Les infections, le cas du SARS-CoV-2	75
1.4.1.3.1	Le SARS-CoV-2, l'agent pathogène de la COVID-19	75
1.4.1.3.2	Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la COVID-19	76
1.4.2	Les stratégies thérapeutiques ciblant l'inflammasome NLRP3.....	79
1.4.2.1	Les thérapies ciblant directement l'inflammasome NLRP3	80
1.4.2.1.1	Les thérapies ciblant la protéine NLRP3	80
1.4.2.1.1.1	Cibler la protéine NLRP3 de façon directe	80
1.4.2.1.1.2	Cibler la protéine NLRP3 de façon indirecte.....	81
1.4.2.1.2	Les thérapies dirigées contre les autres composants de l'inflammasome NLRP3	82
1.4.2.2	Les thérapies ciblant les voies de signalisation de l'inflammasome NLRP3..	82
1.4.2.2.1	Cibler la cascade de signalisation en aval de l'inflammasome.....	82
1.4.2.2.2	Cibler la cascade de signalisation en amont de l'inflammasome	83
2	Les récepteurs purinergiques.....	85
2.1	Les généralités sur les récepteurs purinergiques	85
2.1.1	L'activation des récepteurs purinergiques.....	86
2.1.2	Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques	87
2.1.3	Les récepteurs à l'adénosine (P1).....	89
2.1.4	Les récepteurs ionotropiques (P2X)	90
2.1.5	Les récepteurs métabotropiques (P2Y).....	92
2.2	Le récepteur purinergique P2Y2.....	94
2.2.1	La structure du récepteur P2Y2.....	94
2.2.2	Les mécanismes d'activation, de signalisation et de terminaison du récepteur P2Y2	94
2.2.3	L'expression et les fonctions physiologiques du récepteur P2Y2.....	95
2.2.4	Les voies de signalisation contrôlées par le récepteur P2Y2.....	95
2.2.4.1	La signalisation du cytosquelette d'actine.....	95
2.2.4.2	La modulation des flux ioniques.....	98
2.2.4.3	L'activation de la voie des MAP-kinases.....	100

2.2.5	Le rôle du récepteur P2Y2 dans les réponses inflammatoires.....	101
2.3	Les modulations physiopathologiques du récepteur P2Y2.....	104
2.3.1	Le rôle du récepteur P2Y2 dans un contexte physiopathologique.....	104
2.3.1.1	Les maladies liées à un défaut de sécrétion de fluides	104
2.3.1.1.1	La sécheresse de l'œil.....	104
2.3.1.1.2	La mucoviscidose	104
2.3.1.2	Les maladies cardiovasculaires.....	105
2.3.1.3	Les atteintes neurologiques	105
2.3.1.4	Les autres pathologies impliquant le récepteur P2Y2.....	106
2.3.1.5	Le rôle de P2Y2 dans les infections virales	107
2.3.2	Les stratégies thérapeutiques ciblant le récepteur P2Y2.....	107
2.3.2.1	Les agonistes endogènes	107
2.3.2.2	Les agonistes exogènes	108
2.3.2.2.1	Le Diquafosol tétrasodium	108
2.3.2.2.2	Les autres agonistes.....	109
2.3.2.3	Les antagonistes du récepteur P2Y2.....	110
Objectifs	112
Résultats	113
Discussion et perspectives	158
1	L'impact du récepteur P2Y2 sur l'activité des inflammasomes	161
2	La modulation de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur P2Y2.....	162
3	L'impact de la modulation de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur P2Y2 sur l'infection par le SARS-CoV-2	166
4	Le traitement de la fibrose pulmonaire par un agoniste du récepteur P2Y2.....	167
Annexes	171
Références bibliographiques	213

Liste des tables

Table 1. Principaux activateurs des inflammasomes humains	21
---	----

Listes des figures

Figure 1. Les récepteurs de reconnaissance aux signaux de danger (PRRs).....	20
Figure 2. La structure des récepteurs NLRs chez l'Homme.....	22
Figure 3. Les fonctions des NLRs.....	23
Figure 4. La structure des récepteurs ALRs humains.....	25
Figure 5. Mécanismes d'activation de l'inflammasome CARD8 par la protéase du VIH-1.....	28
Figure 6. La nucléation des protéines ASC et caspase-1 dans l'inflammasome.....	30
Figure 7. Structure et schéma d'activation et de désactivation de la caspase-1.....	33
Figure 8 L'inflammasome non canonique caspase-4/5.....	35
Figure 9. Modalités de sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18.....	38
Figure 10. La mort cellulaire par pyroptose.....	41
Figure 11. La protéine NLRP3 et le modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3.....	43
Figure 12. L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3.....	44
Figure 13. Le priming de l'inflammasome NLRP3.....	46
Figure 14. L'efflux de potassium induit l'activation de l'inflammasome NLRP3.....	48
Figure 15. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par la mitochondrie.....	52
Figure 16. Activation de l'inflammasome NLRP3 par le réseau trans-golgien.....	54
Figure 17. L'ubiquitination de NLRP3.....	58
Figure 18. La phosphorylation de NLRP3.....	60
Figure 19. NEK7 et RACK1 contrôlent l'activation de NLRP3.....	63
Figure 20. L'activation de l'inflammasome NLRP3 est contrôlée par les POPs et COPs.....	67
Figure 21. La régulation de l'inflammasome NLRP3 en fonction de sa localisation subcellulaire.	69
Figure 22. Exemples des mutations de la protéine NLRP3 qui causent les CAPS.....	72
Figure 23. Le cycle de vie du SARS-CoV-2.....	76
Figure 24. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par le SARS-CoV-2.....	78
Figure 25. L'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par différentes stratégies thérapeutiques.....	79
Figure 26. Mécanismes d'action des principaux inhibiteurs directs de NLRP3.....	81
Figure 27. Les récepteurs purinergiques.....	85
Figure 28. L'activation des récepteurs purinergiques par les nucléotides et les nucléosides.....	87
Figure 29. Les voies de signalisation associées aux récepteurs couplés aux protéines G.....	89
Figure 30. Les récepteurs ionotropiques P2X.....	91
Figure 31. La famille des récepteurs P2Y et leurs agonistes endogènes.....	93
Figure 32. La signalisation du cytosquelette d'actine médiée par le récepteur P2Y2.....	97
Figure 33. La régulation des flux ioniques par le récepteur P2Y2.....	99
Figure 34. L'activation de la voie des MAPK par le récepteur P2Y2.....	101
Figure 35. L'implication du récepteur P2Y2 dans le recrutement des phagocytes.....	102
Figure 36. La structure chimique du Diquafosol tétrasodium (INS365).....	109
Figure 37. Illustration de la répression de l'inflammasome NLRP3 par les agonistes du récepteur P2Y2.....	164
Figure 38. Régulation négative suggérée de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur P2Y2.....	165

Liste des annexes

Annexe 1. Liste des inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3.	171
Annexe 2. Distribution tissulaire des principaux récepteurs P1 et P2.....	174
Annexe 3. The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection.....	175

Liste des abréviations

3'UTR : Région 3' non traduite

5'NT : Ecto-5'-nucléotidase

A

AA : Acide arachidonique

A β : Protéine β -amyloïde

ABRO1 : Protéine frère Abraxas 1

AC : Adénylate cyclase

ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2

AD : Domaine transactivateur acide

ADA : Adenosine désaminase

ADAM 10 : Métalloprotéase et désintégrine 10

ADAM 17 : Métalloprotéase et désintégrine 17

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADO : Adénosine

ADP : Adénosine diphosphate

AIM2 : Protéine absente dans le mélanome 2

AKT : Protéine kinase alpha ciblant les sérines et thréonine

ALRs : Récepteurs de type AIM2

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AMs : Macrophages alvéolaires

AMP : Adénosine monophosphate

AMPc : AMP cyclique

Ap4A : Diadénosine-tétraphosphate

APCs : Cellules présentatrices d'antigènes

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde

ARIH2 : Protéine homologue ariadne 2

ARN : Acide ribonucléique

ARs : Récepteurs à adénosine

ASC : Protéine ponctiforme associée à l'apoptose contenant un domaine CARD

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

ATPase : Adénosine triphosphatase

ATP γ S : ATP γ -thiophosphates

B

BIR : Protéine d'inhibition de l'apoptose du baculovirus

BMDMs : Macrophages dérivés de la moelle osseuse

BRCA1 : Gène 1 du cancer du sein

BRCA2 : Gène 2 du cancer du sein

BRCC3 : Sous-unité 3 du complexe BRCA1/BRCA2

BRCC36 : Sous-unité 36 du complexe BRCA1/BRCA2

BRET : Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence

BTK : Tyrosine kinase de Bruton

C

C-terminal : Carboxy-terminal

Ca²⁺ : Ion calcium

CAC : Cancer colorectal associé à la colite

CaCC : Canal de chlorure dépendant du calcium

CAMK2 : Protéine kinase dépendante du Ca²⁺/calmoduline 2

CAPS : Syndromes périodiques associés à la cryopyrine

CARD : Domaine de recrutement de caspase

CARDS : Syndrome de détresse respiratoire aiguë associé au coronavirus

Caspase : Protéase spécifique de la cystéine et de l'aspartate

CASR : Récepteur sensible au calcium

Cbl-b : Proto-oncogène B du Lymphome de la lignée B Casitas

CC : domaine de superhélices α ou *coiled-coil*

CD4 : Cluster de différenciation 4

CD8 : Cluster de différenciation 8

CD39 : Cluster de différenciation 39

CD73 : Cluster de différenciation 73

Cdc42 : Petite protéine G du cycle de division cellulaire 42

CDL : Élément de liaison au domaine CARD

CFTR : Régulateur de conductance transmembranaire de la mucoviscidose

ciAP1/2 : Inhibiteurs cellulaires de la protéine apoptotique 1 et 2

CIITA : Protéine transactivatrice du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CINCA : Syndrome chronique, infantile, neurologique, cutané, articulaire

Cl⁻ : Ion chlorure

CLICs : Canaux de calcium intra-cellulaire

CLRs : Récepteurs de lectine de type C

CNTs : Transporteurs de concentration

COPs : Protéines à domaine CARD unique

COVID-19 : Maladie à coronavirus 2019

CSNK1A1 : Caséine kinase 1 alpha 1

CRAC : Canal calcique activé par la libération de calcium

CRC : Cancer colorectal

CRISPR : Répétitions palindromiques courtes groupées et régulièrement intercalées

CTD : Domaine C-terminal

CXCR2 : Récepteur 2 de la chimiokine à motif C-X-C

Cyt-c : Cytochrome c

D

DAG : Diacylglycérol

DAMPs : Motifs moléculaires associés aux dommages

DD : Domaine de mort

DDX3X : Hélicase 3 à DEAD-box liée à l'X

Diqua : Diquafosol tétrasodium

DRD1 : Récepteur D1 de la dopamine

dTGN : Réseau trans-Golgi dispersé

DUBs : Déubiquitinasés ou enzymes de déubiquitination

E

- E** : Protéine d'enveloppe du SARS-CoV-2
- E3s** : Protéines ligases d'ubiquitines E3 ou ubiquitinases
- ECL** : Boucle extra-cellulaire
- EGF** : Facteur de croissance épidermique
- EGFR** : Récepteur du facteur de croissance épidermique
- ENaC** : Canal de sodium épithélial
- ENTs** : Transporteurs de nucléosides d'équilibre
- EP4** : Récepteur 4 pour les prostanoïdes E
- ERK1** : Kinase régulée par un signal extracellulaire 1
- ERK2** : Kinase régulée par un signal extracellulaire 2

F

- F-actine** : Filaments d'actine ou actine filamenteuse
- FADD** : Protéine associée à FAS par un domaine de mort
- FBXL2** : Protéine 2 contenant une boîte F et une répétition riche en leucine
- FBXO3** : Protéine 3 contenant une boîte F
- FCAS** : Syndrome auto-inflammatoire familial lié au froid
- FISNA** : Domaine associé à NACHT spécifique aux poissons
- FMF** : Fièvres Méditerranéennes familiales
- FP** : Fibrose pulmonaire

G

- GBPs** : Protéines de liaison aux guanylates
- GDP** : Guanosine diphosphate
- GFR** : Récepteurs de facteurs de croissance
- GIRKs** : Canaux rectifiants le potassium entrant régulés par la protéine G
- GRKs** : Kinases régulatrices des récepteurs couplés aux protéines G
- GSDMs** : Gasdermines
- GSDMD** : Gasdermine-D
- GSTO1-1** : Glutathion S-transférase oméga-1
- GTP** : Guanosine-5'-triphosphate

H

- HCMV** : Cytomégalovirus humain
- HDAC6** : Histone déacétylase 6
- HET-E** : Protéine du locus d'incompatibilité de *Podospora anserina*
- HIN-200** : Domaine nucléaire inductible par l'IFN hématopoïétique avec un motif de 200 acides aminés
- hMDM** : Macrophages dérivés de monocytes humains
- HMGB1** : Protéine de la boîte 1 du groupe de haute mobilité
- HSP70** : Protéine de choc thermique 70
- HSP90** : Protéine de choc thermique 90
- HSV-1** : Virus Herpes simplexe de type 1

I

IDL : Lien inter-domaine
IFI16 : Protéine inductible par l'interféron gamma 16
IFIX : protéine inductible par l'interféron X
IFN : Interféron
IgG : Immunoglobuline
I κ B : Inhibiteur du facteur nucléaire kappa-B
IKK : Kinase de l'inhibiteur du facteur nucléaire kappa-B
IKK α : Sous-unité alpha de IKK
IKK β : Sous-unité beta de IKK
IKK ϵ : Sous-unité epsilon de IKK
IKKi : Kinase apparentée à IKK
IL : Interleukine
IL-1 β : Interleukine-1 β
IL-1R : Récepteur de l'IL-1
IL-18 : Interleukine-18
IL-18BP : Protéine de liaison à l'IL-18
IL-18R : récepteur à l'IL-18
IMs : Macrophages interstitiels
iNOS : Synthase inductible du monoxyde d'azote
IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate
IP3R : Récepteur de l'IP3
IRAK1 : Kinase 1 associée au récepteur de l'interleukine-1
IRAK4 : Kinase 4 associée au récepteur de l'interleukine-1

J

JNK1 : Kinase N-terminale c-Jun 1

K

K : Lysine
K⁺ : Ion potassium
kDa : Kilo Dalton

L

LDH : Lactate déshydrogénase
LGP2 : Protéine de laboratoire de génétique et de physiologie 2
LIMK1 : Kinase 1 à domaine LIM
LPS : Lipopolysaccharide
LRR : Répétitions riches en leucine
LS : Grande sous-unité p20 de la caspase-1
LUBAC : Complexe d'assemblage d'ubiquitination linéaire
Lymphocytes T : Lymphocytes du thymus

M

M : Protéine membranaire du SARS-CoV-2
M-CSF : Facteur de stimulation des colonies de macrophages
MA : Maladie d'Alzheimer

MAM : Membranes du RE associées aux mitochondries
MAPK : Protéine kinase activée par des agents mitogènes
MAPL : Protéine ligase ancrée à la mitochondrie
MARCH7 : Ligase E3 avec un doigt de type anneau-CH associé à la membrane 7
MAVS : Protéine de signalisation antivirale mitochondriale
MDA5 : Protéine associée à la différenciation du mélanome 5
MEC : Matrice extra-cellulaire
MEK1/2 : Kinases 1 et 2 des protéines MAPK
MERS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MHC I : Complexes majeurs d'histocompatibilité I
MHC II : Complexes majeurs d'histocompatibilité II
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
miR : Micro-ARN
MLC2 : Chaîne légère de la myosine 2
MLKL : Protéine pseudo-kinase à domaine kinase de lignée mixte
MNDA : Antigène de différenciation nucléaire des cellules myéloïdes
MPTs : Modifications post-traductionnelles
MSU : Urate monosodique
mtROS : ROS mitochondriales
MTOC : Centre d'organisation des microtubules
MTS : Séquence de ciblage mitochondrial
MWS : Syndrome de Muckle-Wells
MyD88 : Protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88

N

N : Nucléoprotéine du SARS-CoV-2
N-terminal : amino-terminal
Na⁺ : Ion sodium
NAIP : Protéine inhibitrice de l'apoptose
NACHT : domaine NAIP, CIITA, HET-E and TP1
NBD : Domaine de liaison aux nucléotides
NEK7 : Protéine kinase 7 apparentée à NIMA
NETs : Pièges extracellulaires des neutrophiles
NF-κB : Facteur nucléaire kappa B
NIMA : Gène A « jamais en mitose »
NINJ1 : Protéine ninjurine 1
NK : Cellule tueuse naturelle ou cellule *natural killer*
NKCC2 : Co-transporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻
NLRs : NOD-like récepteurs ou récepteurs de type NOD
NLRA : NLRs contenant un domaine AD
NLRB : NLRs contenant un domaine de répétition de la protéine BIR
NLRC : NLRs contenant un domaine CARD
NLRP : NLRs contenant un domaine pyrine
NLRP3 : NLR contenant un domaine pyrine 3
NLRX : NLRs contenant un autre domaine ou domaine X
NLS : Domaine de localisation nucléaire
NO : Monoxyde d'azote

NOD : Domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides
NOD1 : Protéine à domaine liant les nucléotides 1
NOD2 : Protéine à domaine liant les nucléotides 2
NOMID : Maladie inflammatoire multi-systémique d'apparition néonatale
NOX : Nicotinamide dinucléotide phosphate oxydases
NPPs : Pyrophosphatases/phosphodiesterases à nucléotides
NQO2 : Quinone oxydoréductase
NSP6 : Protéine non structurale 6
NTPDases : diphosphohydrolases à nucléosides triphosphates

O

OH : Groupe hydroxyle
ORF3a : Viroporine cadre ouvert de lecture 3a
ORF8b : Viroporine cadre ouvert de lecture 8b
OSCC : Carcinome épidermoïde buccal
ox-ADNmt : ADN mitochondrial oxydé

P

P1 : Récepteur purinergique 1 liant l'adénosine
P2Y2R : Récepteur P2Y2
P2XR : Récepteurs ionotropiques P2X
P2YR : Récepteurs métabotropiques P2Y
PAK : Kinase activée par p21
PAK1 : Kinase 1 activée par p21
PAMPs : Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PD : Maladie de Parkinson
PDAC : Adénocarcinomes canaux pancréatiques
PDGFR : Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGE2 : Prostaglandine E₂
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI4P : Phosphatidylinositol-4-phosphate
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PKD : Protéine kinase D
PKG : Protéine kinase G
PLA2 : Phospholipase A2
PLC : Phospholipase C
PLK4 : Kinase 4 de type polo
PMA : Acétate de myristate de phorbol
PMA-THP1 : macrophages dérivés de monocytes THP1 traités avec la PMA
PMV : Virus de la pneumonie murine
POPs : Protéines à domaine PYD unique
PP2A : Phosphatase 2A
PPADS : Acide pyridoxal phosphate-6-azophényl-2',4'-disulfonique
Protéine G : Protéine liant les nucléotides de guanine ou GTPase
PR : Polyarthrite rhumatoïde
PRRs : Récepteurs reconnaissant les motifs moléculaires

PTEN : Protéine homologue de la phosphatase et de la tensine

PTPN22 : Tyrosine phosphatase non réceptrice de type 22

PYD : Domaine pyrine

PYHIN : Protéine contenant les domaines PYD et HIN

PYK2 : Tyrosine kinase riche en proline 2

R

RacGEF : Facteur d'échange de la petite protéine G Rac

RacGTP : Protéine Rac liée au GTP

RACK1 : Récepteur 1 pour la protéine kinase C activée

RB-2 : Bleu réactif-2

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RdRp : ARN-polymérase ARN-dépendante

RE : Réticulum endoplasmique

RGD : Domaine de liaison constitué de 3 acides aminés (arginine, glycine et acide aspartique)

Rho : Protéine homologue de Ras

RhoA : Membre A de la famille des homologues de Ras

RhoGTPase : Rho guanosine triphosphatase

RIG-I : Gène I inductible à l'acide rétinoïque

RIPK : Sérine/thréonine kinase interagissant avec les récepteurs

RLRs : Récepteurs semblables à RIG-I

RNF125 : Protéine 125 contenant un domaine RING finger

ROCK : Kinase associée à Rho

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

S

S : Protéine Spike du SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 : Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

SCAP : Protéine d'activation du clivage de SREBP

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

SGT1 : Suppresseur de l'allèle G2 de SKP1

SH3 : Domaines de liaison d'homologie 3 à Src

SKP1 : Protéine 1 associée à la kinase de la phase S

SLE : Lupus érythémateux systémique

SNC : Système nerveux central

SNP : Polymorphisme mononucléotidique

SPH : Petite protéine partenaire hétérotrimérique

SQSTM1 : Séquestosome 1

Src : Protéine tyrosine kinase proto-oncogène

SREBP2 : Protéine de liaison de l'élément régulateur des stérols-2

SS : Petite sous-unité p10 de la caspase-1

STING : Protéine stimulatrice des gènes de l'IFN

Syk : Tyrosine kinase associée à la rate

T

T : Thréonine

TAK1 : Kinase 1 activée par le TGF- β

TANK : Activateur de NF- κ B associé à un membre de la famille TRAF
TBK1 : Kinase 1 liant TANK
TGF- β : Facteur de croissance transformant bêta
TGN : Réseau trans-Golgi
TGR5 : Récepteur 5 Takeda couplé aux protéines G
Th1 : Lymphocytes T helper 1
Th17 : Lymphocytes T helper 17
TLRs : Récepteurs Toll-like
TM : Domaine transmembraire
TMPRSS2 : Protéase transmembranaire sérine 2
TNF : Facteur de nécrose tumorale
TNFR : Récepteur au TNF
TP1 : Protéine associée à la télomérase 1
TRAF : Facteur associé au récepteur du TNF
TRAF3 : Facteur 3 associé au récepteur du TNF
TRAF6 : Facteur 6 associé au récepteur du TNF
TRIF : Protéine adaptatrice à domaine TIR induisant l'IFN β
TRIM : Protéines contenant un motif tripartite
TrkA : Récepteur de la tyrosine kinase A
TRPC : Canal à potentiel de récepteur transitoire
TTP : Protéine tristetrapoline liant les ARN
TWIK2 : Canal K⁺ à deux pores à faible redressement interne 2
TXNIP : Protéine interagissant avec la thiorédoxine

U

UDP : Uridine diphosphate
Up4U : Diuridine-tétraphosphate
USP : Peptidase spécifique de l'ubiquitine
UTP : Uridine triphosphate
UTP γ S : UTP γ -thiophosphates
UV : Rayonnement ultra-violet

V

VCAM-1 : Molécule d'adhésion des cellules endothéliales vasculaires-1
VDAC : Canal anionique dépendant du voltage
VEGFR : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH : Virus de l'immunodéficiência humaine 1

Y

Y : Tyrosine

Introduction

1 Les inflammasomes

1.1 Les généralités sur les inflammasomes

Les inflammasomes représentent de puissants régulateurs cellulaires de l'immunité innée, jouant un rôle central dans la reconnaissance de dangers imminents et la mise en place d'une réponse de protection [1,2]. Deux décennies après la découverte des inflammasomes par F. Martinon et al. [3], les connaissances sur cette première ligne de défense sont aujourd'hui très vastes et décrivent des complexes macromoléculaires multiprotéiques qui surveillent le milieu intra-cellulaire. Ils correspondent à des plateformes de signalisation qui s'assemblent en réponse à un stress cellulaire ou à une infection microbienne, aussi bien dans les cellules immunitaires que non-immunitaires. Les inflammasomes se caractérisent alors par l'activation d'une protéase inflammatoire, la caspase, et se distinguent en deux familles : les inflammasomes canoniques, activant la caspase-1, et les inflammasomes non canoniques, activant les caspases 4 ou 5 chez l'Homme, et la caspase 11 chez les rongeurs [2,4]. Leur activation conduit à de nombreuses réponses immunitaires incluant la libération de molécules inflammatoires, telles que les cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β) et interleukine-18 (IL-18), la mort de la cellule dans un contexte hyper-inflammatoire, appelée pyroptose, ainsi que l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative [5–7].

1.1.1 La composition des inflammasomes canoniques

Les inflammasomes canoniques s'apparentent à des plateformes moléculaires d'environ 700 kDa constituées de plusieurs protéines comprenant un **récepteur** cytosolique – aussi appelé senseur –, un **adaptateur**, la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*) et un **effecteur**, la cystéine protéase procaspase-1 [8].

1.1.1.1 Les récepteurs cytoplasmiques engagés dans les inflammasomes

La réponse immunitaire innée fait intervenir un nombre limité de récepteurs cellulaires capables de reconnaître des signaux de danger spécifiques associés à des motifs moléculaires (PRRs, *pattern recognition receptors*) [9]. Les structures moléculaires qu'ils détectent peuvent être soit d'origine endogène et exprimées par exemple à la surface de cellules endommagées, nommés motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*), soit d'origine exogène, provenant d'espèces pathogènes (PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*) ou non pathogènes [9,10].

À ce jour, 5 groupes de PRRs ont été décrits chez l'Homme selon leurs différences fonctionnelles : les récepteurs Toll-like (**TLRs**), les récepteurs à domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NOD) et à répétitions riches en leucine (LRR) (NOD-like récepteurs ou **NLRs**), les récepteurs semblables au gène I inducible à l'acide rétinoïque (RIG-I) (**RLRs**), les récepteurs de lectine de type C (**CLRs**) et les récepteurs de type absent dans le mélanome-2 (AIM2) (**ALRs**) [9]. Les TLRs et les CLRs étant localisés à la surface cellulaire ou internalisés, ils détectent les signaux de danger extra-cellulaires et dans les endosomes ; alors que les

récepteurs cytosoliques NLRs, RLRs et ALRs surveillent leur présence au sein du cytoplasme cellulaire (**Figure 1**).

Seuls certains PRRs cytoplasmiques participent à la formation d'un inflammasome, parmi lesquels des membres de la famille des NLRs, des ALRs, et des RLRs [8,11]. Deux PRRs supplémentaires appartenant aussi à cette catégorie, la pyrine et la protéine 8 contenant le domaine de recrutement des caspases (CARD8), ont été récemment caractérisés (**Figure 1**) [12,13]. Lorsqu'ils sont engagés dans un inflammasome, ces récepteurs sont activés par leurs ligands respectifs (**Table 1**) et constituent une plateforme de nucléation pour la pro-caspase-1, indépendamment ou pas d'une première étape de nucléation des filaments de la protéine adaptatrice ASC [14,15].

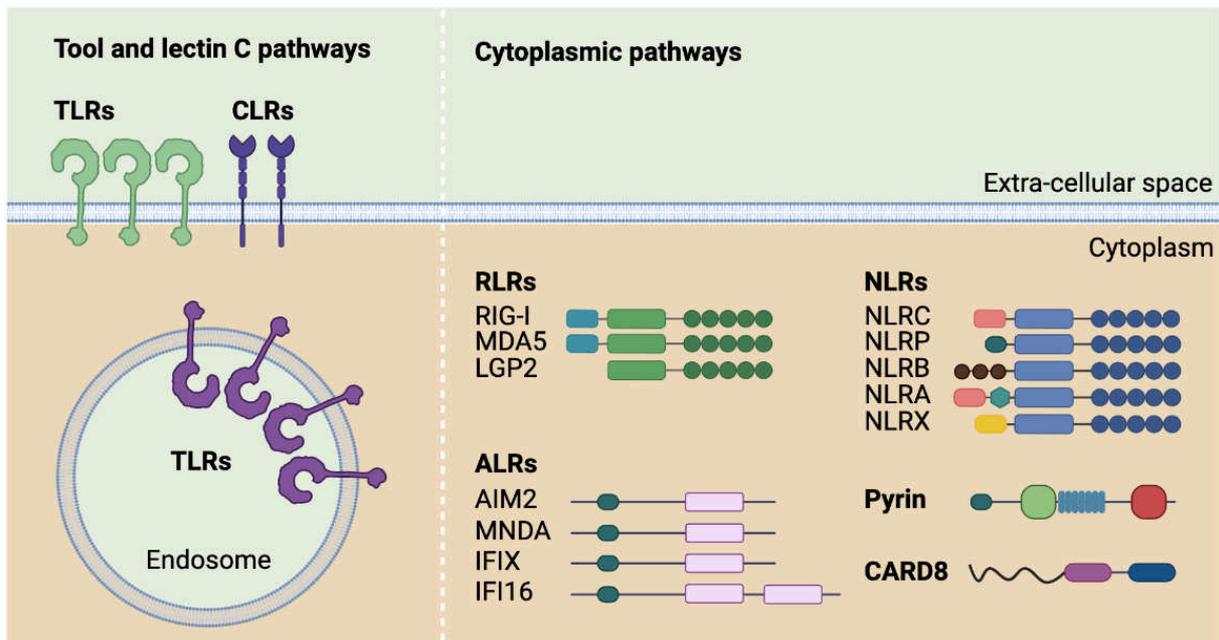


Figure 1. Les récepteurs de reconnaissance aux signaux de danger (PRRs). Les récepteurs Toll-like sont localisés dans les membranes cellulaires et endosomales. Les récepteurs de lectine de type C (CLRs) sont localisés à la membrane cellulaire. Les récepteurs RLRs, NLRs, ALRs et la pyrine sont localisés dans le cytoplasme. RLRs : Récepteurs semblables au gène I inducible à l'acide rétinoïque (RIG-I) ; NLRs : récepteurs à domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides et à répétitions riches en leucine ; ALRs : récepteurs de type absent dans le mélanome-2 (AIM2). Créée sur BioRender.com

Inflammasomes	Stimulus
Inflammasomes canoniques	
NLRP1	Toxine léthale de l'anthrax, muramyl dipeptide, déplétion d'ATP intra-cellulaire, inhibiteurs des protéases DPP8/9, ARN double brin, UVB, protéases virales
NLRP2	?
NLRP3	PAMPs (toxines formant des pores, toxines activant RhoA, protéine M2, cristaux d'urate, cristaux de silice, sels d'aluminium, cristaux de cholestérol, ADN, ARN, céramides, hémocoïne, etc.) ; DAMPs (ATP extracellulaire via P2X7, dérivés réactifs de l'oxygène, calcium intra-cellulaire, cAMP, certains acides gras, acide hyaluronique, protéine β -amyloïde, rupture lysosomale, hyperglycémie, polypeptide amyloïde des îlots de Langerhans, etc.) ; Facteurs environnementaux (ultra-violets (UV), irritants de la peau, fibres d'amiante, etc.)
NLRP6	?
NLRP7	Lipopeptide bactérien
NLRP9	ARN viral double brin
NLRP12	Motif inconnu de <i>Yersinia pestis</i>
NAIP/NLRC4	Flagelline bactérienne, systèmes de sécrétion de type 3 et 4
NLRC5	PAMPs de bactéries, cristaux activant NLRP3, IFN γ / β
AIM2	ADN bactérien, viral et ADN mitochondrial endogène
IFI16	ADN viral nucléaire
RIG-1	ARN viral
Pyrine	Rho GTPase inactivée par des toxines bactériennes
CARD8	Protéase du VIH-1, inhibiteurs des protéases DPP8/9
Inflammasomes non-canoniques	
Caspase-4/5	LPS, bactéries à gram-négatif
Caspase-8	LPS

Table 1. Les principaux activateurs des inflammasomes humains.

À ce jour, la littérature fait état de 14 inflammasomes canoniques et 2 inflammasomes non canoniques chez l'Homme. Chacun est activé par ses propres ligands et participe à la défense de l'hôte contre les pathogènes, les perturbations endogènes et les substances environnementales nocives.

1.1.1.1.1 Les récepteurs NOD-like (NLRs)

1.1.1.1.1.1 Les généralités sur les récepteurs NLRs

Depuis la découverte de la protéine à domaine liant les nucléotides 1 (NOD1), le premier membre de la famille des récepteurs à domaine NOD, en 1999, les connaissances sur la famille des récepteurs NLRs ont largement augmenté ces dernières années. On dénombre à ce jour 22 gènes NLRs dans le génome humain, codant pour autant de protéines, et 34 gènes chez la souris.

Les protéines NLRs se caractérisent par une structure comportant 3 domaines principaux. Le domaine effecteur amino-terminal (N-terminal) supporte les interactions protéiques. Le domaine intermédiaire NACHT (*NAIP*, *CIITA*, *HET-E* and *TP1*), aussi appelé domaine NOD ou NBD, possède une activité adénosine triphosphatase (ATPase) et contrôle son oligomérisation. Enfin le domaine carboxy-terminal (C-terminal) au niveau duquel les NLRs portent de multiples répétitions riches en leucine (LRR) qui sont impliquées dans la détection des ligands et les interactions protéiques [10,16,17]. Selon la nature de leur domaine N-terminal, les récepteurs

NOD-like sont répartis parmi les 5 sous-familles suivantes : les récepteurs NLRs contenant un domaine de recrutement de caspases -CARD- (**NLRC**), les récepteurs NLRs contenant un domaine pyrine -PYD- (**NLRP**), les récepteurs NLRs contenant un domaine transactivateur acide -AD- (**NLRA**), les récepteurs NLRs contenant un domaine de répétition de la protéine inhibitrice de l'apoptose du baculovirus -BIR- (**NLRB**) et les récepteurs NLRs contenant un autre domaine (**NLRX**) (**Figure 2**) [16,18]. Parmi les trois récepteurs appartenant à la sous-famille NLRX, NLRC3 et NLRC5 contiennent un domaine de mort (DD) qui présente quelques similarités avec le domaine CARD trouvé dans les autres NLRC [19,20]. A contrario, le récepteur NLRX1 possède un domaine N-terminal mal caractérisé mais tout à fait particulier car c'est le seul NLR pour lequel une séquence de ciblage mitochondrial (MTS) a été identifiée [21]. La sous-famille NLRC compte trois membres : les protéines NOD1 et NOD2 ainsi que la protéine NLRC4. La sous-famille NLRP en compte 14 (NLRP1-14). La sous-famille NLRA contient seulement un membre, la protéine transactivatrice du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II -CMHII- (CIITA). Enfin, la protéine inhibitrice de l'apoptose (NAIP) est le seul membre appartenant à la sous-famille NLRB chez l'Homme.

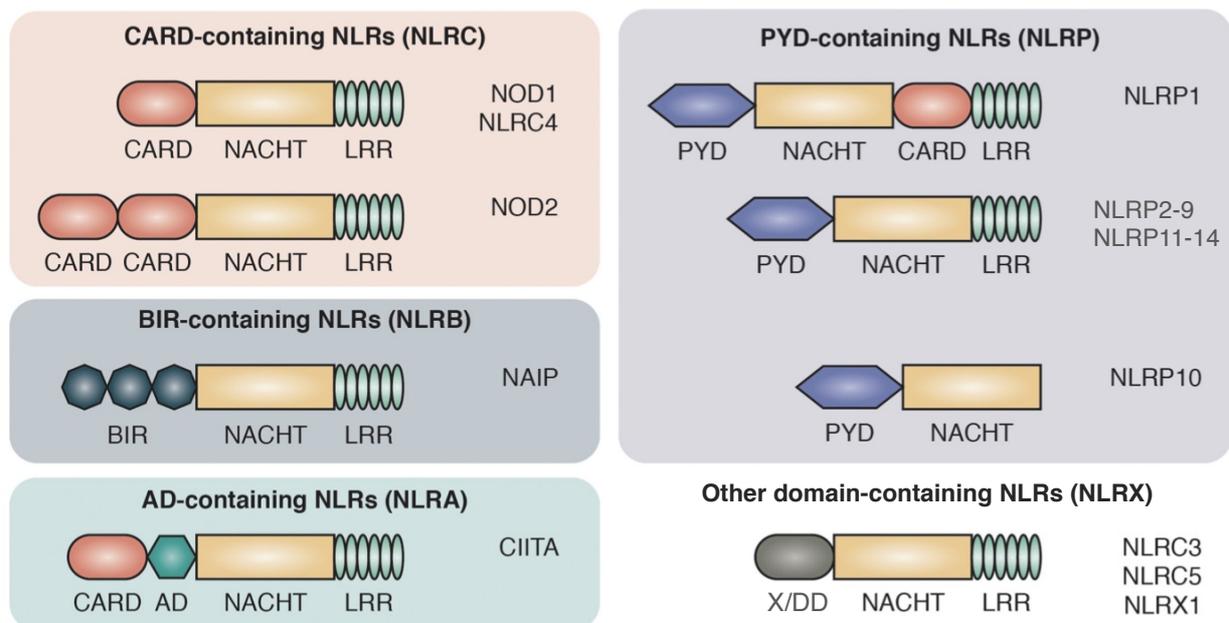


Figure 2. La structure des récepteurs NLRs chez l'Homme. Les récepteurs NOD-like sont composés d'un domaine C-terminal de répétitions riche en leucine (LRR), d'un domaine intermédiaire de liaison aux nucléotides (NACHT), et d'un domaine N-terminal effecteur variable permettant la liaison avec d'autres protéines. NLRC : récepteurs contenant un ou deux domaines de recrutement de caspase (CARD) ; NLRB : récepteurs contenant de multiples répétitions de la protéine d'inhibition de l'apoptose du baculovirus (BIR) ; NLRA : récepteurs contenant au moins un domaine transactivateur acide (AD) ; NLRP : récepteurs contenant un domaine pyrine (PYD) ; NLRX : récepteurs contenant un autre domaine (X) ou un domaine de mort (DD) différent des domaines PYD et CARD. Adaptée de (Heim, Stafford, and Nachbur 2019).

1.1.1.1.2 Les fonctions des récepteurs NLRs

Les NLRs sont des récepteurs de l'immunité innée connus initialement pour répondre aux pathogènes intracellulaires et aux molécules endogènes produites par exemple par les cellules endommagées. Plus récemment, il a été décrit qu'ils pouvaient aussi jouer un rôle dans d'autres processus biologiques, comme la mort cellulaire ou la modulation de la présentation d'antigène [22].

Ils fonctionnent pour la plupart en reconnaissant une grande variété de ligands provenant de pathogènes (comme le peptidoglycan, les acides nucléiques, la flagelline, etc.), des cellules de l'hôte (adénosine 5'-triphosphate (ATP), cristaux d'acide urique, espèces réactives de l'oxygène (ROS), etc.) et de sources environnementales (ultra-violet (UVs), aluminium, etc.). De cette façon, les NLRs sont impliqués dans une multitude de voies de signalisation dont les fonctions peuvent être divisées en 4 catégories : les NLRs formant des inflammasomes, les NLRs impliqués dans la transduction de signaux, ceux impliqués dans l'activation transcriptionnelle et enfin ceux impliqués dans l'autophagie (**Figure 3**) [10,17,22].

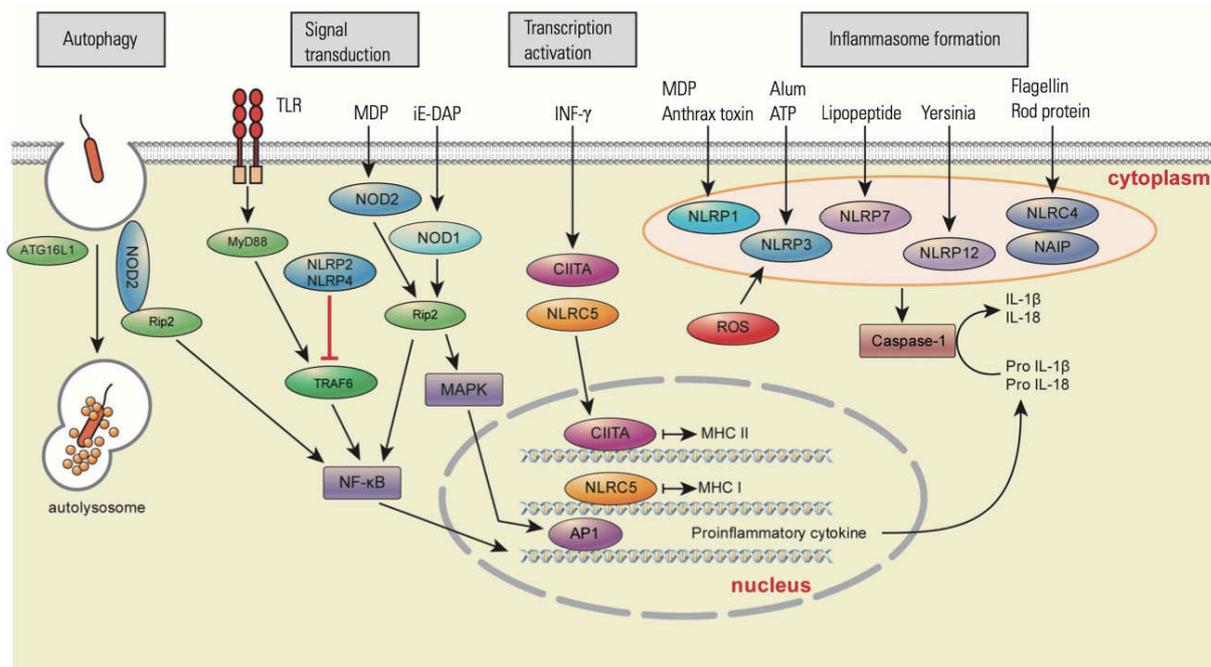


Figure 3. Les fonctions des NLRs. Les récepteurs NLRs sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont les principales sont l'autophagie, la transduction de signalisation, l'activation transcriptionnelle des MHC I et MHC II et la formation d'inflammasomes (Y. K. Kim, J-S Shin and Moon H. Nahm 2016).

NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP5, NLRP6, NLRP7, NLRP9 et NAIP sont chacun capables de former un complexe inflammasome, menant à l'activation de la pro-caspase-1 en caspase-1 effectrice. Les NLRs détectent un large spectre de ligands incluant des PAMPs et DAMPs comme l'ATP, les ROS, l'acide hyaluronique, les rayonnements ultraviolets, certains virus pour NLRP3 ; la flagelline pour NAIP et NLRP4 ; les lipopeptides pour NLRP7 ; des toxines bactériennes pour NLRP1, des acides désoxyribonucléiques (ADN) et ribonucléiques (ARN) viraux pour NLRP5 (**Table 1**). La reconnaissance du domaine LRR du NLR par son ligand induit

son activation en passant d'une conformation repliée d'auto-inhibition à une conformation dépliée active [9]. Leur domaine d'oligomérisation favorise quant à lui la formation de dimères ou d'oligomères en fixant des nucléotides. Ils recrutent ensuite directement ou indirectement le prodomaine de la caspase-1 initiateur à l'aide de leur domaine de recrutement par le biais d'interactions homotypiques entre les plis amino-terminaux des NLRs et ceux présents dans la protéine adaptatrice ASC ou directement avec la pro-caspase-1 [19].

Le NLR le plus étudié, NLRP3, ne lie pas la plupart de ses activateurs et son activation se fait donc de façon indirecte. Il agit plutôt comme un senseur de stress cytosolique et membranaire au travers de la détection d'altérations cellulaires induites par des PAMPs ou des DAMPs [7]. Ce sont alors des modifications protéiques en réponse à ces stress, notamment post-traductionnelles, qui induisent l'activation du récepteur NLRP3 [15].

Les récepteurs NAIP et NLRC4 forment un seul et même inflammasome NAIP/NLRC4 en interagissant directement. La protéine NAIP se comporte alors comme un NLR capable de reconnaître un ligand. Une fois activé, NAIP recrute et active une protéine NLRC4, permettant l'oligomérisation avec plusieurs NLRC4 et le recrutement direct de la procaspase-1 par le domaine CARD de NLRC4. De cette façon, la protéine NLRC4 joue le rôle de protéine adaptatrice [23,24].

Les NLRs sont aussi impliqués dans la transduction de signaux, régulant de cette façon de nombreuses voies de signalisation immunitaires telles que la voie de signalisation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et celle des MAP-kinases [16,25,26]. Une autre fonction primordiale à laquelle les NLRs participent est la régulation positive de l'expression transcriptionnelle des complexes majeurs d'histocompatibilité I (MHC I) et II (MHC II) dans les différentes populations de cellules présentatrices d'antigènes (APCs). Par cette fonction, les protéines CIITA et NLRC5 jouent un rôle crucial dans la modulation de la présentation d'antigènes et donc dans la réponse immunitaire adaptative. Enfin, plusieurs membres de la famille des NLRs participent au maintien de l'homéostasie cellulaire en régulant l'autophagie, un mécanisme d'auto-digestion de certains compartiments cellulaires, ou encore la xénophagie, une voie de signalisation autophagique qui cible spécifiquement les virus et bactéries intracellulaires permettant leur élimination [17,21].

En plus des fonctions évoquées, les NLRs semblent avoir d'autres rôles, notamment dans l'apoptose, et dans le développement embryonnaire. La dérégulation de ces récepteurs se retrouvent alors impliqués dans de nombreuses pathologies comme des maladies inflammatoires dont des maladies auto-immunitaires, mais aussi en cas d'infection, ou encore de cancers [22,26].

1.1.1.1.2 Les récepteurs de type AIM2 (ALRs)

Les récepteurs de type AIM2 (ALRs) ont été initialement découverts chez l'Homme en 1986 dans les cellules myéloïdes [27]. Chez la souris, 13 membres ont été identifiés alors que l'Homme n'en comporte que 4 : la protéine 2 absente dans le mélanome (**AIM2**), l'antigène de différenciation nucléaire des cellules myéloïdes (**MNDA**), la protéine inductible par l'interféron X (**IFIX**, aussi appelée PYHIN1) et la protéine inductible par l'interféron gamma 16 (**IFI16**) [28]. La structure des ALRs est très semblable entre eux puisque chacun contient un domaine pyrine (PYD) à leur extrémité N-terminale et une ou deux copies du domaine de liaison à l'ADN HIN-200 (*hematopoietic interferon-inducible nuclear domain with a 200 amino acid signature motif*) à leur extrémité C-terminale. Lorsque ces deux domaines sont présents ensembles sur la même

protéine, ils sont appelés domaine PYHIN, permettant l'appellation protéines PYHIN pour les récepteurs ALRs. Le domaine de mort PYD peut interagir de façon homotypique avec d'autres protéines contenant ce même domaine et facilite ainsi le recrutement de protéines pour la formation de complexes plus grands, notamment les inflammasomes [28–30]. Le domaine HIN-200, quant à lui, assure la reconnaissance d'ADN double brin, le ligand des ALRs. C'est à travers une interaction électrostatique entre les résidus de ce domaine chargés positivement et l'ADN chargé négativement que la liaison se fait. Selon la séquence de ce domaine, 3 sous-types ont été caractérisés : HIN A, HIN B et HIN C. Les récepteurs AIM2, MNDA et IFIX contiennent chacun un seul domaine HIN-200 alors que le récepteur IFI16 en contient deux (**Figure 4**) [28–30]. À l'exception de la protéine AIM2, les ALRs possèdent un domaine de localisation nucléaire (NLS), ils sont alors majoritairement localisés dans le noyau et peuvent ainsi détecter de l'ADN dans le noyau en plus du cytoplasme [28].

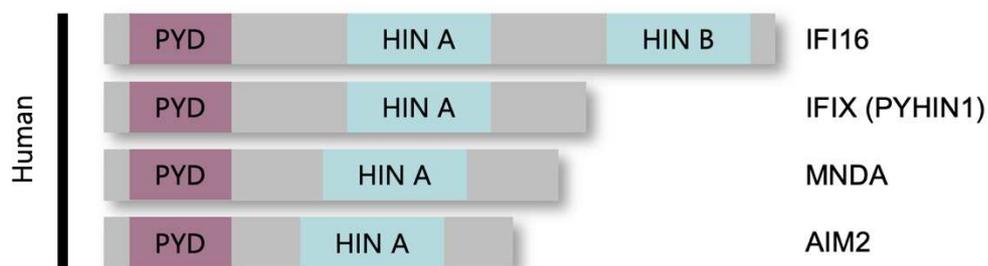


Figure 4. La structure des récepteurs ALRs humains. La famille des récepteurs AIM2-like humains comporte 4 membres : IFI16, IFIX (ou PYHIN1), MNDA et AIM2. Les protéines PYHIN partagent un domaine pyrine (PYD) N-terminal et un ou deux domaines HIN-200, dont 3 sous-types sont connus (HIN A, HIN B et HIN C) selon leur séquence. Adaptée de (Stefan A. Schattgen et Katherine A. Fitzgerald 2011).

À ce jour, les connaissances sur les récepteurs AIM2-like mettent en évidence leur rôle à la fois dans la réponse immunitaire innée et dans le développement tumoral.

Dans un premier temps, les protéines PYHIN ont été décrites comme des protéines inductibles par l'interféron, capables de moduler le cycle cellulaire et l'apoptose. De ce fait, les ALRs agissent comme suppresseur tumoral en inhibant la prolifération et la survie cellulaire [9,31,32]. C'est le cas par exemple du récepteur AIM2, dont l'expression dans les cellules de glioblastome contrôle la prolifération tumorale, conférant une sensibilité accrue aux thérapies [31].

C'est seulement dans un deuxième temps que le lien entre immunité innée et ALRs a été fait, identifiant les ALRs comme des PRRs sensibles à l'ADN double brin intra-cellulaire pathogène, détectant aussi bien la présence de virus que de bactéries. D'une part, les récepteurs AIM2 et IFI16 ont été décrits comme des inducteurs d'inflammasome suite à la détection de leur ligand dans le cytoplasme et dans le noyau, respectivement. La liaison directe de leur domaine HIN-200 avec de l'ADN double brin permet le passage d'une conformation inactive à active, déclenchant le recrutement de la protéine adaptatrice ASC [28]. Le récepteur AIM2 a également été identifié comme un senseur d'ADN mitochondrial [33,34]. D'autre part, les récepteurs IFIX et MNDA qui ne sont pas capables de former des inflammasomes mais participent aussi à la réponse immunitaire anti-virale et anti-bactérienne par la détection d'ADN principalement dans le noyau. La dérégulation de ces protéines peut alors mener à des susceptibilités pour le

développement de certaines pathologies comme des cancers, des infections, et des maladies inflammatoires [28,35].

1.1.1.1.3 Les récepteurs RIG-I-like (RLRs)

Les récepteurs RIG-I-like (RLRs) sont des senseurs d'ARN localisés dans le cytoplasme dont la famille comporte 3 membres : protéine codée par le gène I inductible à l'acide rétinoïque (**RIG-I**), protéine 5 associée à la différenciation du mélanome (**MDA5**) et la protéine de laboratoire de génétique et de physiologie 2 (**LGP2**) [36]. Leur structure est composée de 3 parties dont les deux suivantes sont partagées par les 3 récepteurs : le domaine C-terminal (CTD), responsable de la reconnaissance d'ARN, et le domaine central hélicase qui porte les activités ATPase et hélicase, permettant lui aussi de lier l'ARN avec le CTD. Seuls les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent une extrémité N-terminale constituée de deux domaines successifs de recrutement et d'activation de caspase (CARD). C'est notamment par leur domaine CARD qu'ils peuvent interagir avec une protéine adaptatrice, la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS), essentielle à la transmission du signal [9,36].

Les RLRs jouent un rôle primordial dans la défense de l'hôte contre une infection virale. En effet, ils sont capables de reconnaître les ARN intra-cytoplasmiques de l'ensemble des différentes familles de virus. Ils déclenchent alors une cascade de signalisation menant à la transcription d'interféron de type I ainsi que d'autres facteurs inflammatoires et anti-viraux pour déclencher une réponse anti-virale. De plus, la voie de signalisation NF- κ B peut aussi être induite par les récepteurs RLRs [36]. Les connaissances actuelles suggèrent que le récepteur LGP2 se comporterait comme un régulateur des deux autres RLRs, capable d'inhiber la réponse anti-virale médiée par RIG-I mais, à l'inverse, il favoriserait celle médiée par MDA5 par diverses mécanismes d'action [1,9]. En 2009, H. Poeck et al. ont mis en évidence la capacité du récepteur RIG-I à former un inflammasome canonique en réponse à certains virus, comme le virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Il serait le seul RLR capable d'interagir avec la protéine adaptatrice ASC de façon homotypique par son domaine CARD, conduisant au recrutement et à l'activation de la caspase-1 [37].

Étant donné le rôle critique des RLRs dans les réponses anti-virales et la modulation de la réponse immunitaire innée, leur dérégulation peut donner lieu à des infections non résolues ou à des excès d'inflammation [38].

1.1.1.1.4 La pyrine

La pyrine est une protéine qui détecte les protéines de l'hôte lorsqu'elles sont modifiées par un agent pathogène. Il s'agit d'une protéine d'environ 90 kDa, codée par le gène *MEFV* chez l'Homme, que l'on retrouve principalement exprimée dans les cellules du système immunitaire inné tels que les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques [39]. La pyrine présente une structure contenant 4 domaines fonctionnels. Le domaine pyrine (PYD) à son extrémité N-terminale permet une interaction homotypique avec la protéine adaptatrice ASC. Le domaine en doigts de zinc (Bbox) ainsi que le domaine de superhélices α (ou CC pour *coiled-coil*) participent à l'oligomérisation de la pyrine mais aussi à son interaction avec une protéine du cytosquelette. Enfin, le domaine C-terminal B30.2 pourrait lier directement la caspase-1 mais cela reste à confirmer [39,40]. La pyrine partage les domaines Bbox, CC et B30.2 avec les protéines de la famille TRIM (*tripartite motif*), mais pas le domaine en anneau caractéristique

de ces protéines, elle appartient donc à cette famille sous le nom de « protéine TRIM incomplète » [39,41].

En 1998, la pyrine est identifiée pour la première fois et décrite comme étant la protéine associée aux fièvres Méditerranéennes familiales (FMF), une maladie auto-inflammatoire [42]. Elle appartient au groupe des PRRs cytosoliques et contrôle les réponses immunitaires innées en réponse à la détection de modifications inactivatrices de protéines de l'hôte par des toxines bactériennes, spécifiquement la protéine homologue de Ras (Rho) guanosine triphosphatase (GTP) (RhoGTPase).

Ce n'est que récemment que la pyrine a été caractérisée comme un récepteur formant un inflammasome. Son activation déclenche en effet le recrutement de la protéine adaptatrice ASC et l'activation de la caspase-1 [43,44]. Mais contrairement aux autres PRRs qui engagent un inflammasome, la pyrine n'interagit pas avec un ligand pathogène ni même avec la protéine RhoGTPase modifiée. Plusieurs publications démontrent que l'inactivation de la RhoGTPase induit une inhibition de la phosphorylation de la pyrine, permettant de passer d'un état inactif à un état actif, capable de former un inflammasome [45,46]. La pyrine joue donc un rôle dans plusieurs maladies inflammatoires dont la FMF comme évoqué précédemment, dans laquelle le domaine C-terminal B30.2 a une importance particulière puisque la plupart des mutations associées au développement de cette pathologie sont retrouvées dans ce domaine [39].

1.1.1.1.5 Le récepteur CARD8

La protéine 8 contenant le domaine de recrutement des caspases (CARD8) est codée par le gène *CARD8* et retrouvée dans le cytosol et le noyau des cellules qui l'expriment, à savoir les cellules hématopoïétiques dont les lymphocytes T et B, les cellules NK (*natural killer*) et les macrophages [47]. Il s'agit d'un membre tout à fait particulier des PRRs de par sa structure protéique et des fonctions qui en découlent. Elle est d'abord composée d'une longue queue N-terminale contenant les sites de reconnaissance des PAMPs, suivie d'un domaine N-terminal FIIND (*Function-to-Find*) puis d'un domaine CARD à son extrémité C-terminale. C'est par son domaine FIIND que CARD8 se distingue des autres PRRs car elle est la seule protéine à le contenir avec le récepteur NLRP1 et qu'il leur confère un mode d'activation unique. En effet, leur activation fonctionnelle nécessite un auto-clivage protéolytique au niveau du domaine FIIND qui entraîne la formation des fragments N-terminal et C-terminal reliés entre eux de façon non covalente. Suite à la reconnaissance de son ligand, le fragment N-terminal est adressé au protéasome pour y être dégradé (par la voie appelée *N-end-rule*). La rupture de la chaîne polypeptidique dans le domaine FIIND est essentielle puisqu'elle empêche la dégradation concomitante du fragment C-terminal. Ce dernier est alors libéré, permettant l'exposition du domaine CARD et constitue la forme active de CARD8 (**Figure 5**) [47–49].

Une des principales fonctions de la protéine CARD8 est de former un inflammasome. Ce n'est que récemment que des études ont mis en évidence sa capacité à induire une signalisation de type inflammasome. Ainsi, elle induit l'activation de la caspase-1, entraînant la sécrétion d'IL-1 β et la mort cellulaire par pyroptose (**Figure 5**) [13]. L'inflammasome CARD8 représente néanmoins une exception car il est le seul à ne pas nécessiter d'adaptateur puisque la protéine CARD8 joue le double rôle de récepteur de PAMPs ainsi que d'activateur de la caspase-1. Wang et al. ont identifié pour la première fois en 2021 le ligand détecté par CARD8, une protéase du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), qui induit son activation puis la formation de

l'inflammasome CARD8 [48]. Plus précisément, la protéase du VIH clive CARD8 au niveau de la queue N-terminale, générant une extrémité appelée néo-N-terminale qui sera ensuite adressée au protéasome. La dégradation du fragment N-terminal permet le relargage du fragment C-terminal, l'oligomérisation des formes actives de CARD8 par interactions homotypiques, entraînant l'exposition des domaines CARD. La plateforme ainsi créée recrute et active la pro-caspase-1 (**Figure 5**) [47,48].

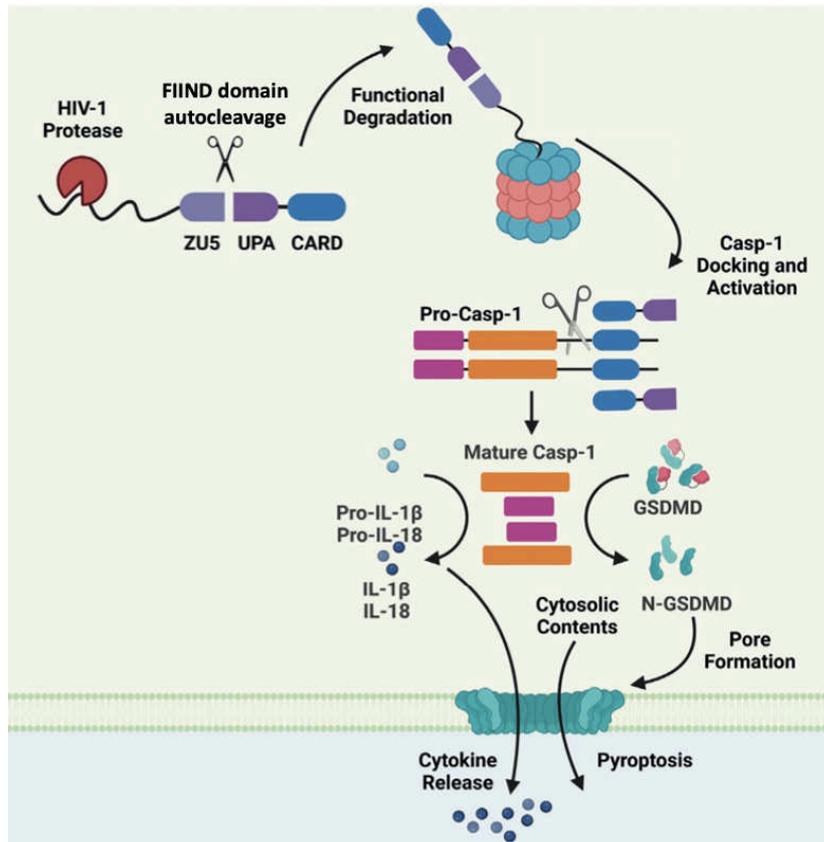


Figure 5. Mécanismes d'activation de l'inflammasome CARD8 par la protéase du VIH-1. Après clivage de la queue N-terminale par la protéase du VIH-1, la protéine CARD8 est adressée au protéasome où son fragment N-terminal sera dégradé entraînant la libération et l'activation de la forme active de CARD8, le fragment C-terminal. Elle est alors capable de s'oligomériser pour recruter et activer la caspase-1 qui pourra à son tour induire la libération de l'IL-1 β et l'IL-18 ainsi que déclencher la pyroptose. Adaptée de (K. M. Clark et al. 2023).

Par ailleurs, la protéine CARD8 avait été initialement caractérisée en 2001 par Pathan et al. qui suggéraient qu'elle pourrait agir comme un inhibiteur de la caspase-9 [50]. Néanmoins, aucune autre étude n'a confirmé cette hypothèse. Depuis, d'autres fonctions indépendantes de la formation d'inflammasomes ont été identifiées, telles que l'inhibition de l'activation de NF- κ B, l'inhibition de l'inflammasome NOD2 en empêchant son oligomérisation, ou encore la régulation de l'inflammasome NLRP3 à travers son interaction avec le récepteur NLRP3. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus par différentes équipes, ne permettant pas à ce jour de statuer quant au rôle répresseur ou activateur de CARD8 sur l'inflammasome NLRP3 [47].

1.1.1.2 La protéine adaptatrice ASC

1.1.1.2.1 Les généralités sur la protéine ASC

La protéine ponctiforme associée à l'apoptose contenant un domaine CARD (ASC) a d'abord été découverte dans les cellules de leucémie promyélocytaire apoptotiques. ASC est une

protéine de 22 kDa, codée par le gène *PYCARD* et contenant le domaine PYD à son extrémité N-terminale relié à un domaine CARD C-terminal [51]. Elle est exprimée dans de nombreux tissus humains dont la rate, les poumons, le tube digestif, la peau, la moelle osseuse, le thymus et à de faibles taux dans le cerveau et le cœur. La protéine ASC est aussi retrouvée dans les leucocytes du sang périphérique et est exprimée de façon constitutive par la plupart des cellules immunitaires, notamment dans la lignée myéloïde où elle est détectée à des taux très élevés [51,52]. Sa localisation subcellulaire sous forme inactive reste aujourd'hui encore largement discutée. La littérature fait état d'une distribution soit dans le cytosol et dans certains compartiments cellulaires [53,54], soit dans le noyau [55]. Dans les cellules, c'est sous la forme de monomères solubles que ASC est présente à l'état inactif alors qu'elle participe à la formation d'agrégats multiprotéiques insolubles lorsqu'elle est active [52].

1.1.1.2.2 Les fonctions de la protéines ASC

La protéine ASC est impliquée dans des fonctions cellulaires très variées, que nous pouvons classer en deux groupes distincts : les fonctions indépendantes d'un inflammasome et sa fonction de protéine adaptatrice nécessaire à la transduction du signal inflammasome.

La protéine ASC a d'abord été décrite en 1999 comme étant une protéine pro-apoptotique, et de multiples autres fonctions ont depuis été caractérisées. Par son rôle clé dans la régulation de la mort cellulaire mais aussi dans l'inflammation, on la retrouve impliquée dans le développement de nombreux cancers. Ses fonctions sont alors dépendantes du type cellulaire dans lequel ASC est exprimée et peut être décrite à la fois comme un suppresseur tumoral (dans le cadre d'adénocarcinomes canauxaires pancréatiques (PDAC) ou de médulloblastomes) ou comme un facteur pro-tumoral (carcinome épidermoïde buccal (OSCC)) [56–58]. Outre ses implications en cancérologie, ASC participe par exemple à activer la formation de thrombus, à moduler la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ dans le cadre d'un rejet de greffe, ou encore à réguler le métabolisme lipidique dans le tissu adipeux [59–61].

En plus de toutes ces fonctions, ASC est principalement étudiée pour le rôle central qu'elle joue dans la transduction de la signalisation des inflammasomes en tant que protéine adaptatrice. Elle connecte le récepteur de l'inflammasome avec l'effecteur, la pro-caspase-1, par des interactions homotypiques PYD-PYD et CARD-CARD, permettant la construction d'un complexe ternaire de la taille d'un micromètre dont l'aspect ponctiforme (*speck* en anglais) est caractéristique des inflammasomes. Ces derniers se caractérisent alors par l'assemblage supramoléculaire de nombreuses protéines ASC, que l'on appelle *speck* ou pyroptosome.

Dans le cas des inflammasomes contenant des domaines PYD, la formation de ces structures dépendante de ASC se fait en réalité en trois étapes successives. La **première étape** consiste à générer un groupe de domaines pyrine (PYD) par les récepteurs à la suite de leur oligomérisation déclenchée par la liaison avec leur ligand. La **deuxième étape** fait intervenir ce groupe de PYD qui constitue un point d'ancrage pour le recrutement d'un premier lot de protéines adaptatrices par des interactions homotypiques entre les domaines PYD des récepteurs et ceux de ASC. De cette façon, les récepteurs initient la nucléation de filaments ASC puisque d'autres ASC seront ensuite recrutées pour interagir avec les domaines PYD des protéines ASC déjà présentes. Ainsi, il se forme une structure filamenteuse linéaire et unidirectionnelle, qui expose et regroupe leurs domaines CARD. Enfin, la **troisième étape** se caractérise par le recrutement d'un premier lot de pro-caspases-1 au niveau des

regroupements des domaines CARD par une interaction CARD-CARD entre les pro-caspases-1 et les ASC dont le domaine CARD est libre. Plus de pro-caspase-1 seront par la suite recrutées via une interaction CARD-CARD avec les caspases déjà présentes, formant à leur tour des filaments (**Figure 6**). La protéine ASC peut aussi engager directement une interaction homotypique avec son domaine CARD et celui d'un récepteur ne contenant pas de PYD, c'est le cas par exemple de l'inflammasome NAIP/NLRC4 qui peut recruter ASC dans certaines conditions [62,51,52].

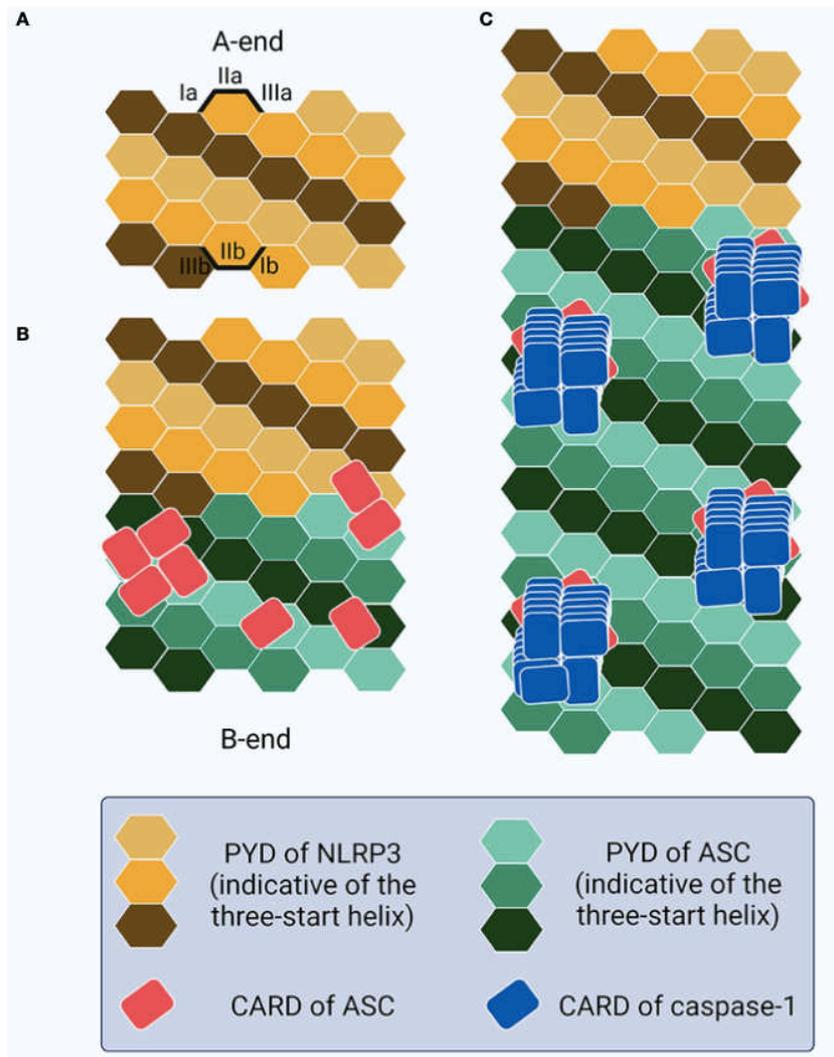


Figure 6. La nucléation des protéines ASC et caspase-1 dans l'inflammasome. La formation d'un pyroptosome ASC se fait en 3 étapes : (A) le regroupement de domaines PYD au niveau des récepteurs (par exemple NLRP3), (B) le recrutement des protéines adaptatrices ASC au niveau des groupes PYD, permettant à leur tour le regroupement de leurs domaines CARD et (C) le recrutement des caspases-1 au niveau des groupes CARD (Y. Li et Q. Jiang 2023).

La protéine adaptatrice ASC joue donc un rôle central dans la signalisation des inflammasomes, permettant la transduction du signal depuis le récepteur en amont qui détecte le danger, vers la caspase effectrice en aval qui déclenche une réponse inflammatoire. De plus, l'inclusion de ASC dans un inflammasome semble réguler la signalisation dépendante de la caspase-1, fonction sur laquelle nous reviendrons dans la section caspase-1 [63].

Il a récemment été mis en évidence que les pyroptosomes ASC peuvent aussi être libérés dans le milieu extra-cellulaire, contribuant de cette manière à promouvoir une inflammation soit en

activant directement les pro-caspases-1 extra-cellulaires, soit en activant l'inflammasome NLRP3 après avoir été phagocytés par les macrophages par exemple [64,51].

La formation de pyroptosomes ASC a été observée dans de très nombreuses circonstances, au moins autant que le nombre de signaux de danger détectés par les récepteurs engagés dans un inflammasome. Son recrutement peut alors aussi bien être déclenché par des virus comme le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2), le VIH, d'infections bactériennes, dans le cadre de fibroses, de septicémies, ou d'autres maladies inflammatoires. Par ses diverses fonctions, l'altération de cette protéine peut être associée aussi à des cancers, ou des pathologies inflammatoires [51].

1.1.1.3 La caspase-1

La caspase-1 est une protéase à cystéine appartenant à la famille des caspases (*cysteine aspartate specific proteases*) qui jouent un rôle clé dans la mort cellulaire et l'inflammation. Il s'agit d'endoprotéases dont le site actif catalytique qui contient une cystéine, coupe ses substrats après un résidu aspartate.

Selon leurs fonctions, les caspases sont catégorisées en deux groupes. Les caspases apoptotiques, d'une part, sont responsables d'une mort cellulaire non inflammatoire, appelée apoptose. Les caspases inflammatoires, d'autre part, sont responsables de la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'une mort cellulaire inflammatoire de type nécrotique, la pyroptose [65]. Ces dernières sont activées exclusivement lors de la formation d'un inflammasome dont elles sont le principal effecteur, et se présentent alors comme des protéines clés du système immunitaire inné. Les caspases inflammatoires se distinguent à leur tour en deux sous-familles : la caspase-1 qui participe à former les inflammasomes canoniques, et les caspases-4,-5 chez l'Homme, et caspase-11 chez la souris qui constituent les inflammasomes non canoniques au sein desquels elles agissent comme un récepteur direct de PAMPs. La caspase-12 humaine est aussi une caspase inflammatoire, qui est non fonctionnelle chez la majorité des humains et dont les mécanismes restent peu compris [1,65]. Dans cette section, seule la caspase-1 sera abordée en détails, nous reviendrons plus tard sur les caspase-4, -5 et -11 lorsque les inflammasomes non canoniques seront décrits.

1.1.1.3.1 La structure et le mécanisme d'activation de la caspase-1

La caspase-1, codée par le gène *CASP1*, est exprimée dans les cellules immunitaires, mais aussi au niveau de la rate, des poumons, du cœur, du système digestif et absente dans le cerveau (uniprot.org). Elle est composée d'abord d'un domaine CARD N-terminal qui permet le recrutement aux inflammasomes, puis d'un élément de liaison au domaine CARD (CDL), suivi d'une grande sous-unité p20 (LS ; *large subunit*) contenant des résidus catalytiques reliée par un lien inter-domaine (IDL) à une petite sous-unité p10 (SS ; *small subunit*) impliquée dans la dimérisation de la protéase (**Figure 7A**) [66]. Elle est synthétisée sous forme de zymogène monomérique inactif dans le cytosol, appelé pro-caspase-1, et s'active dans l'inflammasome. Classiquement, plusieurs pro-caspases-1 sont recrutées sous forme entière au niveau d'un inflammasome. Leur proximité au sein de cette structure conduit à leur dimérisation et permet un auto-clivage générant un tétramère actif p20/p10. Ce dernier est encore largement considéré dans la littérature comme la forme active de la caspase-1, capable de cliver ses

substrats, la gasdermine D (GSDMD) ainsi que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 [63].

Dans le détail, le mécanisme d'activation de la caspase-1 peut être décomposé en 5 étapes (**Figure 7B**) : **(1)** les monomères de pro-caspases-1 sont recrutés à l'inflammasome via leur domaines CARD au niveau des regroupements CARD à la surface des filaments ASC ; **(2)** la proximité des pro-caspases entre elles entraîne la formation de dimères p46 qui possèdent une activité catalytique partielle capable de cliver la pro-GSDMD mais pas l'IL-1 β ; **(3)** le dimère caspase-1-p46 subit une première auto-protéolyse au niveau de ses domaines de liaison IDL, générant un dimère p33/p10 pleinement actif avec la capacité de cliver à la fois la GSDMD et les cytokines IL1- β et IL-18 ; **(4)** puis les domaines de liaison CDL sont auto-clivés, ce qui détruit les interactions CARD-CARD entre les caspases et les filaments ASC, créant un tétramère p20/p10 instable ; **(5)** sans domaine d'interaction et de recrutement avec l'inflammasome, p20/p10 sera rapidement dissocié de l'inflammasome ce qui provoque son instabilité et la perte de la structure quaternaire active. La caspase-1 est alors incapable de cliver ses substrats, elle est désactivée [52,66]. Le tétramère p20/p10 ne représente donc pas la forme active de la caspase-1 mais il est considéré comme un indicateur de l'activation de celle-ci. Il s'agit ici d'une boucle de rétrocontrôle régulant l'activité de la caspase et de l'inflammasome lui-même dont la signalisation en dépend.

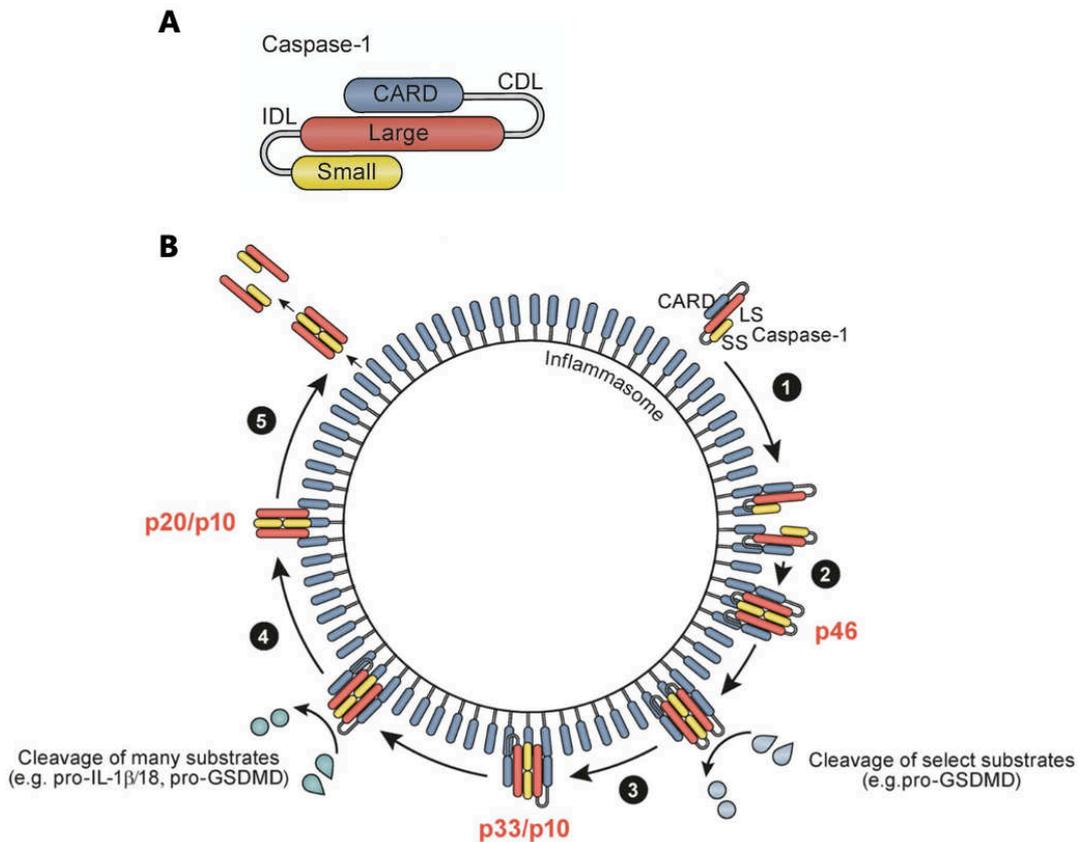


Figure 7. Structure et schéma d'activation et de désactivation de la caspase-1. (A) La caspase-1 se compose d'un domaine CARD N-terminal, un élément de liaison au domaine CARD (CDL), une large sous-unité p20 (LS), un inter-domaine de liaison (IDL) et d'une petite sous-unité p10 (SS) à l'extrémité C-terminale. (B) L'activation de la caspase-1 se déroule en 5 étapes : son recrutement à l'inflammasome, la formation d'un dimère p46 partiellement actif, l'auto-clivage des IDL formant le dimère p33/p10 pleinement actif, l'auto-clivage des CDL générant le tétramère p20/p10 et sa dissociation de l'inflammasome responsable de son inactivation. Adaptée de (D. Boucher et al. 2018)

1.1.1.3.2 Les fonctions de la caspase-1

La fonction principale, la plus étudiée à ce jour, de la caspase-1 est son rôle dans l'inflammation à travers les inflammasomes. Elle est la protéine effectrice de la signalisation des inflammasomes canoniques, au niveau desquels elle exerce son activité catalytique. La caspase-1 est considérée comme une protéine régulatrice pro-inflammatoire qui clive directement la GSDMD ainsi que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18, déclenchant d'une part une mort cellulaire pyroptotique hyper-inflammatoire et, d'autre part, la sécrétion de ces cytokines dans le milieu extra-cellulaire. Néanmoins, ces deux fonctions ne sont pas systématiquement couplées et dépendraient notamment du type cellulaire mais aussi en grande partie de la taille de l'inflammasome. En effet, un inflammasome de petite taille, avec un nombre limité d'adaptateurs ASC, comme NAIP/NLRC4 en absence de ASC, présente un nombre restreint de sites de recrutement pour la pro-caspase-1 associé à une moindre capacité d'auto-protéolyse et mène donc à l'accumulation de dimères p46 et p33/p10. De cette façon, de faibles quantités de cytokines sont produites alors que la pyroptose est fortement induite puisque le clivage de

la GSDMD ne nécessite pas l'auto-protéolyse de la caspase-1. À l'inverse, un inflammasome plus grand contenant notamment de nombreuses protéines ASC, contient davantage de sites de recrutement et génère plus efficacement des tétramères p20/p10. En effet, ces inflammasomes sont associés à une capacité accrue d'auto-clivage des caspases permettant un renouvellement rapide des protéases ayant pour conséquence la production de plus grandes quantités de cytokines matures accompagnées de pyroptose [52].

Par ailleurs, les différents composants des inflammasomes pouvant être sécrétés dans le milieu extra-cellulaire, la caspase-1 peut aussi être activée dans ces conditions et amplifier les réponses inflammatoires [67].

D'autres processus biologiques dans lesquels la caspase-1 est impliquée ont été caractérisés. Par exemple, O. Groß et al. ont démontré qu'elle induirait la sécrétion de cytokines de façon indépendante de son activité catalytique [68], et d'autres travaux ont mis en évidence son implication dans la régulation du métabolisme lipidique et du cycle cellulaire [52,69].

1.1.2 Les inflammasomes non canoniques

Alors que les inflammasomes canoniques sont décrits comme des plateformes activatrices de la caspase-1, les inflammasomes non canoniques ne conduisent pas à son activation mais impliquent d'autres caspases inflammatoires ou des acteurs de l'inflammasome.

Le premier inflammasome non canonique identifié a mis en évidence l'activation des caspase-4 et 5 chez l'Homme et leur orthologue murin, la caspase-11. Cette voie de signalisation, principalement observée dans les macrophages et monocytes, se déclenche en réponse à la détection de lipopolysaccharide (LPS) cytosolique et de bactéries à gram négatif par ces caspases inflammatoires qui jouent le rôle de récepteur [2,70]. Les cellules humaines expriment des niveaux élevés de caspase-4 alors que chez la souris les niveaux d'expression basale de la caspase-11 sont faibles, nécessitant la voie de l'interféron (IFN) pour stimuler son expression avant l'activation de l'inflammasome non canonique [71–73]. Shi et al. ont proposé un modèle dans lequel la liaison directe entre des résidus positivement chargés du domaine CARD des caspases-4/5 et le LPS est suffisant pour induire leur oligomérisation et leur activation [71]. Il en résulte alors le clivage de la GSDMD induisant la mort cellulaire par pyroptose, ainsi que la sécrétion d'alarmines dont l'IL-1 α et la protéine HMGB1 (*high mobility group box 1*) et des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (**Figure 8**) [2,18,74,75]. Des études antérieures suggèrent que les caspase-4/5/11 pourraient ne pas avoir la capacité de cliver l'IL-1 β et l'IL-18 dans leurs formes actives mais faciliteraient leur libération [75–77]. Par ailleurs, des travaux ont mis en évidence le rôle essentiel des protéines de liaison aux guanylates (GBPs) dans la régulation de l'activation de cet inflammasome non-canonique [78,79]. La protéine GBP1 détecte le LPS cytosolique auquel elle s'associe, entraînant le recrutement des protéines GBP2 et 4. La plateforme protéique ainsi formée favorise le recrutement et l'activation de caspases-4/5 [4,80–82]. L'inflammasome non canonique ne dépend donc ni de PRRs ni de la protéine adaptatrice ASC mais est particulièrement important pour contrôler les infections bactériennes [83] et représente un mécanisme de défense supplémentaire, pertinente pour les bactéries à gram négatif qui ont évolué pour contourner le TLR4 de la surface cellulaire. Il a également été décrit que l'activation de l'inflammasome non canonique caspase-4/5/11 est capable de promouvoir indirectement l'activation de l'inflammasome NLRP3 consécutif à un efflux de potassium [84,85].

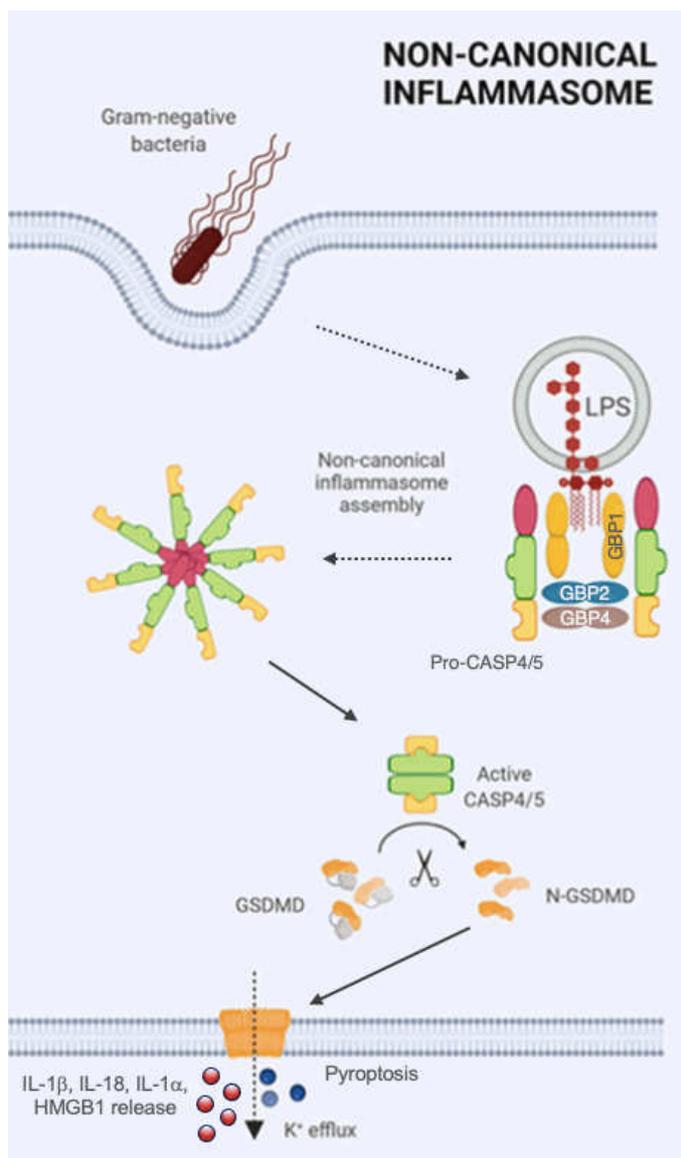


Figure 8 L'inflammasome non canonique caspase-4/5.

L'inflammasome non canonique caspase-4/5 fait intervenir uniquement les caspases inflammatoires 4 ou 5 chez l'Homme. Après la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) cytosolique des bactéries à gram-négatif par les GBPs, les caspase 4/5 sont recrutées. L'oligomérisation des caspases permet leur activation par auto-protéolyse et le clivage de leurs substrats dont la gasdermine D (GSDMD) associé à la sécrétion des cytokines inflammatoires IL-1β et IL-18. Les pores membranaires formés par la N-GSDMD sont associés à une mort cellulaire inflammatoire, la pyroptose, ainsi qu'à la libération des cytokines matures et à un efflux de potassium (K⁺). Adaptée de (O. Paerewijck et M. Lamkanfi 2022).

Un deuxième inflammasome non canonique, bien moins étudié, est médié par la caspase apoptotique 8. Plusieurs publications montrent qu'elle jouerait le rôle d'effecteur à la place de la caspase-1 dans un inflammasome impliquant à la fois la protéine adaptatrice ASC et le récepteur NLRP3 ou AIM2. Il a été montré que le complexe peut se former en réponse à du LPS ou par exemple au cours d'une inflammation du système nerveux central dans les cellules de la microglie, et induit la libération d'IL-1β associée à une inflammation [1,86,87]. D'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser les ligands capables de déclencher sa formation ainsi que pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents au recrutement et à l'activation préférentielle de la caspase-8 par rapport à la caspase-1.

1.1.3 Les conséquences de l'activation des inflammasomes

Même si les inflammasomes diffèrent grandement par leurs composants et les signaux de danger reconnus (**Table 1**), ils partagent la capacité de médier l'activation de la caspase-1 qui promeut, pour la plupart, la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 et l'induction de la pyroptose.

1.1.3.1 Les cytokines pro-inflammatoires

Les interleukines (IL)-1 β et IL-18 appartiennent à la superfamille de l'IL-1, un médiateur majeur de l'immunité innée et de l'inflammation. Deux groupes de protéines constituent cette famille : les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β et IL-36 γ) et les cytokines anti-inflammatoire (IL-37, IL-38, et les antagonistes aux récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) et de l'IL-36 (IL-36Ra)) [88]. Chaque membre de la super-famille de l'IL-1 partage une séquence consensus de trois acides aminés appelée A-X-D (A pour un acide aminé aliphatique, X pour n'importe quel acide aminé et D pour un acide aspartique). Dans le cas de l'IL-1 β et de l'IL-18, c'est en amont de cette séquence que se trouve le site de clivage des protéases formant des cytokines actives [89]. Elles subissent en effet une activation séquentielle qui nécessite la transformation de leur forme synthétisée avant d'être sécrétées pour exercer leurs fonctions.

1.1.3.1.1 Synthèse, maturation et sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18

La synthèse de l'IL-1 β et de l'IL-18

L'IL-1 β est une cytokine dont le gène *IL1B* code pour une forme immature, la pro-IL-1 β , de 31 kDa. Elle est exprimée dans de nombreux types cellulaires, principalement dans les cellules immunitaires de la lignée myéloïde mais aussi certains non immunitaires, à l'image des cellules épithéliales [74,90]. L'IL-1 β , est peu ou pas présente dans le cytoplasme à l'état basal et sa synthèse est déclenchée rapidement en réponse à des signaux inflammatoires. Ces derniers sont extrêmement variés et regroupent l'ensemble des signaux pouvant être détectés par les PRRs à la surface cellulaire, allant des PAMPs à des molécules endogènes inflammatoires comme le TNF (*tumor necrosis factor*), le LPS et l'IL-1 [91]. Ils induisent, entre autres, l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et du facteur de transcription éponyme qui entraîne l'expression du précurseur cytosolique inactif de l'IL-1 β . Il s'agit là de la première étape pour la synthèse de cette cytokine, aussi appelée « signal 1 ». La sécrétion de la pro-IL-1 β dans le milieu extra-cellulaire est rarement observée, elle pourrait notamment se faire de façon passive, consécutive à la lyse cellulaire [52,89].

L'IL-18, contrairement à l'IL-1 β , ne nécessite pas de « signal 1 » pour sa synthèse, puisqu'elle est constitutivement exprimée par les cellules hématopoïétiques, notamment les macrophages, les cellules endothéliales, et les cellules épithéliales, comme les kératinocytes. Le gène *IL18* code lui aussi pour une forme immature de la protéine qui ne possède pas d'action biologique, la pro-IL-18 (24 kDa) [92].

La maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18

L'activation de l'IL-1 β et de l'IL-18 nécessite le clivage protéolytique de leur pro-forme, pour acquérir une activité fonctionnelle. Cette étape de maturation dépend d'un deuxième signal (signal 2) responsable de l'activation de l'inflammasome et de la caspase-1 qui enlève alors les pro-peptides des précurseurs et crée une forme mature des cytokines. Le clivage des précurseurs peut aussi bien se faire dans le cytoplasme que dans des lysosomes sécrétoires. Il existe cependant d'autres mécanismes indépendants de la caspase-1 et de la voie de l'inflammasome canonique qui assurent de façon minoritaire le clivage de l'IL-1 β et de l'IL-18, c'est le cas des caspase-5 et caspase-8, mais aussi de la caspase-4 uniquement pour l'IL-18. Le précurseur de l'IL-1 β peut aussi être activé dans le milieu extra-cellulaire par d'autres protéases comme la protéinase-3 relarguée par les neutrophiles qui cible aussi l'IL-18, ou encore

l'élastase, le granzyme A, la métalloprotéase 9, la chymase des mastocytes ou la cathepsine G produite par les leucocytes [52,74,89]. Par ailleurs, la pro-IL-18 des kératinocytes peut être activée par le granzyme B, une enzyme issue des cellules NK ou des lymphocytes T [92].

La sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18

L'absence d'un peptide signal des cytokines matures empêche leur libération dans l'espace extra-cellulaire par la voie de sécrétion conventionnelle assurée par l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE). Initialement, il était admis que leur relargage relevait d'un mode de sécrétion passif dû à la perte d'intégrité membranaire, consécutive à la mort cellulaire par pyroptose (**Figure 9**). Néanmoins, de nombreuses études ont depuis suggéré que la sécrétion des cytokines pourrait se faire non seulement dans un temps plus précoce que la lyse membranaire mais qu'elle pourrait en être indépendante et se faire aussi dans des cellules non-pyroptotiques [88]. La libération de l'IL-1 β et de l'IL-18 a depuis été caractérisée comme étant majoritairement dépendante de la caspase-1 à travers des modes de sécrétion actifs. Le plus important semblerait être la sécrétion médiée par les pores de GSDMD, formés à la suite du clivage et de l'activation de la GSDMD par la caspase-1 (**Figure 9**). De nombreux autres mécanismes permettant leur sécrétion de façon active ont été identifiés, ils incluent l'exocytose des lysosomes dépendante de la phospholipase C, l'autophagie sécrétoire, l'élimination de microvésicules issues de la membrane plasmique (permise notamment par l'adressage à la membrane des formes matures qui sont chargées positivement), la libération directe par des transporteurs, ou encore via les exosomes (**Figure 9**) [52,88,89].

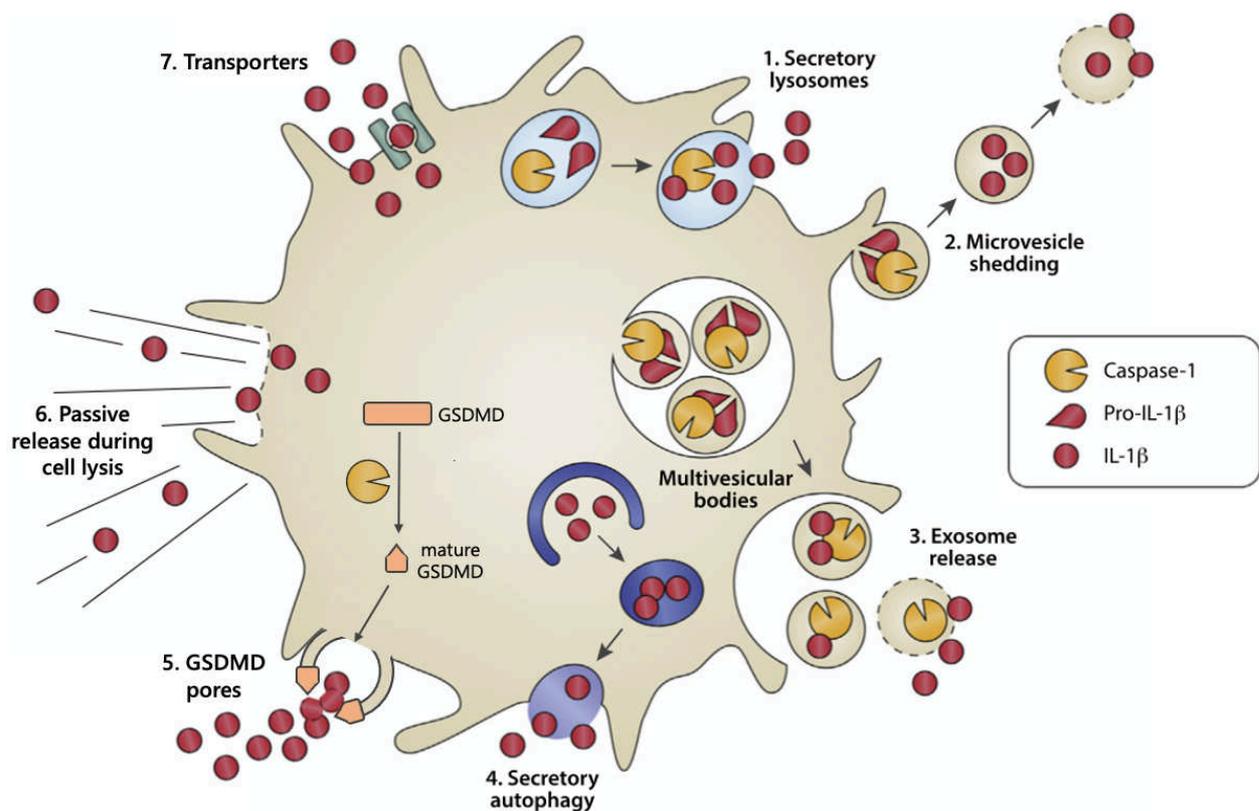


Figure 9. Modalités de sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18. Plusieurs mécanismes de sécrétion passif et actifs participent à la libération des cytokines matures IL-1 β et IL-18 parmi lesquels les lysosomes sécrétoires (1), l'élimination de microvésicules (2), le relargage d'exosomes issues de corps multivésiculaires (3), l'autophagie sécrétoire (4), les pores de GSDMD (5), la libération passive par lyse cellulaire (6) ou la sécrétion directe par des transporteurs (7). Adaptée de (M. Monteleone, J. L. Stow, et K.Schroder 2015)

1.1.3.1.2 Les fonctions de l'IL-1 β et de l'IL-18

Les fonctions de l'IL-1 β sont consécutives à sa liaison avec le récepteur IL1-R1 et la signalisation qui en découle. Selon le type cellulaire avec lequel elle interagit, ses actions sont très variées et participent à la mise en place d'une inflammation locale et à l'amplification des réponses immunitaires, favorisant par exemple l'élimination de pathogènes. Elle agit par exemple au niveau cérébral en induisant la fièvre, ou au niveau de la moelle osseuse, régulant les réponses d'urgence en stimulant l'hématopoïèse et les progéniteurs qui en découlent [90]. Elle peut aussi directement activer les cellules épithéliales et endothéliales, ce qui permet de recruter les cellules du système immunitaire telles que les neutrophiles, les monocytes et macrophages, que l'IL-1 β pourra activer en retour une fois sur le site d'inflammation. Par ailleurs, l'IL-1 β peut stimuler sa propre production et celle d'autres facteurs pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-6, l'IL-18 ; prolonger les fonctions effectrices et la survie des cellules myéloïdes matures ; induire la maturation des cellules dendritiques ; promouvoir la polarisation pro-inflammatoire des macrophages et des lymphocytes T helper 17 (Th17) ou encore la prolifération des lymphocytes B [1,74]. De cette façon, l'IL-1 β coordonne l'inflammation locale au travers des réponses immunitaires innées et adaptatives. Étant donné les implications multiples de l'IL-1 β dans l'inflammation, sa synthèse, sa sécrétion et ses fonctions sont finement régulées. Dans le

cas contraire, des pathologies peuvent survenir telles que des maladies inflammatoires, des maladies auto-immunes, mais aussi des pathologies cardiovasculaires et neurodégénératives et favoriser la carcinogénèse et la progression tumorale [90].

L'IL-18 agit à la suite de sa fixation avec son récepteur, l'IL-18R, et participe aussi grandement aux réponses immunitaires innée et adaptative. Elle est principalement décrite comme étant un effecteur central de l'immunité de type 1 capable d'induire la production d'interféron- γ (IFN γ), nécessaire pour la différenciation et l'activation des cellules *natural killer* (NK) et des lymphocytes T helper 1 (Th1) dans lesquels l'IL-18R est fortement exprimé [90,92]. En outre, l'IL-18 favorise l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, la synthèse de NO, de ROS, de cytokines et de chemokines, ou encore l'activation des lymphocytes T cytotoxiques en combinaison avec l'IL-12 en stimulant la production d'IFN γ [52,92]. Par ces fonctions, l'IL-18 joue un rôle important dans la défense de l'hôte contre des pathogènes à travers la mise en place d'une réponse inflammatoire. Ses effets peuvent cependant contribuer au développement de pathologies comme la COVID-19, les cancers, ou des maladies inflammatoires. L'IL-18 participe également à l'homéostasie métabolique et intestinale, et peut donc contribuer au développement de désordres métaboliques ou du diabète [92]. Il existe un antagoniste naturel soluble à l'IL-18, la protéine de liaison à l'IL-18 (IL-18BP), dont la liaison avec la cytokine bloque l'interaction avec l'IL-18R, inhibant ainsi la signalisation médiée par l'IL-18 [93].

1.1.3.2 La pyroptose

La pyroptose est une forme de mort cellulaire programmée inflammatoire qui est induite à la suite de l'activation des inflammasomes et se caractérise par le gonflement des cellules, suivi par la rupture de la membrane plasmique, aussi appelée lyse, et le relargage du contenu intracellulaire. Cette mort cellulaire rapide est médiée par les protéines de la famille des gasdermines (GSDMs) qui sont activées par les caspases engagées dans les inflammasomes (caspase-1 principalement mais aussi caspase-4/5/11 et caspase-8). Les GSDMs forment alors des pores transmembranaires qui conduisent à l'augmentation de la pression osmotique associée à un afflux d'eau intracellulaire et au gonflement de la cellule. Ces événements aboutissent à une perte de l'intégrité membranaire et la rupture de la membrane permettant la libération dans le milieu extra-cellulaire de nombreux composants inflammatoires comme les cytokines IL-1 β et IL-18 [1,52]. Par ailleurs, la pyroptose se différencie de l'apoptose, une autre forme de mort cellulaire programmée (non inflammatoire), car elle s'accompagne d'une conservation de l'intégrité nucléaire et d'une perte du cytosquelette d'actine [1]. Des similarités sont néanmoins partagées avec l'apoptose telles que la condensation de la chromatine et les dommages à l'ADN, bien que ceux-ci soient d'une moindre intensité et aléatoires [94]. Il s'agit d'un processus immunitaire très important pour le maintien de l'homéostasie et la défense de l'hôte puisqu'il permet, d'une part, d'éliminer les niches cellulaires des pathogènes, empêchant ainsi leur réplication ; et d'autre part, d'induire une réponse inflammatoire locale en présentant les pathogènes aux autres cellules, en relarguant de nombreux DAMPs et en facilitant le recrutement d'autres cellules immunitaires [52].

La gasdermine D (GSDMD) est le principal médiateur de la pyroptose et constitue le point de départ de ce processus [95–97]. Elle est codée par le gène *GSDMD* et exprimée sous forme de monomères dans le cytosol des cellules immunitaires comme les macrophages, les monocytes

mais aussi d'autres cellules non immunitaires comme les cellules épithéliales et les ostéoblastes [52]. Comme les autres GSDM, la GSDMD possède un domaine N-terminal capable de lier certains lipides membranaires chargés négativement et un domaine C-terminal d'auto-inhibition [98]. Néanmoins, elle est le seul membre de cette famille avec la GSDME à porter un site de clivage pour caspases au niveau de la région de liaison entre les deux domaines, qui est essentiel pour l'initiation de la pyroptose [98]. En effet, après activation de l'inflammasome, la caspase-1 ou les caspases-4/5 sont activées et clivent la GSDMD, générant un fragment N-terminal actif de 31 kDa (N-GSDMD) libéré du fragment d'inhibition C-terminal [8,99]. N-GSDMD se dirige alors à la membrane pour interagir spécifiquement avec des lipides et phospholipides membranaires chargés négativement comme les phosphoinositides (PI) [98,100]. La séquence des étapes menant à la formation des pores de GSDMD a récemment été caractérisée par Mulvihill et al., et il semblerait que c'est une fois associée à la membrane sous forme de monomères que la N-GSDMD subit des changements de conformations et s'oligomérisent pour former des pores d'un diamètre interne de 10 à 14 nm en moyenne [96,100]. Le passage de molécules de petites tailles est alors autorisé comme l'IL-1 β et l'IL-18 vers le milieu extra-cellulaire, l'efflux d'ions potassiques mais aussi un influx d'eau et d'ions, comme le calcium, responsable d'une augmentation de la pression osmotique intra-cellulaire qui mènera à la rupture membranaire et à la lyse cellulaire (**Figure 10**) [52,99,101,102]. Il est aujourd'hui clairement établi que la perméabilité membranaire médiée par les pores de GSDMD coïncide avec la pyroptose et se fait dans un temps plus précoce que la lyse cellulaire [103,104]. Cette dernière dépend d'ailleurs d'un autre effecteur activé au cours de la pyroptose en aval de la GSDMD, la protéine de surface Ninjurine 1 (NINJ1) [103]. Son oligomérisation à la membrane entraîne la rupture membranaire permettant à son tour le relargage de molécules intracellulaires de plus grandes tailles telles que la lactate déshydrogénase (LDH) et la protéine HMGB1 (**Figure 10**) [103,105]. La libération de la LDH est considérée et utilisée par l'ensemble de la communauté scientifique comme un marqueur de la mort cellulaire par lyse [5,52]. N. Kayagaki, et al. ont montré récemment que la lyse n'était pas nécessaire à la mort par pyroptose puisque la déplétion de la protéine NINJ1 dans des macrophages murins n'empêchait pas leur mort par pyroptose (**Figure 10**) [103].

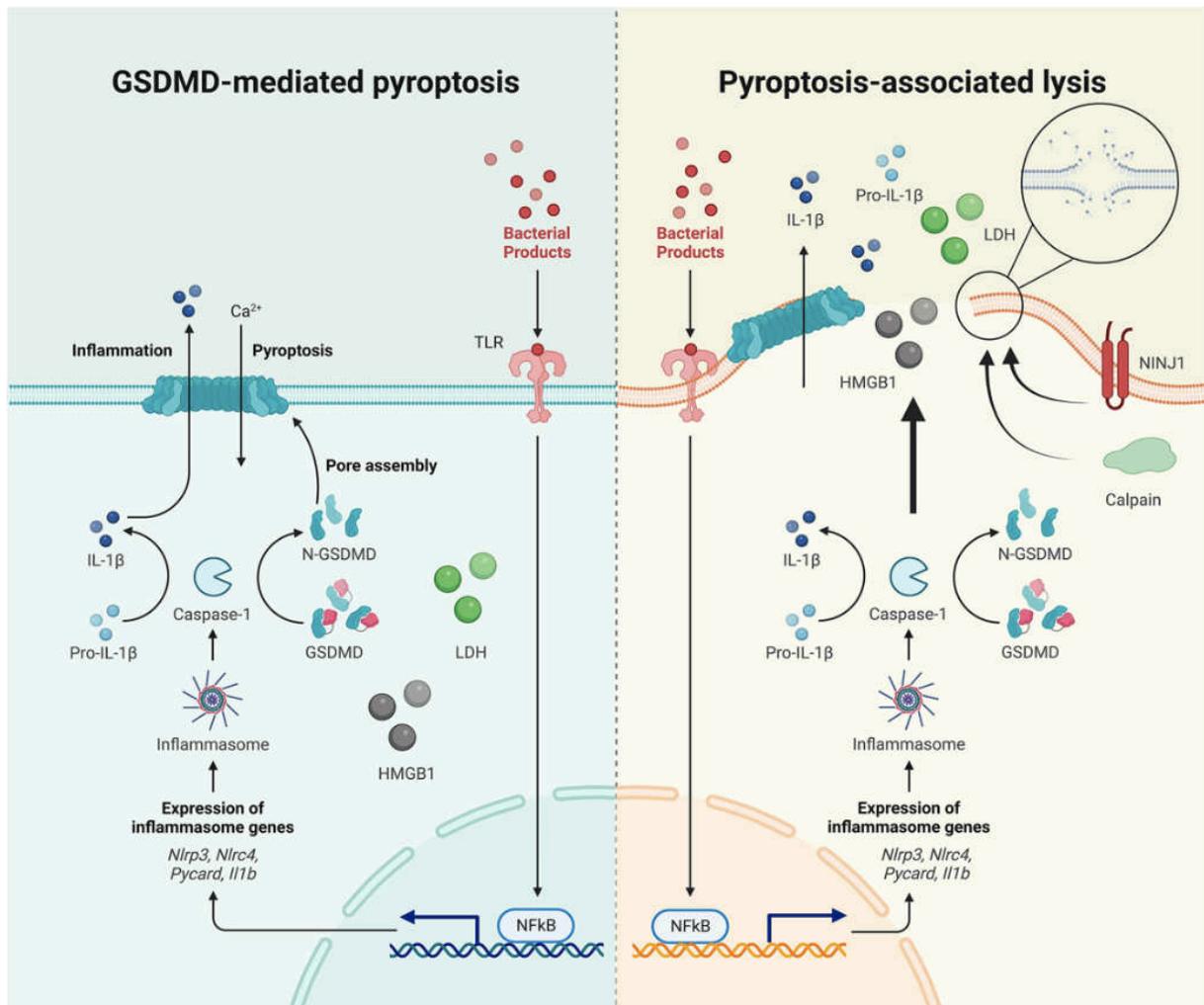


Figure 10. La mort cellulaire par pyroptose. L'activation d'un inflammasome suite à la détection d'un signal de danger comme un pathogène, entraîne l'activation de la caspase-1 (ou caspase-4/5 ou caspase-8 pour les inflammasomes non canoniques) qui clive ses substrats dont la gasdermine D (GSDMD) et entraîne une mort cellulaire par pyroptose. Celle-ci peut être médiée uniquement par les pores de GSDMD responsables d'une augmentation de la pression osmotique et à travers desquels les composants intra-cellulaires de petite taille, comme les cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18, sont libérés dans le milieu extra-cellulaire. Mais la pyroptose peut aussi être associée dans un deuxième temps à une lyse cellulaire médiée notamment par la protéine de surface NINJ1 qui provoque la rupture membranaire et la libération de molécules de taille plus importante comme la lactate déshydrogénase (LDH) et la HMGB1 (*high mobility group box 1*) (Y. Li and Q. Jiang 2023).

1.2 L'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est particulièrement intéressant, car il semble être activé par un large éventail de stimuli comprenant à la fois des pathogènes et des médiateurs endogènes, tels que les ROS, les DAMPs mitochondriaux et l'ATP, ainsi que par des structures cristallines, telles que l'acide urique (**Table 1**). L'engagement de l'inflammasome NLRP3 se traduit classiquement par l'activation de la caspase-1 dont résulte la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18, la pyroptose et une inflammation locale.

1.2.1 L'assemblage de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est constitué classiquement d'un PRR, le récepteur NLRP3 ; d'un adaptateur, la protéine ASC et d'un effecteur, la caspase-1 inflammatoire. En plus de ces trois partenaires protéiques, il nécessite une protéine d'échafaudage, la protéine kinase 7 apparentée à NIMA (NEK7).

NLRP3, aussi appelée cryopyrine, est une protéine cytosolique de 115 kDa qui appartient à la famille des NLRs et qui se retrouve exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes, les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, etc. [106]. Elle se compose comme décrit précédemment d'un domaine pyrine N-terminal (PYD), d'un domaine d'oligomérisation protéique liant les nucléotides (NOD ou NACHT) supportant une activité ATPase, et d'un domaine C-terminal répétitif riche en leucines (LRR) (**Figure 11A**).

La structure conformationnelle de NLRP3 à l'état basal est controversée mais il semblerait qu'elle soit retrouvée sous forme de monomères ou dimères inactifs dans le cytosol ou au niveau du réticulum endoplasmique (RE) alors que de larges oligomères associés à la membrane du trans-Golgi ont été observés. En effet, de récentes études ont montré que NLRP3 se présente sous forme d'oligomères inactifs qui s'assemblent par des interactions entre leurs domaines LRR créant une structure inactive assimilée à une cage à double anneaux (**Figure 11B**) [107,108]. Des expériences de cryomicroscopie électronique ont montré que les domaines PYD sont internalisés dans cette structure [107], empêchant l'assemblage de l'inflammasome. En réponse à certains stimuli, NEK7 est capable d'interagir indépendamment de son activité kinase avec NLRP3 à la fois avec les LRRs et le domaine NOD, induisant des changements conformationnels du NLR qui entraînent la dissociation de la structure en cage et l'activation de NLRP3 [109]. Par ailleurs, Y. Duan et al. ont montré que le récepteur 1 pour la protéine kinase C activée (RACK1) semble intervenir en liant NLRP3 et NEK7 pour induire ces changements de conformation activateurs [110]. Sous forme active, NLRP3 s'oligomérisse à travers des interactions entre les domaines NACHT via leur fonction ATPase et expose ses domaines PYD qui peuvent alors interagir avec ceux de la protéine adaptatrice ASC [111]. La caspase-1 est ensuite recrutée suite à l'oligomérisation et la formation de pyroptosomes ASC qui constituent une plateforme de nucléation permettant l'activation de la caspase-1 par auto-clivage (**Figure 11B**) [108,112].

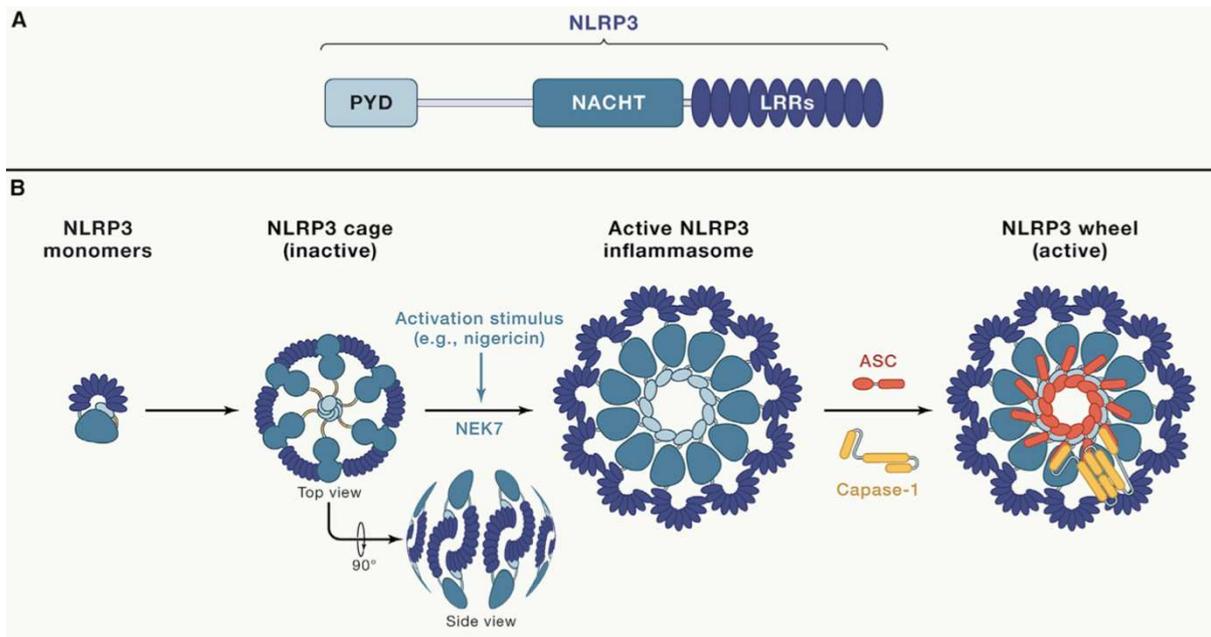


Figure 11. La protéine NLRP3 et le modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3. (A) La protéine NLRP3 comprend un domaine pyrine N-terminal (PYD), un domaine central d'oligomérisation et de liaison aux nucléotides (NACHT) ainsi qu'un domaine de répétitions riches en leucine (LRRs). (B) En réponse à des stimuli activateurs, la kinase NEK7 lie et active NLRP3 en induisant la dissociation de la structure en cage. NLRP3 est alors disponible pour interagir avec ASC qui recrutera à son tour la caspase-1, formant ainsi l'inflammasome NLRP3. Adaptée de (K. Schroder et R. C. Coll 2021 [113]).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 a été observée dans plusieurs types cellulaires et c'est principalement dans les macrophages que les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans cette activation ont été décrits. Il existe différentes modalités présentées ici en deux groupes : l'activation canonique qui sera détaillée dans un premier temps et les activations non canoniques qui seront traitées dans un second temps.

1.2.2 L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3

Dans les macrophages, les cellules dans lesquelles l'inflammasome NLRP3 a été le mieux caractérisé, l'activation de l'inflammasome NLRP3 est un processus qui nécessite deux signaux successifs : d'abord le *priming* ou signal d'amorçage, puis le signal d'activation (**Figure 12**) [112].

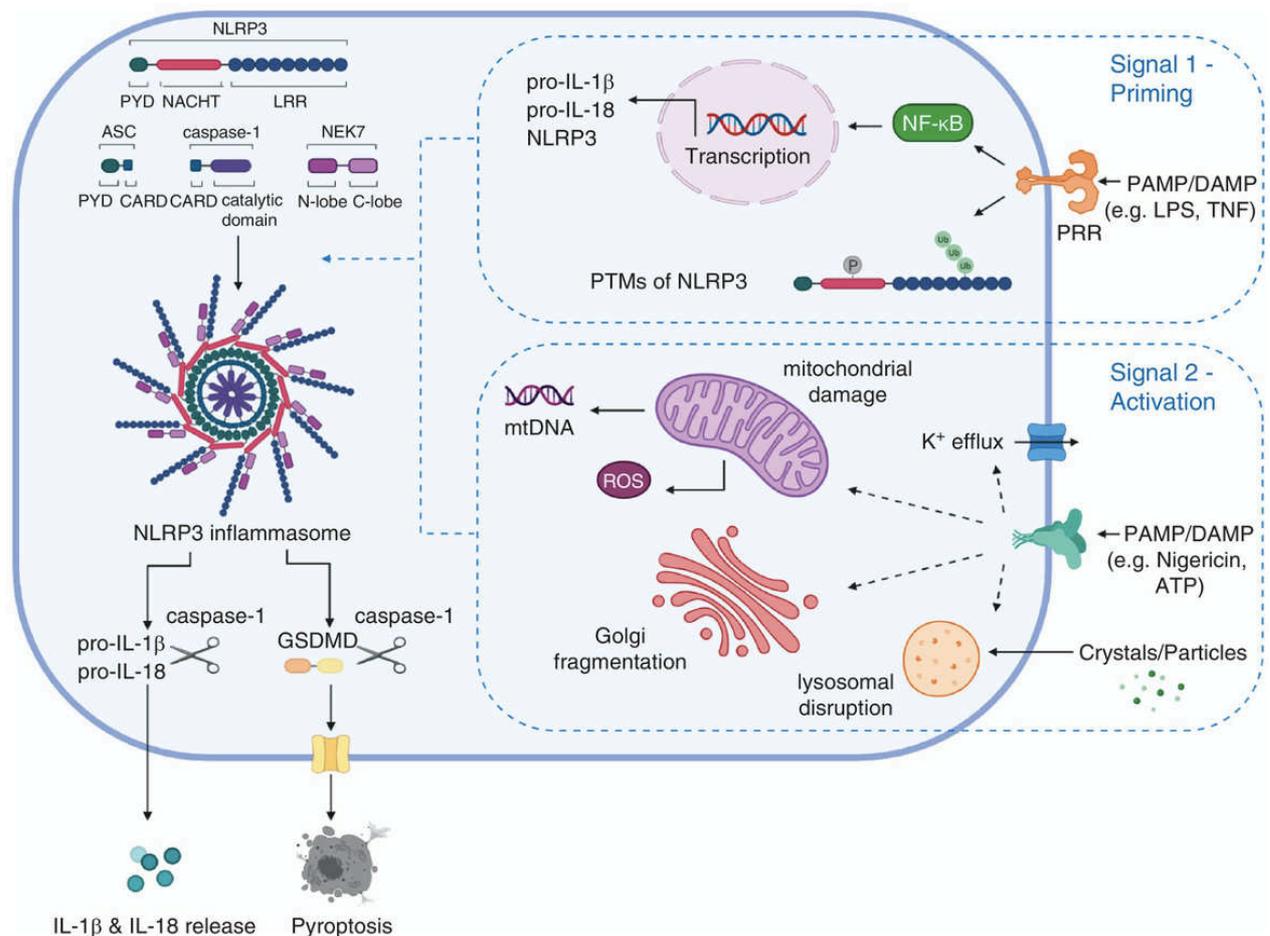


Figure 12. L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux successifs pour être pleinement activé. D'une part, un signal d'amorçage ou de priming induit par des PAMPs ou des DAMPs qui assure l'augmentation d'expression de NLRP3 et de la pro-IL-1 β , ainsi que la pré-activation de NLRP3. D'autre part, des PAMPs, des DAMPs ou des molécules environnementales agissent comme un signal d'activation qui induit des événements cellulaires activant l'inflammasome NLRP3 comme des flux d'ions, la rupture des lysosomes, des dommages aux mitochondries, ou la fragmentation de l'appareil de Golgi (C. M. McKee et R. C. Coll 2020 [114]).

1.2.2.1 Le signal 1 : le signal d'amorçage ou de priming

Le priming est requis avant le signal qui active l'inflammasome NLRP3 et consiste à augmenter l'expression de la protéine NLRP3 et de la pro-IL-1 β mais aussi à activer NLRP3 par des modifications post-traductionnelles (MPTs) (**Figure 12**). Il se fait à travers l'activation de plusieurs récepteurs notamment des PRRs tel que les TLRs, NOD2 mais aussi le récepteur aux IL-1 (IL1R), le récepteur au TNF (TNFR), en réponse à différents signaux comme des DAMPs, des PAMPs (le LPS par exemple), mais aussi des cytokines comme le TNF ou l'IL-1 β ou encore une production excessive de ROS [70,106]. Plusieurs voies de signalisation ainsi induites contrôlent le priming de NLRP3 et diffèrent aussi bien dans le temps que dans les réponses cellulaires qui en découlent. On distingue alors les trois mécanismes suivants : les **primings court et intermédiaire** ou non transcriptionnels au cours desquels NLRP3 subit des MPTs activatrices ; le **priming long** ou transcriptionnel responsable de l'augmentation de la

transcription de NLRP3, de la pro-IL-1 β et d'autres substrats de la caspase-1 ; le **priming prolongé** qui entraîne la désensibilisation de NLRP3 et d'autres composants de l'inflammasome vis-à-vis des signaux d'activation [70]. Ce dernier mécanisme sera discuté ultérieurement dans la section 1.3.1.

Les priming court et intermédiaire

Les primings non transcriptionnels ne dépendent pas de la synthèse de nouvelles protéines mais ils induisent au contraire la pré-activation de NLRP3 à partir des niveaux d'expression basale de NLRP3. En effet, il a été observé une activation rapide et transitoire de NLRP3 médiée par des modifications post-traductionnelles à la suite de l'activation de certains récepteurs TLRs. Dans un premier temps, l'engagement des récepteurs TLR4 et TLR2, aboutit à un priming court au bout de 10 à 30 minutes qui dépend notamment de la protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MyD88) et des kinases 1 et 4 associées au récepteur de l'IL-1 (IRAK1/4) [115,116]. Le priming intermédiaire prend ensuite le relais à partir de 30 minutes jusqu'à 1 heure par la voie de signalisation impliquant la protéine adaptatrice contenant un domaine TIR (récepteur Toll/IL-1) induisant l'IFN β , la kinase IRAK1, la protéine associée à FAS par un domaine de mort (FADD), la caspase-8 et la protéine kinase interagissant avec les récepteurs (RIPK) 1 (RIPK1) suite à la stimulation des TLR3 et TLR4 [70,116,117]. De plus, les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales (mtROS) peuvent aussi initier ces deux voies sans nécessairement engager les TLRs (**Figure 13**) [115]. Cette activation rapide de NLRP3 repose uniquement sur des MPTs telles que des phosphorylations, des ubiquitinations et des déubiquitinations favorisant son activation ou son oligomérisation [70,108,115]. Par exemple, T. Niu et al. ont récemment montré que la pré-activation de NLRP3 par phosphorylation durant le priming est nécessaire pour permettre ensuite le recrutement de la protéine NEK7. La caséine kinase 1 alpha 1 (CSNK1A1) contrôle la phosphorylation du LRR de NLRP3 sur la sérine 803, ce qui régule l'assemblage de l'inflammasome [118]. De plus, les mtROS sont impliquées dans la déubiquitination de NLRP3, induisant son activation [115].

Le priming long

Le priming long survient lorsque la transcription est possible, après plusieurs heures, entre 2h et 12h. La détection de PAMPs ou de DAMPs par les TLRs entraîne l'activation de protéines et de facteurs nucléaires parmi lesquels on retrouve la protéine MyD88, la protéine activatrice 1 (AP-1), la protéine TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta*), mais aussi les mtROS qui permettent l'activation de la voie NF- κ B, qui à son tour induit une augmentation du niveau d'expression transcriptionnelle de NLRP3 et de cytokines pro-inflammatoires comme la pro-IL-1 β (**Figure 13**) [119]. Ce priming permet d'augmenter de façon très importante les quantités de ces protéines dans le cytoplasme par rapport aux niveaux d'expression basale très faibles (NLRP3) ou nuls (pro-IL-1 β). Cependant, il semblerait que dans certaines conditions, l'expression de la pro-IL-18 pourrait aussi être induite par une signalisation TLR alors même qu'elle est exprimée de façon constitutive dans de nombreux types cellulaires [120]. D'autres études suggèrent l'implication de la caspase-8 apoptotique et FADD dans le priming transcriptionnel de NLRP3 en réponse à l'engagement du TLR4, induisant la signalisation NF- κ B [117,121].

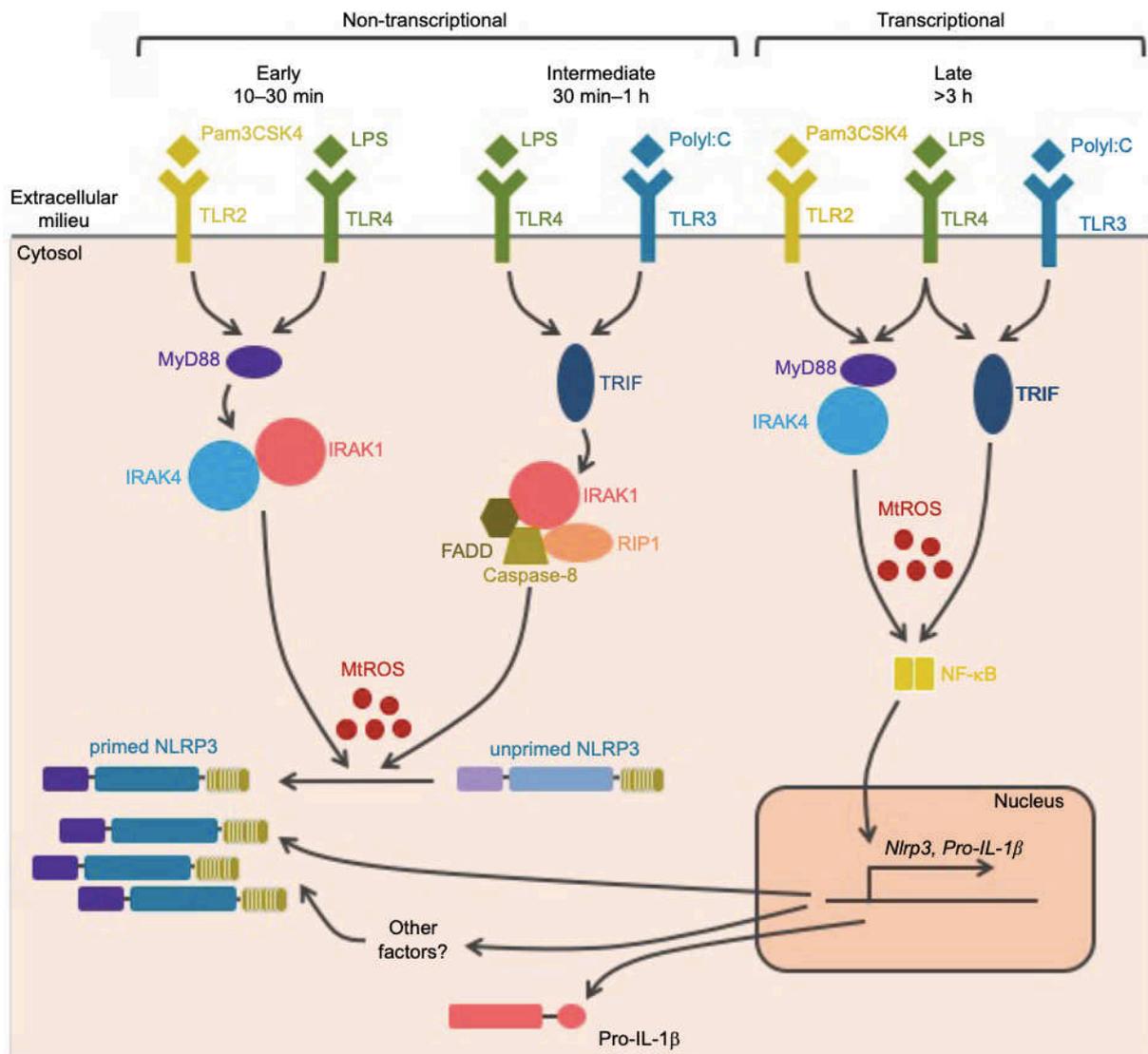


Figure 13. Le priming de l'inflammasome NLRP3. Le priming de NLRP3, déclenché en réponse à l'activation des TLRs, active plusieurs voies de signalisation. Les primings court et intermédiaire (10 minutes – 1 heure) correspondent à la pré-activation de NLRP3 induite par des modifications post-traductionnelles. Un priming plus tardif, le priming long (>3 heures), implique la voie de signalisation NF-κB qui induit la surexpression transcriptionnelle de NLRP3, de la pro-IL-1β et certainement d'autres facteurs engagés dans l'inflammasome (M. Gros Lambert et B. F Py 2018).

Selon des conditions spécifiques, il apparaît que le signal d'amorçage joue principalement un rôle transcriptionnel dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 [119] alors que dans d'autres cas, la surexpression de NLRP3 ne semble pas nécessaire, suggérant que cette étape permet davantage de pré-activer NLRP3 d'une façon post-traductionnelle [122]. Le priming de NLRP3 est néanmoins une étape nécessaire pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages. Cependant, une étude démontre qu'elle ne serait pas indispensable dans les monocytes humains lors de l'activation canonique de l'inflammasome *in vitro* [123].

1.2.2.2 Le signal 2 : le signal d'activation de l'inflammasome NLRP3

Après l'étape d'amorçage, NLRP3 est activé par un second signal qui permet son oligomérisation et la formation de l'inflammasome avec ASC et la pro-caspase-1, provoquant l'activation complète de NLRP3 dans l'inflammasome, ce qui est défini comme l'étape d'activation. Alors qu'une multitude de molécules peuvent jouer le rôle de signal (**Table 1**), la grande diversité chimique et structurale de ces différents activateurs indique que le récepteur NLRP3 ne peut pas les lier directement mais qu'il agit plutôt comme un détecteur de stress cytosoliques engendrés par ces molécules. On peut alors classer ces signaux parmi les trois catégories de stress cellulaires qu'ils causent : les molécules qui entraînent un **flux ionique**, les molécules qui entraînent un **dysfonctionnement des mitochondries** et celles qui induisent la **rupture des lysosomes (Figure 12)**.

1.2.2.2.1 Activation par un flux ionique

L'activation de NLRP3 par un flux d'ions (potassium, calcium, chlorure et sodium) est consécutive à la formation ou à l'ouverture d'un pore membranaire médiée par une molécule activatrice.

L'efflux de potassium

L'efflux de potassium (K^+) est une étape cellulaire commune à la plupart des stimuli de NLRP3 comme l'ATP extra-cellulaire, les toxines bactériennes formant des pores dont la nigéricine, un ionophore à K^+ , les complexes d'attaque membranaire, des particules d'aluminium ou de silice qui perméabilisent la membrane des lysosomes ou encore des virus comme le SARS-CoV-2 [70,106,108,124,125]. De plus, l'efflux de potassium semble aussi requis pour l'activation de NLRP3 médiée par les inflammasomes non-canoniques [126]. Une diminution des quantités de K^+ intra-cellulaire est observée à la suite à l'exposition des macrophages à de l'ATP présent en trop grandes quantités dans le milieu extra-cellulaire, issu de cellules nécrotiques ou libéré à la suite de l'activation de l'hémi-canal pannexine-1 [127,128]. L'ATP peut directement activer un canal sélectif de cations dépendant de l'ATP, le récepteur purinergique P2X7. En déclenchant son ouverture, P2X7 entraîne d'une part un efflux de K^+ et d'autre part, un influx de calcium (Ca^{2+}) et de sodium (Na^+). Cet influx de cations facilite ensuite un efflux potassique à travers le canal potassique à deux pores TWIK2 (*two-pore domain weak inwardly rectifying K^+ channel 2*) en modifiant le potentiel de membrane (**Figure 14**) [129]. Récemment, A. Tapia-Abellan et al. ont montré que les faibles concentrations de K^+ intra-cellulaire mènent à un changement de conformation de NLRP3 sous forme inactive et promeut une ouverture de la protéine nécessaire à l'activation de NLRP3. Ils ont notamment mis en évidence par une expérience de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET), le rôle d'un nouveau domaine, FISNA (*fish-specific NACHT associated domain*), capable de détecter les flux ioniques et celui d'une séquence de liaison entre ce domaine et le domaine PYD de NLRP3 dans ce changement conformationnel [130]. Par ailleurs, il avait déjà été établi que l'efflux de potassium facilite l'interaction entre NLRP3 et le médiateur NEK7 [131], soulignant le rôle important de l'efflux de K^+ dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Néanmoins, l'activation de NLRP3 peut être induite de façon indépendante d'une concentration élevée de potassium dans le milieu extra-cellulaire. Des études ont notamment identifié l'imiquimode et le CL097, des petites molécules qui ciblent les mitochondries et qui sont capables d'activer NLRP3 indépendamment d'un efflux de K^+ [132]. De plus, une longue

stimulation des monocytes humains avec du LPS seul permettrait d'activer NLRP3 de façon alternative sans déclencher un flux de potassium [133]. L'ensemble de ces connaissances suggère que l'efflux de K^+ est suffisant, mais pas nécessaire, pour l'activation de l'inflammasome NLRP3.

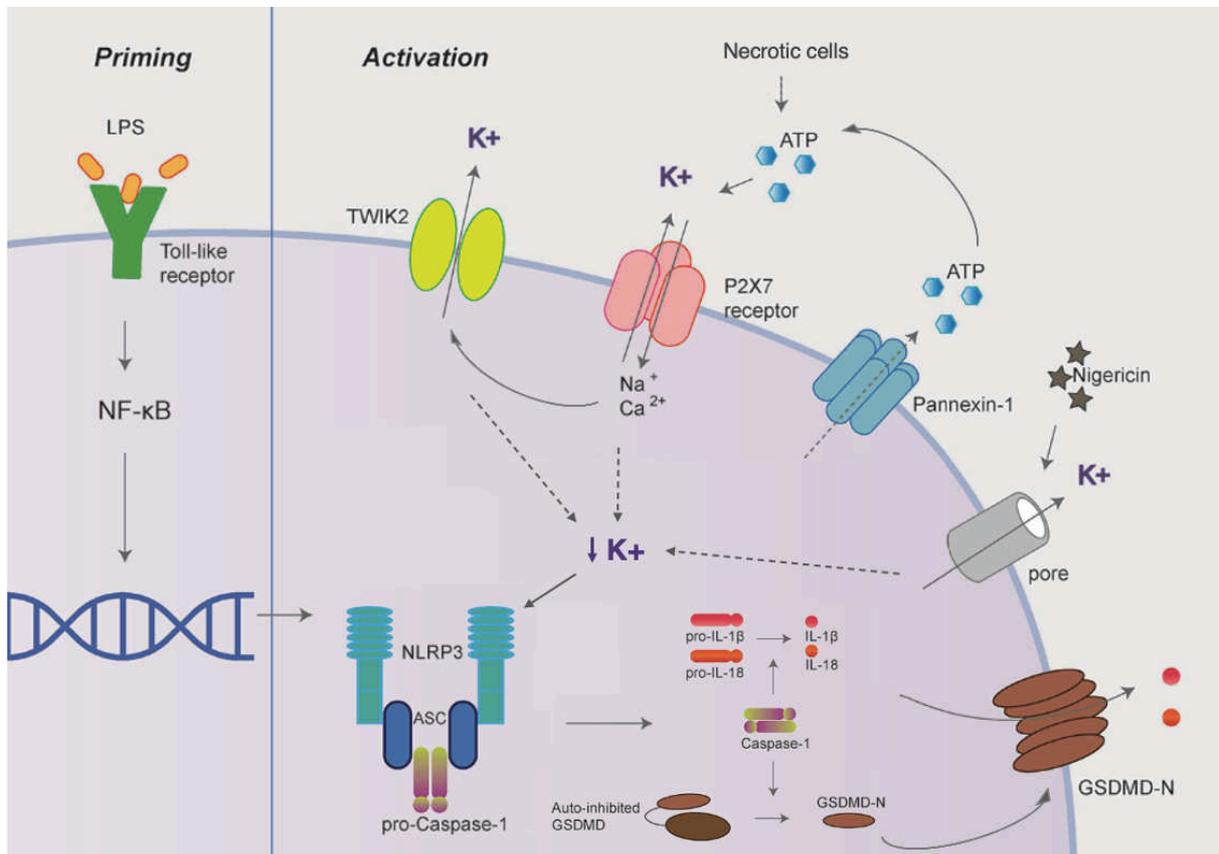


Figure 14. L'efflux de potassium induit l'activation de l'inflammasome NLRP3. En réponse à de l'ATP extra-cellulaire, libéré par des cellules nécrotiques ou à travers la pannexine-1, le canal P2X7 libère du potassium (K^+) et laisse entrer du sodium (Na^+) et du calcium (Ca^{2+}). Cet influx de cations entraîne l'écoulement de K^+ hors de la cellule par le canal TWIK2. Les toxines formant des pores, comme la nigéricine, induisent également un efflux de potassium. La détection par NLRP3 de la diminution de la concentration de K^+ intra-cellulaire induit l'activation de l'inflammasome. Adaptée de (Z. Xu et al. 2020).

L'influx de calcium

Les flux calciques ont aussi été décrit comme important dans l'activation de NLRP3. Une augmentation de la concentration intra-cellulaire de calcium (Ca^{2+}) par plusieurs activateurs de NLRP3 (tels que l'ATP, la nigéricine, des particules, ou des cristaux d'urate monosodique (MSU)) peut induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 [134,135]. Plusieurs sources de Ca^{2+} ont été identifiées dont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), comme le récepteur sensible au calcium (CASR), qui induisent la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en activant la phospholipase C (PLC). L'IP3 déclenche alors le relargage massif de Ca^{2+} dans le cytoplasme à partir du réticulum endoplasmique (RE) à travers le récepteur de l'IP3 (IP3R), un canal d'ions [134,136]. Dans leur

étude, G.S. Lee et al. démontrent l'implication de l'IP3R dans l'activation de NLRP3 puisque son inhibition empêche le relargage de Ca^{2+} et cela est associé à une moindre activation de l'inflammasome [136]. En outre, l'engagement de certains canaux ioniques membranaires comme P2X7 ou certains canaux cationiques à potentiel de récepteur transitoire (TRPC) mais aussi la rupture des lysosomes entraînent un influx de calcium dans le cytosol associé à une activation de NLRP3 [134]. Cependant, les mécanismes par lesquels le flux de Ca^{2+} favorise cette activation sont peu documentés. Il est suggéré que l'excès de calcium intra-cellulaire pourrait favoriser directement l'interaction entre NLRP3 et ASC [136]. D'autre part, il induirait une surcharge de calcium dans les mitochondries, déclenchant leur dysfonctionnement et la production de mtROS, des activateurs de l'inflammasome NLRP3 [134,137]. *In vitro*, l'excès de calcium dans le milieu extra-cellulaire peut former des cristaux ou des particules calciprotéiques et activer NLRP3, notamment à travers l'induction d'un efflux de potassium [125,138,139]. Néanmoins, une étude remet en question le rôle du flux calcique comme signal activateur en montrant par exemple que l'activation de NLRP3 peut se faire de façon indépendante du calcium en réponse à des stimuli comme l'ATP [140].

L'influx de sodium

Il est suggéré dans la littérature que l'influx de sodium (Na^+) dans le cytosol pourrait jouer un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par certains agonistes de NLRP3. Par exemple, l'activation de NLRP3 médiée par la nigéricine ou la gramicidine (un antibiotique) dans des macrophages murins est fortement inhibée lorsque l'influx de sodium est bloqué [125]. Ce n'est pas le cas pour d'autres activateurs tels que l'ATP ou la silice [125]. Alors que l'influx de Na^+ seul semble insuffisant pour activer l'inflammasome NLRP3, son rôle serait indirect et associé à la modulation de la concentration de potassium. Par exemple, suite au relargage de cristaux de MSU par les lysosomes, la concentration intra-cellulaire de Na^+ augmente, entraînant un influx d'eau massif qui réduit la concentration de K^+ intra-cellulaire et active l'inflammasome NLRP3 [125,141].

L'efflux de chlorure

Le rôle des flux de chlorure (Cl^-) dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 est controversé. Des études suggèrent que l'augmentation extra-cellulaire de chlorure inhiberait la libération d'IL-1 β , et qu'inversement la diminution de sa concentration dans le milieu extra-cellulaire est associée à une sécrétion accrue d'IL-1 β après une stimulation par de l'ATP [142,143]. Au contraire, d'autres études montrent que l'efflux de Cl^- modulerait positivement l'activation de NLRP3. En effet, l'efflux de Cl^- à travers les canaux de calcium intra-cellulaire (CLICs) est observé en réponse à un efflux de K^+ associé à un dysfonctionnement des mitochondries et favorise l'interaction entre NLRP3 et NEK7 [144]. De plus, l'efflux de Cl^- à travers ces canaux semble favoriser l'oligomérisation de ASC et jouer un rôle au cours du priming en induisant la transcription de l'IL-1 β [145,146].

1.2.2.2 Activation par les mitochondries et les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

De nombreux activateurs de NLRP3 agissent en induisant des dommages aux mitochondries qui conduisent à leur dysfonctionnement, comme la nigéricine, l'ATP, des particules d'aluminium, des virus, des bactéries, des inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire, ou des molécules induisant un stress métabolique. De cette façon, les mitochondries ont été

reliées à l'activation de l'inflammasome NLRP3 à travers le relargage d'ADN mitochondrial (ADNmt) et de mtROS dans le cytoplasme mais aussi le blocage de la mitophagie, la perte du potentiel de membrane et autres événements. Comme évoqué précédemment, c'est par exemple en réponse à la nigéricine que la mitochondrie capte le Ca^{2+} relargué par le RE à travers un canal anionique de type 1 dépendant du voltage (VDAC1) et se surcharge en Ca^{2+} , à l'origine de dysfonctionnements (**Figure 15**) [137]. En plus, la mitochondrie peut jouer un rôle de plateforme d'assemblage pour l'inflammasome NLRP3 [70,106,108,135].

L'ADN mitochondrial

L'ADNmt est libéré dans le cytosol par les mitochondries endommagées en réponse par exemple à de l'ATP, et ce de façon dépendante ou indépendante de la production de mtROS [147]. L'ADNmt est un ligand direct de NLRP3, qui entraîne l'activation de NLRP3 à la suite de sa liaison. Néanmoins, l'ADNmt peut être également reconnu par l'inflammasome AIM2, Shimada et al. ont montré que c'est sous forme oxydée que l'ADNmt se lie spécifiquement à NLRP3, activant ainsi uniquement l'inflammasome NLRP3 (**Figure 15**) [148]. Récemment, une étude a révélé que l'engagement des TLRs en réponse aux agonistes de NLRP3 induit la transcription de la protéine kinase 2 dépendante du Ca^{2+} /calmoduline (CAMK2), nécessaire à la synthèse d'ADNmt oxydé [149]. En outre, il semblerait que l'activation de NLRP3 médiée par la production d'ATP via la chaîne de transport d'électrons (ETC) dépende en partie de l'ADNmt [150]. L'ETC est importante pour activer NLRP3 de façon indépendante de la production de ROS puisqu'elle permet, à partir de la phosphocréatine, de maintenir un stock suffisamment élevé d'ATP cytosoliques, nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome. La déplétion d'ADNmt pourrait indirectement impacter l'activation de NLRP3 en perturbant l'activité de l'ETC et en diminuant la production d'ATP mitochondrial [150].

Les ROS mitochondriales

Les mitochondries sont la source principale de production des ROS intra-cellulaires. Lorsqu'elles sont endommagées en réponse à certains stimuli, elles produisent des mtROS à travers leurs fonctions respiratoires par les complexes I et III de la chaîne de transport d'électron (ETC), qui contribuent directement à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 15**) [151,152]. Notamment, l'imiquimode et le CL097, des activateurs de NLRP3, en ciblant à la fois la quinone oxydoréductase (NQO2) et le complexe I mitochondrial induisent la production de mtROS. Les stress métaboliques peuvent aussi conduire à leur production. Un excès de palmitate perturbe l'ETC et peut favoriser la génération de mtROS associée à la production d'IL-1 β [153]. De plus, les mtROS produites à partir d'une mitochondrie dysfonctionnelle en réponse à du LPS et de l'ATP, participent au relargage d'ADNmt dans le cytosol et contribue à l'activation de l'inflammasome NLRP3 [147]. Les mitochondries ne sont pas les seules sources de production de ROS. Il a aussi été mis en évidence par plusieurs études le rôle des nicotinamide dinucléotide phosphate oxydases (NOX) dans la production de ROS et l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui en découle [154–156].

Pour autant, le mécanisme par lequel NLRP3 détecte les ROS n'est pas bien compris et certaines études suggèrent que ce serait à travers le modulateur de NLRP3, la protéine NEK7, que les mtROS seraient détectés, permettant ensuite l'activation du NLR [132,157]. Le rôle des mtROS dans l'activation de NLRP3 reste néanmoins très controversé dans la littérature qui suggère qu'ils seraient plutôt une conséquence de l'activation de l'inflammasome NLRP3 [125,158]. Très récemment, les travaux de Billingham et al. sont venus renforcer l'hypothèse selon laquelle les mtROS ne seraient pas à l'origine de l'activation de NLRP3. Pour ce faire, ils ont reconstitué

dans des macrophages murins, une ETC fonctionnelle capable de générer de l'ATP mais pas des ROS, et malgré l'absence de mtROS, les macrophages présentaient une activation normale de NLRP3 ainsi que des niveaux d'IL-1 β sécrétés semblables aux cellules contrôles [150]. Cependant, les mtROS peuvent également participer à l'activation de l'inflammasome NLRP3 à travers leur implication dans l'étape du priming puisque des inhibiteurs de mtROS bloquent l'expression de NLRP3, de même qu'ils participent à la déubiquitination de NLRP3 promouvant ainsi sa pré-activation [115,158].

Les autres dommages à la mitochondrie

D'autres molécules d'origine mitochondriale participent à l'activation de NLRP3 dans certaines conditions. La cardiolipine, un phospholipide présent normalement dans la membrane interne de la mitochondrie et externalisé en cas de dysfonctionnement des mitochondries, peut lier directement NLRP3 au niveau du domaine LRR et conduire à son activation (**Figure 15**) [159,160]. Durant une infection bactérienne, l'hexokinase-1 (une kinase qui catalyse les premières étapes de la glycolyse) lie le peptidoglycane bactérien, engendrant son inhibition et sa dissociation de la membrane mitochondriale pour aller activer NLRP3 [161]. De plus, la protéine MAVS est un ligand direct de NLRP3 dont elle régule l'activation en réponse à des infections virales [162–164].

Ainsi, l'inhibition de la mitophagie (un processus autophagique qui dégrade sélectivement les mitochondries endommagées) favorise l'activation de NLRP3, car la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles ou endommagées empêche la génération ou la libération de mtROS et d'ADNmt. À l'inverse, lorsque des molécules activatrices bloquent la mitophagie, elles activent l'inflammasome NLRP3 par l'accumulation de mitochondries défectueuses [147].

La mitochondrie, un site d'assemblage

Il a été proposé que les mitochondries et les membranes du RE associées aux mitochondries (MAM) servent d'échafaudages pour la localisation de NLRP3 et la formation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 15**). Plusieurs molécules mitochondriales favoriseraient ainsi l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 à la mitochondrie dont la mitofusine-2, la cardiolipine et la protéine MAVS [159,162,165]. En plus de jouer un rôle de ligand activateur, la cardiolipine exposée à la surface mitochondriale en réponse à des dommages pourrait servir de site d'ancrage à la mitochondrie [159]. Une autre étude démontre que la cardiolipine est non seulement capable d'interagir avec NLRP3 mais aussi avec la caspase-1 directement, favorisant d'autant plus la formation de l'inflammasome à ce site [160]. Enfin, la protéine MAVS a une importance double dans son rôle de protéine d'échafaudage. En interagissant physiquement avec NLRP3, elle permet d'une part sa localisation à la mitochondrie, et d'autre part, elle recrute le facteur 3 associé au récepteur du TNF (TRAF3) à ASC, qui en retour ubiquitine ASC qui est nécessaire à son oligomérisation et à l'activation de l'inflammasome [164,166]. D'autres organelles peuvent également supporter la formation de l'inflammasome comme le RE ou l'appareil de Golgi, ce qui suggère que le recrutement de NLRP3 à la mitochondrie pourrait être une étape intermédiaire [167,168]. Chen et al. ont démontré récemment que le réseau trans-golgi dispersé induit par un stimulus NLRP3 sert d'échafaudage pour l'activation de l'inflammasome NLRP3, alors que NLRP3 associé à la mitochondrie ne parvient pas à activer l'inflammasome [169].

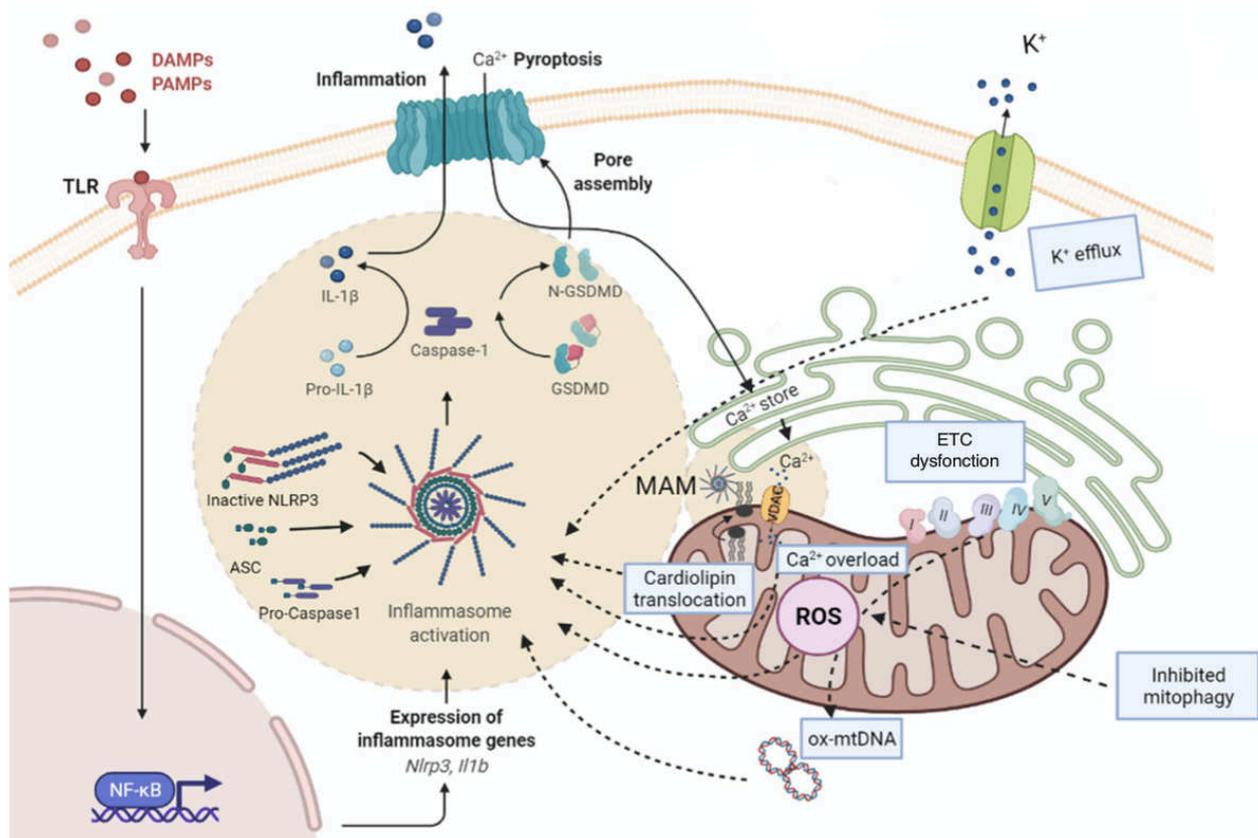


Figure 15. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par la mitochondrie. Le signal de priming, médié notamment par des PAMPs et DAMPs détectés par les TLRs, active entre autres la voie de signalisation NF- κ B qui induit la transcription de NLRP3 et de la pro-IL-1 β . Un signal d'activation permettra ensuite la formation de l'inflammasome NLRP3, entraînant l'activation de la caspase-1 responsable de la libération de cytokines pro-inflammatoires et de l'induction de la pyroptose. Les signaux activateurs déclenchent des multiples stress cellulaires dont l'efflux de potassium et les dommages aux mitochondries sont largement partagés. On retrouve notamment la production de ROS causée par des perturbations de la chaîne de transfert d'électron (ETC), la libération d'ADN mitochondrial oxydé (ox-ADNmt), l'externalisation des cardiolipines, le surdosage en calcium entré dans la mitochondrie par le canal anionique dépendant du voltage (VDAC) qui déclenche à son tour un dysfonctionnement de la mitochondrie. En plus, la mitochondrie semble faciliter l'assemblage de l'inflammasome au niveau des membranes associées aux mitochondries (MAM) par l'interaction de certaines molécules mitochondriales comme la cardiolipine avec NLRP3. Adaptée de (S. Torres et al. 2022).

1.2.2.2.3 Activation par la rupture des lysosomes

Les lysosomes sont les organites responsables de la dégradation d'éléments extra-cellulaires internalisés à la suite d'un processus d'endocytose ou de phagocytose mais aussi de la dégradation et du recyclage du matériel intra-cellulaire. Les lésions lysosomales sont considérées comme jouant un rôle important dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Le dipeptide induisant directement des ruptures membranaires lysosomales, l'ester méthylique de L-leucyl-L-leucine (Leu-Leu-OMe), est notamment capable d'activer NLRP3 [170]. De

nombreux activateurs de NLRP3 comme les particules de MSU, d'aluminium, d'amiante et les cristaux d'acide urique, de calcium, de cholestérol, les agrégats de protéines β -amyloïde (maladie d'Alzheimer) peuvent induire une rupture des lysosomes et donc l'activation de l'inflammasome NLRP3 [141,154,170–173]. Ces éléments ont en effet la particularité d'être résistants à la dégradation lysosomale ce qui mène à leur accumulation et cause des lésions aux lysosomes.

Les mécanismes menant à la rupture de la membrane des lysosomes et à l'activation de NLRP3 ne sont aujourd'hui pas bien connus, néanmoins plusieurs hypothèses ont été avancées. L'une des plus citées repose sur le relargage d'enzymes lysosomales actives dans le cytosol à la suite de la phagocytose de particules, les cathepsines. Il s'agit des protéases responsables de la dégradation de la membrane lysosomale, dont la cathepsine B qui une fois dans le cytosol participe à l'activation de la caspase-1 et la libération d'IL-1 β en réponse aux agrégats β -amyloïdes [173]. Il semblerait que les autres membres de la famille des cathepsines contribuent aussi à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et ce de façon redondante, comme la cathepsine X impliquée dans les réponses induites par la nigéricine [174].

Une autre hypothèse moins connue serait l'augmentation de l'acidification lysosomale induite par l'accumulation de particules. En effet, l'inhibition de la pompe à protons responsable de l'acidification des lysosomes (H⁺-ATPase) prévient l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à certaines particules [170]. Ce processus d'acidification entraînerait un gonflement des lysosomes dont résulterait la perte d'intégrité membranaire et la libération du contenu de ces organites dans le cytosol. Un relargage massif de Na⁺ et de Ca²⁺ est observé, induisant l'augmentation de l'osmolarité cellulaire associée à un influx d'eau ce qui a pour conséquence de diminuer la concentration intra-cellulaire de K⁺ et donc l'activation de NLRP3 [125,134,141,175].

En outre, le flux de calcium provenant du lysosome peut conduire à l'activation de la kinase CAMK2, entraînant l'activation d'autres kinases, qui activent à leur tour NLRP3 et l'inflammasome [176]. En plus, les pyroptosomes ASC extra-cellulaires relargués par des cellules pyroptotiques peuvent être phagocytés par les cellules voisines, déstabilisant l'intégrité des lysosomes. Ceci permet la libération des pyroptosomes dans le cytosol et le recrutement rapide de la caspase-1 menant à l'activation de l'inflammasome NLRP3 [64,67].

1.2.2.2.4 Activation par la dissociation du réseau trans-golgi

Beaucoup plus récemment, un quatrième type de stress cellulaire déclenché par différents stimuli de NLRP3 a été identifié, il s'agit du désassemblage du réseau trans-golgi (TGN). Alors que le rôle de l'appareil de Golgi dans la translocation de NLRP3 et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 est de mieux en mieux caractérisé [168,177], Chen et Chen ont constaté que les agonistes de NLRP3 induisent la dispersion du réseau trans-golgi (dTGN) nécessaire au recrutement et à l'activation de NLRP3 [169]. En effet, les activateurs de NLRP3 déclenchent une réorganisation de la face de maturation du Golgi (trans-Golgi), qui passe d'une structure compacte périnucléaire à un réseau dispersé, coïncidant avec la distribution de NLRP3 en de multiples points (**Figure 16**) [169,178,179]. De plus, cette étude démontre que le recrutement de NLRP3 au dTGN dépend d'une région polybasique positivement chargée localisée entre les domaines PYD et NATCH de NLRP3, qui interagit avec le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), un phospholipide accumulé à la membrane des endosomes en réponse aux agonistes de NLRP3 (**Figure 16**) [169,180]. Par ailleurs, d'autres études suggèrent que le recrutement de NLRP3 à la membrane des vésicules du dTGN est nécessaire à son transport vers le centre

d'organisation des microtubules (MTOC) où réside la protéine NEK7, nécessaire à l'activation de NLRP3 comme évoqué précédemment [107,181]. Néanmoins, les vésicules identifiées comme du trans-Golgi dispersé ont depuis été caractérisées par Zhang et al. pour être d'origine plutôt endosomale suite à une perturbation du trafic des vésicules endosomales entre le réticulum endoplasmique et le réseau trans-golgi [179]. Ceci pourrait être le point commun de certains activateurs de NLRP3.

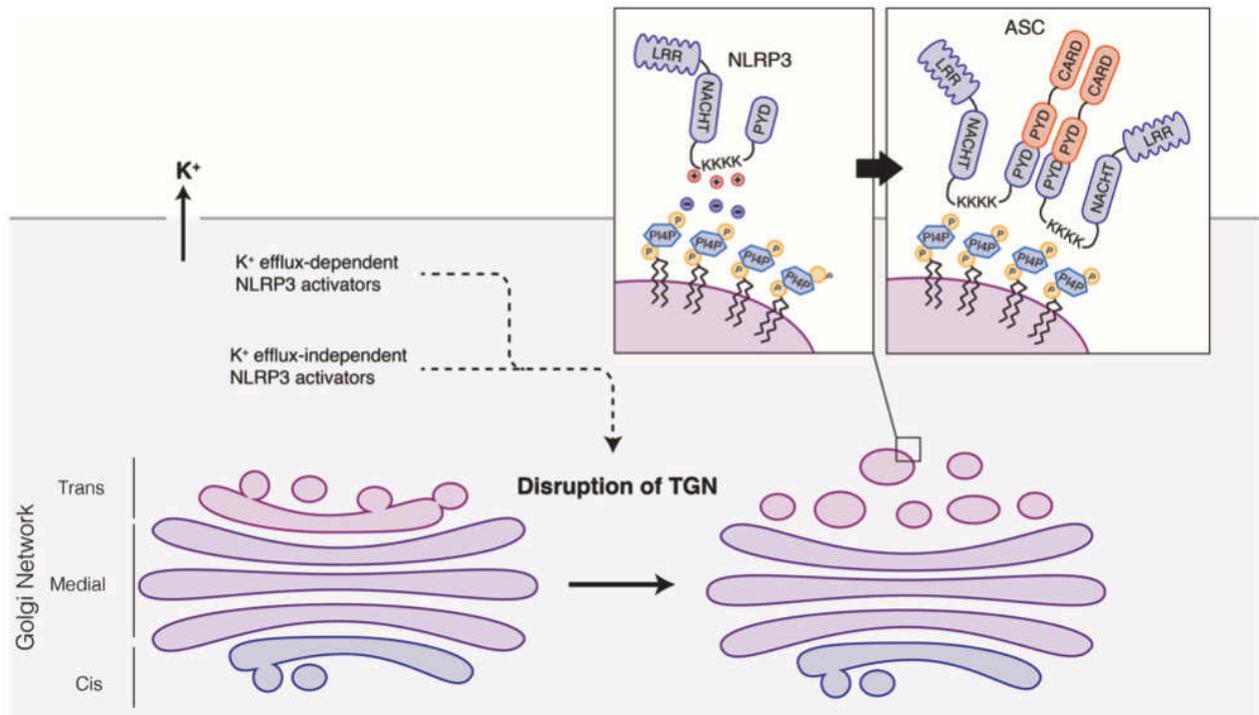


Figure 16. Activation de l'inflammasome NLRP3 par le réseau trans-golgien. Les agonistes de NLRP3 induisent le désassemblage du réseau trans-golgien (TGN) et le recrutement de NLRP3 à la membrane des vésicules du TGN dispersé (dTGN) via l'interaction avec le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P). La liaison ionique entre le motif polybasique (KKKK) de NLRP3 et les charges négatives des PI4P permet d'agréger NLRP3 sur le dTGN, nécessaire au recrutement de la protéine adaptatrice ASC (K. W. Chen, D. Boucher1 and P. Broz 2019).

1.2.3 Les activations non canonique et alternative de l'inflammasome NLRP3

L'activation non canonique

Comme évoqué précédemment, l'inflammasome non canonique médié par les caspase-4/5 chez l'Homme et la caspase-11 chez la souris, participe à l'activation de l'inflammasome NLRP3 après l'infection par des bactéries à gram négatif [84,85,182]. Le mécanisme par lequel les caspases-4/5/11 activent l'inflammasome NLRP3 n'est pas tout à fait clair mais semble reposer sur l'induction d'un efflux de potassium [126]. Une première hypothèse propose que la formation des pores de GSDMD consécutive à l'activation des caspases-4/5/11 induit une perméabilisation de la membrane plasmique entraînant un flux de potassium vers le milieu extra-cellulaire, ce qui active NLRP3 en retour [84,182]. D'autres travaux suggèrent que la caspase-11 activée aurait pour substrat la pannexine-1, dont le clivage entrainerait l'ouverture permettant d'une part un efflux de K⁺, et d'autre part, le relargage d'ATP dans le milieu extra-

cellulaire [127,183,184]. De façon autocrine et paracrine, l'ATP active à son tour le récepteur P2X7 qui induit un efflux massif de K^+ et l'activation de l'inflammasome NLRP3 [127,183,185]. La production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 dépendante de l'inflammasome NLRP3 est de cette façon indirectement régulée par l'inflammasome non canonique. Néanmoins, les caspases-4/5/11 contrôlent directement leur sécrétion à travers les pores de GSDMD formés à la suite de l'activation de l'inflammasome non canonique mais aussi en ciblant le canal potentiel des récepteurs transitoires 1 (TRPC1). En effet, Py et al. ont découvert que ce canal cationique est un substrat de la caspase-11 qui clive TRPC1 en réponse au LPS, induisant la dégradation du canal nécessaire à la sécrétion optimale d'IL-1 β [77].

Les activations alternatives

Une première voie alternative a été caractérisée dans les monocytes humains, où une longue stimulation de LPS seul est capable d'activer la caspase-1 et l'inflammasome NLRP3 et de déclencher la pyroptose sans nécessiter un signal d'activation [186,187]. La sécrétion d'ATP par les monocytes en réponse au signal d'amorçage pourrait alors agir de façon autocrine comme un signal d'activation et favoriser la sécrétion d'IL-1 β [185]. Une étude *in vivo* sur des cellules dendritiques murines révèle une signalisation similaire, dans lesquelles la sécrétion d'IL-1 β dépendante de la caspase-1 et de NLRP3 est médiée par du LPS seul et indépendante des flux de K^+ [188]. Par ailleurs, il a été mis en évidence une voie de signalisation alternative de l'inflammasome NLRP3 qui promeut la sécrétion de l'IL-1 β sans provoquer de pyroptose ni l'assemblage de pyroptosomes ASC. C'est dans une lignée cellulaire de monocytes/macrophages humains trans-différenciés que Gaidt et al. ont montré que la stimulation du TLR4 par du LPS seul active l'inflammasome NLRP3 indépendamment de ASC et d'un efflux de K^+ , à travers un axe qui comprend l'adaptateur TRIF, la kinase RIPK1, la protéine FADD et la caspase-8 [133]. Enfin, la nécroptose, un type de mort cellulaire inflammatoire exécutée par RIP3 et la protéine pseudo-kinase à domaine kinase de lignée mixte (MLKL), active également l'inflammasome NLRP3. En effet, les pores formés par MLKL dans la membrane plasmique induisent un efflux de K^+ qui déclenche l'activation de NLRP3 [189].

1.3 Les modulations physiologiques de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est le plus étudié et le plus caractérisé des inflammasomes canoniques, notamment parce qu'il soutient le système immunitaire pour combattre un large spectre de dangers, aussi bien environnementaux (UV), pathogènes (bactéries, virus), qu'endogènes (ATP) (**Table 1**). Il est considéré comme un composant essentiel du système immunitaire inné. A l'inverse, une activation aberrante de cet inflammasome induite par une mutation de l'une des protéines qui le composent entraîne des troubles inflammatoires ; de la même manière que son activation chronique au cours de certaines pathologies inflammatoires contribue au développement de celles-ci [106,190–194]. Il est donc essentiel que l'activation de l'inflammasome NLRP3 soit finement régulée afin d'assurer une protection immunitaire adéquate sans causer de dommages aux tissus de l'hôte. De ce fait, plusieurs mécanismes, y compris les modifications post-traductionnelles des acteurs de l'inflammasome, des partenaires d'interaction et autres processus cellulaires, ont été identifiés et impliqués dans la régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3.

1.3.1 Les modifications post-traductionnelles (MPTs)

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) influencent de nombreux aspects de la fonction d'une protéine dont son activité, sa dégradation, sa localisation, sa structure et ses interactions avec d'autres protéines. Elles sont donc essentielles pour réguler rapidement l'activité biologique d'une protéine et de multiples MPTs de NLRP3 mais aussi des autres acteurs de l'inflammasome ont été identifiées pour réguler aussi bien le priming que l'activation de l'inflammasome NLRP3 [70,114,195–197]. Parmi ces modifications, l'ubiquitination et la phosphorylation de NLRP3 sont les mieux caractérisées.

1.3.1.1 Les MPTs de NLRP3

Ubiquitination/déubiquitination de NLRP3

L'ubiquitination consiste en l'attachement covalent de une ou plusieurs ubiquitines (chaîne d'ubiquitine) à des résidus de lysine (K) aux protéines substrats cibles via des liaisons isopeptidiques catalysées par les protéines ligases d'ubiquitines E3 (E3s) [198]. Les ubiquitines possèdent également des résidus de lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) à partir desquels les ubiquitines se lient entre elles pour former une chaîne de polyubiquitines [198]. Py et al. ont été les premiers à rapporter le rôle de l'ubiquitination dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (**Figure 17**), en inhibant la déubiquitination par l'inhibiteur d'isopeptidases G5, qui bloque l'activation de l'inflammasome NLRP3 [199]. Dans le même temps, une autre étude confirme ces résultats avec un autre inhibiteur d'enzymes de déubiquitination (DUBs), le b-AP15 [200].

Dans les cellules au repos, NLRP3 est constitutivement ubiquitinée ce qui permet de maintenir un faible niveau basal de la protéine, médié notamment par sa dégradation. Par exemple, la protéine FBXL2 (*F-Box and leucine rich repeat protein 2*) se lie à NLRP3 au niveau de son domaine LRR et assure son ubiquitination sur la lysine 689 (K689), déclenchant son adressage au protéasome pour y être dégradée [201]. La protéine FBXL2 est elle-même ubiquitinée et dégradée par le protéasome via une autre protéine à boîte F, FBXO3 (*F-Box protein 3*), qui est surexprimée suite à une stimulation par du LPS lors de l'étape de priming, allongeant de ce fait le temps de demi-vie de NLRP3, alors disponible pour former l'inflammasome NLRP3 [201]. Deux autres E3s, RNF125 (*ring finger protein 125*) et Cbl-b (*casitas B-lineage lymphoma (Cbl) proto-oncogen B*), participent à la dégradation protéosomale de NLRP3 par une ubiquitination séquentielle [202]. Dans un premier temps, la protéine RNF125 ajoute une chaîne d'ubiquitines reliées par K63 (chaîne K63) au domaine LRR de NLRP3, recrutant Cbl-b qui ajoute à son tour une chaîne K48, entraînant la dégradation de NLRP3 [202]. De plus, en liant NLRP3, la protéine ARIH2 (*ariadne homolog 2*) polyubiquitine le domaine NACHT de NLRP3 et dégrade NLRP3 [203]. Par ailleurs, Song et al. ont mis en évidence une boucle de rétrocontrôle négative médiée par la protéine TRIM31 (*tripartite motif-containing protein 31*), dont l'expression est augmentée simultanément à celle de NLRP3 en réponse à du LPS lors de l'étape de priming. Son interaction directe avec NLRP3 cause la polyubiquitination du domaine PYD ainsi que la dégradation protéosomale de NLRP3, prévenant de cette façon une hyperactivation de l'inflammasome [204]. De façon similaire, NLRP3 peut être dégradée par autophagie, notamment suite à l'activation du récepteur D1 de la dopamine (DRD1) qui induit la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) capable de lier NLRP3 [205]. Cette interaction déclenche alors l'ajout d'une chaîne K48 au domaine LRR de NLRP3 par la ligase E3 MARCH7 (*Membrane*

associated ring-CH-type finger 7), induisant la dégradation de NLRP3 à la suite d'un processus autophagique [205]. En outre, des processus d'inactivation de NLRP3 médiés par des ubiquitinations ont aussi été caractérisés. La ligase E3, Cullin1, ubiquitine NLRP3 en interagissant avec elle à l'état basal et empêche son assemblage avec ASC [206]. D'autres E3s comme les protéines chaperonnes SGT1 (ou SUGT1) (*suppressor of G2 allele of S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1)*) et HSP90 (*heat shock protein 90*) maintiennent NLRP3 sous forme inactive au repos [207]. Un signal d'activation (comme la nigéricine ou l'ATP) est nécessaire ensuite pour dissocier ces ligases E3 de NLRP3 et permettre la formation de l'inflammasome [206,207].

Cependant, plusieurs études montrent que l'ubiquitination peut réguler positivement l'activation de NLRP3. Par exemple, la polyubiquitination de NLRP3 par la ligase E3 Pellino2 favorise l'activation de NLRP3 durant l'étape d'amorçage [208]. Il semblerait néanmoins qu'il soit ensuite nécessaire d'enlever cette chaîne d'ubiquitines, notamment par la DUB BRCC3 (*BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3*) durant l'étape d'activation pour permettre l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 [208]. De plus, la ligase E3 TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) semble être un régulateur positif de NLRP3, à travers la polyubiquitination de NLRP3, favorisant son oligomérisation et son interaction avec ASC [209].

À l'inverse, la déubiquitination de NLRP3 est essentielle à l'activation de l'inflammasome NLRP3 afin de lever les inhibitions induites par les E3s. Les enzymes de déubiquitination (DUBs) sont recrutées au cours de l'activation de l'inflammasome et dépendent notamment des signalisations en aval des TLRs et de la protéine Myd88 [115]. Py et al. ont notamment identifié l'enzyme BRCC3 (chez la souris)/BRCC36 (chez l'Homme) comme indispensable pour l'oligomérisation de NLRP3 en contrôlant la déubiquitination du domaine LRR de NLRP3. En effet, en réponse à un signal d'activation, la sous-unité ABRO1 (*abraxas brother 1*) de BRCC3 se lie directement à NLRP3, recrutant l'ensemble du complexe BRCC3 qui enlève spécifiquement les ubiquitines liées par K63 du domaine LRR, participant ainsi à l'activation de NLRP3 [199]. D'autres DUBs participent à l'activation de NLRP3, comme les peptidases 7 et 47 spécifiques de l'ubiquitine (USP7 et USP47) en réponse à la nigéricine [210], ou encore le stimulateur des gènes de l'IFN (STING) qui interagit directement avec NLRP3 suite à une stimulation par le virus Herpes simplexe de type 1 (HSV-1) et supprime les chaînes K48 et K63 de NLRP3, facilitant ainsi l'activation de l'inflammasome [211].

L'ensemble de ces études suggère que, dans la plupart des cas, l'ubiquitination régule négativement l'activation de NLRP3 en induisant la dégradation de NLRP3 ou en perturbant l'assemblage de l'inflammasome, alors que la déubiquitination de NLRP3 favorise la formation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 17**).

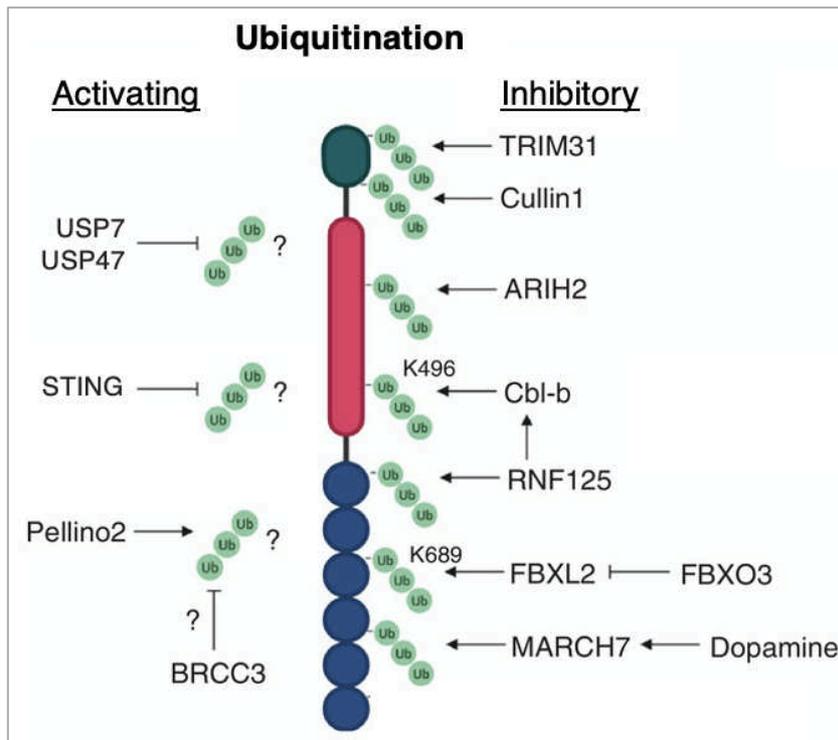


Figure 17. L'ubiquitination de NLRP3. L'activation de l'inflammasome NLRP3 est régulé avec précision au travers notamment de modifications post-traductionnelles de la protéine NLRP3 dont l'ubiquitination (Ub) et la déubiquitination des lysines (K) jouent un rôle essentiel. Ces modifications peuvent à la fois activer ou inhiber NLRP3. Adaptée de (C. M. McKee et R. C. Coll 2020).

Phosphorylation/déphosphorylation de NLRP3

Les activités de nombreuses kinases (enzyme catalysant les phosphorylations) et phosphatases (enzymes qui enlèvent les groupements phosphate) doivent être coordonnées pour permettre à la fois l'amorçage et l'activation du NLRP3 (**Figure 18**).

Plusieurs études ont fait état de la phosphorylation de NLRP3 comme mécanisme potentiel de régulation négative de l'activation de l'inflammasome. À l'état basal, la protéine kinase ciblant les sérines et thréonine (AKT) limite l'activation de NLRP3 en phosphorylant la sérine 5 (S5) du domaine PYD de NLRP3, ce qui inhibe les interactions homotypiques PYD-PYD par répulsion électrostatique entre NLRP3 et ASC [212]. La déphosphorylation de la S5 par la phosphatase 2A (PP2A) permet de lever cette inhibition en réponse à un signal d'activation comme la nigéricine [213]. Fischer et al. ont récemment montré que les kinases TBK1 (*TANK binding kinase 1*) et IKK ϵ (*I κ B kinase (IKK) subunit epsilon*) coopèrent pour contrôler AKT et contrer PP2A pendant l'étape d'amorçage [214]. Une autre étude suggère que la tyrosine kinase de Bruton (BTK) se comporte également comme un inhibiteur de PP2A durant le priming. BTK se lie à NLRP3 suite à une stimulation par du LPS, puis se dissocie en réponse à un second signal d'activation, permettant l'activation de NLRP3 par PP2A [215]. Le résidu tyrosine 861 (Y861) du domaine LRR est aussi la cible de phosphorylations, entraînant la séquestration et la dégradation de NLRP3 dans les autophagosomes, empêchant une activation aberrante de NLRP3 dans les cellules au repos [216]. L'exposition des macrophages à des stimuli activateurs de NLRP3 dont l'ATP ou du MSU, induit la déphosphorylation de la Y861 par la tyrosine phosphatase non réceptrice de type 22 (PTPN22) qui interagit avec NLRP3, ce qui réduit sa dégradation et favorise la formation de l'inflammasome NLRP3 [216,217]. De façon similaire à PTPN22, la protéine homologue de la phosphatase et de la tensine (PTEN), déphosphoryle la tyrosine 32 du domaine PYD de NLRP3, permettant l'interaction avec ASC et donc l'assemblage de l'inflammasome [218]. Dans le domaine NACHT de NLRP3, la sérine 295 (S295) subit une

phosphorylation inhibitrice par la protéine kinase A (PKA) en réponse à la stimulation par des acides biliaires ou la prostaglandine E₂ (PGE₂) suite à l'activation du récepteur 5 Takeda couplé aux protéines G (TGR5) et du récepteur 4 pour les prostanoides E (EP4), respectivement [219–221]. En effet, la production d'AMPc cytosolique résultante de ces signalisations active la PKA qui phosphoryle NLRP3 menant à l'inhibition de l'activité ATPase du domaine NACHT, essentielle pour l'oligomérisation de NLRP3. C. Guo et al. démontrent que la phosphorylation de ce résidu déclenche l'ubiquitination des lysines 48 et 63, inactivant NLRP3 sans induire sa dégradation [221].

Par ailleurs, des interactions entre phosphorylation et déubiquitination ont été observées. C'est le cas de la phosphorylation du résidu sérine 198 (S198) (chez l'Homme ; sérine en position 194 chez la souris) qui représente une étape importante commune aux primings transcriptionnel et non-transcriptionnel de NLRP3 [222]. La phosphorylation de cette sérine est médiée par la kinase JNK1 (*c-Jun N-terminal protein kinase*) et requise pour recruter BRCC3 qui enlève ensuite les chaînes d'ubiquitine du domaine LRR de NLRP3, permettant son activation et son oligomérisation [199]. Il s'agit d'un résidu critique pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 puisque le blocage de la phosphorylation de la S194 prévient son activation dans les syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS), syndrome inflammatoire causé par une activation excessive de l'inflammasome NLRP3 [222,223]. Comme évoqué précédemment, NLRP3 est aussi phosphorylé dans le domaine LRR sur la sérine 803 (S803) par CSNK1A1 pendant l'étape d'amorçage alors que la déphosphorylation de ce résidu en réponse à un signal d'activation permet de recruter NEK7 à NLRP3, ce qui favorise la déubiquitination et l'activation de NLRP3 médiée par BRCC3 [118].

Il est important de noter que la phosphorylation de NLRP3 n'est pas toujours associée à une régulation négative, illustrée plus tôt par la phosphorylation médiée par la kinase JNK1. La kinase 1 activée par p21 (PAK1), induit l'activation de NLRP3 en réponse à une toxine de *Escherichia coli*, à travers la phosphorylation de la thréonine 659 (T659), nécessaire pour l'interaction entre NLRP3 et NEK7 et la maturation de la cytokine Il-1 β [224]. D'autres kinases, comme la kinase 1 régulée par un signal extracellulaire (ERK1), sont impliquées dans la formation de l'inflammasome NLRP3 mais il n'est pas certain que NLRP3 soit leur cible [225].

Il a été rapporté que les phosphorylations de NLRP3 peuvent être impliquées dans la localisation subcellulaire de NLRP3, et régulent ainsi son activation. Une kinase est notamment connue pour contrôler le mouvement des composants de l'inflammasome NLRP3 à travers les différents compartiments cellulaires, il s'agit de la protéine kinase D (PKD). En effet, certains agonistes de NLRP3 déclenchent, d'une part, le regroupement des MAM au niveau de l'appareil de Golgi, et d'autre part, l'accumulation de diacylglycérol à la membrane du Golgi associée au recrutement et à l'activation de la PKD [168]. Cette dernière phosphoryle alors NLRP3 qui est associée aux MAM sur la sérine 295 (S295) entraînant la libération de NLRP3 des MAM vers le cytoplasme, ce qui permet l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Il existe donc deux effets opposés pour une même sérine phosphorylée, médiés par la PKA et la PKD, ce qui suggère que les fonctions qui y en découlent dépendent peut-être d'autres partenaires protéiques ou de la localisation subcellulaire de NLRP3. Zhang et al. montrent que l'activité de la PKD se fait en aval du regroupement des MAM et des lésions mitochondriales, ce qui évoque une régulation à la fois dans le temps et localement de la phosphorylation de la S295 [168]. Par ailleurs, il a été rapporté que la kinase BTK semble favoriser l'activation de NLRP3 puisqu'en se

liant à NLRP3 et ASC, elle phosphoryle la région polybasique et le domaine FISNA entre les domaines PYD et NACHT, responsables de la translocation de NLRP3 du Golgi intact au Golgi dispersé (dTG), nécessaire à la formation de l'inflammasome [226–228]. Évoquée ultérieurement, la kinase BTK fonctionne aussi comme un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3 en ciblant la sérine 5 (S5) [215]. Cette kinase semble donc jouer un rôle double dans la régulation de l'activation de NLRP3 en fonction du résidu qu'elle cible. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre son implication dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

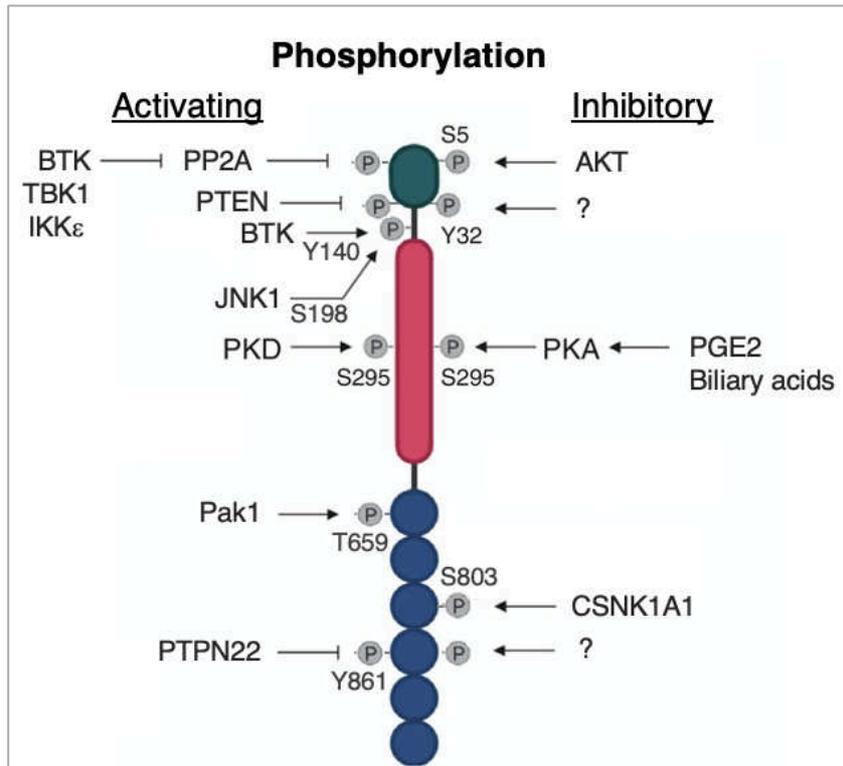


Figure 18. La phosphorylation de NLRP3. L'activation de l'inflammasome NLRP3 est finement régulée au travers notamment de modifications post-traductionnelles de la protéine NLRP3 dont la phosphorylation (P) et la déphosphorylation des sérines (S), tyrosines (Y) et thréonines (T) jouent un rôle essentiel. Ces modifications peuvent à la fois activer ou inhiber NLRP3. Adaptée de (C. M. McKee et R. C. Coll 2020).

Les autres MPTs de NLRP3

Plus récemment, de nombreuses études ont révélé l'implication d'autres MPTs dans l'activation de NLRP3, parmi lesquelles des sumoylations, des acétylations ou encore des nitrosylations [229–232]. Par exemple, la sumoylation consiste en l'attachement covalent de petites protéines modificatrices de type ubiquitine (SUMO) sur les résidus lysine de NLRP3. À l'état basal, la ligase E3 de SUMO MAPL (*mitochondrial-anchored protein ligase*) sumoyle et inhibe NLRP3 alors que les protéases 6 et 7 spécifiques de la sentine (SEN6 et SEN7) désumoyle NLRP3 en réponse à un signal d'activation, favorisant l'activation de l'inflammasome [229]. D'autres MPTs de NLRP3 moins bien caractérisées comprennent l'alkylation qui régule l'activation de l'inflammasome en empêchant l'activité ATPase de NLRP3 [233] et l'ADP-ribosylation qui est essentielle pour l'activation de NLRP3 notamment à la suite d'une infection par des mycoplasmes [234].

1.3.1.2 Les MPTs des autres acteurs de l'inflammasome

En plus de la régulation directe de l'activation de NLRP3, les MPTs régulent l'inflammasome NLRP3 à travers la modulation de l'activité biologique des autres composants comme les protéines ASC, caspase-1, NEK7 ou même la cytokine IL-1 β .

Dans les cellules au repos, ASC peut faire l'objet de phosphorylations inhibitrices, prévenant ainsi une activation spontanée de l'inflammasome NLRP3. La kinase IKK α (*I κ B kinase (IKK) subunit alpha*) phosphoryle le domaine CARD de ASC sur les sérines 16 et 193, induisant la séquestration de ASC dans le noyau alors qu'un stimulus NLRP3 semble déclencher la déphosphorylation de IKK α par PP2A, supprimant son activité kinase et levant l'inhibition sur ASC [235]. À l'inverse, en présence d'un signal de priming comme le LPS, la translocation de ASC vers la région périnucléaire est médiée par la kinase IKKi (*IKK-related kinase*) au travers de la phosphorylation de S58, nécessaire à la formation de l'inflammasome NLRP3 dans le cytoplasme [235]. D'autres études ont montré l'implication des kinases Syk (*spleen associated tyrosine kinase*) et JNK1 dans les macrophages. La phosphorylation de ASC dans le domaine CARD sur la tyrosine 146 par ces kinases régule son oligomérisation et la formation des pyroptosomes ASC ainsi que le recrutement de la pro-caspase-1 [236,237]. Chung et al. ont proposé que l'activation de la tyrosine kinase 2 riche en proline (PYK2) par Syk en réponse à des activateurs de NLRP3, induit la phosphorylation de ASC et son activation [238]. De plus, il a été proposé que la kinase BTK qui interagit avec NLRP3 et ASC, participe également à l'activation de l'inflammasome en phosphorylant ASC [226]. Cette protéine adaptatrice est aussi la cible de tyrosine phosphatases qui favorise la formation de pyroptosomes ASC et de l'inflammasome NLRP3 [239]. En plus d'être phosphorylée sur plusieurs sites, ASC est également ubiquitinée au cours de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Lors d'un signal d'amorçage tel que le LPS, la protéine ASC se retrouve polyubiquitinée pour être dégradée par autophagie. À l'inverse, le second signal d'activation permet sa déubiquitination par la peptidase 50 spécifique de l'ubiquitine (USP50), induisant son oligomérisation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 dans les macrophages [240]. Comme évoqué précédemment, certaines infections virales déclenchent la signalisation médiée par la protéine MAVS à la mitochondrie qui sert alors de plateforme pour recruter ASC et TRAF3 qui stabilise ASC à la suite de son ubiquitination sur la lysine 174, favorisant ainsi l'activation de l'inflammasome NLRP3 [166]. De façon similaire, le complexe d'assemblage d'ubiquitination linéaire (LUBAC) assure l'ubiquitination linéaire de ASC, essentielle à l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages [241].

Un autre partenaire de NLRP3, NEK7, est aussi régulé par des MPTs, influençant l'activité de l'inflammasome NLRP3. En effet, la kinase 4 de type polo (PLK4) inhibe l'association de NEK7 à NLRP3 en phosphorylant NEK7 sur la sérine 204, ce qui empêche l'activation de l'inflammasome NLRP3 [242]. NEK7 est aussi la cible d'une déglutathionylation médiée par la glutathion S-transférase oméga-1 (GSTO1-1) qui favorise l'activation de l'inflammasome NLRP3 [243].

La caspase-1, la pro-IL-1 β et la GSDMD sont également régulées par des MPTs qui peuvent avoir un impact sur l'activité de NLRP3. Par exemple, les inhibiteurs cellulaires de la protéine apoptotique 1 et 2 (cIAP1 et cIAP2) induites par le LPS, catalysent l'ajout d'une chaîne d'ubiquitines liée à K63 sur la caspase-1, nécessaire à son activation [244]. Au contraire,

l'ubiquitination linéaire de la caspase-1 dans son domaine CARD par LUBAC supprime son activité [245]. En plus, la kinase PAK1 participe à activer la caspase-1 en la phosphorylant suite à l'exposition au LPS d'un pathogène spécifique, *Helicobacter pylori* [246]. Concernant la pro-IL-1 β , sa maturation est aussi soumise à une régulation médiée par des MPTs et nécessite notamment d'être ubiquitinée pour subir un clivage protéolytique médié par la caspase-1 et produire une cytokine mature [247]. La protéine kinase RIPK3 participe à l'ubiquitination de la pro-IL-1 β alors que la déubiquitinase A20 empêche sa maturation et sa libération spontanée en réponse au LPS seul, en supprimant les chaînes d'ubiquitine de la lysine 133, régulant par conséquent, négativement l'inflammasome NLRP3 [247,248]. Enfin, Wang et al. ont montré que l'oxydation de la GSDMD induite par les mtROS augmente l'efficacité du clivage de la GSDMD par la caspase-1.

Ainsi, l'abondance et la redondance des MPTs soulignent l'importance de la régulation de la voie de l'inflammasome NLRP3. Il est cependant nécessaire d'engager de futures recherches afin de mieux caractériser la façon dont les MPTs coopèrent pour influencer l'activation de NLRP3 et l'assemblage de l'inflammasome.

1.3.2 La régulation par des partenaires protéiques d'interaction

1.3.2.1 La protéine kinase 7 apparentée à NIMA (NEK7)

À travers un criblage CRISPR (*clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) à l'échelle du génome, Schmid-Burgk et al. ont identifié NEK7 comme un régulateur critique de l'activation de l'inflammasome NLRP3 [249]. Appartenant à la famille des kinases apparentées à NIMA (*never in mitosis gene a*), cette protéine était initialement connue pour le rôle qu'elle joue dans la formation des fuseaux mitotiques et la progression mitotique [157,250].

Plusieurs études ont depuis démontré que NEK7 est un composant essentiel et spécifique de l'inflammasome NLRP3 [109,131,157,249]. La liaison de NLRP3 avec ce partenaire d'interaction directe est nécessaire pour l'activation et l'oligomérisation de NLRP3, et par conséquent il est indispensable pour la formation des pyroptosomes ASC et l'activation de la caspase-1 (**Figure 19**) [109]. L'interaction entre NLRP3 et NEK7 est déclenchée en réponse à la combinaison des stimuli d'amorçage et d'activation et se caractérise par une liaison entre le domaine catalytique de NEK7 et les domaines NOD et LRR de NLRP3. Sharif et al. ont décrit qu'il s'agit d'une complémentarité électrostatique entre NLRP3 chargé négativement et NEK7 chargée positivement, l'activité kinase de NEK7 n'étant donc pas requise. De cette façon, NEK7 joue le rôle de médiateur dans la formation des interactions bipartites entre les sous-unités adjacentes de NLRP3, induisant un changement de conformation de NLRP3. Ceci permet alors la dissociation de la structure en cage inactive vers une forme active [109,131,251]. Néanmoins, suite au recrutement de NEK7, la protéine NLRP3 est observée en conformation semi-ouverte considérée comme semi-inactive, suggérant la liaison à NEK7 comme une étape intermédiaire pour passer d'un état fermé de NLRP3 (conformation inactive) à un état pleinement ouvert (conformation active) capable d'engager une interaction avec ASC [130]. Comme évoqué précédemment, un autre partenaire régule par ailleurs cette étape, la protéine RACK1, qui facilite la liaison entre NLRP3 et NEK7 en interagissant avec les deux protéines (**Figure 19**) [110].

NEK7 est décrit comme un switch cellulaire entre la mitose et l'activation de l'inflammasome NLRP3 puisque lorsqu'il est localisé aux fuseaux mitotiques durant le cycle cellulaire, il est en quantité insuffisante pour participer à la formation de l'inflammasome NLRP3 [157]. Il prévient

donc l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules en division dont le cytoplasme se retrouve particulièrement enrichi avec des ligands endogènes qui pourraient être considérés comme des signaux de stress. Ainsi, l'ensemble des stimuli NLRP3 testés dans les différents modèles *vivo* et *in vitro* utilisés montre qu'il s'agit d'un régulateur essentiel de l'inflammasome NLRP3. Cependant, une étude semble suggérer que certains signaux d'amorçage pourraient activer NLRP3 indépendamment de NEK7, et appelle donc à de futurs travaux pour confirmer ces résultats [252].

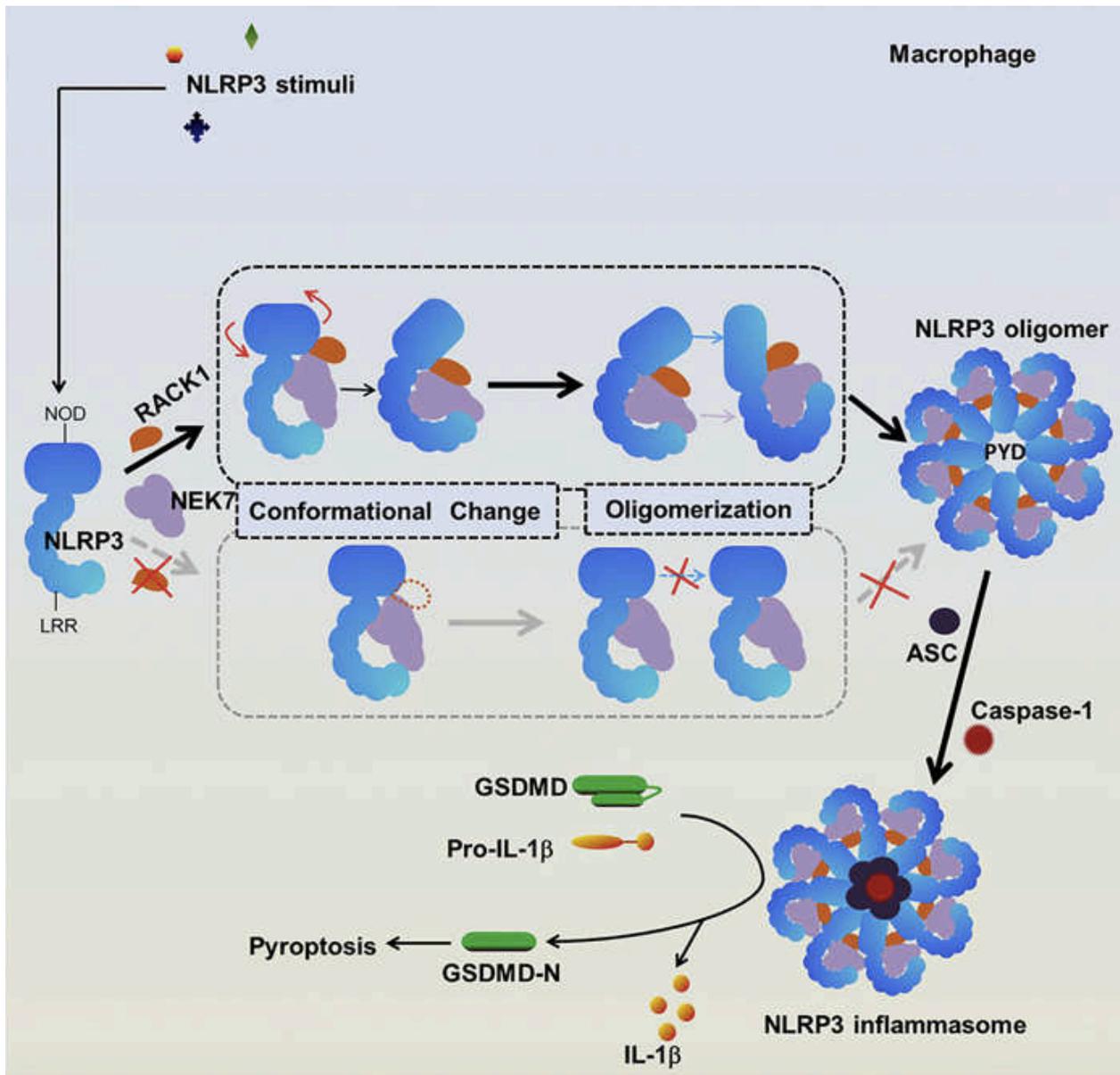


Figure 19. NEK7 et RACK1 contrôlent l'activation de NLRP3. En réponse à des stimuli de NLRP3, NEK7 se lie à NLRP3, dont l'interaction est favorisée par RACK1 qui interagit avec les deux protéines. NEK7 et RACK1 induisent un changement de conformation de NLRP3, essentiel pour passer d'un état fermé inactif à un état ouvert actif qui permet son oligomérisation, nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et la libération d'IL-1 β (Y. Duan et al. 2020).

1.3.2.2 Les protéines à pyrine (POPs) et les protéines à CARD (COPs)

En plus des protéines qui forment l'inflammasome NLRP3, il en existe d'autres qui interagissent avec elles pour réguler les interactions homotypiques PYD-PYD et CARD-CARD médiées par les domaines PYD et CARD des différents composants de l'inflammasome (**Figure 20**) [253,254]. Cela permet aux protéines régulatrices de séquestrer les molécules contenant les domaines PYD ou CARD afin de réguler leurs activités. En effet, les protéines à domaine PYD unique (POPs) et les protéines à domaine CARD unique (COPs) sont de petites protéines qui contiennent des domaines homotypiques uniques de liaison aux protéines, jouant le rôle de leurres cytoplasmiques et fonctionnent comme des inhibiteurs endogènes de l'inflammasome NLRP3 [255]. Il est intéressant de noter que ces protéines POPs et COPs ne sont présentes que chez les primates et les humains, alors qu'elles sont totalement absentes chez les souris [254].

Les POPs

Les interactions PYD-PYD entre NLRP3 et ASC sont essentielles pour l'assemblage de l'inflammasome et sont la cible des POPs qui les régulent. Parmi les quatre membres de la famille des protéines POPs (POP1, POP2, POP3 et POP4), seuls POP1 et POP2 sont connus à ce jour pour réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3.

La protéine POP1 est exprimée dans plusieurs tissus et en particulier dans les monocytes, les macrophages et les granulocytes [256]. Son motif PYD partage 64% d'identité de séquence d'acides aminés avec le PYD de ASC, permettant sa liaison à ASC par interaction homotypique, ce qui empêche la nucléation de ASC mais aussi l'interaction avec le domaine PYD de NLRP3 (**Figure 20**) [256]. Il en résulte ainsi l'inhibition de la formation de l'inflammasome associée à l'inhibition de l'activation de la caspase-1 et de la libération d'IL-1 β . Par ailleurs, POP1 est aussi décrite comme un régulateur négatif de la signalisation NF κ B car en liant les complexes IKK, il inhibe leur activité kinase, s'opposant au priming transcriptionnel des composants de l'inflammasome comme NLRP3 et IL-1 β qui en dépend (**Figure 20**) [256]. Almeida et al. ont démontré que la protéine POP1 semble fonctionner comme un rétrocontrôle négatif puisque son expression est augmentée tardivement (plus de 4 heures) en réponse aux signalisations TLR et IL-1R. Il autorise alors une défense de l'hôte par la mise en place d'une inflammation précoce mais un amorçage à long terme prévient l'activation excessive de l'inflammasome NLRP3 et favorise la résolution de l'inflammation [257]. En adéquation avec ces résultats, l'expression transgénique de la protéine POP1 humaine dans des souris protège contre les maladies inflammatoires médiées par l'inflammasome NLRP3 dont un modèle de CAPS [257].

De façon similaire, la protéine POP2 se retrouve exprimée dans de nombreux types cellulaires et lignées dont les cellules myéloïdes comme les monocytes et les macrophages, ou les cellules lymphoïdes [258]. Malgré une similarité de séquence plus faible (37%) avec le PYD de ASC, POP2 est aussi capable d'interagir avec ASC, inhibant son oligomérisation et son interaction avec NLRP3, et par conséquent l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 20**) [259,260]. La protéine POP2 possède elle aussi une seconde activité qui cible l'activation de NF κ B et donc le priming transcriptionnel de NLRP3 et la production des cytokines. En effet, en réponse à la stimulation des TLRs par du LPS, POP2 inhibe l'accumulation nucléaire de la sous-unité p65 de NF κ B [259], qui peut être attribuée à l'inhibition de la kinase non-canonique IKK ϵ et en conséquence celle de I κ B α [260]. Étant surexprimée par des stimuli pro-inflammatoires après une longue stimulation (pic d'expression à 20 heures dans des macrophages humains) des TLRs ou de l'IL-1R, la protéine POP2 participe comme la protéine POP1 à un mécanisme de

rétrocontrôle négatif, favorisant la résolution de l'inflammation déclenchée par l'inflammasome NLRP3 [260]. Par ailleurs, POP2 participe d'autant plus à atténuer les réponses inflammatoires excessives puisque les macrophages de souris transgéniques exprimant POP2 produisent de plus grandes quantités d'IFN γ permettant une meilleure capacité des macrophages à tuer les bactéries et donc une résistance accrue aux infections bactériennes [261]. De plus, des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 induisent l'expression de la protéine POP2, démontrant son implication dans la maintenance d'un contexte anti-inflammatoire [260].

Ainsi, les protéines POP1 et POP2 sont impliquées dans l'activation de NLRP3 par des interactions directes avec ASC, et indirectement dans l'amorçage de NLRP3 via des effets sur la signalisation NF κ B (**Figure 20**). En conjonction avec d'autres mécanismes, les protéines POP1 et POP2 semblent jouer un rôle critique dans la restauration de l'homéostasie après une réponse inflammatoire induite par l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Les COPs

Trois protéines COPs ont été identifiées chez les humains, CARD16, CARD17 et CARD18, et présentent une forte homologie de séquence avec le domaine CARD de la caspase-1 [254]. Alors que les interactions CARD sont essentielles à l'assemblage de l'inflammasome, les COPs les régulent en établissant des interactions homotypiques avec la caspase-1 [253].

La protéine CARD16, aussi nommée Pseudo-ICE, a été observée dans différents tissus dont la rate, le placenta et la moelle osseuse, et dans les cellules myéloïdes comme les monocytes. Elle est la COP ayant l'identité de séquence la plus élevée (97%) avec le domaine CARD de la pro-caspase-1, lui conférant une capacité de liaison forte avec la pro-caspase-1, responsable de l'inhibition de l'auto-activation de la caspase-1 [262,263]. En effet, en réponse à des stimuli de l'inflammasome NLRP3, CARD16 s'associe elle-même en homodimère avant d'interagir avec la pro-caspase-1, interférant avec les interactions CARD-CARD entre caspases, ce qui prévient leur dimérisation et donc la formation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 β (**Figure 20**). De plus, la protéine CARD16 est aussi capable d'établir une liaison avec le domaine CARD de la kinase RIPK2, qui a été décrite comme étant un partenaire d'interaction de la caspase-1 favorisant sa polymérisation et donc son activation [264]. De cette façon, la protéine CARD16 entre en compétition avec la kinase RIPK2 pour lier la pro-caspase-1, inhibant de ce fait l'oligomérisation et l'activation de la caspase-1 associées à une moindre sécrétion d'IL-1 β [263]. De façon contradictoire, il a été rapporté que la protéine CARD16 induit l'activation de la signalisation NF κ B par sa liaison avec la kinase RIPK2 [262]. De plus, Karasawa et al. ont récemment montré que cette COP semble aussi pouvoir interagir avec le CARD de ASC et favoriser l'assemblage de la caspase-1 et la maturation de l'IL-1 β [265]. De plus amples recherches sont donc nécessaires pour élucider le rôle de CARD16 dans la régulation de l'inflammasome NLRP3.

La protéine CARD17, aussi connue comme INCA (*inhibitory CARD*), présente une identité de séquence de 81% avec le CARD de la pro-caspase-1 [266]. L'expression de la protéine CARD17 peut être détectée dans une grande variété de tissus humains, mais les niveaux d'expression les plus élevés sont observés dans le cœur, le cerveau, les poumons et les glandes salivaires [266]. Elle est par ailleurs surexprimée comme la pro-caspase-1 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, en particulier l'IFN γ . La protéine CARD17 interagit directement et spécifiquement avec la pro-caspase-1, et préférentiellement lorsque celle-ci est sous forme d'oligomères. Ainsi, elle empêche, d'une part, la liaison entre ASC et la caspase-1, et d'autre

part, la polymérisation et la formation des filaments de caspase-1, nécessaires à la formation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 20**) [266,267]. En conséquence, la protéine CARD17 bloque la sécrétion d'IL-1 β induite par du LPS dans des monocytes THP1 [266].

La protéine CARD18 (ou ICEBERG), qui était la première COP décrite en 2000, présente l'homologie de séquence la plus faible (52%) avec le domaine CARD de la pro-caspase-1 [268]. Au repos, la protéine CARD18 est principalement exprimée dans le cœur et le placenta mais des PAMPs comme le LPS ou des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF induisent son expression dans les monocytes et macrophages [262,268]. Plusieurs études ont montré la capacité de CARD18 à interagir spécifiquement et de façon homotypique avec le CARD de la pro-caspase-1, réduisant la sécrétion d'IL-1 β en réponse à des stimuli de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 20**) [262,268]. En effet, cette protéine fonctionne comme un antagoniste compétitif de la kinase RIPK2 puisque la pro-caspase-1 se lie préférentiellement à CARD18, qui peut même déplacer RIPK2 des complexes caspase-1-RIPK2 [262,268]. L'oligomérisation de la caspase-1 médiée par cette kinase se retrouve donc inhibée. Contrairement à la protéine CARD16, CARD18 n'étant pas capable de lier RIPK2, elle présente des capacités inhibitrices plus faibles. D'après une étude de Humke et al., l'expression de la protéine CARD18 est augmentée dans les monocytes après 7 heures de stimulation par du LPS ou du TNF, suggérant son implication dans un mécanisme de rétrocontrôle négatif pour réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1 β associée. Cependant, une étude récente s'oppose à l'ensemble de ces résultats en montrant que CARD18 ne parvient pas à empêcher l'activation de l'inflammasome [267].

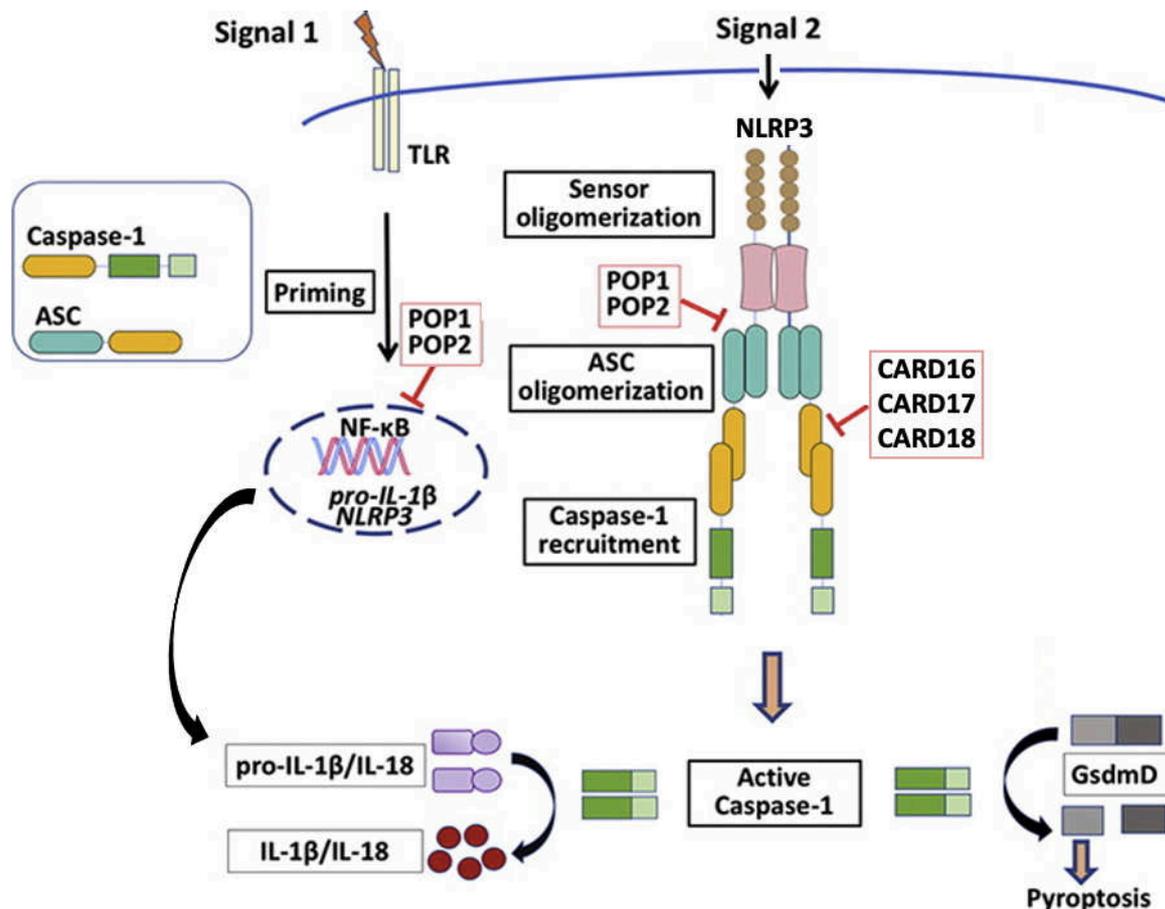


Figure 20. L'activation de l'inflammasome NLRP3 est contrôlée par les POPs et COPs. Les protéines endogènes à domaine PYD (POPs) et à domaine CARD (COPs) participent à réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les protéines POP1 et POP2 isolent la protéine adaptatrice ASC des autres composants de l'inflammasome en liant son domaine PYD et inhibe l'étape de priming en régulant la signalisation NFκB. De façon similaire, les COPs CARD16, CARD17 et CARD18 interagissent chacune avec le domaine CARD de la pro-caspase-1, l'empêchant de participer à l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Adaptée de (M. Indramohan, C. Stehlik et A. Dorfleutner 2018).

D'autres molécules endogènes ont été décrites agissant comme des COPs. Notamment, la caspase-12 et son variant tronqué, la caspase-12L, dont le rôle de régulateur négatif de l'activation de la caspase-1 a été proposé mais reste encore discuté [253]. Le variant d'épissage de ASC, ASC-c, auquel il manque la majorité du domaine PYD, semble fonctionner comme les COPs et prévenir l'activation de l'inflammasome NLRP3 *in vitro* [269].

1.3.2.3 Les autres partenaires d'interaction protéiques

De nombreuses autres protéines ont été décrites comme étant des régulateurs de l'inflammasome NLRP3. Ces molécules comprennent entre autres, la protéine interagissant avec la thiorédoxine (TXNIP), un capteur d'oxydation qui en réponse aux ROS favorise l'activation de l'inflammasome NLRP3 en interagissant directement avec NLRP3 [270] ; la protéine de liaison des guanylates 5 (GBP5) induite par le LPS, qui lie NLRP3 et dont le rôle activateur pour l'oligomérisation de ASC médiée par NLRP3 est controversé [79,271] ; l'hélicase

3 à DEAD-box liée à l'X (DDX3X) qui conduit à l'activation de NLRP3 en la liant [272] ; ainsi que la caspase-8 et FADD ayant un double rôle d'effecteur et de régulateur dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique et non-canonique [117,273,274].

Au contraire, la kinase 1 activée par le TGF- β (TAK1) agit comme un régulateur négatif qui maintient l'homéostasie en inhibant l'activation de l'inflammasome NLRP3 [275] ; de même que la petite protéine partenaire hétérodimérique (SPH) dont le maintien de l'homéostasie mitochondriale et l'inhibition compétitive de la liaison entre NLRP3 et ASC participent à bloquer l'activation de l'inflammasome NLRP3 [276]. D'autres protéines encore, telles que la protéine de choc thermique 70 (HSP70), participent à inhiber cet inflammasome en interagissant directement avec NLRP3 au repos [277].

1.3.3 Les autres mécanismes de régulation

1.3.3.1 La localisation subcellulaire

L'activation des inflammasomes repose sur l'assemblage de protéines différentes et suppose qu'elles colocalisent au moins momentanément au cours du processus d'activation. Des études récentes ont mis en évidence la régulation de la localisation subcellulaire de ces protéines comme un paramètre important qui facilite l'assemblage et l'activation des inflammasomes.

Comme évoqué précédemment, la localisation de NLRP3 à la mitochondrie médiée par certaines molécules telles que la cardiolipine, la mitofusine-2 ou encore MAVS, constitue une étape essentielle pour son activation en réponse à des stimuli spécifiques [159,162,165]. Cependant, la libération cytosolique de la protéine mitochondriale cytochrome c peut jouer un rôle régulateur en entrant en compétition avec NLRP3 pour la liaison à la cardiolipine, réduisant de ce fait l'activation de l'inflammasome NLRP3 [278].

En plus du recrutement de NLRP3 au niveau du TGN dispersé (dTGN) par sa liaison avec les phospholipides PI4P décrit précédemment [169], d'autres partenaires d'interaction permettent de réguler l'activation de NLRP3 au travers de son adressage à l'appareil de Golgi. En effet, en réponse à des stimuli de NLRP3 comme le LPS, la protéine de liaison de l'élément régulateur des stérols-2 (SREBP2) et la protéine d'activation du clivage de SREBP (SCAP) interagissent avec NLRP3 pour former un complexe ternaire capable de transloquer au Golgi. Ainsi, ces protéines contrôlent la localisation et l'activation de NLRP3 au Golgi, étape essentielle pour un assemblage optimal de l'inflammasome NLRP3 [177].

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est aussi régulée par la mobilisation de NLRP3 au MTOC qui constitue un site d'assemblage primordial puisque NEK7 est lui-même localisé au niveau du centrosome, nécessaire à la formation d'un complexe unique dans les cellules activées (**Figure 21**). Plusieurs molécules endogènes régulent le transport de NLRP3 au MTOC en interagissant directement avec NLRP3. Notamment, la kinase 4 régulant l'affinité des microtubules (MARK4) favorise l'adressage de NLRP3 au MTOC [279], alors que l'histone déacétylase 6 (HDAC6) régule négativement l'activation de l'inflammasome NLRP3 par sa liaison avec NLRP3, induisant sa séquestration dans le cytoplasme ce qui l'empêche de participer à l'assemblage de l'inflammasome [280]. Cependant, une étude plus récente démontre que HDAC6 est au contraire impliquée dans le transport de NLRP3 vers le MTOC, favorisant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 21**) [181].

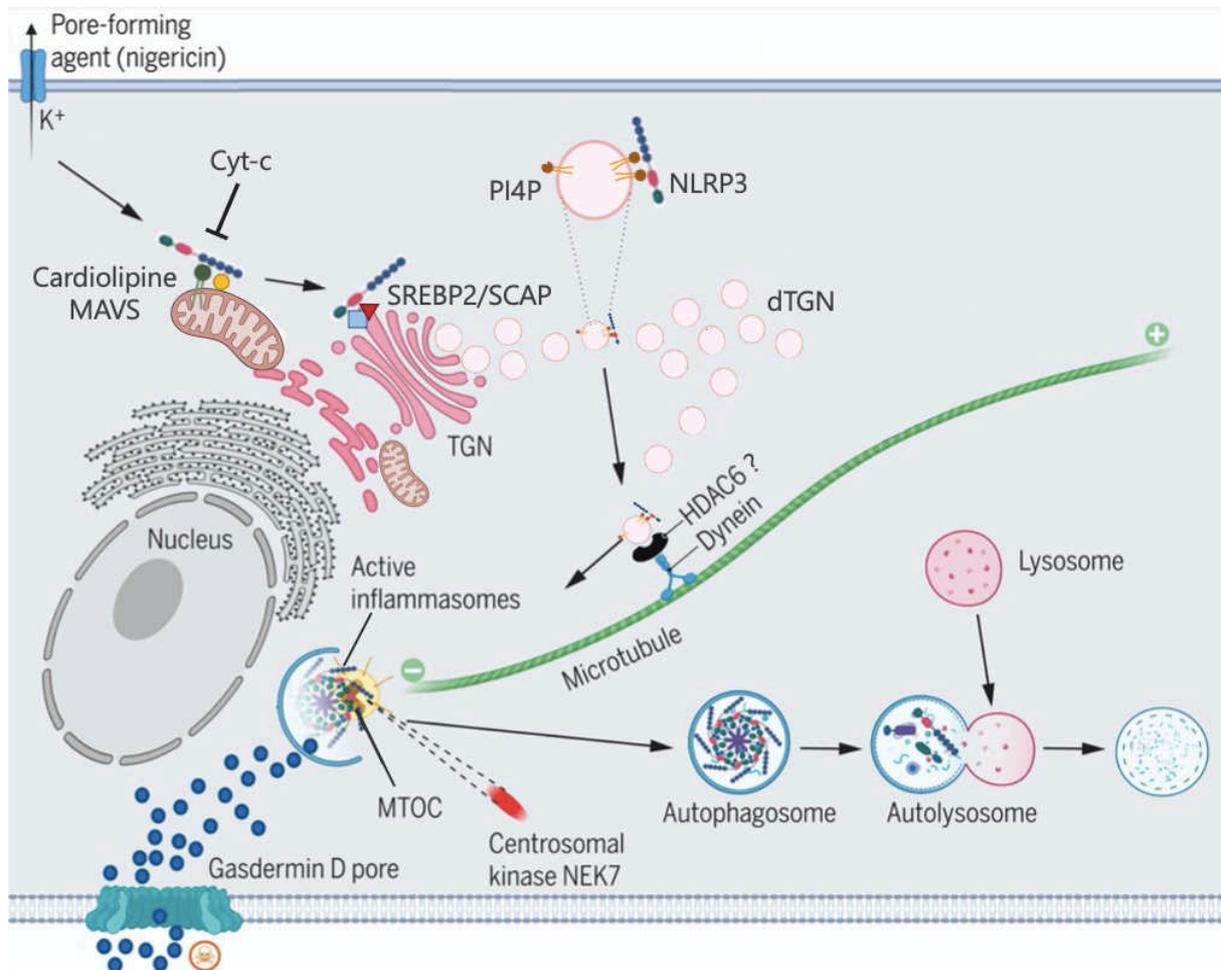


Figure 21. La régulation de l'inflammasome NLRP3 en fonction de sa localisation subcellulaire. Les agonistes de NLRP3 (la nigéricine, par exemple) induisent d'abord le recrutement de NLRP3 à la mitochondrie, notamment par sa liaison à la cardiolipine, dont l'interaction peut être inhibée par le cytochrome c (Cyt-c). Ensuite, la translocation de NLRP3 au réseau trans-golgien (TGN), médiée par SREBP2/SCAP, permet son recrutement à la membrane des vésicules du TGN dispersé (dTGN) via l'interaction avec le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P). Les vésicules sont transportées le long des microtubules par les protéines HDAC6 et dynéine vers le MTOC où réside la kinase NEK7, permettant l'activation totale de l'inflammasome NLRP3. Les inflammasomes assemblés au MTOC sont ensuite dégradés par autophagie. Adaptée de (V. G. Magupalli et al. 2020).

1.3.3.2 Le priming prolongé

Une stimulation prolongée des cellules (plus de 12 heures) par un agoniste de NLRP3 lors de l'étape d'amorçage empêche NLRP3 de répondre à de futurs signaux d'activation. Ce mécanisme de régulation appelé désensibilisation, limite l'activation de NLRP3 pour prévenir une réponse inflammatoire inappropriée médiée par l'inflammasome et protéger de cette façon les tissus et organes en restaurant l'homéostasie tissulaire [70]. Ce rétrocontrôle anti-inflammatoire est initié par l'exposition à long terme des TLRs à un stimulus, induisant plusieurs processus cellulaires. Comme mentionné précédemment, les POPs 1 et 2 ainsi que la COP

CARD18 se retrouvent surexprimées après un temps long de stimulation et participent de cette façon à diminuer l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Par ailleurs, le LPS induit la sécrétion d'IFN-I qui de façon autocrine et paracrine entrainera trois réponses distinctes : d'abord l'expression de la synthase inductible du monoxyde d'azote (iNOS) dont la production de monoxyde d'azote (NO) qui en résulte inhibe NLRP3 [230] ; ensuite, l'expression de la protéine TRIM30 (*tripartite motif-containing protein 30*) qui inhibe NLRP3 en diminuant la production de ROS [281] ; et enfin, la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, qui régule négativement les niveaux d'expression de NLRP3 et de l'IL-1 β [282]. De façon complémentaire, NF κ B est aussi capable de prévenir une inflammation excessive en induisant une accumulation retardée du récepteur de l'autophagie le Séquestosome 1 (p62/SQSTM1) qui déclenche la dégradation des mitochondries endommagées empêchant l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les stimuli mitochondriaux [283]. D'autres mécanismes régulateurs évoqués précédemment se produisent durant le priming prolongé comme l'ubiquitination de NLRP3 par TRIM31, ou encore sa phosphorylation sur la tyrosine 861, entraînant toutes deux sa dégradation. Au contraire, une exposition chronique au TNF peut être associée à une activation excessive de NLRP3 que l'on retrouve impliquée dans des maladies inflammatoires chroniques comme des CAPS [284].

1.3.3.3 Les microARN (miRs)

Les micro-ARN (miRs) sont des petites molécules d'acides ribonucléiques (ARN) non codants simple brin qui régulent l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle en se liant spécifiquement à des ARNm cibles par complémentarité de séquence, et en empêchant leur traduction. Alors que de nombreux miRs influencent différentes cibles dans la voie de l'inflammasome NLRP3, plusieurs d'entre eux ciblent la protéine NLRP3 [285]. Le premier miR découvert ciblant NLRP3 est le miR-223 qui lie spécifiquement la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARN messager (ARNm) de NLRP3, régulant négativement son expression [286,287]. Il a été rapporté que cette molécule régule les niveaux d'expression de la protéine NLRP3 dans les différents types cellulaires puisque l'expression de miR-223 est inversement proportionnelle au niveau de NLRP3 observé. C'est le cas notamment de la différenciation des monocytes en macrophages qui entraîne une diminution de l'expression du miR-223 et une augmentation des niveaux de la protéine NLRP3 [287]. Plusieurs autres miRs ont également été impliqués dans la régulation de l'expression de l'ARNm de NLRP3 dans divers contextes inflammatoires. Le miR-133b inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 à travers la diminution de l'expression de la protéine NLRP3, améliorant l'inflammation allergique dans un modèle murin de rhinite allergique [288]. Chez des souris infectées par *Mycobacterium tuberculosis*, le traitement avec des molécules mimant le miR-20b a inhibé la production de NLRP3 et atténué l'inflammation pulmonaire [289]. D'autres, comme le miR-7 et le miR-30e, agissent de façon similaire en régulant négativement l'expression protéique de NLRP3, et régulent la neuro-inflammation induite par l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans des modèles de maladies de Parkinson [290,291]. D'autres miR qui régulent négativement l'expression de la protéine NLRP3, tels que miR-22, miR-186 et miR-495, ont été étudiés dans diverses situations pathologiques, notamment l'asthme et la maladie d'Alzheimer [292–295]. Par ailleurs, Haneklaus et al. ont mis en évidence le rôle similaire de la protéine tristetrapoline liant les ARN (TTP) qui réprime l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans des macrophages en interagissant directement avec l'ARNm de NLRP3 [296].

1.4 Les modulations physiopathologiques de l'inflammasome NLRP3

1.4.1 Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans un contexte physiopathologique

L'inflammasome NLRP3 fait partie d'un arsenal de mécanismes cellulaires de défense de l'hôte permettant de déclencher une inflammation puissante et la destruction des cellules. Comme cela vient d'être décrit, l'activation de cet inflammasome est strictement contrôlée. Dans le cas contraire, il peut participer à l'initiation des maladies inflammatoires ou à leur développement.

1.4.1.1 Les maladies auto-inflammatoires

Les maladies auto-inflammatoires se définissent comme étant principalement dues à une activation aberrante ou excessive d'origine génétique des cellules immunitaires innées avec une sécrétion dérégulée de cytokines inflammatoires, et dans lesquelles les lymphocytes T et B ne jouent qu'un rôle marginal [297,298]. Les maladies auto-inflammatoires dans lesquelles les inflammasomes sont connus ou suspectés d'être à l'origine de la pathologie sont appelées inflammasomopathies, dont un certain nombre d'entre elles implique l'inflammasome NLRP3 [299].

1.4.1.1.1 Les cryopyrinopathies

Les syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS) sont un groupe de maladies auto-inflammatoires héréditaires causées par une ou plusieurs mutations dans le gène *NLRP3*. Ces mutations déclenchent une activation dérégulée de l'inflammasome NLRP3, provoquant ainsi ces pathologies qui regroupent 3 syndromes de gravité croissante : le syndrome auto-inflammatoire familial lié au froid de type 1 (FCAS1), le syndrome de Muckle-Wells (MWS) et la maladie inflammatoire multi-systémique d'apparition néonatale (NOMID), également appelé syndrome chronique, infantile, neurologique, cutané, articulaire (CINCA) [300]. Il s'agit de la première maladie auto-inflammatoire directement liée à la dérégulation de l'inflammasome NLRP3.

Les CAPS sont des maladies rares diagnostiquées aussi bien chez l'homme que chez la femme mais étant donné leur nature héréditaire, elles se déclarent le plus souvent en période néonatale. Cliniquement, elles sont caractérisées par une inflammation systémique, cutanée, musculo-squelettique et du système nerveux central qui provoque des épisodes récurrents de fièvre, des éruptions cutanées, des yeux enflammés, des douleurs articulaires, des gonflements, des maux de tête et, en l'absence de traitement, la surdité et l'amyloïdose [301]. Le FCAS étant la forme la moins sévère de ces syndromes, les patients atteints ne présentent pas tous les symptômes évoqués alors qu'une atteinte neuro-sensorielle est retrouvée dans la forme la plus grave, la NOMID [302,303].

À ce jour, près de 200 mutations du gène codant NLRP3 associées aux CAPS ont été identifiées [300,304,305]. Ces mutations produisent des protéines NLRP3 à gain de fonction à l'origine d'une activation constitutionnelle aberrante, qui ne nécessitent plus un deuxième signal d'activation pour former des inflammasomes fonctionnels [223]. Il est rapporté que le domaine NACHT de NLRP3 est le principal lieu des mutations associées aux CAPS (**Figure 22**) [305]. Par exemple, une mutation dans ce domaine interfère avec la phosphorylation inhibitrice de NLRP3

sur la sérine 295 par la PKA [219], à l'inverse de la phosphorylation activatrice de NLRP3 sur la sérine 194 induite par d'autres mutations de NLRP3 [222]. Par ailleurs, Hu et al. ont récemment identifié une nouvelle mutation activatrice impliquant le domaine pyrine de NLRP3 chez un patient MWS [306]. Il en résulte alors une hyperactivation de la caspase-1 associée à une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β dérivées des cellules myéloïdes, et une inflammation systémique et tissulaire [223]. La production excessive d'IL-1 β semble être le mécanisme majeur responsable des symptômes de la maladie comme le démontre l'excellente réponse des patients CAPS à la thérapie ciblée contre l'IL-1 β [307,308]. D'autres études ont caractérisé des événements cellulaires associés aux CAPS tels que l'augmentation du stress oxydatif observé dans les cellules de patients atteints de CAPS qui induit un excès de ROS et une inhibition des mécanismes anti-inflammatoires [309–311], ou encore la déméthylation de l'ADN des gènes de l'inflammasome dans les monocytes circulants [312]. De nouvelles observations ont également permis de mieux comprendre les réponses inflammatoires associées aux CAPS, notamment des mutations NLRP3 retrouvées dans les lymphocytes T responsables d'une hyperactivation de ces cellules, qui affectent les réponses immunitaires adaptatives [313], et l'enrichissement en cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde [314]. Il est intéressant de noter que chez les patients CAPS présentant une mutation de NLRP3, des inflammasomes NLRP3 extracellulaires actifs ont été détectés. Ces complexes extracellulaires se retrouvent internalisés par d'autres macrophages, propageant une production excessive de l'IL-1 β [67].

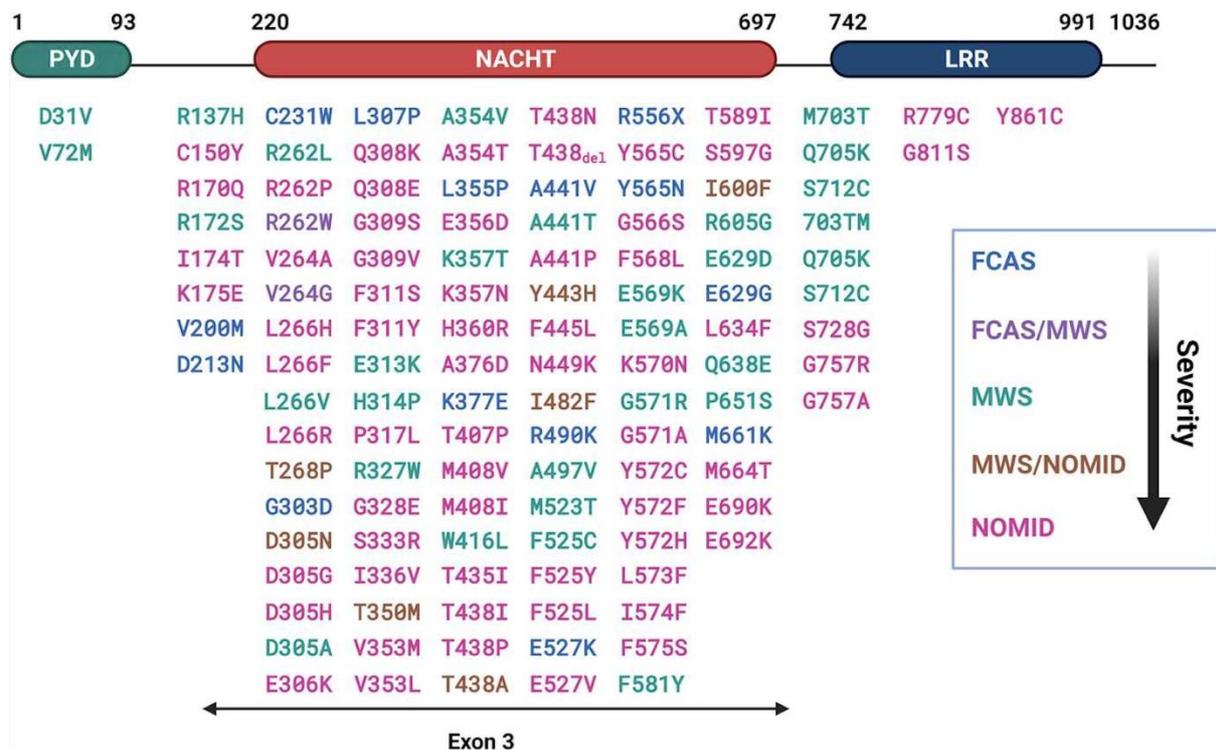


Figure 22. Exemples des mutations de la protéine NLRP3 qui causent les CAPS. Les mutations de NLRP3 sont à l'origine d'un spectre d'états pathologiques dont la gravité va de légère (FCAS, bleu), à intermédiaire (MWS, vert), en allant à sévère (NOMID/CINCA, rose). Le continuum des symptômes cliniques ne permet pas toujours de faire la distinction entre ces différents états pathologiques. Ces cas sont présentés en violet (FCAS/MWS) et en marron (MWS/NOMID) (Qiang Ma et John Schuetz 2023).

1.4.1.1.2 Les autres inflammasomopathies impliquant l'inflammasome NLRP3

L'implication de l'inflammasome NLRP3 est démontrée ou suspectée dans plusieurs autres pathologies dont les symptômes sont relativement similaires à ceux observés dans le cadre des cryopyrinopathies. Il a été suggéré que la maladie auto-inflammatoire monogénique la plus répandue chez l'homme, la fièvre Méditerranéenne familiale (FMF) qui est associée à une mutation du gène *MFEV*, soit aussi liée à une sécrétion accrue d'IL-1 β dépendante de l'inflammasome NLRP3 [315]. De plus, des variants de NLRP3 ont été identifiés chez des patients atteints du syndrome de Marshall, suggérant que les gènes liés à l'inflammasome NLRP3 pourraient être impliqués dans cette pathologies [316]. D'autres études démontrent le rôle de NLRP3 dans certaines maladies auto-inflammatoires polygéniques comme la maladie de Still, le syndrome de Schnitzler et la maladie de Behçet [11].

1.4.1.2 Les maladies multifactorielles

1.4.1.2.1 Les maladies du système nerveux central (SNC)

Le système nerveux central (SNC) n'échappe pas à la surveillance immunitaire, essentielle pour le protéger des lésions par exemple. Une inflammation médiée par l'inflammasome NLRP3 peut donc se déclarer au sein du SNC et être impliquée dans le développement de certaines maladies neurologiques si celle-ci n'est pas contrôlée, telles que la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (PD) et la sclérose en plaque, mais aussi en réponse aux lésions cérébrales traumatiques ou au cours d'infections du SNC [11,106].

Dans la maladie d'Alzheimer, qui se caractérise par l'accumulation sous forme de plaques de peptides amyloïdes beta (A β) et des enchevêtrements de protéines tau anormales, l'établissement d'une inflammation médiée par l'inflammasome NLRP3 participe à la progression de la maladie [317]. Les molécules inflammatoires qui en résultent, dont l'IL-1 β sont produites en excès et exercent des effets neurotoxiques envers la microglie et les astrocytes [318,319]. Plusieurs études ont en effet observé l'activation de l'inflammasome suite à la phagocytose de plaques A β par les cellules microgliales, dont l'accumulation aboutit à la rupture des lysosomes et l'activation de NLRP3 comme décrit précédemment [173,320,321]. En plus de la neuro-inflammation, l'activation de NLRP3 semble provoquer l'hyperphosphorylation de la protéine tau à l'origine de son agrégation sous forme de neurofibrilles [322]. Dans le cadre de la maladie de Parkinson, ce sont les agrégats fibrillaires de synucléine- α qui participent au développement d'une neuro-dégénération en induisant le relargage massif de cytokines pro-inflammatoires à la suite de l'activation de l'inflammasome NLRP3 [106,323]. L'identification du rôle joué par NLRP3 dans ces pathologies représente une cible thérapeutique d'intérêt.

1.4.1.2.2 Les maladies périphériques

La dérégulation de l'inflammasome NLRP3 est retrouvée dans une multitude de pathologies comme les maladies auto-immunes et les affections communes.

Par opposition aux maladies auto-inflammatoires, les maladies auto-immunes se caractérisent par un dysfonctionnement du système immunitaire entraînant une perte de tolérance immunitaire vis-à-vis des tissus du soi, par la présence d'auto-anticorps et de lymphocytes T et B auto-réactifs [297]. Il est aujourd'hui reconnu que l'inflammasome NLRP3 participe à la

pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde (PR), une maladie articulaire inflammatoire chronique, comme le démontre l'amélioration de la PR suite à l'inactivation de NLRP3 [138,324,325]. De manière similaire, NLRP3 a été reliée au développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui incluent la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. En effet, de récents travaux ont montré le rôle clé de l'inflammasome NLRP3 dans l'initiation des MICI, dans lesquels la surexpression de NLRP3 et la suractivation de l'inflammasome entraînent des lésions tissulaires et les manifestations cliniques de ces troubles [26]. Des polymorphismes du gène de NLRP3 ont été retrouvés dans d'autres affections auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (SLE), le psoriasis, et le diabète de type 1 [11,26].

L'importance de l'inflammasome NLRP3 en physiopathologie est relativement mis en évidence au regard des nombreuses affections communes avec lesquelles il est associé. Parmi ces maladies fréquentes, on retrouve des maladies métaboliques comme l'athérosclérose, le diabète de type 2 et l'obésité, ainsi que des maladies cardiovasculaires ou encore des maladies à cristaux comme la goutte. Pour exemple, le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans le diabète de type 2 est multiple. Il se retrouve activé au niveau des macrophages en réponse à plusieurs stimuli dont la céramide et autres acides gras, l'hyperglycémie et les dépôts d'amyline qui entraînent une libération excessive d'IL-1 β responsable d'une insulino-résistance, de la mort progressive des cellules β des îlots de Langerhans, et d'une inflammation du pancréas [11,193].

1.4.1.2.3 Les cancers

L'inflammation est l'une des principales caractéristiques du développement et de la progression du cancer [326]. De fortes connections sont aujourd'hui établies entre inflammation et tumorigénèse, y compris la prolifération, l'invasion, l'angiogénèse et le développement de métastases. D'une part, la sécrétion de cytokines inflammatoires médiée par l'inflammasome NLRP3 par diverses cellules de l'écosystème tumoral, dont celles du microenvironnement tumoral, peut participer activement à chacun de ces processus. D'autre part, l'altération de l'expression de NLRP3 a été observée dans divers cancers. Elle est notamment altérée dans les cellules cancéreuses chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, et le polymorphisme d'autres constituants de l'inflammasome ont aussi été documentés comme pour l'IL-1 β chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique [193,327].

Étant donné la complexité et la grande hétérogénéité tumorale, NLRP3 a des rôles opposés, parfois suppresseur tumoral, et plus fréquemment promoteur tumoral. En effet, plusieurs travaux décrivent les effets protecteurs de l'inflammasome NLRP3 dans des modèles murins de cancer colorectal (CRC) associé à la colite (CAC) [193]. Ces derniers sont, par exemple, médiés par l'activité tumoricide des cellules NK hépatiques sur la croissance métastatique du CRC dans le foie en réponse à l'IL-18 induite par NLRP3 [328], ou encore la régulation de l'axe IL-22–IL-22BP par l'IL-18, favorisant la réparation des tissus intestinaux et contrôlant la genèse des tumeurs [329]. NLRP3 joue également un rôle protecteur contre les cancers au travers notamment de l'induction d'une immunité adaptative antitumorale dépendante des cellules dendritiques et T CD8+ [330,331].

À l'inverse, NLRP3 peut être délétère et jouer un rôle dans la tumorigénèse en interagissant avec les cellules voisines et d'autres compartiments immunitaires. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* illustrent la régulation positive de la formation et la progression tumorale aussi bien que

l'établissement de métastases par l'inflammasome, tels que le cancer du sein, le cancer gastrique, le fibrosarcome, le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, et le lymphome. En outre, l'inflammasome NLRP3 semble favoriser la mise en place d'un micro-environnement pro-tumoral en diminuant l'immunité anti-tumorale naturelle ou induite par immunothérapie [193].

1.4.1.3 Les infections, le cas du SARS-CoV-2

1.4.1.3.1 Le SARS-CoV-2, l'agent pathogène de la COVID-19

Le récepteur NLRP3 peut s'engager dans la signalisation de l'inflammasome en réponse à un large spectre de pathogènes dont les bactéries et les virus, à travers la détection de toxines, d'ARN et d'ADN, etc. Ainsi, l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cas d'infections participe à l'élimination des agents microbiens et viraux. Lors de notre étude, nous avons porté une attention particulière à l'infection par le SARS-CoV-2. Nous détaillerons ici le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'infection par ce virus.

Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) appartient à la famille des *Coronaviridae*, du genre *Betacoronavirus* et représente le 3ème coronavirus humain à provoquer une épidémie après le SARS-CoV-1 et le MERS-CoV (*middle east respiratory syndrome-coronavirus*) [332]. Il a fait son apparition à la fin de l'année 2019 dans la ville de Wuhan en République populaire de Chine et s'est propagé très rapidement au reste du monde. Il est à l'origine d'une maladie appelée maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) qui a entraîné jusqu'à aujourd'hui, en mai 2023, près de 7 millions de décès (données de l'Organisation mondiale de la santé [OMS]) (<https://covid19.who.int>). Le SARS-CoV-2 cible un large spectre de tissus dont les épithéliums nasaux et bronchiques à l'origine de symptômes de type grippaux qui peuvent se développer en détresse respiratoire aiguë. L'infection d'autres tissus peut être associée à des diarrhées ou une perte du goût et de l'odorat [333].

Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN simple brin dont le génome code notamment pour 4 protéines structurales (les protéines Spike (S), d'enveloppe (E), membranaire (M) et la nucléoprotéine (N)) et plusieurs protéines non structurales nécessaires à la réplication et à la transcription virale, dont l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). La glycoprotéine de surface Spike (S) permet la liaison du virus au récepteur membranaire des cellules qu'il cible, l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2). L'interaction du virus avec cette protéine exprimée à la surface des cellules représente la première étape nécessaire à l'entrée du SARS-CoV-2, qui peut se faire par fusion à la membrane plasmique ou par endocytose. Le premier mode d'entrée nécessite le clivage de la protéine S par la protéase transmembranaire sérine 2 (TMPRSS2), conduisant à la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule, suivie par la libération du génome viral dans le cytosol. Pour les cellules qui n'expriment pas cette enzyme, le virus est internalisé dans une vésicule d'endocytose dont l'acidification permettra ensuite la fusion des membranes virale et endosomale, exposant l'ARN viral au cytoplasme [334,335]. Le virus réalise ensuite son cycle réplcatif aboutissant à la production de nouveaux virions qui seront libérés par exocytose lysosomale (**Figure 23**).

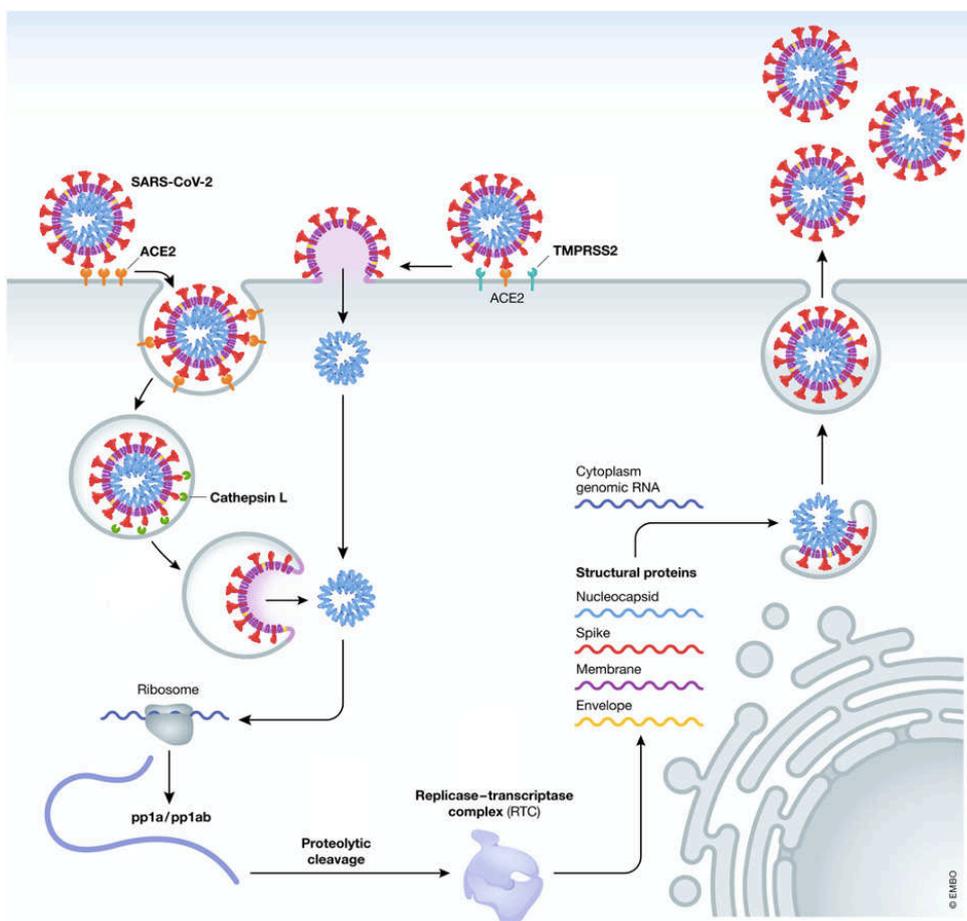


Figure 23. Le cycle de vie du SARS-CoV-2. L'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule cible se fait selon deux modalités : soit par endocytose dépendante du récepteur ACE2, soit par fusion à la membrane plasmique nécessitant en plus la protéase TMPRSS2. Après libération de l'ARN génomique viral dans le cytoplasme de la cellule infectée, le virus entame son cycle de réplication. Les protéines de structure et accessoires ainsi que le génome viral sont produits afin de s'assembler en virions libérés par exocytose lysosomale. Adaptée de (A. Simonis et al. 2021).

Face au SARS-CoV-2, la réponse de l'hôte se traduit par l'activation des cellules épithéliales et du système immunitaire inné au travers notamment de la détection du virus par les PRRs. La production de cytokines pro-inflammatoires qui en résulte stimulent le recrutement des cellules du système immunitaire inné comme les macrophages et les neutrophiles, mais aussi des cellules dendritiques qui vont permettre la mise en place d'une immunité adaptative. L'activation de l'inflammasome NLRP3 à la fois dans les cellules épithéliales et immunitaires participe à la mise en place de cette réponse immunitaire qui lorsque qu'elle est excessive, conduit au développement d'une COVID-19 sévère [336,337].

1.4.1.3.2 Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la COVID-19

L'activation de l'inflammasome NLRP3 a été démontrée dans les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales chez la souris mais aussi chez l'Homme. En plus d'études réalisées *in vitro* qui ont montré l'activation de l'inflammasome dans ces types cellulaires [124,338,339],

plusieurs équipes ont confirmé ces résultats dans les monocytes et macrophages de patients atteints de la COVID-19 [339–342]. Ces observations ont également été retrouvées suite à l'infection par le SARS-CoV-2 *in vivo* [343].

Plusieurs études ont identifié des mécanismes précis qui permettent l'activation de l'inflammasome NLRP3 lors de l'infection par le SARS-CoV-2, qui constitue à la fois un signal d'amorçage et un second signal d'activation. D'abord, certains constituants du virus participent au priming transcriptionnel, tel que l'ARN viral dont la détection par les TLR3, TLR7, TLR8 ou encore le RLR MDA5 qui active NFκB, se traduit par l'augmentation d'expression protéique de NLRP3, l'IL-1β et l'IL-18. De façon similaire, la signalisation du récepteur TLR2 induite par la protéine E augmente l'expression de NLRP3 et de l'IL-1β, tout comme l'amorçage par la viroporine cadre ouvert de lecture 3a (ORF3a) qui entraîne une augmentation de la transcription de l'IL-1β [337,344–346]. Ensuite, l'activation de l'inflammasome est provoquée par les viroporines ORF3a et E capables de déclencher respectivement un efflux de potassium et un influx de calcium à partir du RE, qui vont activer NLRP3 et favoriser l'assemblage de l'inflammasome [344,347]. Les protéines ORF8b et N peuvent également activer directement NLRP3 en interagissant avec le NLR [348,349], de même que la protéine non structurale 6 (NSP6) capable d'activer l'inflammasome NLRP3 [338]. La protéine Spike participerait aussi à l'activation de l'inflammasome NLRP3 à travers sa liaison avec les récepteurs ACE2 et TLR4 [350]. D'autres études proposent que NLRP3 soit également activée par une série de processus cellulaires intrinsèques déclenchés en réponse à l'infection par le SARS-CoV-2 tels que la production de ROS induite par la protéine du complément C5a retrouvée en abondance dans le fluide bronchoalvéolaire des patients atteints de COVID-19 sévère ; l'activation non canonique de NLRP3 via des phospholipides oxydés provenant du surfactant pulmonaire ; mais également le relargage d'ATP par des cellules mortes dans le milieu extra-cellulaire (**Figure 24**) [337,351]. Un relargage massif de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β et l'IL-18 est ainsi observé dans le sérum de patients, dont les niveaux corrént avec la sévérité de la maladie et sont associés avec un mauvais pronostic. De plus, l'activation de l'inflammasome NLRP3 semble être associée avec une mort cellulaire par pyroptose des cellules infectées. Ceci est révélé par la présence d'un taux élevé de GSDMD dans le sérum de patients associé à un relargage de LDH, dont les niveaux sont aussi corrélés avec la sévérité de la maladie [337,352].

L'inflammasome NLRP3 est donc activé en réponse à l'infection par le SARS-CoV-2 afin de monter une réponse immunitaire de défense et participerait à limiter l'infection, notamment par l'induction de la pyroptose qui semble empêcher la réplication du virus dans les macrophages par exemple [124]. Néanmoins, ce processus déclenche la sécrétion d'une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires et de PAMPs par les cellules lésées, induisant une réponse hyper-inflammatoire et le recrutement de cellules immunitaires comme les macrophages alvéolaires, les macrophages dérivés de monocytes ou encore les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules sont activées en réponse aux signaux inflammatoires et amplifient l'inflammation en libérant massivement à leur tour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-8, le TNF-α et le M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (**Figure 24**). Il est désormais reconnu que l'hyper-inflammation induite par les inflammasomes joue un rôle dans la physiopathologie de la COVID-19 chez les patients en participant à la mise en place d'une immunopathologie [124,337,346,351,353].

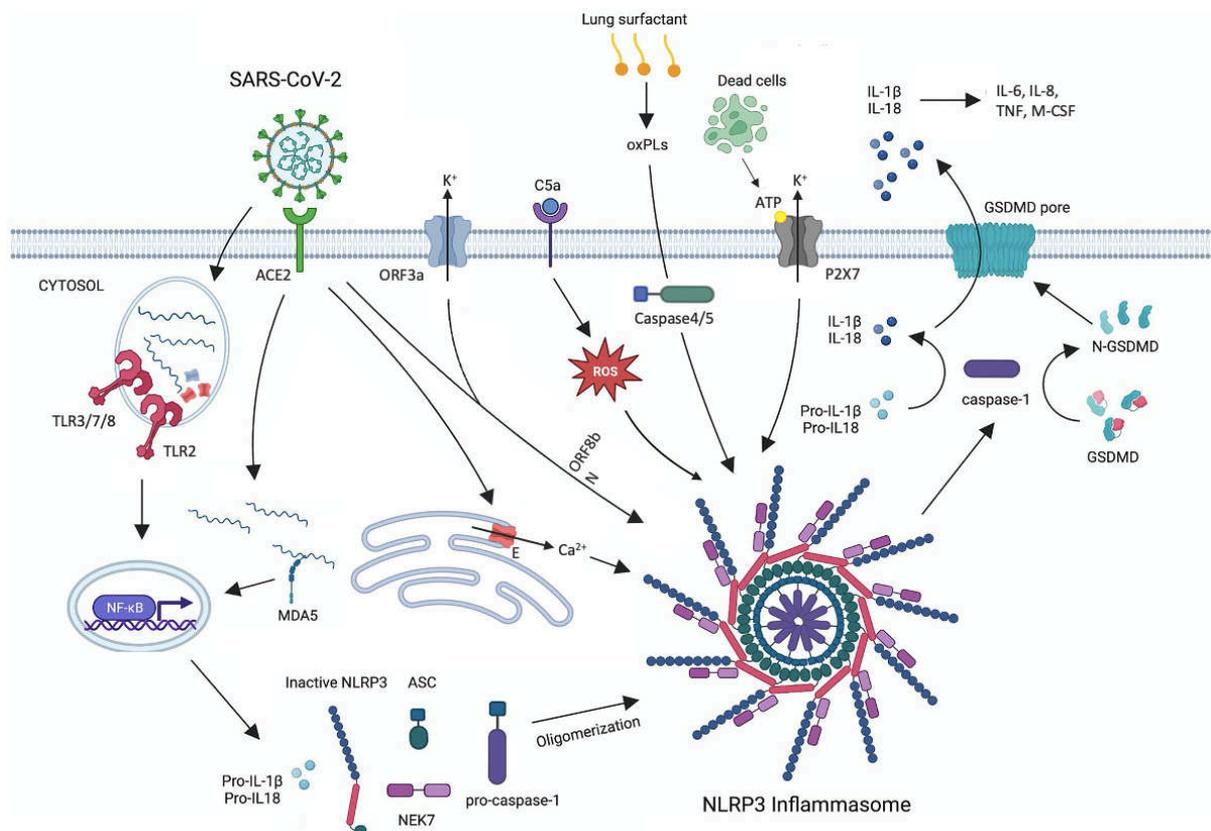


Figure 24. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par le SARS-CoV-2. L'ARN du SARS-CoV-2 peut être détecté dans les endosomes par les récepteurs TLR3, TLR7 et TLR8, ainsi que par la protéine MDA5, tout comme les viroporines ORF3a et E par le TLR2, qui régulent l'expression génétique de NLRP3 et des pro-formes d'IL-1 β et d'IL-18 par l'intermédiaire du facteur de transcription NF- κ B. Un second signal du virus est nécessaire pour oligomériser l'inflammasome NLRP3 qui active alors la caspase-1 pour cliver les pro-IL-1 β et pro-IL-18 en leurs formes matures. NLRP3 peut être directement activée par sa liaison avec les protéines ORF8b et N, ou par les flux de K $^{+}$ et de Ca $^{2+}$ induits par les protéines E et ORF3a. Des mécanismes intrinsèques à l'hôte peuvent également entraîner son activation tels que la production de ROS déclenchée par la protéine C5a du complément, les phospholipides oxydés des surfactants pulmonaires ou l'ATP libéré par les cellules mortes. L'IL-1 β et l'IL-18 sont alors libérées de la cellule par les pores de GSDMD. Adaptée de (M. Yin et al. 2023).

De façon intéressante, plusieurs études nuancent ces résultats en montrant que le SARS-CoV-2 interfère avec la fonction antivirale de l'inflammasome NLRP3. C'est le cas, par exemple, de la nucléocapside N qui en opposition avec sa capacité à activer l'inflammasome, semblerait inhiber la pyroptose en se liant à la GSDMD. Ce sont dans les monocytes humains infectés que Juan Ma et al. démontrent que malgré l'activation de l'inflammasome et de la caspase-1, le clivage de la GSDMD semble être empêché par son interaction avec la protéine N, inhibant la sécrétion d'IL-1 β . Les auteurs suggèrent que ce mécanisme pourrait expliquer la période d'infection asymptomatique de la COVID-19 et permettre au virus d'échapper au contrôle de sa réplication par la pyroptose [354]. Par ailleurs, notre équipe a récemment mis en évidence une contribution inattendue de l'activation de l'inflammasome NLRP3 à la pathogenèse du SARS-CoV-2 en promouvant la réplication virale. De plus, le récepteur purinergique P2X7 qui participe à l'activation de l'inflammasome, favorise également la réplication du virus, et ce suite

à l'entrée du virus dans la cellule pendant les étapes précoces d'infection [339]. Ceci soutient une précédente étude qui révélait que l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 abroge à la fois la réplication du SARS-CoV-2 ainsi que l'inflammation associée au cours de l'infection de souris [343].

1.4.2 Les stratégies thérapeutiques ciblant l'inflammasome NLRP3

De nombreux inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3 ont récemment émergé, certains ciblant directement l'inflammasome, d'autres ayant les signalisations en aval et en amont pour cibles thérapeutiques (**Annexe 1**). Ainsi, l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 peut aussi bien se faire au niveau de l'étape d'amorçage que de l'étape d'activation, mais également en ciblant les substrats de la caspase-1 [106,355,356] (**Figure 25**). Ces molécules inhibitrices peuvent être d'origine synthétique ou bien naturelle, comme le parthenolide et l'oridonine qui sont les deux seuls produits naturels cités dans l'Annexe 1 [106,355].

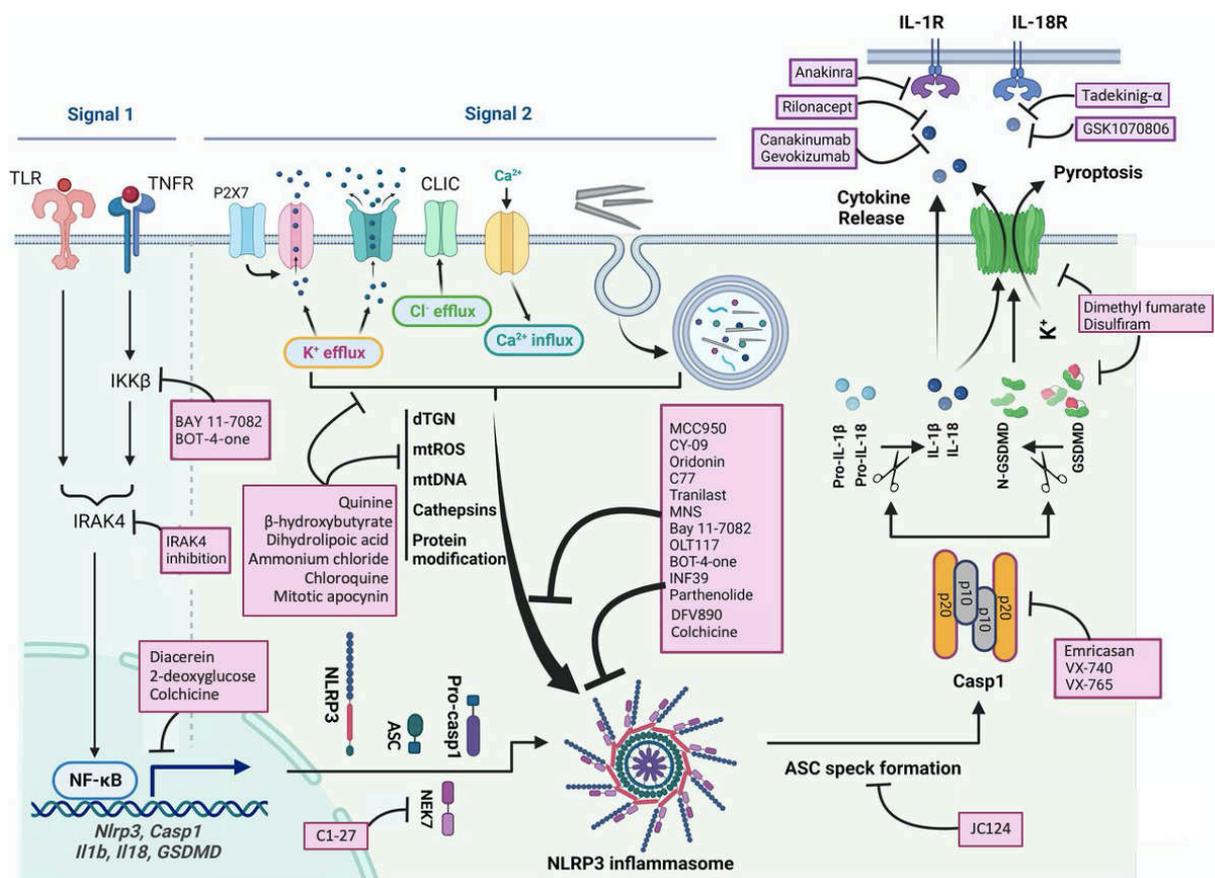


Figure 25. L'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par différentes stratégies thérapeutiques. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par le signal d'amorçage (signal 1) peut être inhibée en ciblant la voie de signalisation NFκB. L'activation par le second signal d'activation (signal 2) peut être ciblée pour inhiber la formation de l'inflammasome au niveau des voies de signalisation activatrices, des effecteurs ou des substrats. Adaptée de (Q. Ma et J. Schuetz 2023).

1.4.2.1 Les thérapies ciblant directement l'inflammasome NLRP3

1.4.2.1.1 Les thérapies ciblant la protéine NLRP3

1.4.2.1.1.1 Cibler la protéine NLRP3 de façon directe

L'inhibition de la protéine NLRP3 elle-même par de petites molécules a été proposée pour bloquer ou réprimer l'inflammation provoquée par l'inflammasome NLRP3. Parmi les composés inhibiteurs de NLRP3, une grande majorité fonctionnent en se liant au domaine NACHT, bloquant son activité ATPasique, tel que le MCC950, ou bien son interaction avec ses partenaires de l'inflammasome (**Figure 26**) (**Annexe 1**).

Le MCC950, initialement appelé CP-456,773 ou CRID3 lorsqu'il a été découvert en 2001 [357], est le plus étudié des inhibiteurs de NLRP3. Ce n'est que récemment que Coll et al. ont démontré sa capacité à inhiber l'inflammasome NLRP3 [358]. Depuis, d'autres études ont montré qu'il s'agit d'un inhibiteur non covalent de NLRP3 qui empêche tout changement de conformation du NLR en se liant au domaine NACHT. En le maintenant ainsi dans son état inactif, la fixation d'ATP n'est pas permise, NLRP3 est donc incapable d'initier une activité ATPase nécessaire à son oligomérisation et celle de la protéine adaptatrice ASC [359,360]. Le MCC950 est considéré à ce jour comme l'inhibiteur le plus fort et spécifique de l'inflammasome NLRP3, bloquant d'ailleurs à la fois les activations canonique et non canonique de l'inflammasome. Il n'est cependant pas utilisé en clinique suite à l'apparition de toxicités hépatiques au cours d'un essai clinique de phase II pour le traitement de la PR. Il est donc prioritairement utilisé dans des études de mécanistiques comme un outil chimique permettant de comprendre les rôles pathologiques de l'inflammasome NLRP3 dans divers modèles de maladies, notamment la MA, l'athérosclérose, l'asthme, l'inflammation allergique des voies respiratoires, ainsi que les MICI. Le Parthenolide est également un composé qui a été étudié *in vivo* dans le cadre du diabète ou de la colite. Cet agent naturel d'origine végétale bloque spécifiquement l'inflammasome NLRP3 en se liant au domaine NACHT de NLRP3 au travers d'une alkylation. Ceci inhibe l'activité ATPase et prévient son oligomérisation avec les protéines NEK7 et ASC, empêchant ainsi l'assemblage et l'activation de l'inflammasome [361]. D'autres molécules fonctionnent de façon similaire et font l'objet de développement clinique, comme le Dapansutrile actuellement étudié comme traitement de la COVID-19, de la goutte ou encore de l'arthrose [356,362]. Un autre inhibiteur de la protéine NLRP3, le DFV890, a également été testé au cours d'une étude randomisée de phase II réalisée avec des patients infectés par le SARS-CoV-2 présentant une pneumonie à COVID-19 et une altération de la fonction respiratoire. Une élimination précoce du SARS-CoV-2, une amélioration de l'état clinique, ainsi que moins d'événements mortels ont été observés avec le DFV890 par rapport au traitement standard. Les auteurs de l'étude considèrent cet inhibiteur de NLRP3 comme une thérapie protectrice pour le syndrome de détresse respiratoire aiguë associé au coronavirus (CARDS) [356,363].

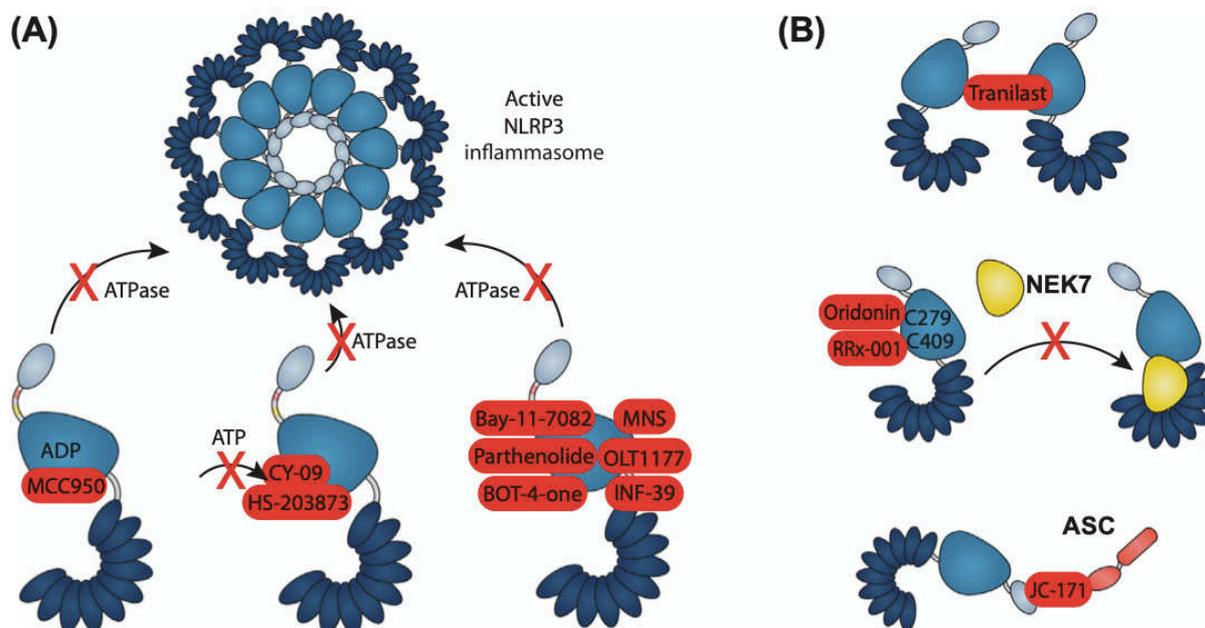


Figure 26. Mécanismes d'action des principaux inhibiteurs directs de NLRP3. (A) Les inhibiteurs bloquant l'activité ATPase de NLRP3 par liaison directe. (B) Les inhibiteurs bloquant les interactions de NLRP3 avec ses partenaires (R. C. Coll 1, K. Schroder et P. Pelegrin 2022).

1.4.2.1.1.2 Cibler la protéine NLRP3 de façon indirecte

La meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'inflammasome NLRP3 offre des opportunités thérapeutiques importantes. Parmi celles-ci, les nombreuses enzymes de régulation de NLRP3 représentent de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses (**Annexe 1**). On retrouve des composés ciblant les deux principaux types de modifications post-traductionnelles de NLRP3, la phosphorylation et l'ubiquitination.

Il a été démontré que l'inhibiteur de kinases JNK, le SP600125, bloque l'activation de la protéine NLRP3. Des molécules de deuxième génération ciblant ces kinases ont d'ailleurs été évalués en clinique, notamment le composé CC-90001 pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique (NCT03142191) [114]. L'inhibition de la protéine kinase PKD par une petite molécule inhibitrice, le CRT0066101, permet par exemple de contrôler la libération excessive de cytokines médiée par l'inflammasome NLRP3 dans un modèle murin de lésion pulmonaire [364]. À l'inverse, l'activation de la protéine kinase PKA par le Dibutyryl cAMP, de l'AMP cyclique synthétique, peut indirectement inhiber la protéine NLRP3. D'autres inhibiteurs de kinases, tels que l'Ibrutinib, l'Evobrutinib et le Fenebrutinib, tous trois ciblant la kinase BTK, montrent des intérêts cliniques importants pour le traitement de maladies inflammatoires comme la PR et la sclérose en plaques [227,365,366]. Néanmoins, étant donné la multitude de processus cellulaires dans lesquels cette kinase est impliquée, les effets positifs observés ne résultent pas uniquement de l'inhibition de l'inflammasome NLRP3.

Plusieurs inhibiteurs de DUBs comme le G5, le WP1130 et le BC-1215 empêchent l'activation de NLRP3. L'inhibition de la peptidase USP7 apparaît efficace, notamment par la molécule P22077 pour atténuer l'inflammation induite par l'inflammasome NLRP3 dans un modèle murin

de maladie cardiovasculaire [367]. Par ailleurs, favoriser la dégradation de la protéine NLRP3 à travers l'inhibiteur spécifique de l'ubiquitine FBXO3, le BC-1215, représente une autre stratégie thérapeutique pour laquelle une étude clinique de phase I a été autorisée [356]. Plus récemment, les laboratoires adoptent une nouvelle stratégie afin de trouver des drogues ayant des profils de distribution limités aux compartiments malades. Compte tenu de l'étendue des indications dans lesquelles NLRP3 est impliquée, cette stratégie pourrait permettre de s'attaquer à certaines maladies sans interférer avec la fonction NLRP3 dans des compartiments qui ne contribuent pas à une maladie particulière [356].

1.4.2.1.2 Les thérapies dirigées contre les autres composants de l'inflammasome NLRP3

Une autre stratégie thérapeutique consiste à cibler les partenaires protéiques de NLRP3 formant l'inflammasome (ASC, NEK7, caspase-1) et leur processus de régulation (**Annexe 1**). Le développement d'inhibiteurs directs ou indirects de la protéine adaptatrice ASC en sont des exemples, dont un anticorps monoclonal, l'IC100, qui supprime les réponses inflammatoires induites par un modèle murin de sclérose en plaques [368]. Certains composés perturbent l'oligomérisation de ASC en bloquant sa phosphorylation. C'est notamment le cas du Fostamatinib et du Cerdulatinib, des inhibiteurs de la tyrosine kinase Syk, dont un essai clinique de phase II est planifié pour évaluer le traitement de la PR et du SLE [356,369].

L'inhibiteur de la protéine GSTO1, le C1-27, empêche quant à lui l'activation de l'inflammasome en interférant avec la déglutathionylation de NEK7, nécessaire pour sa fonction dans le complexe multi-protéique [243].

Les inhibiteurs de caspase-1 représentent également des molécules cliniques intéressantes capables de bloquer la maturation des cytokines pro-inflammatoires ainsi que la pyroptose médiées par NLRP3. Les molécules VX-765 et VX-740 sont deux inhibiteurs sélectifs de la caspase-1 qui ont progressé en clinique afin d'évaluer leur efficacité dans le cadre du traitement de la COVID-19 (NCT05164120) et de la PR, respectivement. Le VX-740 ayant révélé des toxicités hépatiques en préclinique a été abandonné malgré l'absence de toxicités similaires chez l'Homme [356].

1.4.2.2 Les thérapies ciblant les voies de signalisation de l'inflammasome NLRP3

1.4.2.2.1 Cibler la cascade de signalisation en aval de l'inflammasome

Une autre approche pour inhiber l'inflammasome NLRP3 consiste à interférer avec les voies de signalisation nécessaires à son activation ainsi que celles qui en découlent. C'est dans cet objectif que des molécules inhibitrices des substrats de la caspase-1 ont été développées (**Annexe 1**).

Cibler la GSDMD apparaît comme une stratégie pertinente étant donné que cette protéine est l'effecteur central de la pyroptose et qu'elle induit le relargage massif d'IL-1 β , d'IL-18 et de DAMPs. Deux petites molécules ont été récemment décrites pour inhiber la GSDMD, il s'agit du disulfirame et du diméthylfumarate. Le premier, initialement connu pour cibler d'autres protéines, a été identifié par Hu et al. comme un inhibiteur de l'ancrage de la GSDMD à la membrane plasmique, empêchant la formation des pores et donc la pyroptose et la mort

septique induite par le LPS chez la souris [370]. Le disulfiram a d'ailleurs fait l'objet d'une première étude clinique randomisée de phase II avec des patients atteints de COVID-19 modéré dont les résultats ne sont pas encore publiés (NCT04594343). Une deuxième étude est en cours afin d'évaluer l'effet du disulfiram sur la gravité des symptômes de COVID-19, la charge virale du SARS-CoV-2 et les biomarqueurs de l'inflammation et de la pyroptose (NCT04485130). Il est d'autant plus intéressant de cibler la GSDMD pour le traitement de la COVID-19 étant donné le rôle prépondérant qu'elle joue dans la formation des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs), structures chromatinienne qui participent à la réponse inflammatoire dérégulée [351,371].

L'IL-1 β est une autre cible intéressante puisque cette cytokine est un produit direct de l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui induit une inflammation locale et participe à l'amplification des réponses immunitaires. Trois traitements anti-IL-1 β sont particulièrement connus pour être prescrits dans les cryopyrinopathies et ont depuis été testés pour un spectre plus large de maladies inflammatoires comme la COVID-19 ou l'arthrite goutteuse. L'Anakinra a été le premier à être développé pour le traitement des CAPS, bien qu'il fût d'abord étudié dans la septicémie, puis approuvé dans la PR en 2001. Il s'agit d'une forme recombinante de la protéine antagoniste de l'IL-1R endogène, l'IL-1RA. Il bloque ainsi la signalisation de l'IL-1 α et de l'IL-1 β par l'intermédiaire de l'IL-1R1 et est actuellement un médicament approuvé pour les CAPS. En plus de l'Anakinra, une autre approche pour bloquer la signalisation de l'IL-1 β est la neutralisation de la cytokine. C'est le cas du Rinolcept, une protéine de fusion dimérique constituée de domaines de liaison au ligand de l'IL-1R1 humain et de la protéine accessoire du récepteur de l'IL-1 liée au fragment Fc de l'IgG1 humain. Cet antagoniste du récepteur de l'IL-1 modifié fonctionne comme un récepteur leurre afin de lier et de neutraliser l'IL-1 β et l'IL-1 α . De façon similaire, le Canakinumab est un anticorps monoclonal humain dirigé spécifiquement contre l'IL-1 β qui inhibe son interaction avec le récepteur IL-1R. En plus de posséder une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement des CAPS, il est également indiqué pour l'arthrite juvénile idiopathique systémique et l'arthrite goutteuse, pour lesquelles il présente une grande efficacité dans l'amélioration des symptômes inflammatoires. Il est important de noter que le recours à ces composés chimiques n'est pas anodin puisqu'il présente un risque d'infection pour les patients car les réponses médiées par l'IL-1 β sont essentielles pour la défense de l'hôte contre les pathogènes [190,302,337,356]. D'autres biothérapies sont étudiées, et permettent notamment le blocage de la signalisation de l'IL-18 par une protéine recombinante de l'IL-18BP ou un anticorps anti-IL-18 [93,190].

1.4.2.2 Cibler la cascade de signalisation en amont de l'inflammasome

Le priming transcriptionnel des composants de l'inflammasome, tels que la protéine NLRP3 et la pro-IL-1 β , fait l'objet de plusieurs thérapies ciblant la signalisation NF κ B. C'est le cas du PF-06650833, un inhibiteur de la kinase IRAK4, qui a fait l'objet d'études cliniques pour la PR (NCT04413617) et la COVID-19 (NCT04575610 et NCT04933799). Les voies de signalisation déclenchées en réponse au second signal d'activation peuvent également être ciblées afin d'empêcher l'activation de l'inflammasome NLRP3. Des inhibiteurs de l'efflux potassique, de la rupture des lysosomes, des dommages à la mitochondrie ou encore de la polymérisation des microtubules sont développés dans ce sens (**Annexe 1**) [356]. Plus précisément, les inhibiteurs de la cathepsine B (Chloroquine, Chlorure d'ammonium) qui empêchent la rupture des

lysosomes et la libération de la cathepsine B dans le cytosol, inhibent l'activation de l'inflammasome par certains stimuli [356]. Outre les inhibiteurs de cathepsines, les inhibiteurs indirects de la kinase CAMK2, comme l'acide dihydrolipoïque, ont été utilisés pour atténuer les dommages induits par la perméabilisation de la membrane lysosomale [372]. Un autre composé, la colchicine, interfère avec le transport intra-cellulaire des différents composants de l'inflammasome au niveau du MTOC. En effet, en liant la tubuline, la colchicine favorise la dépolymérisation des microtubules ce qui empêche la colocalisation des protéines de l'inflammasome NLRP3 dont résulte une moindre production d'IL-1 β et d'IL-18 [167]. Il s'agit d'un puissant anti-inflammatoire qui possède une AMM pour le traitement de la goutte. Une suppression de la production des cytokines induite par NLRP3 a aussi été observée *ex vivo* à partir de cellules de patients atteints de CAPS et FMF à la suite du traitement par la colchicine. Le champ d'action de cette molécule semble plus large encore puisqu'il a été rapporté qu'elle est capable d'inhiber l'expression protéique de la caspase-1 et de l'IL-1 β , ainsi que de réduire l'efflux de potassium et la quantité de ROS en inhibant fortement la formation de pores via P2X7 [346,373].

2 Les récepteurs purinergiques

2.1 Les généralités sur les récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont des récepteurs membranaires découverts en 1972 par Geoffrey Burnstock, qui propose le concept d'une neurotransmission par l'ATP, qu'il nomme purinergique [374]. Plus tard, ces récepteurs à purines et pyrimidines sont caractérisés et classifiés en 2 groupes en fonction de leurs ligands extra-cellulaires. Les récepteurs liant l'adénosine sont nommés P1 (récepteurs couplés aux protéines G) et les récepteurs liant des nucléotides di- et triphosphates sont nommés P2 (**Figure 27**). Ces derniers sont ensuite eux-mêmes subdivisés en 2 sous-familles selon leur structure moléculaire : les récepteurs ionotropiques à ligands P2X (récepteurs canaux), et les récepteurs métabotropiques P2Y (récepteurs couplés aux protéines G).

Alors que les récepteurs purinergiques sont majoritairement exprimés à la membrane plasmique, certains peuvent être redistribués à la membrane mitochondriale (P2X1, P2X4, P2X7 et P2Y11) [375,376]. En fonction du type de cellules dans lequel ils sont exprimés, ils déclenchent une variété de réponses, exerçant des fonctions physiologiques spécifiques. Les signalisations purinergiques soutiennent de cette façon des mécanismes neuronaux tels que la neurotransmission et la neuromodulation, ainsi que de nombreux autres processus non-neuronaux comme les réponses immunitaires, l'inflammation, les sécrétions endocrines et exocrines, l'agrégation plaquettaire, la douleur, mais aussi la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, ou encore la mort cellulaire. Étant distribués dans presque tous les types cellulaires (**Annexe 2**), la dérégulation de ces récepteurs peut entraîner le développement de multiples pathologies humaines. Ils sont particulièrement associés avec des troubles du système nerveux, des maladies inflammatoires, ou encore des maladies cardiovasculaires et le développement de cancers [377,378].

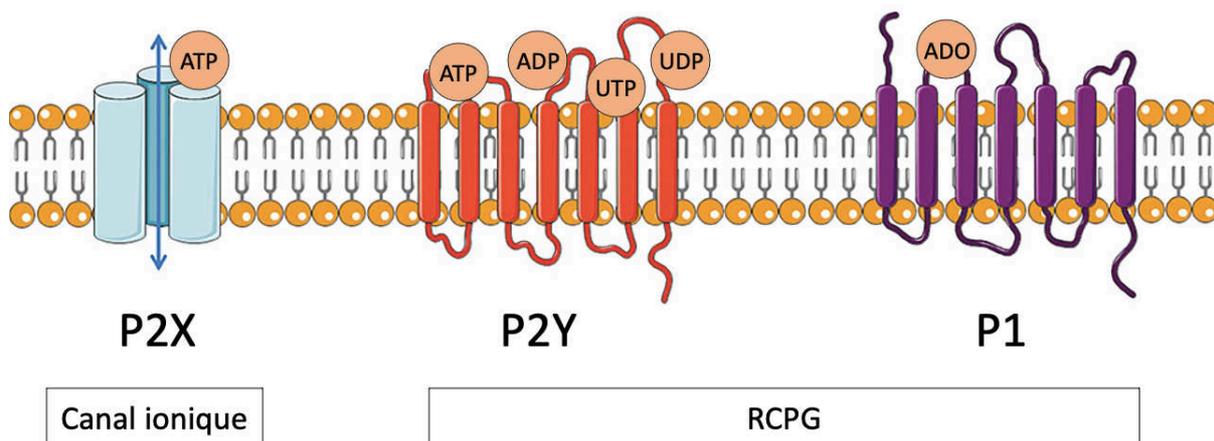


Figure 27. Les récepteurs purinergiques. Les récepteurs purinergiques sont subdivisés en 3 sous-familles en fonction de leurs ligands et de leur structure moléculaire. Les récepteurs ionotropiques P2X lient l'ATP, les récepteurs métabotropiques P2Y lient les nucléotides di- ou tri-phosphates (ATP, UTP, ADP, UDP) et les récepteurs à adénosine (ADO) P1. Le premier est un canal ionique alors que les deux autres sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Adaptée de (R. J. Thompson et al. 2021).

2.1.1 L'activation des récepteurs purinergiques

La signalisation purinergique est induite à travers la reconnaissance de différents dérivés extra-cellulaires de la purine et de la pyrimidine qui servent de molécules de signalisation. Ainsi, le nucléoside adénosine active les récepteurs P1 alors que les nucléotides tels que l'ATP, l'uridine triphosphate (UTP), l'adénosine diphosphate (ADP), et l'uridine diphosphate (UDP) activent les récepteurs P2Y. Les récepteurs P2X sont activés uniquement par de l'ATP (**Figure 27**) [377].

Les purines et pyrimidines sont les bases nucléiques (ou bases azotées) que l'on retrouve dans les nucléosides, des molécules organiques dans lesquelles un sucre est relié à la base par liaison N-glycosidique. Ce composé intermédiaire peut subir des phosphorylations via l'ajout d'un, deux ou trois groupements phosphate au niveau du ribose par des liaisons phosphodiester, devenant ainsi un nucléotide mono-, di- ou triphosphate. Les nucléotides extra-cellulaires peuvent être issus de cellules nécrotiques ou sécrétées de façon paracrine ou autocrine et agir au niveau des récepteurs purinergiques [378,379]. Néanmoins, leur disponibilité extra-cellulaire est contrôlée par des enzymes liées à la membrane plasmiques, des ectonucléotidases, qui les dégradent (**Figure 28**). En effet, l'hydrolyse de l'ATP ou de l'UTP forme d'autres nucléotides intermédiaires et nucléosides qui influencent la signalisation purinergique. Ainsi, le métabolisme de l'ATP par des diphosphohydrolases à nucléosides triphosphates (NTPDases) produit de l'ADP puis de l'AMP, qui peut à son tour être déphosphorylé par une ecto-5'-nucléotidase (5'NT), formant de l'adénosine. L'ATP peut être directement métabolisé en AMP par des pyrophosphatases/phosphodiesterases à nucléotides (NPPs). Ces produits de dégradation induisent une activation différentielle des récepteurs P2 et des récepteurs P1 [377,380].

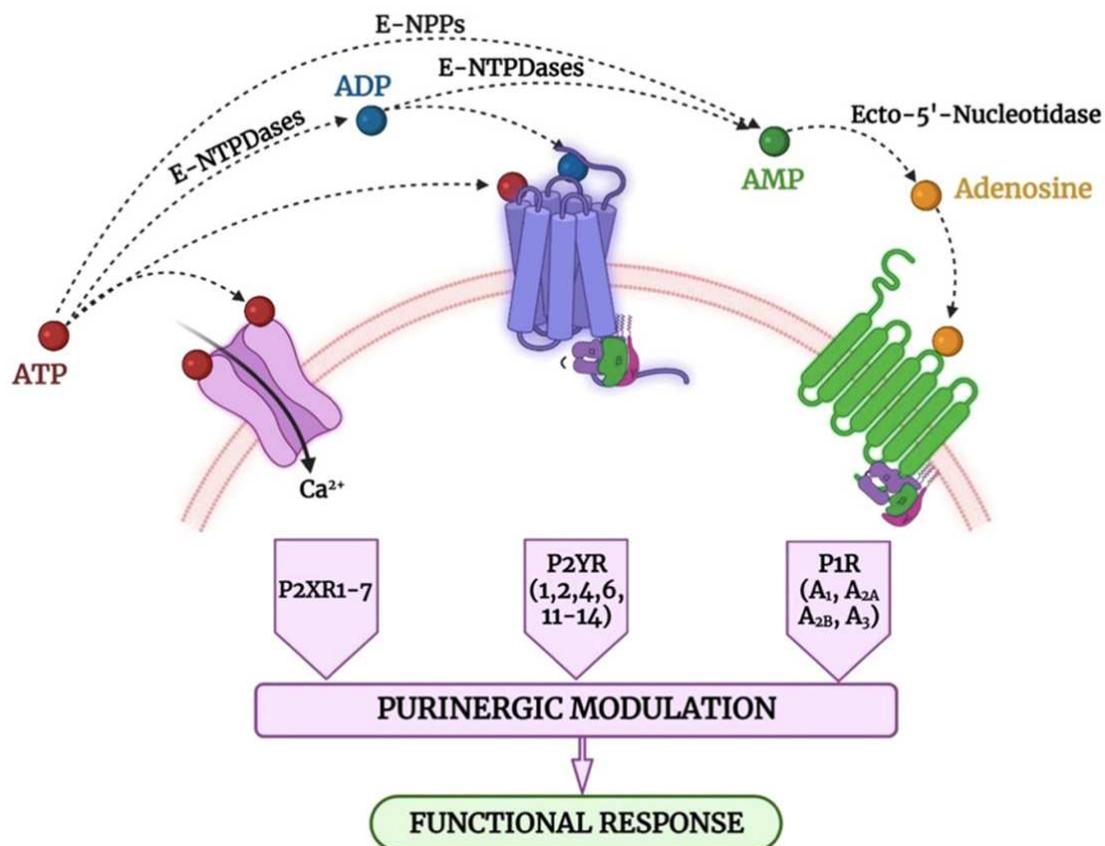


Figure 28. L'activation des récepteurs purinergiques par les nucléotides et les nucléosides. La signalisation purinergique est contrôlée par des ectonucléotidases qui régulent la concentration extra-cellulaire des ligands nucléotidiques des récepteurs purinergiques. Les diposphohydrolases à nucléosides triphosphates (E-NTPDases) dégradent l'ATP en ADP puis en AMP. Les pyrophosphatase/phosphodiesterases à nucléotides (E-NPPs) transforment directement l'ATP en AMP. L'adénosine est ensuite métabolisée à partir de l'AMP par des ecto-5'-nucléotidases pour activer les récepteurs P1 à adénosine (A. Mahmood et J. Iqbal 2022).

2.1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques

Les récepteurs P1 et P2Y appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils ont en commun un domaine central formé de 7 hélices hydrophobes qui traversent chacune la membrane plasmique, on parle de 7 domaines transmembranaires (TM), reliés entre eux par 3 boucles extra-cellulaires et 3 boucles intra-cellulaires. Ils possèdent en plus un N-terminus extracellulaire et un C-terminus intracellulaire. La transduction classique du signal par les RCPG dépend de l'activation de protéines régulatrices hétérotrimériques liant les nucléotides de guanine (protéines G). Ces protéines, aussi appelées grandes protéines G (en opposition aux petites protéines G), sont composées de 3 sous unités, $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Elles appartiennent à la famille des GTPases, des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la guanosine-5'-triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). À l'état basal, la sous-unité $G\alpha$ lie la GDP permettant son association avec les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ pour former un hétérotrimère inactif. Lors de la liaison avec leurs agonistes, les RCPG agissent comme des facteurs d'échange de nucléotides de guanine (GEFs) en favorisant la dissociation de la GDP de la sous-unité $G\alpha$. Un autre nucléotide, la GTP, vient alors se lier à la place de la GDP, ce qui conduit à la

dissociation de la sous-unité $G\alpha$ du dimère $G\beta\gamma$. Les sous unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ sont toutes les deux fonctionnelles et capables d'initier diverses voies de signalisation en aval (**Figure 29**) [381,382].

La réponse cellulaire induite par les récepteurs purinergiques P1 et P2Y dépend de la protéine G à laquelle ils sont couplés. Les protéines G, identifiées par leurs sous-unités $G\alpha$, sont regroupées en 4 grandes familles : $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$, et $G\alpha_{12/13}$. Les effecteurs de signalisation au travers desquels elles transduisent le signal sont bien définis pour chacune d'entre elles (**Figure 29**). Dans la famille $G\alpha_s$, les deux membres $G\alpha_s$ et $G\alpha_{olf}$ stimulent les adénylate cyclases qui produisent de l'AMPc à partir d'ATP, permettant notamment l'activation de la PKA [383]. À l'inverse, les 7 membres des protéines $G\alpha_i$ ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_g$ et $G\alpha_z$) inhibent les adénylate cyclases. La famille $G\alpha_{q/11}$ qui comprend les protéines $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ et $G\alpha_{16}$, déclenche la production d'IP3 et de diacylglycérol (DAG) à travers l'activation de la PLC β , qui induisent respectivement l'ouverture du canal de calcium IP3R à la membrane du RE et l'activation de la protéine kinase C (PKC) [382,383]. Les protéines $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ activent un autre effecteur, le facteur d'échange de guanine spécifique de la protéine RhoA (p63RhoGEF), qui active le membre A de la famille des homologues de Ras (RhoA), une petite protéine G monomérique qui régule l'organisation du cytosquelette d'actomyosine [384]. Enfin, la protéine $G\alpha_{13}$ active d'autres protéines RhoGEF comme la p115RhoGEF alors que la protéine $G\alpha_{12}$ interagit avec plusieurs protéines dont la tyrosine kinase BTK, et certaines cadhérines [385,386]. Ainsi, les RCPG régulent de nombreuses fonctions telles que la contractilité cardiaque, la migration et l'activation des cellules du système immunitaire comme les macrophages, l'agrégation et l'activation plaquettaire, mais également certaines fonctions neuronales [382].

Comme évoqué précédemment, le dimère $G\beta\gamma$ possède aussi un rôle important puisqu'il peut lui-même recruter des effecteurs. La protéine $G\beta\gamma$ module des canaux ioniques, certaines isoformes de l'adénylate cyclase, de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K), et de la PLC, ainsi que les protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPKs) [387].

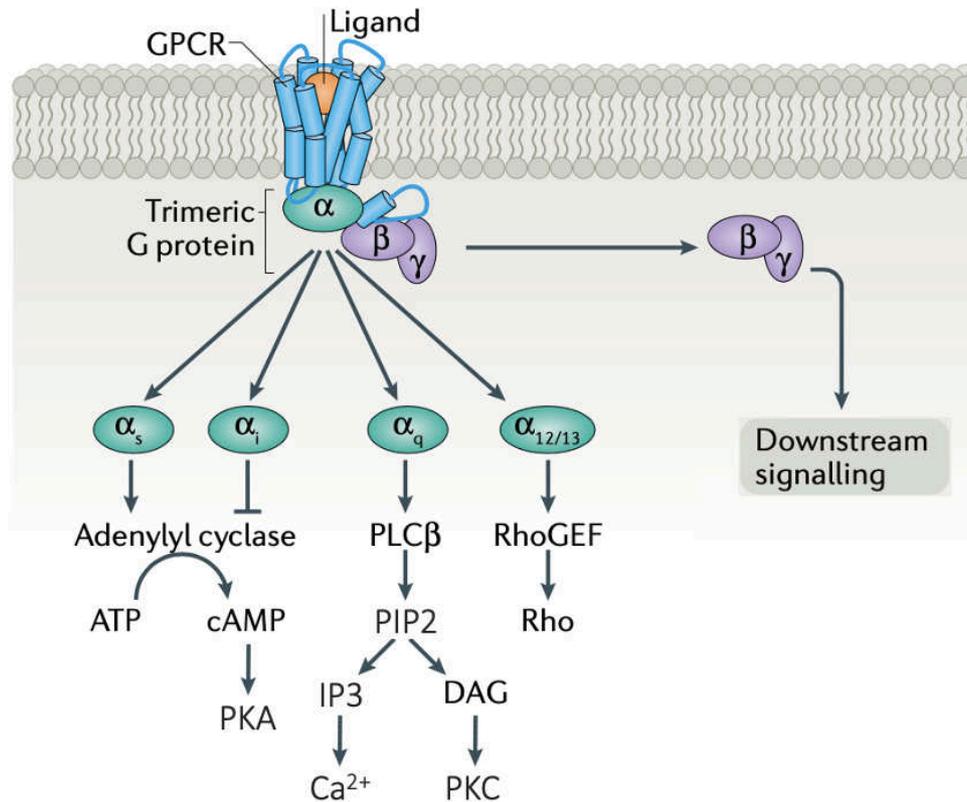


Figure 29. Les voies de signalisation associées aux récepteurs couplés aux protéines G. Sous l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), la sous-unité $G\alpha$ se dissocie de la sous-unité $G\beta\gamma$. En fonction de la nature de la protéine $G\alpha$, diverses voies de signalisation peuvent être induites comme la régulation de l'adénylate cyclase, l'activation de la $PLC\beta$ et l'activation de RhoGEF. Le dimère $G\beta\gamma$ participe lui aussi à la transduction de signaux. Adaptée de (J. Pflieger et al. 2019).

2.1.3 Les récepteurs à l'adénosine (P1)

La famille des récepteurs P1 se compose de 4 sous-types qui reconnaissent l'adénosine comme ligand endogène, et sont ainsi nommés A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 . Ces récepteurs à adénosine (ARs) sont distribués dans l'ensemble de l'organisme (**Annexe 2**), avec un niveau d'expression plus élevé dans le cerveau pour les récepteurs A_1 et A_{2A} . Le récepteur A_{2B} est présent quant à lui en faible abondance dans les différents tissus qui l'expriment à l'exception des voies respiratoires, alors que le récepteur A_3 est connu pour être fortement exprimé dans le système cardiaque [377,388]. Ces RCPG possèdent classiquement 7 domaines transmembranaires associés à une extrémité N-terminale extracellulaire et une C-terminale intracellulaire. La première contient un ou plusieurs sites de glycosylation, tandis que l'extrémité COOH fournit des sites de phosphorylation, jouant un rôle dans les mécanismes de désensibilisation et d'internalisation des ARs [389]. Les sous-types de récepteurs P1 présentent une affinité de liaison différente pour l'adénosine. Les récepteurs A_1 et A_{2A} ont une grande affinité et sont activés par des niveaux physiologiques d'adénosine extracellulaire, A_3 a une affinité intermédiaire, alors que le récepteur A_{2B} possède la plus faible affinité pour l'adénosine [377,390]. Comme décrit précédemment, cet agoniste naturel est formé par déphosphorylations successives de ses

précurseurs ATP, ADP et GTP par la NTPDase CD39 (*cluster of differentiation 39*) et la 5'NT CD73 (*cluster of differentiation 73*). L'adénosine peut également être libérée par les transporteurs de nucléosides d'équilibre (ENTs), et absorbée par ces mêmes transporteurs ou par les transporteurs de concentration (CNTs). Par ailleurs, l'adénosine peut être convertie en inosine dans le milieu extra-cellulaire par l'adénosine désaminase (ADA) pour activer les récepteurs A_{2A} et A_{2B} [379].

Sur le plan fonctionnel, les ARs sont couplés à différentes protéines G, modulant l'activité de l'adénylate cyclase (AC) de manière positive ou négative, affectant les niveaux d'AMPc cytoplasmiques. Les récepteurs A₁ et A₃ sont couplés à la protéine G_i, inhibant ainsi l'AC alors qu'au contraire les récepteurs A_{2A} et A_{2B} sont liés à la protéine G_s qui stimule l'AC et la production d'AMPc. Les récepteurs à l'adénosine régulent également l'activation de la PLC en interagissant avec la protéine G_q et déclencher le relargage massif de calcium dans le cytosol et l'activation de protéines dépendantes du calcium comme la PKC. De plus, tous les récepteurs P1 stimulent les voies MAPK, incluant les kinases ERK1 et ERK2, la kinase Jun N-terminale (JNK) et la p38-MAPK [391]. Par ailleurs, ils peuvent se dimériser avec un même récepteur, on parle d'homodimère, ou bien avec un autre récepteur, on parle d'hétérodimère. C'est le cas par exemple du complexe A₁-A_{2A} qui est ainsi couplé aux deux protéines G_i et G_s, et dont l'effet sur l'AC dépend de la concentration en adénosine [392]. Des interactions avec des récepteurs d'une autre famille ont également été observés comme les hétérodimères A₁-P2Y_{1/2} [393] et AR-récepteurs dopaminergiques [394].

Les récepteurs à adénosine sont ainsi impliqués dans un grand nombre de réponses physiologiques telles que la modulation du système cardiovasculaire ; le contrôle des fonctions cérébrales comme l'activité motrice, les comportements psychiatriques, le relargage des neurotransmetteurs ; la modulation de diverses réponses immunitaires et l'atténuation de l'inflammation ; mais également la régulation des systèmes respiratoire et rénal. Les récepteurs P1 jouent ainsi un rôle important dans de nombreuses maladies neurologiques (MA, PD), cardiovasculaires, inflammatoires et auto-immunes (MICI, diabète) et dans les cancers. Ils représentent alors des cibles de choix pour le traitement de ces pathologies pour lesquelles plusieurs agonistes et antagonistes ont été développés en clinique. L'adénosine est utilisée pour prévenir l'infarctus du myocarde ou traiter la tachycardie supraventriculaire, comme le Neladenoson, un agoniste du récepteur A₁. Au contraire, des antagonistes de ce même récepteur, dont la Théophylline, protègent contre les crises d'asthme. L'antagoniste du récepteur A_{2A}, l'Istradefylline, est commercialisé au Japon pour le traitement de la maladie de Parkinson [377,389].

2.1.4 Les récepteurs ionotropiques (P2X)

Les récepteurs P2X (P2XR) sont des canaux ioniques à ligands, aussi connus sous le nom de récepteurs ionotropiques, dont l'ATP est le seul agoniste physiologique. Cette famille de récepteurs membranaires est constituée de 7 membres (P2X₁₋₇) qui comprennent chacun deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 (**Figure 30A**). Le domaine TM1 régule l'ouverture du canal alors que le domaine TM2 fait face au canal interne, formant le pore conducteur d'ions. Ils présentent également une large boucle extra-cellulaire contenant le site de liaison à l'ATP, ainsi que des extrémités N- et C-terminale intra-cellulaires qui interagissent avec des protéines régulatrices de l'activité du récepteur. Les récepteurs P2X s'assemblent à la

membrane dans une conformation trimérique en forme de calice, composée de 3 sous-unités. On retrouve ainsi 6 homotrimères (P2X1-5 et P2X7) et 7 hétérotrimères (P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/5, P2X2/6, and P2X4/6) [395,396]. P2X6 n'est pas capable de former un homotrimère, il n'est fonctionnel que sous forme hétérotrimérique [397].

Le récepteur fonctionnel étant un trimère, il présente trois sites de liaison à l'ATP qui doivent tous être occupés pour déclencher l'ouverture du récepteur/canal. Au niveau du domaine extra-cellulaire de chaque sous-unité, les résidus chargés positivement interagissent avec les charges négatives des phosphates d'un ATP. Ces liaisons induisent l'ouverture du canal ionique dans la partie inférieure de la structure du récepteur, en élargissant la région des domaines TM [377]. Selon le trimère considéré, l'affinité pour l'ATP diffère, ce qui influence sa désensibilisation. Par exemple, l'homotrimère P2X7, qui possède la plus faible sensibilité, nécessite des concentrations importantes d'ATP pour être activé et ne peut pratiquement pas être désensibiliser [398]. A l'inverse, P2X1 et P2X3 ayant une affinité importante pour l'ATP, se désensibilisent rapidement. En outre, l'exposition prolongée des récepteurs P2X aux agonistes peut conduire à l'élargissement du pore qui devient perméable à de grosses molécules [399].

L'activation de ces canaux ioniques permet le passage de petits cations à travers la membrane. Il en résulte un influx de calcium et de sodium extra-cellulaires dans la cellule associé à un efflux de potassium (**Figure 30B**), qui mènent à l'activation de diverses voies de signalisation. Souvent, l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} consécutive à l'activation des P2XR induit la dépolarisation de la membrane plasmique, ainsi que des cascades de signalisation via la calmoduline, les MAPKs, la calcineurine, la PKC, etc [395,400,401]. Comme décrit précédemment, l'influx de potassium à travers le récepteur P2X7 est déterminant dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à un large éventail de signaux de danger.

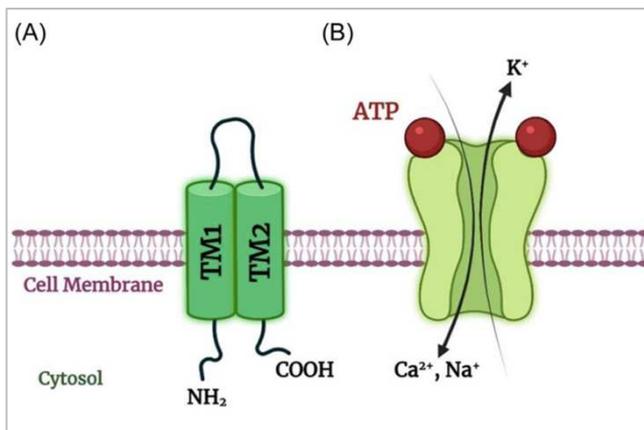


Figure 30. Les récepteurs ionotropiques P2X. (A) Un monomère se compose d'une boucle extra-cellulaire, de deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 et des extrémités N- et C-terminale cytosoliques. (B) Ces canaux ioniques à ligands lient plusieurs ATP permettant l'ouverture du canal perméable aux cations potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}) et sodium (Na^+). Adaptée de (A. Mahmood et J. Iqbal 2022).

L'expression des P2XR étant étendue à l'ensemble de systèmes du corps humain (nerveux, cardiovasculaire, respiratoire, urinaire, gastrointestinal, immunitaire, squelettique, endocrine) (**Annexe 2**), on les retrouve impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Ainsi, ils jouent un rôle clé dans la neurotransmission, la contraction des muscles, la sécrétion de cytokines mais aussi la transduction du goût et de la douleur [402]. Des études ont, par ailleurs, montré le lien entre des polymorphismes de ces récepteurs altérant leurs fonctions et certaines pathologies telles que des maladies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde) et des maladies

neurodégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson) [403,404]. Plusieurs agonistes et antagonistes des récepteurs P2X ont donc été développés pour le traitement de ces maladies.

2.1.5 Les récepteurs métabotropiques (P2Y)

La famille des récepteurs P2Y (P2YR), aussi appelés récepteurs métabotropiques, comprend huit membres (P2Y1,2,4,6,11-14). Les agonistes endogènes reconnus par ces récepteurs incluent des nucléotides à base d'adénine ou d'uridine comme l'ATP, l'ADP, l'UTP et l'UDP mais aussi des sucres nucléotidiques. Chaque récepteur possède une affinité préférentielle pour un ou plusieurs de ces agonistes extracellulaires. Ainsi l'ATP est le plus efficace pour P2Y11, alors que P2Y1, P2Y12 et P2Y13 préfèrent l'ADP. Au contraire, P2Y2 est activé de façon plus efficace par l'UTP que l'ATP mais est presque insensible à l'ADP. Les récepteurs P2Y4, P2Y6 et P2Y14 présentent, respectivement, une meilleure affinité pour l'UTP, l'UDP, et les UDP-glucose et UDP-galactose (**Figure 31**) [398]. Comme les récepteurs à l'adénosine, les P2YR sont couplés aux protéines G et partagent une structure générale commune. Ils se composent d'abord d'une extrémité N-terminale extra-cellulaire qui contient des sites potentiels de N-glycosylation. Ensuite, ils présentent 7 domaines transmembranaires (TM) hydrophobes dont les TM 3, 6 et 7 forment le site de liaison au ligand. Les TM sont reliés par 3 boucles extra-cellulaires et 3 boucles intra-cellulaires qui participent au couplage avec la protéine G. Enfin, ils comprennent une queue C-terminale intra-cellulaire contenant des sites de phosphorylations essentiels pour leur désensibilisation, la transduction de signaux et leur internalisation [377,405]. En se basant sur la nature de la protéine G avec laquelle ils sont couplés et leur similarité de séquence, ces récepteurs ont été classés en deux groupes. Le 1^{er} groupe rassemble des récepteurs de type P2Y1, incluant les récepteurs P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 et P2Y11, et active la protéine $G\alpha_q$. À l'inverse, le 2^{ème} groupe est couplé à la protéine $G\alpha_i$ et comprend les récepteurs P2Y12, P2Y13 et P2Y14. Cependant, les récepteurs du 1^{er} groupe sont connus pour lier les autres familles de protéines G (**Figure 31**) [405].

La signalisation induite en aval des P2YR dépend de la protéine G à laquelle ils sont couplés. Les récepteurs couplés à la protéine $G\alpha_q$ activent classiquement la PLC et les voies de signalisation IP3/DAG-PKC qui en découlent. Le récepteur P2Y11 est également capable d'induire la production d'AMPc en activant l'adénylate cyclase par sa liaison avec la protéine $G\alpha_s$. De la même façon, P2Y1, P2Y2 et P2Y6 activent les petites protéines G Rho ou Rac via leur liaison avec les protéines $G\alpha_q$, $G\alpha_o$ ou $G\alpha_{12/13}$ (**Figure 31**). Au contraire, l'activation des récepteurs P2Y12-14 conduit à l'inhibition de l'AC et à la réduction des niveaux d'AMPc intracellulaires [377]. De plus, de nombreuses études ont montré la modulation de l'activité de canaux ioniques ainsi que de récepteurs de facteurs de croissance par différents sous-types de P2YR, comme le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGF) (EGFR) [405]. De façon similaire aux ARs, les récepteurs P2Y peuvent dimériser pour former des homodimères ou des hétérodimères. Par exemple, P2Y1 et P2Y2 sont tous deux capables de former un complexe dimérique avec le récepteur A_1 , alors que les récepteurs P2Y4, P2Y6 et P2Y12 forment des homodimères [406,407].

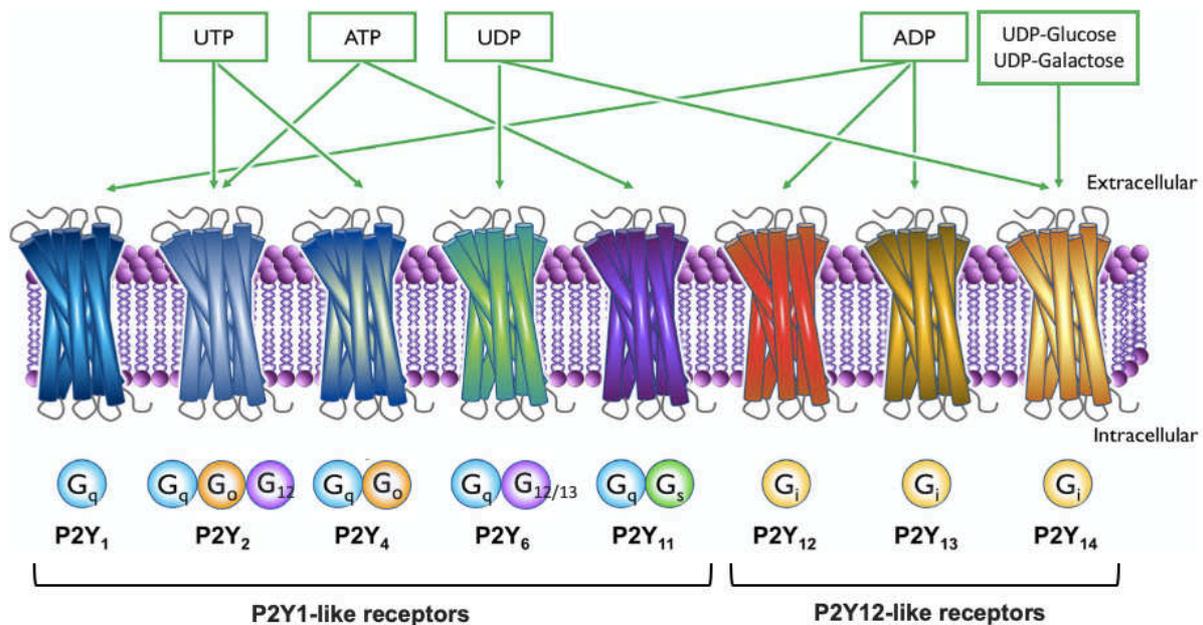


Figure 31. La famille des récepteurs P2Y et leurs agonistes endogènes. Chaque membre de cette famille de récepteurs membranaires reconnaît un ou plusieurs nucléotides par lesquels il est préférentiellement activé (UTP, ATP, UDP, ADP, UDP-glucose ou UDP-galactose). Les récepteurs de type P2Y1 sont couplés à la protéine $G_{\alpha q}$ alors que ceux ressemblant au récepteur P2Y12 sont couplés à la protéine $G_{\alpha i}$. Certains récepteurs du 1^{er} groupe peuvent aussi interagir avec d'autres protéines G. Adaptée de (A. Neumann et al. 2020).

Un mécanisme de désensibilisation se met également en place en réponse à la liaison de l'agoniste, médié par des kinases régulatrices des RCPG (GRKs). En effet, la phosphorylation par les GRKs de certains résidus de la queue C-terminale des récepteurs P2Y est nécessaire à la liaison de β -arrestines, qui en retour désensibilisent le récepteur en inhibant son interaction avec la protéine G et en provoquant son internalisation par endocytose. Par ailleurs, la β -arrestine est impliquée dans la transduction de signaux puisqu'en interagissant directement avec les MAPKs ERK1/2 et la protéine tyrosine kinase proto-oncogène (Src), elle contrôle entre autres la prolifération et la survie cellulaire, respectivement [408]. En revanche, les P2YR peuvent être resensibilisés indépendamment de leurs agonistes. Ce mécanisme repose sur la phosphorylation des récepteurs par des kinases comme la PKC ou la PI3K, activées par des facteurs de croissance tels que l'EGF [409,410].

Les récepteurs P2Y sont exprimés dans l'ensemble des cellules du corps humain, et ont un rôle particulièrement important dans les fonctions cardiaques, immunitaires et nerveuses. Le couplage des P2YR avec les canaux ioniques a notamment montré son importance dans les neurones pour assurer la neurotransmission, mais ils ont aussi été détectés dans les cellules musculaires cardiaques ou encore dans les plaquettes, contrôlant l'agrégation plaquettaire. Des polymorphismes de certains de ces récepteurs ont été identifiés et associés à diverses pathologies. Ainsi, plusieurs composés chimiques ont été développés cliniquement, comme des antagonistes du récepteur P2Y12 pour traiter et prévenir l'agrégation plaquettaire [377,411].

2.2 Le récepteur purinergique P2Y2

2.2.1 La structure du récepteur P2Y2

Le récepteur P2Y2 (P2Y2R), initialement nommé P2U, est localisé sur le chromosome 11. Il comporte 377 acides aminés qui contiennent la structure classique des RCPG, à savoir 7 domaines TM, 3 boucles extra-cellulaires (ECL1-3), 3 boucles intra-cellulaires, un C-terminal intracellulaire et un N-terminal extracellulaire. À l'aide d'études d'ancrage et de mutagenèse du récepteur, il est aujourd'hui connu que les TM3, TM6 et TM7 permettent de lier les phosphates des nucléotides triphosphates alors que la boucle extra-cellulaire 3 interagit avec les agonistes portant deux phosphates [412,413]. De plus, les ECL2 et 3 possèdent chacune deux résidus cystéines formant un pont disulfure qui semble participer à l'activation du récepteur. La transduction du signal dépend, quant à elle, d'une part de l'extrémité intra-cellulaire C-terminale via son couplage à une protéine G, ainsi que par la présence de sites de phosphorylations comme les domaines de liaison d'homologie 3 à Src (**SH3**) [414] ; et d'autre part d'un domaine de liaison aux intégrines constitué de 3 acides aminés (arginine, glycine et acide aspartique) (**RGD**) contenu dans l'ECL1 [415].

2.2.2 Les mécanismes d'activation, de signalisation et de terminaison du récepteur P2Y2

Le récepteur P2Y2 possède une particularité parmi les P2YR puisqu'il est le seul à être activé à la fois par un nucléotide purique (ATP) et par un nucléotide pyrimidique (UTP). Ces deux agonistes naturels, dont l'efficacité est la plus importante pour l'UTP, peuvent être libérés par de nombreux types cellulaires à travers la pannexine-1 par exemple, et activent pleinement le récepteur P2Y2 [414]. Leurs analogues γ -thiophosphates, l'ATP γ S et l'UTP γ S, se comportent également comme des agonistes. Ces derniers étant néanmoins non hydrolysables, ils sont résistants aux ectonucléotidases [377]. En outre, le récepteur P2Y2 répond aux polyphosphates dinucléosidiques endogènes, dont la diadénosine-tétraphosphate (Ap4A), ainsi qu'à la diuridine-tétraphosphate (Up4U) [411]. Au contraire, l'ADP et l'UDP sont peu efficaces et jouent le rôle d'agonistes partiels [416,417].

Comme évoqué précédemment, ce récepteur est principalement connu pour être couplé à la protéine G α_q mais plusieurs études ont montré que les protéines G α_o ou G $\alpha_{12/13}$ interagissent aussi avec P2Y2R, à l'origine de diverses signalisations. Il a été démontré par plusieurs travaux que le couplage de ce récepteur avec G α_o ou G $\alpha_{12/13}$ dépend de l'interaction du domaine RGD avec des intégrines α_v qui recrutent ces protéines G au niveau du récepteur P2Y2. À l'inverse, cette interaction n'est pas nécessaire pour le couplage avec G α_q [418–420]. Comme tous les P2YR, l'activation de ce récepteur par ses agonistes entraîne sa désensibilisation via l'interaction avec des β -arrestines, et dépend dans le cas de P2Y2R du ligand qui le stimule. En effet, alors que l'UTP induit une interaction forte avec les β -arrestines 1 et 2, l'ATP n'entraîne la liaison que de la β -arrestine 1, nécessitant des concentrations bien plus élevées que l'UTP pour désensibiliser P2Y2R et arrêter les signalisations. Par ailleurs, il a été montré que ce mécanisme nécessite la phosphorylation de la queue C-terminale de P2Y2R par la GRK2 alors que son internalisation semble être indépendante de la dynamine, contrairement aux autres P2YR [405]. De plus, Santiago-Pérez et al. ont montré dans les monocytes que la désensibilisation prolongée de ce récepteur est corrélée avec une diminution de sa transcription ainsi qu'à un découplage fonctionnel avec les voies de signalisation qu'il induit [421].

Non seulement l'internalisation et la désensibilisation du récepteur P2Y2 interrompent la signalisation, mais aussi la dégradation des nucléotides par les ectonucléotidases, comme décrit précédemment.

2.2.3 L'expression et les fonctions physiologiques du récepteur P2Y2

Le récepteur P2Y2 est distribué dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Son expression sous forme d'ARNm est notamment fortement détectée dans les poumons, le cœur, le cerveau, les muscles squelettiques, la rate, les reins, la moelle osseuse et le système immunitaire. D'un point de vue cellulaire, le récepteur P2Y2 fonctionnel est présent dans les cellules immunitaires (lymphocytes et macrophages), épithéliales, endothéliales, mais aussi dans les cardiomyocytes, les ostéoblastes, ou encore les cellules des systèmes nerveux périphérique et central. Par ailleurs, l'expression du récepteur se trouve être polarisée dans les cellules épithéliales puisqu'il est retrouvé au niveau de la surface apicale de multiples lignées cellulaires épithéliales. Qi et al. ont démontré que l'adressage de P2Y2R à la membrane apicale dépend du domaine RGD qui contient le signal d'adressage permettant la polarisation de son trafic cytosolique [422].

Le récepteur P2Y2 joue ainsi un rôle majeur dans de nombreuses réponses physiologiques. Il est notamment important dans les réponses immunitaires à travers la modulation de la migration des cellules immunes dont les cellules dendritiques et les neutrophiles [423,424], favorisant leur infiltration tissulaire. De même, il favorise l'activité phagocytaire des macrophages et des cellules microgliales [425,426], ainsi que la cicatrisation des plaies par les neutrophiles [427]. Il influence également les fonctions cardiaques en régulant la tension artérielle par la promotion de la vasodilatation des vaisseaux sanguins [428], tout comme les fonctions rénales par la régulation du transport ionique au sein des cellules épithéliales [429]. À travers la modulation de l'équilibre ionique, P2Y2R contrôle aussi les sécrétions salivaires, lacrymales et pancréatiques. Il joue un rôle important au niveau des systèmes endocrinien et métabolique [411]. On le retrouve impliqué dans certaines fonctions neuronales comme la différenciation et la régénération des neurones ou bien la nociception [430]. Il régule aussi la formation des os par les ostéoblastes et leur minéralisation [431], l'organisation de certaines cellules épithéliales [432], mais aussi la prolifération et la progression dans le cycle cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires [433,434].

2.2.4 Les voies de signalisation contrôlées par le récepteur P2Y2

2.2.4.1 La signalisation du cytosquelette d'actine

Le récepteur P2Y2 régule l'organisation du cytosquelette d'actine en favorisant sa réorganisation. Différentes voies de signalisation induites par P2Y2R sont ainsi capables d'entraîner la modification du cytosquelette qui transmet les signaux biochimiques et les forces nécessaires à la locomotion des cellules.

La liaison d'ATP ou d'UTP au récepteur induit l'interaction directe de son domaine RGD extracellulaire avec les intégrines membranaires $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$. La protéine $G\alpha_o$ devient accessible au récepteur P2Y2 au niveau intra-cellulaire, qui peut alors l'activer. La protéine G active à son tour la protéine Vav2, un facteur d'échange de la petite protéine G Rac (RacGEF), qui mène à l'activation de Rac sous forme liée au GTP (RacGTP). Cette petite GTPase entraîne l'activation successive de deux kinases : d'abord la kinase PAK qui phosphoryle ensuite la kinase 1 à

domaine LIM liant l'actine (LIMK1), responsable de la phosphorylation de la protéine de désassemblage de l'actine, la cofiline. Cette dernière se retrouve inhibée, favorisant la croissance des filaments d'actine (F-actine) à proximité du récepteur activé (**Figure 32**). Par ailleurs, Bagchi et al. ont montré que l'activation de P2Y2R par l'UTP déclenche également une augmentation d'expression de deux protéines de la matrice extra-cellulaire, la fibronectine et l'ostéopontine, en fonction du type cellulaire [419]. Leur liaison aux intégrines renforce la signalisation décrite et participe à la migration par chimiotaxie des cellules qui les sécrètent. Il s'agit d'un mécanisme de motilité cellulaire initié en réponse à un stimulus chimique, ici l'UTP et les ligands des intégrines, aussi appelés molécules chémoattractantes [419,420].

De façon similaire, l'interaction du récepteur P2Y2 aux intégrines $\alpha\beta3/5$ lui permet d'accéder à la protéine $G\alpha_{12}$, entraînant ainsi l'activation de cette protéine G hétérotrimérique qui contrôle les réarrangements du cytosquelette d'actine dépendant de la petite protéine G RhoA (**Figure 32**). En effet, une fois activée, cette GTPase lie la protéine kinase associée à Rho (ROCK) pour stimuler des effecteurs en aval. L'activation de la kinase liant l'actine LIMK2 par ROCK entraîne la phosphorylation et l'inactivation de la cofiline, ce qui inhibe la dépolymérisation des filaments d'actine. D'autre part, la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine 2 (MLC2) médiée par ROCK favorise une contraction accrue de l'actomyosine et donc la migration cellulaire [418,435].

Par ailleurs, il existe une signalisation directe du cytosquelette induite par le récepteur P2Y2. Celle-ci fait intervenir les domaines SH3 de la queue C-terminale qui permettent de lier la filamine A, une protéine de liaison à l'actine. Ainsi, P2Y2R est directement associé au cytosquelette d'actine (**Figure 32**). L'activation du récepteur par ses agonistes entraîne la phosphorylation de la filamine A favorisant alors le réarrangement du cytosquelette, ainsi que la migration cellulaire [436,437].

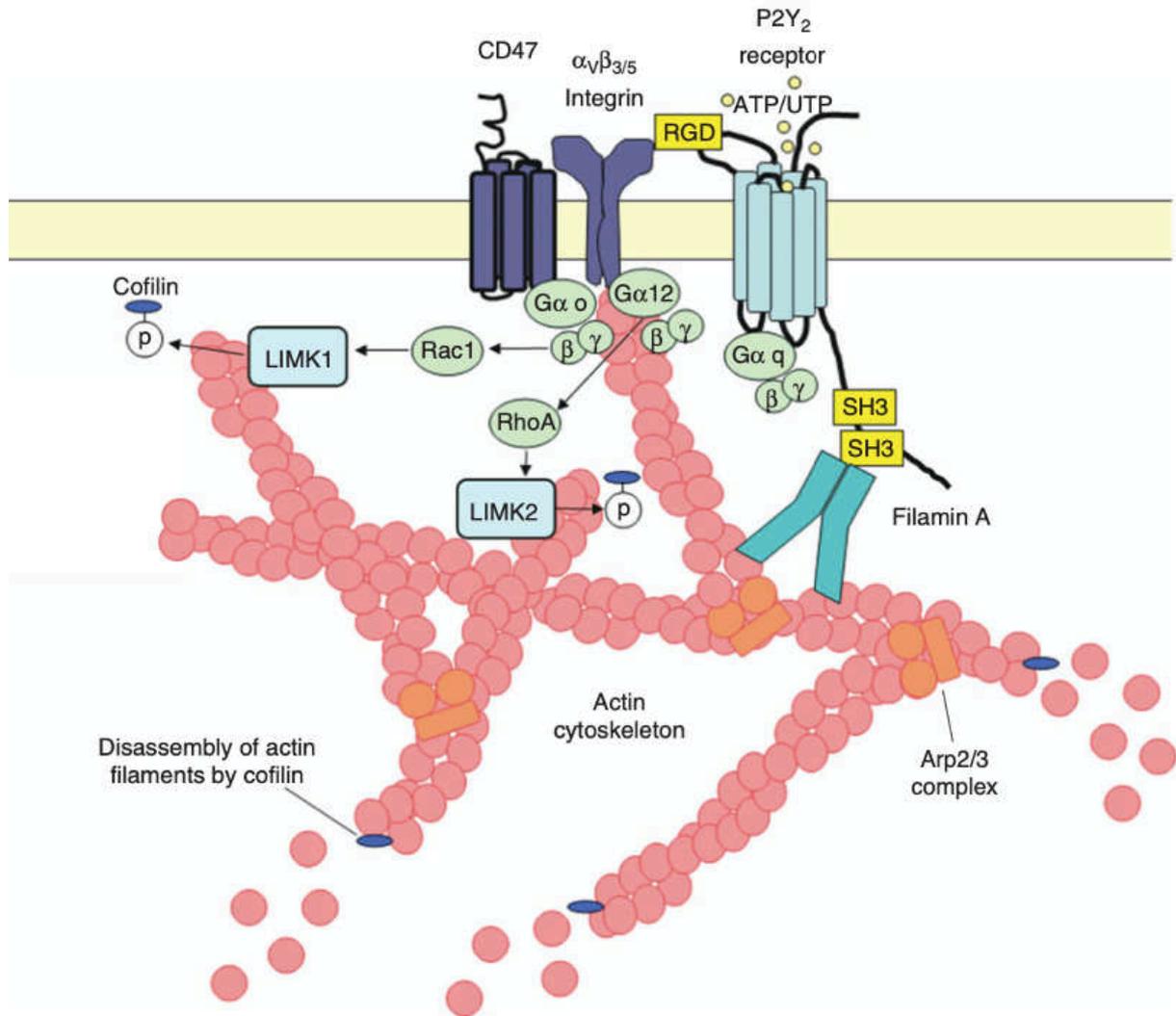


Figure 32. La signalisation du cytosquelette d'actine médiée par le récepteur P2Y2. À travers le domaine RGD, le récepteur P2Y2 stimule la signalisation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ via les protéines G_{α_o} et $G_{\alpha_{12}}$ qui induisent un réarrangement du cytosquelette d'actine dépendant des petites protéines G Rac1 et RhoA, respectivement. L'activation du récepteur par ses agonistes, les nucléotides ATP et UTP, favorise également la formation de filaments d'actine et la migration cellulaire qui y est associée, par l'intermédiaire de la protéine de liaison à l'actine, la filamine A. Adaptée de (L. Erb et G A. Weisman 2012).

Enfin, l'activation de la tyrosine kinase PYK2 est connue pour moduler le réarrangement et la polymérisation de la F-actine afin de réguler la migration des cellules immunitaires comme les macrophages [438–441]. Séror et al. ont par ailleurs montré que la phosphorylation de PYK2 induite par P2Y2R permet la polymérisation de filaments d'actine, nécessaire à l'entrée du VIH-1. Plusieurs voies de signalisation déclenchées par ce récepteur sont aujourd'hui connues pour mener à la phosphorylation de PYK2. L'une d'elles fait intervenir la kinase Src qui interagit avec un domaine SH3 de P2Y2R activé, et entraîne la phosphorylation activatrice de PYK2 [442–444]. D'autres articles suggèrent que l'activation de PYK2 par ce récepteur est médiée par la PKC suite à l'élévation intra-cellulaire du calcium dépendante de P2Y2R [415,445].

Le réarrangement du cytosquelette d'actine soutient la migration et les fonctions de divers types cellulaires tels que les macrophages, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules dendritiques, les éosinophiles, les neutrophiles ainsi que les astrocytes [423,424,433].

2.2.4.2 La modulation des flux ioniques

À travers le couplage avec la protéine $G\alpha_q$, le récepteur P2Y2 module les concentrations intracellulaires de diverses cations et anions, dont le plus connu est le calcium (**Figure 33**).

En effet, l'activation de cette protéine G par P2Y2R stimule classiquement la protéine PLC β qui forme de l'IP3 à partir du phospholipide PIP2. Il en résulte une augmentation massive du niveau cytosolique de Ca^{2+} à la suite de l'ouverture du canal calcique IP3R à la membrane du RE. La PLC β permet également de générer du DAG, un activateur endogène de la PKC, qui active à son tour la phospholipase A2 (PLA2) et produit de l'acide arachidonique (AA), précurseur de la PGE2. Cette dernière bloque par ailleurs la signalisation du récepteur P2Y2 et son expression dans les astrocytes et des macrophages, respectivement [446,447]. L'excès de calcium peut également déclencher l'activation de la PKC et/ou directement celle de la PLA2 ; de la même façon qu'il induit la production de monoxyde d'azote (NO) et l'activation de la protéine kinase G (PKG) via la calmoduline [405].

Néanmoins, une partie de la signalisation calcique est indépendante de la protéine $G\alpha_q$ et passe par le domaine RGD extra-cellulaire du récepteur P2Y2. Erb et al. ont montré que P2Y2R régule le flux calcique intra-cellulaire à travers son interaction avec les intégrines $\alpha_v\beta_3/5$ et l'activation de la protéine $G\alpha_{\beta\gamma}$. Celle-ci est capable d'initier les signalisations dépendantes du calcium en aval du récepteur, telles que la voie des MAPK [420]. Une étude de Murthy et al. a d'ailleurs décrit que le récepteur P2Y2 se couple à la PLC β_3 via les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine $G\alpha_{13}$ alors qu'il stimule la PLC β_1 via la protéine $G\alpha_q$ [448].

Enfin, la littérature fait état du couplage du récepteur P2Y2 avec des récepteurs membranaires, comme le canal calcique activé par la libération de calcium (CRAC) et le récepteur 2 de la chimiokine à motif C-X-C (CXCR2), à travers lesquels il entraîne l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules, dépendante de l'augmentation du calcium intra-cellulaire [405,449]. En revanche, P2Y2R semble inhiber l'entrée de calcium par les canaux calciques de type N activés par le voltage dans les neurones du système nerveux sympathique [450].

D'autres flux ioniques sont contrôlés de façon indirecte, notamment par l'augmentation du calcium intra-cellulaire dépendante de la signalisation P2Y2-PLC β , qui influence l'ouverture de divers canaux ioniques (**Figure 33**). La stimulation du récepteur P2Y2 augmente ainsi la sécrétion de chlorure en ouvrant le canal de chlorure dépendant du calcium (CaCC) et le régulateur de conductance transmembranaire de la mucoviscidose (CFTR) [451,452]. Par ailleurs, plusieurs études indiquent que l'activation de P2Y2R induit l'inhibition du co-transporteur $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC2), empêchant la réabsorption cellulaire de sodium, potassium et chlorure [453,454]. De façon similaire, la réabsorption de sodium est limitée par P2Y2 dans les cellules épithéliales à travers l'inhibition de l'expression du canal de sodium épithélial (ENaC). De plus, Rajagopal et al. ont mis en évidence que l'activation du récepteur P2Y2 favorise indirectement le transport de Na^+ vers le milieu extra-cellulaire, consécutif à l'induction de la sécrétion de Cl^- [455].

La modulation des concentrations ioniques par P2Y2R influence par conséquent les mouvements d'eau à travers la membrane cellulaire, on parle de régulation osmotique. Il contribue d'une part à bloquer la réabsorption d'eau, et favorise, d'autre part, la sécrétion d'eau

associée à celle du chlorure de sodium. Le récepteur P2Y2 participe de cette façon à maintenir l'homéostasie osmotique cellulaire, notamment au niveau des épithéliums rénal, respiratoire et conjonctival [453,456].

Enfin, les flux de potassium peuvent être modulés par le récepteur P2Y2 dans certains types cellulaires. Par exemple, Filippov et al. ont observé l'inhibition du courant de potassium à travers les canaux K^+ de type M activés par le voltage suite à l'activation de P2Y2R dans les neurones sympathiques [450]. De plus, une étude révèle que les récepteurs P2Y2 et P2Y4 induisent une sécrétion de potassium à la suite de leur stimulation par de l'ATP ou de l'UTP dans des cellules épithéliales de colon murin [457]. Les canaux rectifiants le potassium entrant régulés par la protéine G (GIRKs) sont également modulés par P2Y2R. Leur activation est d'abord induite de façon transitoire par la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G associée au récepteur, permettant la sécrétion de K^+ . À la suite d'une stimulation prolongée de P2Y2R, les GIRKs sont inhibés par les sous-unités α_i ou α_q [458,459]. Ainsi, le récepteur P2Y2 régule les canaux ioniques dépendants du potentiel de membrane de façon dépendante de l'augmentation de calcium cytosolique. Pourtant, il a été suggéré qu'un motif spécifique au niveau de la queue C-terminale du récepteur P2Y2 qui pourrait interagir directement avec ces canaux [460].

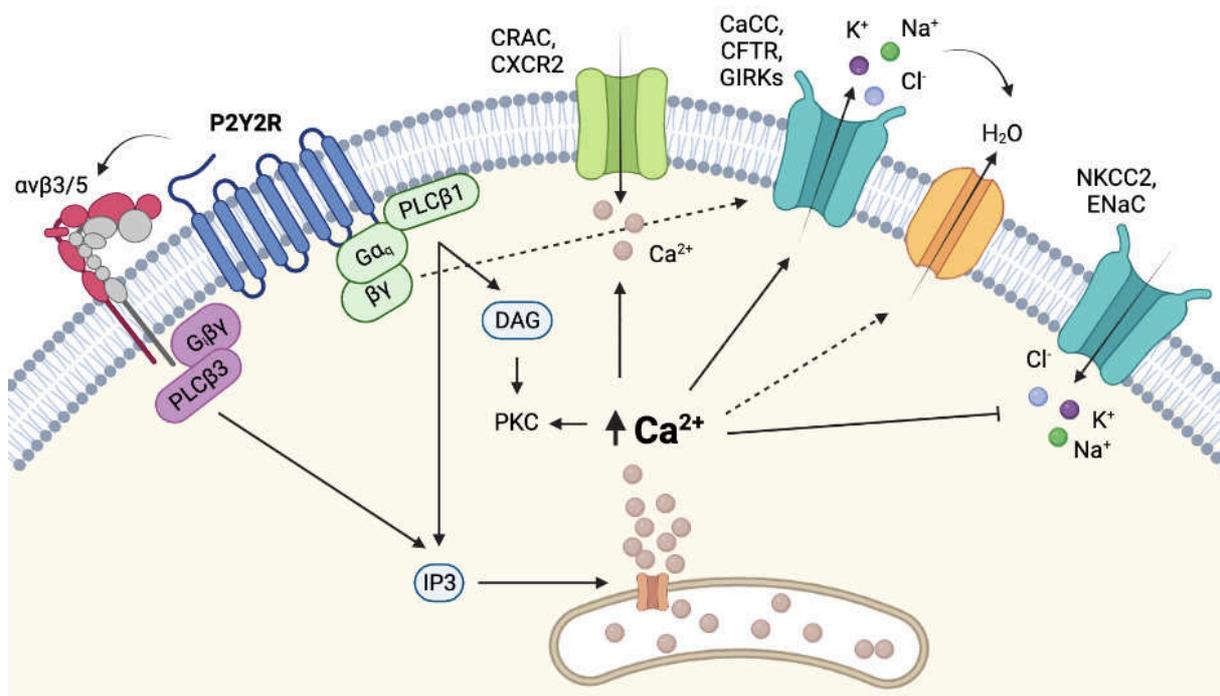


Figure 33. La régulation des flux ioniques par le récepteur P2Y2. L'activation du récepteur P2Y2 (P2Y2R) stimule la protéine $G\alpha_q$ qui active à son tour la voie PLC β_1 dont résulte la production d'IP3 et de DAG. L'IP3 déclenche le relargage massif de calcium depuis le réticulum endoplasmique, augmentant la concentration cytosolique de Ca^{2+} , à l'origine de l'entrée de calcium via des canaux calciques qui en dépendent (CRAC, CXCR2) ; de la sécrétion de chlorure, potassium et sodium par des canaux dépendants du voltage (CaCC, CFTR, GIRKs) associée à une sécrétion d'eau (H_2O) ; et de l'inhibition de la réabsorption du chlorure, potassium et sodium à travers les canaux NKCC2 et ENaC. Le DAG active la protéine kinase C, elle-même stimulée par le calcium cytosolique. Le récepteur P2Y2 est également capable de stimuler la PLC β_3 via la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G_i après interaction avec les intégrines $\alpha\beta_3/5$. Créée sur BioRender.com

2.2.4.3 L'activation de la voie des MAP-kinases

En plus de la capacité à réguler le cytosquelette d'actine et les flux ioniques, le récepteur P2Y2 influence largement la voie de signalisation des MAP kinases (**Figure 34**). Ces dernières sont des protéines kinases à sérine-thréonine intra-cellulaires qui assurent la transduction des signaux entre les récepteurs de la membrane plasmique et les composants du cytoplasme et du noyau qui régulent les processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration et la survie [461].

Il est aujourd'hui reconnu que la stimulation de la PKC par le récepteur P2Y2 aboutit à l'activation de certaines MAPK (**Figure 34**) [462,463]. En effet, la liaison des agonistes ATP ou UTP au récepteur entraîne la phosphorylation des kinases régulées ERK1/2 médiée par la PKC. Soltoff et al. ont d'ailleurs suggéré que l'activation de ERK1/2 dépend de l'élévation cytosolique de calcium ainsi que de la stimulation de PYK2 par la PKC [445]. Selon le type cellulaire considéré, la modulation de ces kinases par la PKC peut également se faire indépendamment du calcium [464]. En plus de ERK1/2, P2Y2R peut induire la phosphorylation de la MAP kinase p38 via la signalisation PLC-PKC dans les ostéoblastes [463]. Comme décrit précédemment, l'activation de la protéine $G_{\alpha_{i/o}}$ par P2Y2R via son domaine RGD mène aussi à la phosphorylation de ERK1/2 et nécessite la mobilisation intra-cellulaire de calcium [420].

De nombreuses études montrent aussi que le récepteur P2Y2 module l'activation des MAPK via les récepteurs de facteurs de croissance (GFR) (**Figure 34**). Cette signalisation dépend principalement de la stimulation de la kinase Src qui se lie au domaine SH3 de P2Y2R, nécessaire pour activer PYK2 [442]. Ceci mène ensuite à la transactivation par phosphorylation des récepteurs à tyrosine kinases comme l'EGFR [465], le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) [442] et le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) [466]. De cette façon, P2Y2R déclenche la cascade des MAPK pour aboutir à l'activation de ERK1/2, p38 ou la kinase Jun N-terminale (JNK) [462]. Dans les cellules épithéliales, P2Y2R favorise indirectement la signalisation de l'EGFR par l'activation des métalloprotéases ADAM10 (*A disintegrin and metalloproteinase 10*) et ADAM17, qui catalysent la libération des facteurs de croissance activateurs de l'EGFR [467,468]. Ce processus de transactivation de l'EGFR semble également médié par la petite protéine G Cdc42 (*cell division cycle 42*) en aval de la liaison de P2Y2R à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ [432].

En plus de l'induction des MAPK par les GFR, le récepteur P2Y2 est capable de stimuler de façon séquentielle les kinases des MAPK 1/2 (MEK1/2) et ERK1/2 via l'activation de la PI3K par Src [421].

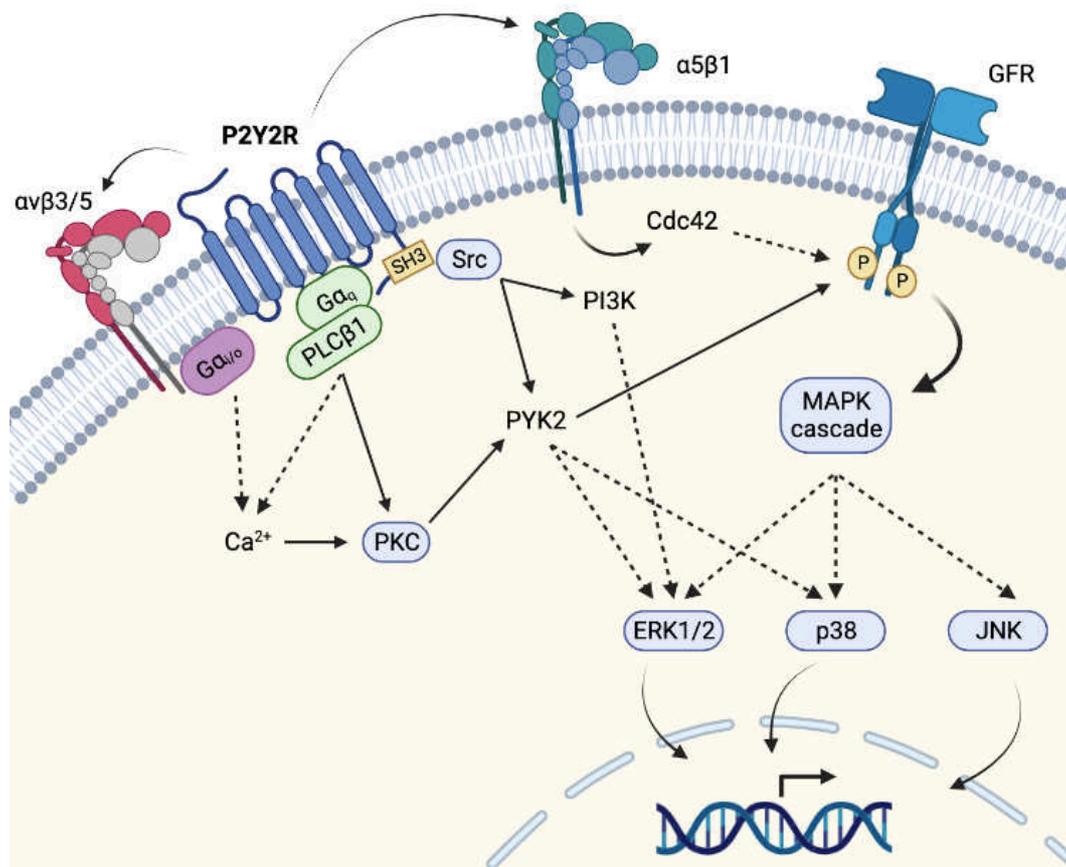


Figure 34. L'activation de la voie des MAPK par le récepteur P2Y2. L'activation du récepteur P2Y2 stimule la PKC qui active à son tour la protéine PYK2, menant à l'activation des MAPK ERK1/2 et p38. Lorsque P2Y2R est couplé à la protéine $G\alpha_{i/o}$, il entraîne également l'activation de ERK1/2. Le domaine SH3 du récepteur P2Y2 permet la stimulation des récepteurs de facteurs de croissance (GFR) induite par Src et PYK2, qui induisent l'activation de la cascade des MAPK aboutissant à celle de ERK1/2, p38 et JNK. En plus, ERK1/2 est activé par Src via la PI3K. L'interaction de P2Y2R par son domaine RGD à l'intégrine $\alpha5\beta1$ participe à stimuler les GFR et les signalisations qui en découlent. Créée sur BioRender.com

Enfin, l'internalisation du récepteur P2Y2 par les β -arrestines participe en partie à la signalisation des MAPK puisqu'elles lient directement la kinase ERK1/2. Les β -arrestines jouent en effet le rôle de protéines d'échafaudage qui interagissent avec les différentes kinases de la cascade des MAPK, aboutissant à l'activation de ERK [469]. Néanmoins, selon l'agoniste qui stimule P2Y2R, la β -arrestine recrutée n'est pas la même, ce qui influence les réponses cellulaires en aval. Ainsi, en présence d'ATP, ERK1/2 est activé de façon durable alors que l'UTP induit une activation transitoire de cette MAPK, ce qui génère des variations de la signalisation et des réponses distinctes [470].

2.2.5 Le rôle du récepteur P2Y2 dans les réponses inflammatoires

La signalisation des récepteurs purinergiques durant l'inflammation, et plus particulièrement celle du récepteur P2Y2 dépend de la présence de nucléotides dans le milieu extra-cellulaire. De nombreuses cellules peuvent être à l'origine du relargage de nucléotides comme l'ATP et l'UTP, incluant les cellules apoptotiques, nécrotiques, les cellules inflammatoires, ou lorsqu'elles

subissent un stress cellulaire. Leur sécrétion peut se faire de façon passive, ou bien par des canaux membranaires dont la pannexine et la connexine, ou encore à travers la libération de vésicules par les plaquettes par exemple [471]. En présence de fortes concentrations d'ATP ou d'UTP, le récepteur P2Y2 est activé et participe à la réponse inflammatoire en soutenant les fonctions de multiples cellules immunitaires, telles que les macrophages, les monocytes, les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les éosinophiles, les neutrophiles, et les mastocytes [472].

La détection des nucléotides libérés par les cellules apoptotiques par le récepteur P2Y2 entraîne le réarrangement du cytosquelette d'actine, nécessaire à la migration des leucocytes jusqu'au site où sont présents les débris cellulaires. L'ATP et l'UTP jouent le rôle de signaux de « recherche » chémoattractants (« *find me* » en anglais) qui recrutent les phagocytes mobiles par l'activation de P2Y2R dans ces cellules (**Figure 35**) [425]. Ainsi, les cellules inflammatoires dont les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques, répondent à une concentration graduelle de nucléotides en se déplaçant vers le noyau du gradient. Il a aussi été démontré qu'en réponse à la détection des molécules chémoattractantes comme le composant du complément C5a, les macrophages libèrent de l'ATP qui régule leur migration par la stimulation autocrine du récepteur P2Y2 [473]. Ce dernier favorise de cette façon l'élimination par phagocytose de cellules apoptotiques, nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire. Au cours des réponses immunitaires face aux pathogènes, les phagocytes sont également recrutés au site d'infection par chimiotactisme, indispensable à la résolution de l'inflammation. Stober et al. ont rapporté que l'activation du récepteur P2Y2 dans les macrophages humains favorise l'acidification des phagosomes (production de ROS et de NO) contenant des mycobactéries, participant ainsi à la destruction des mycobactéries englouties [474]. La promotion de la migration des cellules microgliales par P2Y2R a également été observé par Kim et al., facilitant la phagocytose des dépôts de protéines A β dans le cerveau [426].

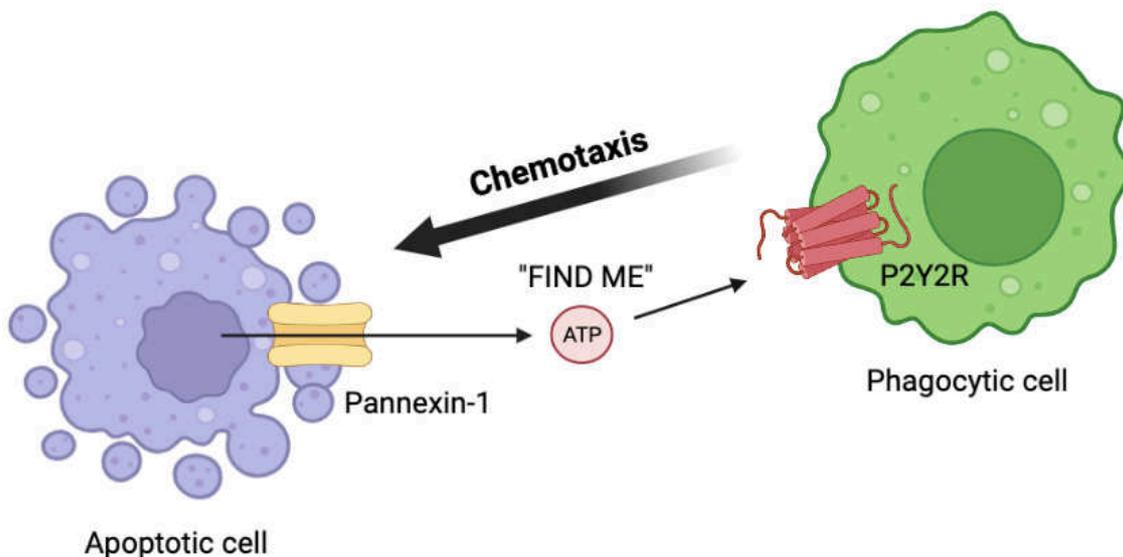


Figure 35. L'implication du récepteur P2Y2 dans le recrutement des phagocytes. Les cellules en cours d'apoptose relarguent de l'ATP qui sert de signal de « recherche » (« *find me* » en anglais) pour attirer les phagocytes en direction des cellules apoptotiques. À travers la signalisation déclenchée par le récepteur P2Y2 qui joue le rôle de senseur d'ATP, le phagocyte migre par chimiotactisme. Créée sur BioRender.com.

En plus d'induire la migration des neutrophiles par chimiotactisme [423], les signalisations en aval du récepteur P2Y2 dans ces cellules déclenchent leur activation à travers l'engagement de ses fonctions immunitaires. Ainsi, la stimulation de la PKC par P2Y2R qui mène à l'activation des kinases ERK et p38, joue un rôle essentiel dans le relargage du contenu des granules, dont des enzymes lysosomales comme l'élastase. Ce mécanisme de dégranulation par les neutrophiles est indispensable à la phagocytose des pathogènes et des cellules apoptotiques pour promouvoir la cicatrisation tissulaire [475,476]. De plus, le récepteur P2Y2 induit la mobilisation du calcium cytosolique, un marqueur d'activation des neutrophiles qui soutient leurs fonctions immunitaires comme la phagocytose et la production de ROS, la dégranulation, mais aussi l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire au cours de la migration [475,477].

D'autres processus inflammatoires impliquent le récepteur P2Y2, notamment au niveau pulmonaire où les tissus sont exposés à divers stress qui peuvent être à l'origine de la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire. Douillet et al. ont démontré que sous l'influence de nucléotides, P2Y2R induit la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 par les cellules épithéliales des voies respiratoires [478]. Le récepteur P2Y2 semble également favoriser la dégranulation et le relargage d'histamine par les mastocytes pulmonaires, une molécule qui participe à la réaction inflammatoire [479]. En outre, lors d'une inflammation de l'endothélium vasculaire des tissus pulmonaires, la libération d'ATP peut stimuler les récepteurs P2Y2 à la surface des cellules dendritiques et des polynucléaires éosinophiles, conduisant à leur recrutement et activation [424,480]. Seye et al. ont d'ailleurs montré que P2Y2R peut promouvoir les réponses inflammatoires dans les vaisseaux sanguins en augmentant l'expression de la molécule d'adhésion des cellules endothéliales vasculaires-1 (VCAM-1) à la surface des cellules endothéliales. Ce processus, qui dépend de la transactivation de GFR comme le VEGFR-2 par P2Y2R, favorise la migration des cellules immunitaires comme les monocytes en facilitant leur adhésion aux cellules endothéliales [466,481]. En outre, il a été démontré que l'activation des récepteurs P2Y2 induit la différenciation des monocytes en macrophages. Cowen et al. parlent notamment d'une activation pro-inflammatoire des monocytes, caractérisée par l'inhibition de la prolifération et l'augmentation de la réponse aux peptides chimiotactiques [421,482].

Par ailleurs, des molécules inflammatoires comme l'IL-1 β ou le LPS induisent une augmentation d'expression du récepteur P2Y2, caractérisée par des niveaux plus élevés d'ARNm [433,483,484]. Il semblerait également que la stimulation de P2Y2R par de l'ATP ou de l'UTP soit associée à un signal de priming de l'inflammasome NLRP3, à travers la surexpression de la pro-IL-1 β dans des macrophages murins [485]. Thorstenberg et al. suggèrent en revanche que le récepteur P2Y2 contribue à la résistance des macrophages contre une infection par une coopération avec le récepteur P2X7, en induisant une sécrétion d'ATP à travers la pannexine-1 [486]. Au contraire, une étude montre que l'activation de P2Y2R et la mobilisation de calcium qui en découle ne sont pas associées avec un efflux de potassium à travers P2X7, et ne permettent pas non plus d'activer l'inflammasome NLRP3 [140]. Le sujet de ce travail de thèse portant sur la relation fonctionnelle entre le récepteur P2Y2 et l'inflammasome NLRP3, cette partie sera largement rediscutée par rapport aux résultats obtenus et présentés dans ce manuscrit.

2.3 Les modulations physiopathologiques du récepteur P2Y2

2.3.1 Le rôle du récepteur P2Y2 dans un contexte physiopathologique

Compte tenu de la diversité des processus biologiques et des signalisations activés par le récepteur P2Y2, il n'est pas surprenant que ce dernier soit impliqué dans une multitude de processus pathologiques. Cependant, le récepteur P2Y2 est associé à des effets à la fois bénéfiques et néfastes selon les conditions pathologiques.

2.3.1.1 Les maladies liées à un défaut de sécrétion de fluides

2.3.1.1.1 La sécheresse de l'œil

Comme décrit précédemment, en régulant les flux ioniques des cellules épithéliales, le récepteur P2Y2 contrôle les mouvements d'eau à travers les membranes cellulaires et influence de ce fait les fonctions sécrétrices de divers tissus. Il a donc un rôle particulier à jouer dans le cadre de maladies liées à un dysfonctionnement des épithéliums sécrétoires.

Dans ce contexte, la signalisation P2Y2 a été étudiée dans le syndrome de l'œil sec, y compris dans le syndrome de Sjögren, une maladie auto-immune qui altère notamment les glandes lacrymales [487]. La sécheresse de l'œil est causée par un défaut de la sécrétion lacrymale qui peut endommager la surface oculaire et entraîner une altération de l'épithélium cornéen. Le film lacrymal, composé d'eau, de mucine et de lipides, assure l'hydratation de la cornée ainsi que sa protection contre des agressions extérieures, notamment vis-à-vis des agents pathogènes. Le récepteur P2Y2 est exprimé dans l'ensemble des cellules qui assurent la sécrétion de ce film, incluant les cellules caliciformes de la conjonctive, les cellules acineuses et les cellules de la glande de Meibomius [488,489]. Plusieurs travaux ont ainsi montré que son activation favorise la sécrétion de mucine et d'ions chlorure par l'épithélium conjonctival mais aussi celle de lipides comme le cholestérol à travers les meibocytes [488,490]. Récemment, Zhang et al. ont démontré que c'est à travers l'activation des canaux de chlorure CaCC et CFTR que P2Y2R induit un flux de Cl⁻ qui constitue une partie de la sécrétion du liquide conjonctival [452]. De plus, l'inhibition du récepteur P2Y2 déclenche une sécheresse oculaire dans le modèle *vivo* utilisé, suggérant qu'il pourrait être l'un des mécanismes clé du développement de cette maladie.

2.3.1.1.2 La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique qui se manifeste principalement par une atteinte pulmonaire. Les mutations du gène codant pour le canal de chlorure CFTR entraînent une régulation anormale du liquide de surface des voies respiratoires, le mucus. Le dégagement des voies aériennes par l'épuration du mucus, aussi appelé clairance mucociliaire, est altéré et mène à des complications respiratoires, telles que la formation de bouchons de mucus, des infections bactériennes fréquentes et le déclin de la fonction pulmonaire au fil du temps [451]. Une voie alternative et fonctionnelle à la sécrétion de Cl⁻ par le canal CFTR a néanmoins été mise en évidence par plusieurs études et fait intervenir le récepteur P2Y2. En effet, en conditions physiologiques, son activation au niveau des cellules caliciformes, les cellules sécrétrices de mucus de l'épithélium respiratoire, stimule la sécrétion de Cl⁻ par les canaux CaCC et CFTR dépendants de la mobilisation de Ca²⁺ intra-cellulaire et de la PKC, respectivement. En conditions pathologiques, l'activation de P2Y2R permet de rétablir le transport de Cl⁻ par CaCC, inhibant d'autant plus la réabsorption de sodium ce qui favorise le

transport de liquide à travers la surface apicale de l'épithélium pulmonaire [491–493]. Ainsi, la sécrétion de mucus et la clairance mucociliaire sont améliorées, faisant du récepteur P2Y2 une cible thérapeutique dans le traitement de la mucoviscidose [451].

2.3.1.2 Les maladies cardiovasculaires

Le récepteur P2Y2 est connu pour jouer un rôle crucial dans le contrôle de la pression artérielle systémique, la prolifération et le remodelage des cellules vasculaires, et l'angiogenèse [494]. Il a ainsi été rapporté qu'il participe au maintien des conditions vasculaires physiologiques tant au niveau du système pulmonaire qu'au niveau du système cardiaque. Plusieurs études ont montré qu'en affectant les cellules endothéliales, la signalisation P2Y2 protège contre la survenue de lésions ischémiques cardiaques mais aussi contre l'hypertension et le risque d'infarctus. McEnaney et al. ont démontré dans un modèle murin que c'est notamment en favorisant l'artériogenèse que P2Y2R assure ses fonctions cardioprotectrices [495]. Il semble également permettre une meilleure récupération des fonctions cardiaques en diminuant les lésions causées par un infarctus du myocarde [496,497]. De plus, le récepteur P2Y2 protège contre la calcification des vaisseaux et favorise la vasodilatation, réduisant le risque d'athérosclérose et d'hypertension [498,499]. D'autres études mettent en évidence les fonctions protectrices du récepteur P2Y2 contre l'hypertension pulmonaire, à travers notamment la modulation de la perméabilité vasculaire et ses capacités vasodilatatrices [494]. Récemment, des variants de P2Y2R aussi appelés polymorphismes mononucléotidiques (SNP pour *single-nucleotide polymorphisms*), ont été identifiés dans des populations asiatiques, et ont été associés avec la susceptibilité de présenter une hypertension. Ces variants peuvent alors être utilisés comme des marqueurs génétiques de la pathologie pour le dépistage clinique ou le suivi des cas potentiels d'hypertension [500,501].

Au contraire, Seye et al. suggèrent que l'augmentation de la liaison des monocytes aux cellules endothéliales induites par P2Y2R et VCAM-1 favorise l'inflammation vasculaire associée au développement d'une athérosclérose [466,502]. De plus, la prolifération des cellules musculaires vasculaires et endothéliales induites par ce récepteur durant le remodelage vasculaire représente un risque de resténose après un traitement par angioplastie [503].

Le récepteur P2Y2 est donc considéré comme un élément protecteur dans de nombreuses conditions pathologiques cardiovasculaires mais il peut également être délétère dans certaines autres.

2.3.1.3 Les atteintes neurologiques

Par de nombreux aspects, il est considéré que le récepteur P2Y2 joue un rôle neuroprotecteur dans le système nerveux central (SNC), notamment dans des conditions pro-inflammatoires associées avec des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (MA) [504].

L'une des fonctions du récepteur P2Y2 est de promouvoir la différenciation, le développement et la régénération neuronales. Arthur et al. ont par exemple montré qu'en présence de nucléotides extra-cellulaires qui activent P2Y2R, ce dernier s'associe avec le récepteur de la tyrosine kinase A (TrkA) pour déclencher la signalisation induite par les neurotrophines, des peptides essentiels à la différenciation et à la survie des neurones. Les auteurs suggèrent que le développement d'agonistes du récepteur P2Y2 pourrait ainsi avoir un potentiel thérapeutique pour aider la régénération neuronale après des lésions ou au cours de la maladie d'Alzheimer [430].

Par ailleurs, il est aujourd'hui reconnu que l'inflammation médiée par le récepteur P2Y2 dans le SNC participe largement à promouvoir des réponses neuroprotectrices. Dans des conditions inflammatoires, comme c'est le cas dans la MA, les niveaux élevés d'IL-1 β induisent la surexpression du récepteur P2Y2 à la fois dans les neurones et les cellules gliales. De plus, les astrocytes libèrent des nucléotides extra-cellulaires dans la MA en réponse aux peptides A β , favorisant l'activation des récepteurs P2Y2. Ces derniers protègent les neurones de lésions en activant et en recrutant les cellules gliales dont les astrocytes et les cellules microgliales. Les premières ont un rôle majeur pour moduler les réponses en cas de dommages ou de stress, et favorisent la survie des neurones. En effet, P2Y2R induit, d'une part, la migration des astrocytes au site inflammatoire et déclenche une signalisation anti-apoptotique dans ces cellules, nécessaire à leur survie. D'autre part, il renforce la dégradation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) en un produit non amyloïdogène dans les astrocytes par l'activation de l' α -sécrétase. Le récepteur P2Y2 empêche ainsi la transformation de l'APP en amyloïde- β , le principal composant des plaques associées à la maladie d'Alzheimer [505]. Son activation provoque également la prolifération et la migration des macrophages résidents du SNC, aussi nommées cellules de la microglie, favorisant la phagocytose des oligomères toxiques d'A β en plus des débris cellulaires [506]. Dans les neurones, les fonctions neuroprotectrices de P2Y2R se traduisent à la fois par le clivage de l'APP en protéine non amyloïdogène, et par la phosphorylation de la cofiline, stabilisant les excroissances neuritiques qui sont nécessaires au bon fonctionnement des neurones [465,504].

2.3.1.4 Les autres pathologies impliquant le récepteur P2Y2

L'implication du récepteur P2Y2 est démontrée dans d'autres conditions pathologiques. Une étude sur un modèle murin suggère que l'inhibition de P2Y2R serait liée à une progression de l'insuffisance rénale chronique [507], alors que le récepteur semblerait au contraire jouer un rôle dans le développement de la polyurie liée au lithium [508,509]. De plus, Harada et al. ont mis en évidence l'induction de la prolifération des cellules mésangiales par le récepteur P2Y2 chez le rat, ce qui pourrait participer à la mise en place d'une fibrose rénale par la production excessive de matrice extra-cellulaire [510].

Dans la plupart des travaux étudiant le rôle de P2Y2R dans les cancers, il apparaît qu'il augmente le nombre de cellules en induisant leur prolifération comme dans les mélanomes, les cancers du poumon, du sein, de l'œsophage, le cancer colorectal, ou encore le cancer gastro-intestinal. Le récepteur P2Y2 favoriserait également le développement métastatique. En effet, les plaquettes activées par les cellules tumorales libèrent de l'ATP qui active P2Y2R, qui déclenche l'ouverture de la barrière endothéliale et permet l'extravasation des cellules cancéreuses [511]. En outre, ce récepteur a notamment été identifié comme un marqueur défavorable dans le cancer du pancréas [512]. Pourtant, quelques études suggèrent que son activation protégerait contre la croissance tumorale [513–515].

De plus, le récepteur P2Y2 semble favoriser le développement du syndrome métabolique en influençant notamment la prise de poids, l'hypercholestérolémie, ou encore l'inflammation du tissu adipeux. Par ailleurs, en stimulant les réponses inflammatoires telles que la migration des neutrophiles et des macrophages, mais aussi le relargage de cytokines inflammatoires par les éosinophiles, P2Y2R contribue à l'installation de maladies inflammatoires comme l'inflammation chronique pulmonaire. Il existe également des variants génétiques du récepteur

pour lesquels un lien a été établi avec le risque d'ostéoporose, sans que l'on sache comment ces SNP affectent sa fonction [516].

2.3.1.5 Le rôle de P2Y2 dans les infections virales

Le relargage de nucléotides comme l'ATP par les cellules infectées au cours d'une infection virale stimule la signalisation du récepteur P2Y2. Celle-ci régule, d'une part, le cycle viral (entrée, réplication, sortie) dans les cellules infectées, et d'autre part, elle participe à la mise en place d'une réponse immunitaire pour éliminer les virus.

Au cours de l'infection par le VIH-1 dans les macrophages et les lymphocytes T CD4+, de l'ATP est libéré vers le milieu extra-cellulaire à travers l'hémi-canal pannexine-1. L'ATP agit ensuite sur le récepteur P2Y2 en l'activant et déclenche une cascade de signalisations. Paoletti et al. ont montré qu'il interagit directement avec la protéine NLRP3, déclenchant la dégradation de cette protéine qui à l'état basal agit comme un inhibiteur de l'entrée virale en réprimant le remodelage de la F-actine. Ensuite, P2Y2R peut activer la kinase PYK2 qui mène à la polymérisation des filaments d'actine ainsi qu'à la dépolarisation de la membrane de la cellule infectée, nécessaire à la fusion avec les protéines d'enveloppe du virus. Ainsi, le récepteur P2Y2 facilite l'infection du VIH-1 dans les cellules cibles en régulant son entrée [444,517].

De la même façon que le VIH-1, le cytomégalovirus humain (HCMV) détourne la signalisation P2Y2 pour optimiser son cycle viral. En effet, l'infection des fibroblastes par le HCMV augmente l'expression du récepteur P2Y2 qui coopère avec les protéines virales pour faciliter la réplication du virus. Ainsi, il augmente l'efficacité d'expression des gènes viraux, de la synthèse d'ADN et de la production de nouveaux virus [518].

Contrairement aux infections par le VIH-1 et l'HCMV, P2Y2R a un rôle protecteur contre l'infection par le virus de la pneumonie murine (PMV). Vanderstocken et. al. ont observé qu'en absence du récepteur, les souris infectées présentaient une augmentation du titre viral et de la mortalité associée à une inflammation plus importante. L'étude suggère que le rôle protecteur de P2Y2R serait médié par une meilleure infiltration des cellules dendritiques et des lymphocytes T ainsi qu'une réponse Th1 plus efficace qui diminue l'infection pulmonaire [519].

2.3.2 Les stratégies thérapeutiques ciblant le récepteur P2Y2

2.3.2.1 Les agonistes endogènes

Étant donné le rôle protecteur que joue le récepteur P2Y2 dans diverses pathologies, son activation représente un potentiel thérapeutique important, ce qui a motivé le développement de nombreux ligands du récepteur pour être utilisés comme outils pharmacologiques. Ceci a donné lieu à la découverte de plusieurs agonistes et seulement quelques antagonistes.

Comme décrit précédemment, le récepteur P2Y2 est naturellement activé par des agonistes naturels, parmi lesquels les nucléotides triphosphates à base d'uridine (UTP) ou d'adénine (ATP) sont les plus efficaces. L'UTP et l'ATP peuvent être libérés par de multiples cellules du corps humain et stimuler P2Y2R à la surface des cellules qui l'expriment. L'UTP a notamment été développé sous forme de solution à inhaler sous le nom INS316 dans le cadre d'un essai clinique à des fins diagnostiques chez des patients atteints de bronchite chronique légère. Les résultats indiquant qu'il améliore la capacité d'expectoration pulmonaire profonde des

patients, supposent qu'il pourrait être utilisé dans le traitement du cancer pulmonaire [520]. Une autre étude a démontré que l'inhalation d'UTP améliore le dégagement des voies respiratoires chez des patients atteints de dyskinésie ciliaire primaire, probablement en modifiant la composition des sécrétions des voies respiratoires [451]. L'ATP a lui aussi fait l'objet de plusieurs essais cliniques pour le traitement de diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la fatigue musculaire, des maladies pulmonaires comme l'asthme, etc [414].

2.3.2.2 Les agonistes exogènes

L'UTP et l'ATP étant la cible de nucléotidases présentes dans le milieu extracellulaire, leur demi-vie est courte (quelques minutes) [451]. Des agonistes de synthèse ont donc été développés afin d'obtenir des composés plus stables dont la métabolisation est plus lente. Par ailleurs, étant donné les multiples fonctions de l'ATP dans l'organisme, notamment son action broncho-constrictrice, les nucléotides à base d'uridine ont été préférentiellement développés. Seuls deux dinucléotides, le Diquafosol tétrasodium et le Dénufosol, ont fait l'objet d'études cliniques dans le cadre du traitement de pathologies impliquant le récepteur P2Y2 [414].

2.3.2.2.1 Le Diquafosol tétrasodium

Le Diquafosol tétrasodium, aussi appelé INS365, est un agoniste sélectif puissant du récepteur P2Y2. Il s'agit d'un composé de synthèse analogue de l'UTP et qui comporte deux nucléosides uridines reliés par 4 groupements phosphates, on parle d'un dinucléoside tétraphosphate, nommé Up4U. Il est synthétisé sous forme de sel de sodium puisqu'il possède également 4 atomes de sodium au niveau des phosphates, lui permettant d'être soluble dans l'eau (**Figure 36**). La présence de 2 nucléotides confère au Diquafosol une meilleure stabilité métabolique ainsi qu'une moindre dégradation enzymatique car il est plus résistant à l'hydrolyse que les mononucléotides. Il possède donc une demi-vie prolongée par rapport à l'UTP et l'ATP, ce qui lui permet d'avoir une durée d'action plus longue [451]. Par ailleurs, le Diquafosol a été développé à partir de plusieurs études d'optimisation basée sur la relation structure-activité des agonistes potentiels sur le récepteur P2Y2. Ainsi, il a été découvert que la chaîne comportant 4 phosphates est la plus appropriée puisqu'elle permet à la fois une forte capacité de liaison et d'activation du récepteur, associée à une puissance accrue par rapport à des agonistes comportant des chaînes plus longues ou plus courtes [414,521]. Les similarités de séquences entre les P2YR ne facilite pas le développement d'agonistes sélectif, néanmoins le Diquafosol est considéré comme tel vis-à-vis du récepteur P2Y2, malgré le fait qu'il semble avoir une affinité pour le récepteur P2Y4 [522].

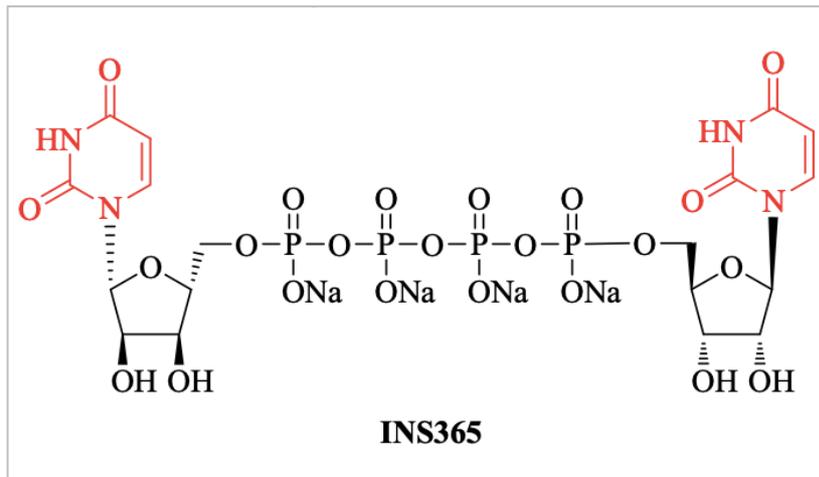


Figure 36. La structure chimique du Diquafosol tétrasodium (INS365). Le Diquafosol tétrasodium se compose de deux uridines formées chacune d'une base d'uracile (en rouge) rattachée à un cycle ribose, et reliées entre elles par une chaîne de 4 groupements phosphates qui supportent chacun un atome de sodium (Na) (Xu et al. 2018).

Le Diquafosol a été évalué pour sa capacité de traitement de la sécheresse de l'œil ainsi que dans le cadre de la mucoviscidose. Lors d'évaluations pré-cliniques, il a permis d'augmenter la sécrétion de larmes aqueuses malgré l'absence de glandes lacrymales chez un modèle de rat [523]. De plus, le Diquafosol induit les sécrétions d'eau, de mucines [524], ainsi que de lipides à partir des glandes de Meibomius en favorisant notamment la maturation holocrine de ces cellules, nécessaire à la libération des produits de sécrétion [488]. Les résultats prometteurs obtenus sur les modèles pré-cliniques ont mené à des études cliniques pour évaluer l'effet du Diquafosol administré sous forme de gouttes pour les yeux sur les sécrétions ophtalmiques. Récemment, il a été montré qu'une solution à 3% de Diquafosol est très bien tolérée et efficace sur du long terme en permettant d'augmenter la couche lipidique dès 60 minutes chez des patients atteints du syndrome de l'œil sec [525,526]. Cette formulation ophtalmique a été approuvée et commercialisée dès 2010 dans les pays asiatiques comme le Japon, la Corée du Sud et la Chine dans le traitement de la sécheresse des yeux. Pourtant, l'évaluation initiale du Diquafosol chez l'homme a été réalisée sous la forme d'une solution d'inhalation dans le cadre de bronchites chroniques chez les fumeurs, puis d'autres ont suivi pour le traitement de maladies respiratoires comme la mucoviscidose, sans donner lieu à une AMM pour ces maladies [451].

2.3.2.2.2 Les autres agonistes

Le Dénufosol tétrasodium

Le Dénufosol tétrasodium (INS37217) est le seul autre agoniste synthétique du récepteur P2Y2 ayant débouché sur des études cliniques. Il s'agit également d'un analogue d'UTP qui possède deux nucléosides, mais contrairement au Diquafosol, l'une des deux uridines est remplacée par une déoxycytidine, une cytidine à laquelle il manque un groupe hydroxyle (OH) sur le cycle ribose. De cette façon, le Dénufosol possède une résistance accrue à l'hydrolyse enzymatique et donc une demi-vie plus longue que les agonistes naturels de P2Y2R. Étant l'agoniste dont la stabilité métabolique est la plus importante dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, le Dénufosol a été sélectionné et a atteint la phase 3 des essais cliniques pour traiter cette maladie [527]. La solution inhalée a permis de rétablir les échanges d'ions et les sécrétions et d'améliorer le dégagement des voies respiratoires en augmentant la fréquence des battements ciliaires chez des patients dont la fonction pulmonaire était normale ou

légèrement altérée [528,529]. Néanmoins, le Dénufofol n'a pas été approuvé pour traiter la mucoviscidose à cause du manque d'efficacité à long terme chez les patients [527].

Les dérivés de l'UTP

De nombreux autres analogues de l'UTP ont été développés pour résoudre le problème de son métabolisme rapide. Ainsi, de multiples dérivés ont été synthétisés comme les UTP qui peuvent être modifiés au niveau de l'uracile, du ribose ou des phosphates. Par exemple, la modification de l'uracile peut se faire par substitution des groupes OH ou hydrogène, respectivement au niveau des carbones qui les supportent par un autre groupe d'atomes. C'est le cas du 4-Thio-UTP dont le groupe thiol remplace l'hydroxyle en position 4 de l'uracile et qui donne un analogue de l'UTP présentant une puissance accrue pour l'activation des récepteurs P2Y2 et P2Y4 [530]. D'autres dérivés ont été modifiés au niveau des phosphates, tels que le MRS2768 qui possède un cycle phénol supplémentaire à son extrémité. Hochhauser et al. ont d'ailleurs montré que le traitement *in vivo* avec cet agoniste spécifique du récepteur P2Y2 protégeait le cœur contre les lésions ischémiques [496].

Récemment, le premier agoniste non nucléotidique de P2Y2R, le Composé 89, a été identifié par Sakuma et al. à partir de ses effets sur la mobilisation de calcium dans une lignée d'astrocytes humains. Ce dérivé de la 4(1H)-quinolinone agit comme un modulateur allostérique du récepteur P2Y2 qui potentialise les réponses induites par l'ATP et dont l'administration atténuait les symptômes d'un modèle animal d'hypertrophie cardiaque [531].

2.3.2.3 Les antagonistes du récepteur P2Y2

L'inhibition du récepteur P2Y2 a également été proposée comme option pour aider à combattre le développement de pathologies dans lesquelles il est impliqué telles que certains cancers, des fibroses, des maladies inflammatoires. L'utilisation potentielle d'antagonistes de P2Y2R en vue d'une application thérapeutique a donné lieu au développement de plusieurs composés, dont aucun n'a fait l'objet d'évaluation clinique à ce jour.

Initialement, plusieurs composés non nucléotidiques ont été identifiés comme des inhibiteurs de P2Y2R, parmi lesquels la suramine, le bleu réactif-2 (RB-2) et le PPADS (acide pyridoxal phosphate-6-azophényl-2',4'-disulfonique). Ils agissent comme des antagonistes compétitifs faibles et présentent un défaut important de sélectivité vis-à-vis de P2Y2R. En effet, ils sont des inhibiteurs d'autres P2YR et peuvent même antagoniser certains récepteurs P2X [415,494]. D'autres travaux ont montré la capacité inhibitrice des dérivés de flavone sur ce récepteur comme le Kaempférol, un antagoniste sélectif ou la tangérine, un antagoniste non compétitif [444,532]. Des antagonistes sélectifs ont donc été plus amplement développés dont l'AR-C126313, le PSB-416 ou encore le MRS2312 dont le traitement sur des lignées de carcinome hépatocellulaire humain mène à l'inhibition de la viabilité cellulaire médiée par P2Y2R [494].

À ce jour, le seul composé à être commercialisé est l'AR-C118925, l'antagoniste le plus puissant et sélectif du récepteur P2Y2. Cet inhibiteur compétitif de l'UTP est un dérivé d'aminotétrazole hétérocyclique contenant un groupement thiouracile dont les différents groupements chimiques lui confèrent une stabilité métabolique importante, une bonne distribution ainsi qu'une absorption gastro-intestinale élevée. Ce composé a principalement été utilisé comme un outil pour mieux comprendre le rôle physiologique de P2Y2R. Ses effets thérapeutiques n'ont été évalués que récemment depuis qu'il a été mis sur le marché en 2017 d'après des

modèles précliniques, il n'a encore jamais été étudié en clinique. Ainsi, l'utilisation de l'AR-C118925 semble être pertinente pour le traitement des modèles pathologiques suivants, et pour lesquels il serait intéressant de les transposer en contexte clinique : des maladies auto-immunes et inflammatoires comme la sclérose systémique, des cancers notamment du pancréas, mais aussi des troubles du système nerveux tels que la douleur oro-faciale neuropathique médiée par la signalisation P2Y2 au niveau du ganglion trigeminal [415,533]. Par ailleurs, Conroy et al. ont développé le premier antagoniste fluorescent de P2Y2R, basé sur l'AR-C118925 [534].

Objectifs

Le rôle clé de l'inflammasome NLRP3 dans de nombreux processus physiologiques a motivé l'émergence de nombreuses connaissances, permettant une meilleure appréhension des mécanismes moléculaires contrôlant son activation. Pourtant, la dérégulation ou l'activation excessive de ce complexe multiprotéique a été impliquée dans le développement de multiples maladies inflammatoires telles que le syndrome périodique associé à la cryopyrine (CAPS), ou d'autres plus communes comme le diabète et la polyarthrite rhumatoïde. Plus récemment, c'est dans l'inflammation pulmonaire associée à la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) que l'activité de l'inflammasome NLRP3 a été mise en cause [124]. Compte tenu de l'importance d'identifier de nouveaux inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3 pour le traitement des maladies inflammatoires qui y sont liées, une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant l'activation de l'inflammasome NLRP3 est nécessaire.

Des relations fonctionnelles entre les récepteurs purinergiques P2R et l'inflammasome NLRP3 ont été établies et caractérisées. L'équipe a récemment révélé qu'en plus de la stimulation de l'hyper-inflammation, l'inflammasome NLRP3 favorise la réplication du SARS-CoV-2 et a également identifié le récepteur P2X7 comme un moteur de l'activation de l'inflammasome NLRP3 pendant la réplication de ce virus [535]. Par ailleurs, l'équipe a démontré l'implication du récepteur P2Y2 dans l'entrée du VIH-1 dans les cellules hôtes. Il a d'abord été mis en évidence que l'activation de P2Y2R facilite l'infection par le VIH-1 des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages. Ensuite, les mécanismes moléculaires mis en cause ont été approfondis, révélant une interaction constitutive entre P2Y2R et NLRP3 dans les macrophages ainsi que dans les cellules hôtes. Cette interaction s'est avérée augmentée au cours des premières étapes de l'infection par le VIH-1 et impliquée dans le contrôle de la permissivité des cellules hôtes. En effet, en liant NLRP3, le récepteur P2Y2 entraîne sa dégradation, ce qui permet le remodelage du cytosquelette d'actine par la kinase PYK2, nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules infectées [517]. Ainsi, un nouveau lien fonctionnel entre P2Y2R et NLRP3 a été identifié au cours de l'infection des macrophages.

Dans ce contexte, nos travaux se sont intéressés à l'influence du récepteur P2Y2 sur l'activation de l'inflammasome NLRP3, et sur les conséquences de sa modulation sur le cycle réplicatif du SARS-CoV-2 ainsi que lors du développement d'une fibrose pulmonaire, deux processus biologiques qui participent à l'établissement de la COVID-19. Pour mieux caractériser l'interaction fonctionnelle entre P2Y2 et NLRP3, nous avons d'abord étudié l'effet de l'inactivation de P2Y2 sur les fonctions des macrophages, notamment la sécrétion d'IL-1 β et la mort par pyroptose. Nous avons ensuite étudié les mécanismes de régulation moléculaire de l'inflammasome NLRP3 par P2Y2. Pour ce faire, nous avons déterminé les effets biologiques de la modulation du récepteur purinergique sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à une stimulation inflammatoire dans les macrophages *in vitro*. Ensuite, il s'agissait de déterminer l'impact de P2Y2 sur la modulation de l'inflammasome et de l'infection par le SARS-CoV-2 *in vitro* dans des cellules épithéliales, premières cibles cellulaires de ce virus. Enfin, il était important de caractériser le potentiel thérapeutique de cette modulation sur les lésions pulmonaires et l'inflammation induites par la bléomycine *in vivo*.

P2Y2 agonists impair NLRP3-dependent SARS-CoV-2 replication and lung inflammation

**Emie Gutierrez-Mateyron^{1,2}, Aurélia Deva-Nathan^{1,2}, Déborah Lécuyer^{1,2},
Désirée Tannous^{1,2,3}, Audrey Paoletti^{1,2,4-6}, Frédéric Subra⁷, Vanessa Petit⁸,
Clémence Richetta⁴, Lydia Meziani^{1,2}, Ali Mostefa-Kara^{1,2}, Romain Marlin⁴,
Pauline Maisonnasse⁴, Julia Delahousse^{1,2}, Juliette Pascaud^{5,6}, Anais
Chapel^{1,2}, Eric Deutsch^{1,2}, Eric Deprez⁷, Marie Naigeon^{2,9,10}, Nathalie
Chaput⁹⁻¹¹, Angelo Paci^{1,2,10,12}, Véronique Saada¹², David Ghez^{1,13}, Isabelle
Couillin¹⁴, Xavier Mariette⁴⁻⁶, Awatef Allouch^{1,2}, Olivier Delelis⁷, Roger Le
Grand⁴ and Jean-Luc Perfettini^{1,2*}**

¹ Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Villejuif, 94805, France;

² Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

³ NH TherAguix SAS, Meylan, 38240, France;

⁴ Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial diseases (IMVA- HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses, 92265, France;

⁵ Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, 94270, France;

⁶ Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, 94270, France;

⁷ Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS UMR 8113, IDA FR3242, Laboratory of Biology and Applied Pharmacology (LBPA), Gif-sur-Yvette, 91190, France;

⁸ Université Paris-Saclay, Inserm U1274, CEA, Genetic Stability, Stem Cells and Radiation, Le Kremlin Bicêtre and Fontenay aux roses, 92260, France;

⁹ Université Paris-Saclay, Inserm, CNRS, Analyse moléculaire, modélisation et imagerie de la maladie cancéreuse, Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, Villejuif, 94805, France;

¹⁰ Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, 92296, France;

¹¹ Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Center, CNRS, Stabilité génétique et oncogénèse, Villejuif, 94805, France;

¹² Gustave Roussy Cancer Center, Department of Biology and Pathology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

¹³ Gustave Roussy Cancer Center, Department of Hematology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

¹⁴ University of Orleans and CNRS, INEM-UMR7355, Orleans, France.

* Correspondence to:

Dr. Jean-Luc PERFETTINI
Cell death, Immunity and Therapeutic Innovation team
Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Inserm UMR1030
Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Pavillon de Recherche 1
114, rue Edouard Vaillant
94805 Villejuif, France
Tel. 33-1-42 11 54 24
Fax 33-1-42 11 52 36
e-mail: jean-luc.perfettini@gustaveroussy.fr

Abstract

Functional interaction between the purinergic receptor P2Y₂ and the nucleotide-binding oligomerization (NOD)-like receptor protein 3 (NLRP3) was recently described in macrophages, however the impact of P2Y₂ on NLRP3 inflammasome activation and lung inflammation-associated pathogenesis remains unexplored. Here, we report that the purinergic receptor P2Y₂ acts as an endogenous repressor of NLRP3 inflammasome activation. P2Y₂^{-/-} mice exhibit an increase of plasma IL-1 β concentration and pyroptotic cell death of lung macrophages. These results were confirmed in vitro with human macrophages inactivated for P2Y₂. Inversely, P2Y₂ activation with agonists impair the secretion of IL-1 β through the inhibition of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) oligomerization, thus highlighting that P2Y₂ negatively regulates NLRP3 inflammasome assembly. To assess the potential of P2Y₂ activation for the treatment of lung diseases triggered by excessive NLRP3 inflammasome activation, we first analysed the biological effects of P2Y₂ agonists on the replication of SARS-CoV-2, which depends on the activation of NLRP3 inflammasome. Surprisingly, P2Y₂ agonists impair the replication of SARS-CoV-2, and inversely, a pharmacological inhibitor of P2Y₂ (Kaempferol) stimulates the viral replication, thus revealing that P2Y₂ act as a host restriction factor for SARS-CoV-2. Furthermore, the P2Y₂ agonist Diquafosol also protects mice from bleomycin-induced lung inflammation and injury, which are triggered by NLRP3 inflammasome activation. Altogether, our results identify P2Y₂ as a druggable endogenous repressor of NLRP3 inflammasome activation that offers novel opportunities for treatment of NLRP3-related pulmonary inflammatory diseases such as acute lung injury (ALI), acute respiratory distress syndrome (ARDS) and coronavirus disease 2019 (COVID-19).

Character summary

NLRP3 inflammasome activation is involved in several lung inflammatory diseases. P2Y2 agonists abrogate NLRP3-dependent SARS-CoV-2 replication and lung inflammation, making P2Y2 agonists candidates for ALI or COVID-19 treatment.

Introduction

Inflammasomes are composed of cytosolic pathogen pattern receptors (PPRs) that sense intracellular pathogen-associated molecular-patterns (PAMPs) or damage-associated molecular-patterns (DAMPs), such as pathogen-derived nucleic acids, lipopolysaccharide (LPS), adenosine triphosphate (ATP) or uric acid, in response to microbial infection or cellular stress. Upon recognition of ligands, cytosolic sensors such as NOD-like receptors (NLRs), retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), pyrin or absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors (ALRs) oligomerize with ASC to form a large protein complex also known as ASC speck. ASC speck then recruits the pro-caspase-1 to form multimeric protein complex that promotes the proteolytic activation of caspase-1 and subsequently, drives the maturation of interleukins 1 β (IL-1 β) and 18 (IL-18), and the induction of pyroptosis [1, 2]. The NLRP3 inflammasome, which can be activated by a wide variety of stimuli, requires the assembly of NLRP3 with ASC and pro-caspase-1 [3]. NLRP3 expression and functions, which are critical to numerous physiological processes, including innate immune response and tissue homeostasis [4], are tightly regulated by multiple transcriptional and post-transcriptional modifications (including ubiquitinylation, phosphorylation and sumoylation) [3]. Nevertheless, excessive NLRP3 inflammasome activation or dysregulation has been detected and involved in numerous human respiratory disorders including chronic obstructive pulmonary disease (COPD), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), ALI/ARDS and COVID-19 [5, 6]. Considering the importance of identifying novel NLRP3 inflammasome inhibitors for the treatment of lung inflammatory diseases, a better understanding of cellular and molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation is under intense investigations.

P2 purinergic receptors (P2Rs) are ubiquitously expressed plasma membrane danger receptors that ligate extracellular nucleotides such as adenosine triphosphate (ATP) or uridine triphosphate (UTP) [7]. These receptors, which are divided into two subtypes, the ionotropic P2X purinergic receptors and the metabotropic G protein-coupled-P2Y purinergic receptors, regulate multiple physiological and pathophysiological processes, ranging from neurotransmission to immune response and from inflammation to pathogen infection and cancer development [8-10]. P2X and P2Y subtypes consist of 7 (P2X1 to P2X7) and 8 (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 and P2Y14) receptors, respectively [7]. A wide variety of cellular functions are controlled by P2Rs such as migration, maturation, phagocytosis, antigen presentation, inflammatory cytokine secretion and cell death [11]. Overlaps between cellular functions of P2Rs and those regulated by NLRP3 inflammasome have been identified and characterized. Upon binding of extracellular ATP, P2X7 purinergic receptor may

interact with NLRP3 protein [12] and acts upstream NLRP3 inflammasome signaling pathways [1]. P2X7-dependent NLRP3 inflammasome activation is a key step in the regulation of innate immune response against infection and diseases [1, 13]. Nevertheless, several human diseases in whose P2X7 dictates NLRP3 inflammasome activation have been reported including age-related macular degeneration [14], uveitis [14], diabetes [15], bacterial infection [16] and ALI/ARDS [17, 18]. We recently revealed that in addition to the stimulation of hyperinflammation, NLRP3 inflammasome supports SARS-CoV-2 replication [16]. Interestingly, P2X7 was identified as a driver of NLRP3 inflammasome activation during SARS-CoV-2 replication [16]. The purinergic receptor P2X4, whose functional interactions with P2X7 were reported [19], was proposed as positive modulators of NLRP3- dependent release of IL-1 β and IL-18 [20]. The metabotropic P2Y2 purinergic receptor, which was initially involved in cystic fibrosis [21] and migration of neutrophils [22], was recently involved in the entry of HIV-1 into host cells [8]. A constitutive interaction between P2Y2 and NLRP3, which was initially reported in macrophages [9], was found up-regulated during the early steps of HIV-1 infection and involved in the control of host cell permissiveness [9], thus revealing an unsuspected functional link between P2Y2 and NLRP3 during macrophage activation and infection. To further characterize the functional interaction between P2Y2 and NLRP3, we first studied effect of P2Y2 inactivation on macrophage functions including IL1- β secretion and pyroptotic death using knockout mice, and investigated molecular regulatory mechanisms *in vitro*. We then determined biological effects of P2Y2 inactivation or activation on NLRP3 inflammasome activation in response to inflammatory stimulation or SARS-COV-2 infection *in vitro*, and on bleomycin-induced inflammation and lung injury *in vivo*.

Material and methods

Additional details can be found in supplementary material.

P2Y2 agonists and chemical compounds

Uridine 5'-triphosphate (UTP) (#U6625), Kaempferol (#K0133), Lipopolysaccharides (LPS) (#L2880), Adenosine 5'-triphosphate (ATP) (#A2383) were purchased from Sigma-Aldrich. Diquafosol (#HY-B0606) and Denufosol (#ND45968) were from MedChemExpress and Biosynth Carbosynth, respectively. Phorbol myristate acetate (PMA) (#ttrl-pma) and Nigericin (#ttrl-nig-5) were from Invivogen. 4-Thio-UTP (#31556-28-2) was from BOC Sciences and recombinant human interferon gamma (IFN γ) was from R&D systems (#285- IF).

Cell lines and primary cells

Monocyte THP1 cells were obtained from ATCC (#TIB2002) and maintained in RPMI-1640- Glutamax medium (Gibco, Life Technologies, UK) supplemented with 10% heat inactivated (HI) foetal bovine serum (FBS) (Eurobio, France) and 100 UI penicillin/streptomycin (P/S) (Gibco, Life Technologies, United Kingdom). THP1 macrophages were obtained after incubation for 24 hours with 320 nM PMA, as previously described [23], with the exception of LDH release assay where THP1 macrophages were obtained 3 days after incubation of THP1 monocytes with 100 nM PMA for 3 hours. African green monkey kidney Vero E6 cells were obtained from ATCC (#CRL-1587), ACE2-overexpressing A549 (ACE2-A549) cells were obtained from Dr. Olivier Schwartz (Institut Pasteur, France), ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) cells were from Invivogen (#a549-hace2tps). All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) with 10% HI FBS and 100 UI P/S at 37°C. Caco-2 cells were obtained from Pr. Guido Kroemer (Gustave Roussy, France) and cultured in EMEM (30-2003, ATCC) supplemented with 20% HI FBS and 100 UI P/S at 37°C. All cell lines used were mycoplasma-free. Human Monocytes Derived Macrophages (hMDMs) were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from buffy coats of healthy donors from the French blood bank (Établissement Français du Sang (EFS)), after approval of EFS ethical committee (convention N°14EFS003) in agreement with French law and after obtaining a written informed consent for each donor. As previously described [24], monocytes were separated from PBMCs by adherence to the plastic and cultured in hydrophobic Teflon dishes (#94.6077.305, Lumox) in RPMI 1640 medium supplemented with 200 mM L- glutamine, 100 UI P/S, 10 mM HEPES, 10 mM sodium

pyruvate, 50 μ M β -mercaptoethanol, 1% minimum essential medium vitamins, 1% non-essential amino acids (all from Gibco) and 20% HI human AB serum (hABS) (#H3667, Sigma). For treatment with Kaempferol or P2Y2 depletion, MDMs were harvested and cultivated in supplemented RPMI 1640 medium containing 10% of HI FBS. Mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were obtained from femurs of 5 to 6-week-old C57BL/6 JRj mice (JANVIER Labs, France) after flushing with cold phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco) containing 5% FBS and filtration through a 70- μ m strainer. After 5 minutes of centrifugation at 4°C, supernatant was discarded and cells were cultured in RPMI-1640-Glutamax medium (Gibco) supplemented with 10% HI FBS, 100 UI P/S and 20 ng/mL recombinant mouse M-CSF (BioLegend, US) during 7 days. Primary salivary gland epithelial cells were obtained as previously described [16] and were plated at the concentration of 100 000 cells per well in 48-well plates that were pre-treated with collagen for 1 hour at 37°C.

Samples from $P2y2^{+/+}$ and $P2y2^{-/-}$ mice

Two weeks old $P2y2^{+/+}$ and $P2y2^{-/-}$ transgenic mice were obtained from Dr. Isabelle Couillin (INEM-UMR7355, Orleans, France) and sacrificed upon arrival following the Federation of European Laboratory Animal Science Association guidelines and in accordance with the Ethical Committee of the Gustave Roussy Cancer Campus (CEE A26) (Villejuif, France). After sacrifice, plasmatic serum was stored at -80°C and lung biopsies were either fixed or digested for biological analysis as previously described [25].

In vitro infection with SARS-CoV-2

Vero E6 cells, ACE2-A549 and Caco-2 cells were infected during indicated times with SARS-CoV-2 (BetaCoV/France/IDF0372/2020) at multiplicity of infection (MOI) from 1 to 2 for cytopathogenic analysis, from 0.1 to 0.2 for WB experiments, quantitative PCR experiments and immunofluorescence (IF) experiments on Vero E6 cells and at MOI 1 for IF experiments. Viral infections were performed in absence or in presence of 100 μ M Diquafosol, Denufosol, 500 μ M UTP or 100 μ M Kaempferol, unless stated otherwise. As previously published [16], ACE2-TMPRSS2-A549, ACE2-A549 and Vero E6 cells were also infected during 4 hours with HIV-1NL4-3 Δ Env particles (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-LV) at MOI 0.1 during 4 hours for WB experiments. Virus neutralization was achieved using convalescent COVID-19 serum collected, as previously described [16]. Primary salivary gland epithelial cells were infected with SARS-CoV-2 at MOI of 0.5 for 48 hours in

presence of 100 μ M Kaempferol. Viral RdRp RNA was then analyzed using quantitative RT-PCR.

Bleomycin lung injuries

Female C57BL/6J mice aged 8 to 10 weeks (from JANVIER Labs (France)) were anesthetized with 2% isoflurane and instilled into the trachea with 50 UI bleomycin (Gustave Roussy Institute, France). Diquafosol (# HY-B0606, MedChemExpress) (300 μ g in 100 μ L/mouse) was intraperitoneally administrated 3 days before and after intratracheal instillation of bleomycin, and then, Diquafosol was injected every 3 days until day 21. Mice were randomized into 4 experimental groups: control mice, Diquafosol-treated mice, bleomycin-treated mice, and mice treated with bleomycin and Diquafosol. Lung injury was evaluated by determining lung density through computed tomography imaging. Lung immune infiltrate was analysed using immunohistochemistry (HES staining) and flow cytometry. Mice were sacrificed after CT imaging.

Computed tomography imaging

Twenty-one days after intratracheal instillation of bleomycin, mice were anesthetized with 2% isoflurane and computed tomography analysis of lung was performed using IVIS® SpectrumCT preclinical in vivo imaging system and Living Image (PerkinElmer) software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad). Statistical tests and calculated p values (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$) are indicated in each figure and corresponding figure legend.

Results

The purinergic receptor P2Y2 is an endogenous repressor of inflammasome activation.

To study effects of P2Y2 inactivation on macrophage functions, we first assessed basal expression levels of IL-1 β in P2y2^{-/-} and P2y2^{+/+} mice. Interestingly, the baseline plasma levels of IL-1 β in P2y2^{-/-} mice were higher than in wild type controls (Figure 1a), suggesting that P2Y2 acts to suppress production of IL-1 β . In addition, P2y2^{-/-} mice exhibited a significant reduction in the frequency of interstitial macrophages carrying signs of proinflammatory activation (Gr1⁺CD11b⁺CD11c⁺CD40⁺) (Figure 1b, 1c and supplementary Figure S1). The vast majority of residual P2y2^{-/-} lung CD40⁺ macrophages contained cleaved caspase-1 and exhibited nuclear DNA fragmentation (as revealed by the TUNEL assay) (Figure 1d-1g), suggesting that the proinflammatory P2y2^{-/-} interstitial macrophages were eliminated through pyroptosis. We then investigated the ability of human macrophages to release IL-1 β upon treatment or not with lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP) following P2Y2 inhibition. Pharmacological inhibition of P2Y2 with Kaempferol (a specific P2Y2 inhibitor) (Figure 1h and 1j), or depletion of P2Y2 by means of specific short hairpin RNAs (Figure 1i) or small interfering RNAs (Figure 1k and 1l), increased IL-1 β release from PMA-treated THP1 macrophages primed with LPS and simulated with ATP (LPS+ATP) or from human monocyte derived macrophages (hMDMs), thus revealing that P2Y2 interferes with inflammasome activation. Accordingly, PMA- differentiated THP1 macrophages released the cell death marker, lactate dehydrogenase (LDH), upon treatment or not with LPS+ATP following P2Y2 inhibition with Kaempferol (Figure 1m). This LPS+ATP-induced THP1-cell death was inhibited by depletion of caspase-1 (CASP1) (Figure 1m and supplementary Figure S2). These results are consistent with the interpretation that P2Y2 inactivation favours CASP1-dependent macrophage pyroptosis. Altogether these results indicate that P2Y2 antagonizes inflammasome activation.

P2Y2 activation impairs the oligomerization of NLRP3 inflammasome.

Considering the functional interaction between P2Y2 and NLRP3 that we initially described [9], we then investigated the impact of P2Y2 on the activation of NLRP3 inflammasome. Pharmacological stimulation of P2Y2 with agonists Diquafosol (Figure 2a, 2b and supplementary Figure S3a and S3b) or 4-thiouridine-5'-triphosphate (supplementary Figure S3a and S3b) impaired IL-1 β release from PMA-treated THP1 macrophages primed with LPS and stimulated with ATP (LPS+ATP) (Figure 2a and supplementary Figure S3a and S2b), or Nigericin (LPS+Nigericin) (Figure 2b). P2Y2

agonists prevented the release of pro-caspase-1 (pro-CASP1) and its cleaved form (cleaved-CASP1) in the supernatant from PMA-treated THP1 macrophages stimulated with LPS+ATP (Figure 2c and supplementary Figure S 3c-S3g) or LPS+Nigericin (Figure 2d and supplementary Figure S3h), or from bone-marrow-derived-macrophages (BMDMs) stimulated with LPS+ATP (Figure 2e, 2f and supplementary Figure S3i and S3j). These results were corroborated by the detection of IL-1 β and IL-18 release from LPS+ATP-stimulated BMDMs that were treated with Diquafosol (Figure 2g, 2h and supplementary Figure S3k and S3l). To evaluate the possibility that P2Y2 agonists may act through the modulation of NLRP3 and ASC expression, mRNA expression levels of NLRP3, ASC, pro-CASP1 and pro-IL-1 β were analysed in PMA-THP1 macrophages that were stimulated with LPS+ATP (supplementary figure S4a-d) or LPS+Nigericin (supplementary Figure S4e-h) in presence or absence of Diquafosol or 4-thiouridine-5'-triphosphate (supplementary Figure S4a-h). Despite the fact that in response to LPS+ATP (supplementary Figure S4a-d) or LPS+Nigericin (supplementary Figure S4e-h) stimulation, NLRP3 (supplementary Figure S4a and S4e) and pro-IL-1 β (supplementary Figure S4d and S4h) mRNA levels were increased and ASC mRNA levels were found decreased (supplementary Figure S4b and S4f). No significant difference in the expression levels of mRNAs was found when cells were treated with P2Y2 agonists. This demonstrates that P2Y2 agonists did not affect the transcription of NLRP3, ASC, pro-CASP1 or IL-1 β . Then, cellular lysates from LPS+ATP-stimulated BMDMs that were treated with or without Diquafosol (supplementary Figure S4i and S4k) or from LPS+ATP-stimulated THP1 macrophages that were treated with or without 4-thiouridine-5'-triphosphate (supplementary Figure S4j and S4l) were analysed for NLRP3 protein expression levels. Consistent with the decrease in IL-1 β secretion and proteolytical cleavage of CASP1 that we previously shown (Figure 2a-h and supplementary Figure S3a-l)), P2Y2 agonists impaired the increased expression levels of NLRP3 that were detected when BMDMs (supplementary Figure S4i and S4k) or PMA-THP1 macrophages (supplementary Figure S4j and S4l) were stimulated with LPS+ATP, thus revealing that P2Y2 may act on NLRP3 inflammasome at post-transcriptional levels.

To further investigate the role of P2Y2 in the regulation of NLRP3 inflammasome, we studied the effects of P2Y2 agonists on NLRP3 oligomerization, which is a central event involved in the NLRP3 inflammasome activation [2]. We thus performed a fluorescence microscopy with LPS+Nigericin-primed BMDMs that were treated in presence or in absence of Diquafosol. In BMDMs treated with LPS+Nigericin, NLRP3 colocalized with ASC speck (Figure 2i). Interestingly, we observed that P2Y2 activation with Diquafosol significantly impaired the colocalization between NLRP3 and ASC (Figure 2i and 2j). This effect was also observed in BMDMs that were treated with LPS+Nigericin in

presence of 4-thiouridine-5'-triphosphate (Figure 2k and supplementary Figure 5a), thus demonstrating that P2Y2 negatively modulates NLRP3 inflammasome activation through the repression of NLRP3 oligomerization.

P2Y2 agonists restricts the replication of SARS-CoV-2 into permissive cells

Initially reported in immune cells including dendritic cells [26], monocytes [27] and macrophages [27], inflammasomes also assemble in several non-immune cells such as epithelial cells [16, 28]. We previously revealed that NLRP3 inflammasome activation regulates host epithelial cell permissiveness to SARS-CoV-2 infection [16]. According to the previously described role of P2Y2 on the modulation of NLRP3 inflammasome activation, we then determined the impact of P2Y2 modulation on the replication of SARS-CoV-2. Interestingly, Diquafosol and other P2Y2 agonists (UTP and Denufosol) strongly reduced cytopathogenic effects associated with viral infection and/or blocked the replication of SARS-CoV-2 in permissive host Vero E6 cells (Figure 3a-d, 3g, 3h and supplementary Figure S6a) or human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expressing lung A549 (ACE2-A549) cells (Figure 3e and supplementary Figure S6b and S6c), as revealed by the SARS-CoV-2 – mediated cytopathogenicity (Figure 3a and 3b), the detection of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and E mRNA expression (Figure 3c-f and supplementary Figure S6b), the intracellular expression of viral spike (S) protein (supplementary Figure S6a and S6c) and the frequency of S-positive cells (Figure 3g and 3h). Inversely, the pharmacological inhibition with Kaempferol or P2Y2 depletion favoured viral replication in primary salivary gland epithelial cells (Figure 4f) or ACE2-A549 cells (supplementary Figure S6d). Considering that NLRP3 contributes to viral replication at post-entry level [16], we then examined whether P2Y2 control SARS-CoV-2 replication as the same level or through the modulation of viral entry. As previously described [16], we studied the effects of UTP and Diquafosol on viral entry by using SARS-CoV-2 spike (S) pseudotyped HIV-1. Vero E6 cells (supplementary Figure S7a), ACE2-A549 cells (supplementary Figure S7b) and ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) cells (supplementary Figure S7c) were incubated with UTP, Diquafosol or serum of convalescent COVID-19 patients during 4 hours before infection with HIV1NL4-3 Δ Env variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-LV) (supplementary Figure S7a-c). We analysed the viral entry by detecting the intracellular expression of HIV-1 Cap24 capsid in Vero E6 (supplementary Figure S7a), ACE2-A549 cells (supplementary Figure S6b) and ACE2-TMPRSS2-A549 cells (supplementary Figure S7c). Despite the fact serum from convalescent patients strongly reduced its intracellular expression (supplementary Figure S7a-c), the intracellular expression of Cap24 did not change in presence of the agonists of P2Y2 (UTP and

Diquafosol), implying that P2Y2 agonists do not affect SARS-CoV-2 entry into host cells (supplementary Figure S7a-c). Interestingly, ASC specks detected in SARS-CoV-2-infected ACE2-A549 cells (Figure 3i and 3k) or Caco-2 cells (Figure 3j and 3l) were inhibited by Diquafosol, thus confirming the negative regulatory effect of P2Y2 on NLRP3 oligomerization during SARS-CoV-2 infection. Altogether, the results demonstrate that P2Y2 acts as cellular host restriction factor against SARS-CoV-2.

The P2Y2 agonist Diquafosol inhibits bleomycin-induced lung inflammation and injury

Considering the critical role of NLRP3 inflammasome during bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis [29], we therefore investigated whether P2Y2 activation may decrease pulmonary injuries and performed *in vivo* studies with P2Y2 agonist Diquafosol (received 3 days before instillation and every 3 days until 20 days after instillation) in mice that were intratracheally instilled with bleomycin. Using micro-computed tomography analysis, we detected a significant increase of lung density at day 20 in mice that were treated with bleomycin, as compared to control mice or Diquafosol-treated mice (Figure 4a), revealing the development of pulmonary injuries. Interestingly, mice treated with P2Y2 agonist Diquafosol and bleomycin showed a strong reduction of lung density as compared to those treated with bleomycin alone (Figure 4a), thus revealing the ability of P2Y2 agonist Diquafosol to reduce bleomycin-induced pulmonary injuries. To precise the biological effects of Diquafosol during bleomycin-induced lung injuries, immune infiltrates were analyzed at day 21 using eosin-hematoxylin staining. We detected the presence of perialveolar and perivascular immune infiltrates in lung biopsies obtained from bleomycin-treated control mice (Figure 4b). We also revealed that Diquafosol significantly inhibited the infiltration of immune cells in bleomycin-treated lung tissues (Figure 4b), as compared to the lung biopsies obtained from bleomycin-treated mice (Figure 4b). To precisely identify macrophage populations that are affected by Diquafosol during bleomycin-induced lung injuries, alveolar (CD45⁺SiglecF⁺CD11b⁻CD11c⁺CD169⁺) and interstitial (CD45⁺SiglecF⁻CD11b⁺Ly6C⁻CD64⁺) macrophages were analysed at day 21 (supplementary Figure 8). Despite the fact the number of alveolar CD45⁺SiglecF⁺CD11b⁻CD11c⁺CD169⁺ macrophages was not affected in bleomycin-treated mice as compared to control mice (Figure 4c and 4d), we observed a significant increase in the number of interstitial macrophages detected in bleomycin-treated mice (Figure 4e and 4f). No effect of Diquafosol was observed at day 21 on alveolar macrophages (Figure 4c and 4d), but interestingly, we observed a significant reduction in the number of interstitial macrophages detected in bleomycin-treated mice that were treated with Diquafosol (Figure 4e and 4f), thus revealing that Diquafosol impairs

the infiltration of macrophages into lung parenchyma, which has been identified as critical events for lung injuries [30]. Altogether, these results reveal the ability of P2Y2 agonist Diquafosol to repress lung inflammation and the development of associated injuries.

Discussion

Pathologic NLRP3 inflammasome activation has been associated with several human diseases including pulmonary inflammatory diseases, COVID-19 and ALI/ARDS [5, 6]. A better understanding of molecular mechanisms regulating inflammasome activation is a key step for the identification of novel therapeutic approaches targeting NLRP3 inflammasomopathies. We previously revealed that two major sensors of danger signals, namely, P2Y2 and NLRP3, constitutively interact and are functionally linked during SIV and HIV infection [9]. Their interaction is increased on HIV-1-infected monocytes, macrophages and lymphocytes during the early acute and chronic steps of viral infection. We showed P2Y2 and NLRP3 regulate host cell susceptibility to HIV-1 through the modulation of viral entry. P2Y2 facilitates HIV-1 entry into target cells and inversely, NLRP3 represses it through the inhibition of host cytoskeleton remodelling. Interestingly, we demonstrated that P2Y2-dependent signaling pathway, which is triggered by the binding of HIV-1 envelope to target cell coreceptors, induces the ubiquitinylation and the degradation of NLRP3, thus allowing viral entry. This report initially revealed that the activation of P2Y2 antagonizes NLRP3 biological activities [9]. In the present study, we further characterized the interplay between P2Y2 and NLRP3 during inflammasome activation. We studied signs of inflammasome activation in P2y2^{-/-} mice and observed a significant increase of plasma IL-1 β levels and pyroptotic death of alveolar macrophages in P2y2^{-/-} mice, as compared to P2y2^{+/+} mice. These results were confirmed in vitro after pharmacological inhibition (with Kaempferol) or genetic depletion of P2Y2 in hMDMs, thus indicating that the purinergic receptor P2Y2 acts as an endogenous repressor of inflammasome activation. Inflammasome activation generally requires a priming step in response to stimulatory signals (such as LPS) and a protein complex assembly step in response to activation signals (such as ATP or Nigericin) [3]. Here, we report that P2Y2 inactivation is sufficient for inflammasome activation, thus interrogating the signaling pathways triggered by P2Y2 inactivation. Additional investigations are needed to precisely decipher P2Y2-dependent signaling pathways involved in the regulation of inflammasome activation. In this report, we also showed that P2Y2 agonists such as 4-ThioUTP or Diquafosol significantly inhibited proteolytic caspase-1 activation and IL-1 β secretion from macrophages stimulated with LPS+ATP or LPS+Nigericin, thus revealing that the stimulation of P2Y2 can inhibit NLRP3 inflammasome activation. This process is associated with a reduced expression of NLRP3 protein levels and the inhibition of ASC oligomerization and NLRP3 inflammasome assembly, but did not affect NLRP3 mRNA expression levels. Inversely, P2Y2 inactivation also enhanced ASC oligomerization in

PMA-THP1 macrophages (data not shown). Altogether, our results identify an unexpected role of P2Y2 in the regulation of NLRP3 protein expression (at post-translational level) as well as ASC oligomerization and NLRP3 inflammasome assembly. Molecular mechanisms involved in these processes remain to be elucidated and should pave the way for the identification of novel molecular targets for the treatment of NLRP3 inflammasomopathies.

We then evaluated the ability of P2Y2 agonists Denufosol, Diquafosol and UTP to repress NLRP3 inflammasome activity in physiopathological situations. Considering the contribution of P2Y2 and NLRP3 to the entry of HIV-1 into target cells [9], we investigated the biological effects of P2Y2 and NLRP3 on the early steps of SARS-CoV-2 infection. We demonstrated that NLRP3 acts at post-entry level and favours viral replication into epithelial cell lines that overexpressed or constitutively expressed ACE2 (such as ACE2-A549 cells, Vero E6 cells, Caco2 cells or primary epithelial cells). The purinergic receptor P2X7, which can act upstream NLRP3 inflammasome, was also shown to control SARS-CoV-2 replication [16]. Here we reported that P2Y2 also regulates the susceptibility to SARS-CoV-2 by acting at post-entry level and by antagonizing NLRP3-mediated effects on viral replication. These results showed that P2Y2 negatively regulates NLRP3 biological functions in epithelial cells and acts as a cellular host restriction factor against SARS-CoV-2.

In this report, we also studied biological activities of P2Y2 agonists during bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis, which is dependent on NLRP3 inflammasome [29]. We revealed that Diquafosol abrogated pulmonary injuries and immune cell infiltration in bleomycin-treated animals. The percentage of interstitial macrophages, which play a key role in the early stages of bleomycin-induced lung injuries [31], is significantly reduced in Diquafosol-treated mice. Our results thus underline a mechanism that depends on P2Y2 activation and restrains bleomycin-induced pulmonary injuries. The proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2), which regulates macrophage adhesion, migration and activation [32] and can be activated by P2Y2 [33], was recently involved in the induction of bleomycin-induced lung fibrosis [34]. In response to LPS+Nigercin stimulation, Pyk2 interacts with ASC and NLRP3, controls ASC phosphorylation and oligomerization and promotes the assembly of NLRP3 inflammasome [35]. Pyk2 also accumulates to the ring of macrophage podosomes surrounding F-actin cores or colocalizes with F-actin when interaction with ASC is reduced [34]. Colocalization of Pyk2 with F-actin correlates negatively with NLRP3 inflammasome activation, suggesting that NLRP3, ASC and F-actin compete for Pyk2. Accordingly, P2Y2- dependent NLRP3 degradation was shown permissive of Pyk2-

dependent cytoskeletal reorganization, which is required for the entry of HIV-1 into target cells [9]. Further investigations to evaluate effects of P2Y2 agonists on Pyk2 localization are needed. Considering that P2Y2 and Pyk2 can be activated by tensile stress such as fluid shear stress [36], a better understanding of signaling pathways involving P2Y2, NLRP3, ASC and Pyk2 should help to specify molecular link between mechanical transduction and macrophage activation and could have significant implications for several human lung inflammatory diseases.

Altogether, our study provides the first rationale for testing P2Y2 agonists, such as Diquafosol and Denufosol, which have been previously approved or proposed for the treatments of dry eye [37] and cystic fibrosis [38], respectively, as NLRP3 negative modulators for blocking viral replication and COVID-19-associated hyperinflammation in SARS-CoV-2-infected patients or for restraining lung injuries in patients with idiopathic pulmonary fibrosis patients or acute respiratory distress syndrome (ARDS). The repurposing of P2Y2 agonists for the treatment of other human diseases associated with excessive activation of NLRP3 inflammasome, such as cryopyrin-associated periodic syndromes, rheumatoid arthritis, obesity or Alzheimer's disease [39], should be also investigated.

Figure legends

FIGURE 1. Increased plasma IL-1 β secretion and pyroptosis of interstitial macrophages in P2y2^{-/-} mice.

a-g) Plasma IL-1 β (a), representative flow cytometry analysis (b), frequencies of interstitial Gr1⁻CD11b⁺CD11c^{high}CD40⁺ macrophages (c), representative images (d, f) and frequencies (e, g) of cleaved Caspase-1⁺ (CASP1⁺) CD40⁺ macrophages (d, e) or TUNEL⁺CD40⁺ macrophages (f, g) were determined from 7 to 8 wild-type P2y2^{+/+} mice and 8 to 9 P2y2^{-/-} mice. h, i) Control or LPS+ATP-stimulated PMA-THP1 macrophages treated with Kaempferol (Kaempf.) (h), or depleted for P2Y2 (shRNA P2Y2) or control (shRNA Co.) (i) were analyzed for IL-1 β release. j-l) Human monocyte-derived macrophages (hMDMs) treated with IFN γ (j), Kaempferol (Kaempf.) (j) or depleted for P2Y2 (siRNA P2Y2) (k) were analyzed for IL-1 β release in the supernatant (SN) of treated cells (j, k) and for P2Y2 expression (l). m) Kaempferol (Kaempf.)-treated, control or CASP1-depleted PMA-THP1 macrophages were analysed for LDH release after stimulation with LPS and ATP. Nuclei and cellular shapes are detected using Hoechst 33342 and phase contrast in (d) and (f). Scale bars in (d) and (f) are 5 μ m. Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative images and western blots are shown. Data are presented as means \pm SEM. Two-tailed Mann-Whitney test (a, c, e and g) and two-way ANOVA analyses (h, i and m) were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

FIGURE 2. P2Y2 agonists regulate NLRP3-dependent inflammasome activation through negative modulation of ASC oligomerization.

a-h) Control, LPS+ATP- (a, c, e-h) or LPS+Nigericin (LPS+Nig.) (b, d) stimulated human PMA-THP1 macrophages (a-d) or mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (e-h) treated with Diquafosol (Diqua.) were analyzed for IL-1 β (a, b, g, h) and for expression of pro-caspase-1 (pro-CASP1) and proteolytic cleavage of pro-CASP1 (cleaved CASP1 (c-f). i, j) Colocalization of NLRP3 (red) and ASC (green) proteins (NLRP3-ASC⁺) in LPS+Nigericin (LPS+Nig.) stimulated human PMA-THP1 macrophages treated with Diqua. were analyzed using fluorescent microscopy (i) and quantified (j). Percentages of human PMA-THP1 macrophages with NLRP3-ASC colocalization (NLRP3-ASC⁺) are shown. k) Percentages of human PMA-THP1 macrophages with NLRP3-ASC colocalization (NLRP3-ASC⁺) after stimulation with LPS+Nig. and treatment with 4-thiouridine-5'-triphosphate (4-Thio.) were quantified and shown. Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative images and western blots are shown. Data are presented as means \pm

SEM. Two-tailed Mann-Whitney test (f, h) and one-way ANOVA (g, j, k) analyses were used. **P < 0.01 and ****P < 0.0001.

FIGURE 3. P2Y2 agonists dictate cytopathogenicity and susceptibility to SARS-CoV-2 infection through the modulation of viral replication.

a, b) Cytopathogenicity of Vero E6 cells that were infected or not with SARS-CoV-2 (MOI=1 or 2) during 72 hours in presence of indicated concentrations of Diquafosol (Diqua.) (a) or Denufosol (Denu.) (b) were analyzed using MTT assays. c-h) Vero E6 cells (c, d, g, h), ACE2-A549 cells (e) and primary epithelial cells (f) were respectively infected with SARS-CoV-2 (MOI=0.1 or 0.2) during 24 (c, d, g, h) or 48 (e, f) hours in presence of 500 μ M UTP, 100 μ M Diquafosol (Diqua.), 5 mM Denufosol (Denu.) or 100 μ M Kaempferol (Kaempf.). Intracellular mRNA expressions of RdRp (c, f) and E (d, e) were analyzed using quantitative RT-PCR (c-f). Spike positive cells were imaged (g) and quantified (h) using fluorescence microscopy. Representative images (g) of 3 independent experiments are shown. i-l) ACE2- A549 cells (i, k) and Caco-2 cells (j, l) were respectively infected with SARS-CoV-2 (MOI=1) during 48 hours in presence of 100 μ M Diquafosol (Diqua.). Cells showing ASC+ specks were imaged (i, j) and quantified (k, l) using fluorescence microscopy. Representative images (i, j) of 3 independent experiments are shown. Fold changes of RdRp and E RNA from SARS-CoV-2 infected Vero E6 cells (n=3) and ACE2-A549 cells (n=2-3) are shown (c- f). Scale bar in (i) is 10 μ m. Data are presented as means \pm SEM. One-way (a-e, h, k and l) ANOVA analyses and two-tailed Mann-Whitney (f) test were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

FIGURE 4. P2Y2 agonist Diquafosol inhibits bleomycin-induced lung injury and inflammation.

a) Computed tomography (CT) scans of lung density from mice that were treated with control, bleomycin (Bleo), Diquafosol (Diqua.) or bleomycin and Diquafosol (+Bleo.+Diqua.) during 21 days were obtained. CT scans from 3 independent experiments are shown. b) Sections of lungs obtained from control, Bleo.-, Diqua.- or Bleo.+Diqua.-treated mice were stained with hematoxylin and eosin and analyzed. Representative images are shown. c, d) Representative flow cytometry analyses of alveolar (CD45⁺SiglecF⁺CD11b⁻CD11c⁺CD169⁺) macrophages (c) and interstitial CD45⁺SiglecF⁻CD11b⁺Ly6C⁻CD64⁺ macrophages (d) determined 21 days after intratracheal instillation in control, Bleo.-, Diqua.- or Bleo.+Diqua.- treated mice are shown (n=9-19 mice/group). e, f). Numbers of alveolar macrophages (e) and interstitial macrophages (f) determined 21 days after intratracheal instillation in control, Bleo.-, Diqua.- or Bleo.+Diqua.-treated mice are shown (n=9-19 mice/group). Data were

obtained from 2 independent experiments and are presented as means \pm SEM. One-way (e, f) ANOVA analyses were used. **P < 0.01.

Supplementary materials

SUPPLEMENTARY FIGURE S1. Flow cytometry detection of interstitial macrophages in P2y2^{+/+} and P2y2^{-/-} mice.

a) Representative gating strategy for the quantification of interstitial macrophages in P2y2^{+/+} and P2y2^{-/-} mice is shown.

SUPPLEMENTARY FIGURE S2. Validation of Caspase-1 knockdown.

a) Caspase-1 (CASP1) expression of control (shCo.) and CASP1 (shCASP1-1 and -2)-depleted, PMA-THP1 macrophages was determined by western blot. GAPDH expression was used as loading control. Representative western blot of 3 independent experiments is shown.

SUPPLEMENTARY FIGURE S3. P2Y2 agonists negatively regulate the secretion of IL-1 β , pro-caspase-1, cleaved caspase-1 and IL-18.

a-l) Control, LPS+ATP- (a-g, i-l) or LPS+Nigericin (LPS+Nig.) (h) stimulated human PMA-THP1 macrophages (a-h) or mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (i-l) treated with Diquafosol (Diqua.) (a-d, h-l) or with 4-thiouridine-5'-triphosphate (4-Thio.) (a, b, e) were analyzed for IL-1 β secretion (a, b), for the expression of secreted pro-caspase-1 (pro-CASP1) and proteolytic cleavage of pro-CASP1 (cleaved CASP1) (c-j) and IL-18 secretion (k, l). Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative experiments (a, k) and western blots (e) are shown. Data are presented as means \pm SEM. One-way (b) ANOVA analyses, unpaired two-tailed t-test (c, d, f-j and l) were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

SUPPLEMENTARY FIGURE S4. P2Y2 agonists did not affect the mRNA expression levels of NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and pro-IL-1 β .

a-h) Control, LPS+ATP- (a-d) or LPS+Nigericin (LPS+Nig.) (e-h) stimulated human PMA-THP1 macrophages treated with Diquafosol (Diqua.) or with 4-thiouridine-5'-triphosphate (4-Thio.) (a-h) were analyzed for mRNA expression levels of NLRP3 (a, e), ASC (b, f), pro-caspase-1 (pro-CASP1) (c, g) and pro-interleukin 1 β (pro-IL-1 β) (d, h). i-l) Control or LPS+ATP-stimulated bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (i, k) or human PMA-THP1 macrophages (j, l) treated with Diquafosol (Diqua.) (i, k) or with 4-thiouridine-5'-triphosphate (4-Thio.) (j, l) were analyzed for NLRP3 expression (i-l). β -actin expression was used as loading control (i, j). Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative western blots are shown. Data are

presented as means \pm SEM. One-way (a-h) ANOVA analyses and unpaired two-tailed t-test (k, l) were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

SUPPLEMENTARY FIGURE S5. The P2Y2 agonist 4-thiouridine-5'-triphosphate inhibits LPS+Nigericin-mediated NLRP3-ASC⁺ speck formation.

a) Colocalization of ASC (green) and NLRP3 (red) proteins (NLRP3-ASC⁺) in LPS+Nigericin (LPS+Nig.) stimulated bone marrow-derived macrophages (BMDMs) treated with 4-thiouridine-5'-triphosphate (4-Thio.) were analyzed using fluorescent microscopy. Nuclei are stained with Hoechst 33342. Representative images are shown (scale bar, 10 μ m).

SUPPLEMENTARY FIGURE S6. Effects of P2Y2 agonists and depletion on the replication of SARS-CoV-2.

a-c) Vero E6 cells (a) and ACE2-A549 cells (b, c) were infected or not with SARS-CoV-2 (MOI=1 or 2) during 24 (a) or 48 (b, c) hours in presence of 500 μ M UTP (a-c) or 100 μ M Diquafosol (Diqua.) (a, b) and analyzed for Spike expression (using western blot analysis) (a, c) or intracellular mRNA expression of RdRp (using quantitative RT-PCR) (b). GAPDH expression was used as loading control (a, c). Fold changes of RdRp from SARS-CoV-2 infected ACE2-A549 cells are shown (b). d) Control or P2Y2-depleted ACE2-A549 cells were infected or not with SARS-CoV-2 (MOI=2) during 48 hours and analyzed for intracellular mRNA expression of RdRp (using quantitative RT-PCR). Fold changes of RdRp from SARS-CoV-2 infected, control or P2Y2-depleted ACE2-A549 cells are shown. Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative western blots are shown. Data are presented as means \pm SEM. One-way (B) ANOVA analyses and unpaired two-tailed t-test (d) were used. *P < 0.05 and **P < 0.01.

SUPPLEMENTARY FIGURE S7. P2Y2 agonists UTP and Diquafosol did not affect viral entry of SARS-CoV-2 into host cells.

a-c) Vero E6 (a), ACE2-A549 (b) or ACE2-TMPRSS2-A549 (c) cells were incubated during 4 hours with control, 500 μ M UTP or 100 μ M Diquafosol (Diqua.), and infected for 48 hours with HIV-1NL4-3 Δ Env variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-LV) or with S-LV neutralized with convalescent COVID-19 serum. Then, cells were analyzed for intracellular HIV-1 CAp24 capsid expression (a-c). β -actin was used as loading control (a-c). Representative western blots are shown. In (b), the asterisk (*) is indicating a non-specific band.

SUPPLEMENTARY FIGURE S8. Flow cytometry detection of interstitial and alveolar macrophages from mice that were treated with control, bleomycin (Bleo), Diquafosol (Diqua.) or bleomycin and Diquafosol (+Bleo.+Diqua.) during 21 days.

a, b) Representative gating strategies for the detection and the quantification of interstitial (a) and alveolar macrophages (b) in treated mice is shown.

Supplemental Tables S1 and S2

Table S1. Human siON-TARGETplus SMARTpool and shRNA used in this study.

Human target	sg	Target sequence	Reference
siON-TARGETplus Non-targeting Control Pool	1	UGGUUUACAUGUCGACUAA	Dharmacon (D-001810-10-20)
	2	UGGUUUACAUGUUGUGUGA	
	3	UGGUUUACAUGUUUUCUGA	
	4	UGGUUUACAUGUUUCCUA	
siON-TARGETplus Human P2RY2	1	CGAGAACACUAAGGACAUU	Dharmacon (L-003688-00-0005)
	2	CGACAGAACUGACAUGCAG	
	3	GGAAUGCGUCCACCACAU	
	4	UGCCGUCGUCGUCUAUUA	
pLKO.1 sh-1Caspase-1	1	ATAATGAGAGCAAGACGTGTG	
pLKO.1 sh-2Caspase-1	2	AGCATCATCCTCAAACCTCTTC	

Table S2. Sequences of primers and probes used to quantify the RdRp and E genes.

Gene target	Primers and Probe sequences	Reference
SARS-Cov-2 RdRp	F: GGTAAGTGGTATGATTT R: CTGGTCAAGGTTAATATA Probe: [FAM]TCATACAAACCACGCCAGG[BHQ1]	Eurofins - Customized
SARS-Cov-2 E-gene	F: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT R: ATATTGCAGCAGTACGCACACA Probe: [FAM]CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC[BBQ]	TIB MolBiol
β-actin (human) (for epithelial cells)	F 5': CACCATTGGCAATGAGCGGTTC R 3': AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT SYBR-Green	Origene (NM_001101)

Acknowledgements

We gratefully acknowledge NH TherAguix SAS and ENS Paris-Saclay for supporting our effort against COVID-19 pandemic, and Imaging and Cytometry Platform (Y. Lecluse and S. Salome-Desnoulez), IMS 3655 CNRS / US 23 INSERM from Gustave Roussy Cancer Campus (Villejuif, France) for technical support. This work was supported by funds from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-IBHU-0001, ANR-10-LABX33, ANR-11- IDEX-003-01 and ANR Flash COVID-19 "MacCOV"), Fondation de France (alliance "tous unis contre le virus"), Electricité de France, Fondation Gustave Roussy, Institut National du Cancer (INCa 9414 and INCa 16087), The SIRIC Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE), Fédération Hopitalo-Universitaire (FHU) CARE (Cancer and Autoimmunity Relationships) (directed by X. Mariette, Hôpital Bicêtre, AP-HP) and Université Paris-Saclay (to Jean-Luc Perfettini), and REACTing and the Fondation pour la Recherche Médicale (AM-CoV-Path program) (to Roger Le Grand). We thank the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM, Paris, France) "One Health" and "Immunothérapies, auto- immunité et Cancer" (ITAC) for its support. The Infectious Disease Models and Innovative Therapies research infrastructure (IDMIT) is supported by the "Programmes Investissements d'Avenir" (PIA), managed by the ANR under references ANR-11-INBS-0008 and ANR-10- EQPX-02-01. Emie Gutierrez-Mateyron and Aurélia Deva Nathan are recipients of PhD fellowships from French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. Déborah Lécuyer and Désirée Tannous are recipients of PhD fellowships from LabEx LERMIT and Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Cifre#2019/0639), respectively. Ali Mostefa-Kara is recipient of PhD fellowship from Ecole et Loisir.

Footnotes

Author contributions:

Jean-Luc Perfettini provided financial support. Jean-Luc Perfettini designed and conducted the study. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra, Vanessa Petit, Clémence Richetta, Lydia Meziani, Ali Mostefa-Kara, Romain Marlin, Pauline Maisonnasse, Julia Delahousse, Juliette Pascaud, Marie Naigeon, Olivier Delelis and Awatef Allouch performed experiments. Isabelle Couillin provides $P2y2^{+/+}$ and $P2y2^{-/-}$ transgenic mice. Xavier Mariette provided cultures of salivary gland epithelial cells. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra, Vanessa Petit, Lydia Meziani, Ali Mostefa-Kara, Anais Chapel, Eric Deutsch, Eric Deprez, Nathalie Chaput, Angelo Paci, Véronique Saada, David Ghez, Isabelle Couillin, Xavier Mariette, Olivier Delelis, Roger Le Grand and Jean-Luc Perfettini analyzed the results. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra and Lydia Meziani assembled the figures. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra and Anais Chapel performed statistic analysis. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra, Vanessa Petit, Clémence Richetta, Lydia Meziani, Ali Mostefa-Kara, Romain Marlin, Pauline Maisonnasse, Julia Delahousse, Juliette Pascaud, Anais Chapel, Eric Deutsch, Eric Deprez, Marie Naigeon, Nathalie Chaput, Angelo Paci, Véronique Saada, David Ghez, Isabelle Couillin, Xavier Mariette, Olivier Delelis, Roger Le Grand, Awatef Allouch and Jean-Luc Perfettini wrote the initial draft. All authors approved the final version.

Conflict of Interest:

Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Awatef Allouch, Frédéric Subra, Olivier Delelis and Jean-Luc Perfettini are listed as co-inventors on a patent application related to SARS-CoV-2 therapy. Désirée Tannous and Awatef Allouch were employed by NH TherAguix SAS. Angelo Paci, Eric Deutsch and Jean-Luc Perfettini are founding members of Findimmune SAS, an Immuno-Oncology Biotech company. Jean-Luc Perfettini disclosed research funding not related to this work from NH TherAguix and Wonna Therapeutics. Nathalie Chaput disclosed research funding not related to this work from GlaxoSmithKline, Roche, Cytune pharma and Sanofi. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140(6): 821-832.
2. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014; 157(5): 1013-1022.
3. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2019; 19(8): 477-489.
4. Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol* 2011; 32(4): 171-179.
5. Hosseini N, Cho Y, Lockey RF, Kolliputi N. The role of the NLRP3 inflammasome in pulmonary diseases. *Ther Adv Respir Dis* 2015; 9(4): 188-197.
6. Sefik E, Qu R, Junqueira C, Kaffe E, Mirza H, Zhao J, Brewer JR, Han A, Steach HR, Israelow B, Blackburn HN, Velazquez SE, Chen YG, Halene S, Iwasaki A, Meffre E, Nussenzweig M, Lieberman J, Wilen CB, Kluger Y, Flavell RA. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature* 2022; 606(7914): 585-593.
7. Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv* 2018; 2: 2398212818817494.
8. Seror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saidi H, Nardacci R, Voisin L, Paoletti A, Law F, Martins I, Amendola A, Abdul-Sater AA, Ciccocanti F, Delelis O, Niedergang F, Thierry S, Said-Sadier N, Lamaze C, Metivier D, Estaquier J, Fimia GM, Falasca L, Casetti R, Modjtahedi N, Kanellopoulos J, Mouscadet JF, Ojcius DM, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J Exp Med* 2011; 208(9): 1823-1834.
9. Paoletti A, Allouch A, Caillet M, Saidi H, Subra F, Nardacci R, Wu Q, Muradova Z, Voisin L, Raza SQ, Law F, Thoreau M, Dakhli H, Delelis O, Poirier-Beaudouin B, Dereuddre-Bosquet N, Le Grand R, Lambotte O, Saez-Cirion A, Pancino G, Ojcius DM, Solary E, Deutsch E, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL. HIV-1 Envelope Overcomes NLRP3-Mediated Inhibition of F-Actin Polymerization for Viral Entry. *Cell Rep* 2019; 28(13): 3381-3394 e3387.
10. Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, Verkhatsky A, Sperlagh B, Yu SG, Huang C, Tang Y. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6(1): 162.

11. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(3): 177-192.
12. Franceschini A, Capece M, Chiozzi P, Falzoni S, Sanz JM, Sarti AC, Bonora M, Pinton P, Di Virgilio F. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J* 2015; 29(6): 2450-2461.
13. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 2017; 47(1): 15-31.
14. Dechelle-Marquet PA, Guillonneau X, Sennlaub F, Delarasse C. P2X7-dependent immune pathways in retinal diseases. *Neuropharmacology* 2023; 223: 109332.
15. Wang D, Wang H, Gao H, Zhang H, Zhang H, Wang Q, Sun Z. P2X7 receptor mediates NLRP3 inflammasome activation in depression and diabetes. *Cell Biosci* 2020; 10: 28.
16. Lécuyer D, Nardacci R, Tannous D, Gutierrez-Mateyron E, Deva Nathan A, Subra F, Di Primio C, Quaranta P, Petit V, Richetta C, Mostefa-Kara A, Del Nonno F, Falasca L, Marlin R, Maisonnasse P, Delahousse J, Pascaud J, Deprez E, Naigeon M, Chaput N, Paci A, Saada V, Ghez D, Mariette X, Costa M, Pistello M, Allouch A, Delelis O, Piacentini M, Le Grand R, Perfettini JL. The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv* 2023.
17. Wang S, Zhao J, Wang H, Liang Y, Yang N, Huang Y. Blockage of P2X7 attenuates acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol* 2015; 27(1): 38-45.
18. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(6): 774-783.
19. Kawano A, Tsukimoto M, Noguchi T, Hotta N, Harada H, Takenouchi T, Kitani H, Kojima S. Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419(2): 374-380.
20. Kanellopoulos JM, Almeida-da-Silva CLC, Ruutel Boudinot S, Ojcius DM. Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. *Front Immunol* 2021; 12: 645834.

21. Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, Turner JT. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(8): 3275-3279.
22. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006; 314(5806): 1792-1795.
23. Wu Q, Allouch A, Paoletti A, Leteur C, Mirjolet C, Martins I, Voisin L, Law F, Dakhli H, Mintet E, Thoreau M, Muradova Z, Gauthier M, Caron O, Milliat F, Ojcius DM, Rosselli F, Solary E, Modjtahedi N, Deutsch E, Perfettini JL. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy. *Cell Death Differ* 2017; 24(9): 1632-1644.
24. Allouch A, Voisin L, Zhang Y, Raza SQ, Lecluse Y, Calvo J, Selimoglu-Buet D, de Botton S, Louache F, Pflumio F, Solary E, Perfettini JL. CDKN1A is a target for phagocytosis-mediated cellular immunotherapy in acute leukemia. *Nat Commun* 2022; 13(1): 6739.
25. Meziani L, Mondini M, Petit B, Boissonnas A, Thomas de Montpreville V, Mercier O, Vozenin MC, Deutsch E. CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *Eur Respir J* 2018; 51(3).
26. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008; 181(6): 3755-3759.
27. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; 113(10): 2324-2335.
28. Abdul-Sater AA, Koo E, Hacker G, Ojcius DM. Inflammasome-dependent caspase-1 activation in cervical epithelial cells stimulates growth of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* 2009; 284(39): 26789-26796.
29. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. Uric acid is a danger signal activating NALP3

inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(10): 903-913.

30. Gu Y, Lawrence T, Mohamed R, Liang Y, Yahaya BH. The emerging roles of interstitial macrophages in pulmonary fibrosis: A perspective from scRNA-seq analyses. *Front Immunol* 2022; 13: 923235.

31. Liborio-Ramos S, Barbosa-Matos C, Fernandes R, Borges-Pereira C, Costa S. Interstitial Macrophages Lead Early Stages of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Induce Fibroblasts Activation. *Cells* 2023; 12(3).

32. Okigaki M, Davis C, Falasca M, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP, Schlessinger J. Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(19): 10740-10745.

33. Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin KD, Garrad RC, Santiago-Perez LI, Gonzalez FA, Seye CI, Weisman GA, Erb L. Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J Biol Chem* 2004; 279(9): 8212-8218.

34. Joshi H, Almgren-Bell A, Anaya EP, Todd EM, Van Dyken SJ, Seth A, McIntire KM, Singamaneni S, Sutterwala F, Morley SC. L-plastin enhances NLRP3 inflammasome assembly and bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Rep* 2022; 38(11): 110507.

35. Chung IC, OuYang CN, Yuan SN, Li HP, Chen JT, Shieh HR, Chen YJ, Ojcius DM, Chu CL, Yu JS, Chang YS, Chen LC. Pyk2 activates the NLRP3 inflammasome by directly phosphorylating ASC and contributes to inflammasome-dependent peritonitis. *Sci Rep* 2016; 6: 36214.

36. Wang S, Iring A, Strilic B, Albarran Juarez J, Kaur H, Troidl K, Tonack S, Burbiel JC, Muller CE, Fleming I, Lundberg JO, Wettschureck N, Offermanns S. P2Y(2) and Gq/G(1)(1) control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *J Clin Invest* 2015; 125(8): 3077-3086.

37. Keating GM. Diquafosol ophthalmic solution 3 %: a review of its use in dry eye. *Drugs* 2015; 75(8): 911-922.

38. Ratjen F, Durham T, Navratil T, Schaberg A, Accurso FJ, Wainwright C, Barnes M, Moss RB, Group T-SI. Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2012; 11(6): 539-549.

39. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17(9): 688.
40. Allouch A, Di Primio C, Paoletti A, Le-Bury G, Subra F, Quercioli V, Nardacci R, David A, Saidi H, Cereseto A, Ojcius DM, Montagnac G, Niedergang F, Pancino G, Saez-Cirion A, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL. SUGT1 controls susceptibility to HIV- 1 infection by stabilizing microtubule plus-ends. *Cell Death Differ* 2020; 27(12): 3243-3257.

Supplementary Material

P2Y2 agonists impair NLRP3-dependent SARS-CoV-2 replication and lung inflammation

Emie Gutierrez-Mateyron et al.,

Supplementary Methods

RNA interference

Human MDMs and ACE2-A549 were transfected using smart pools of siGenome non-targeting control and P2Y2 specific siRNAs from Dharmacon as previously described [9, 16, 40]. After 48 hours of transfection, cell lysates and supernatants were analyzed for protein expression by western blot, flow cytometry and ELISA. Plasmids coding for the gag-pol HIV-1 genes (pCMV GAG-POL HIV University of Michigan), for shRNA of interest (pLKO.1 shRNA, Thermo Scientific) and for VSVG envelope (pMDG-VSV-G) were transfected into HEK293T cells using calcium phosphate reagent (Promega) to obtain lentiviral vector particles. After 48 hours, supernatants were filtered using 0.45- μ m cellulose acetate filters (Sartorius stedim), aliquoted and stored at -80°C . Monocytic THP1 cells were transduced for 24 hours and grown in medium containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (Invivogen). Control THP1 (PLKO.1) cells and CASP1- (shRNA1 CASP1 and shRNA2 CASP1)-depleted THP1 cells were thus obtained. Sequences of human siRNA, siGENOME SMARTpool and shRNA used in this study are shown in Table S1.

Virus, pseudoviral constructs and viral production

As previously published [16], the SARS-CoV-2 BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain (D614G) was obtained from Dr. Benoit Viseaux and Prof. Diane Descamps (UMR S 1135, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris), and from the National Reference Center For Respiratory Viruses (Institut Pasteur, Paris, France). Viral stocks (2×10^6 PFU/mL) were prepared by propagation in African green monkey kidney epithelial (Vero E6) cells as previously described [16]. Plasmid NLENG1-ES-IRES coding for defective virus carrying two stop codons in the reading frame of the envelope was derived from the HIV-1 virus NL4-3 and used for the production of HIV-1NL4-3 Δ Env particles (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-LV), as previously published [16]. Supernatants containing the viruses were collected 48 hours after transfection, low-speed centrifuged, filtered, titrated using HIV-1 P24 ELISA assay

(#NEK05001KT, Perkin Elmer) and stored at -80°C until use, as previously published [16].

Immunohistochemistry

Mouse lungs were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS, paraffin embedded and cut into 4- μ m sections. Lung sections were then stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) and scanned using a microscopy virtual slide system (Olympus VS120).

Immunofluorescence

After SARS-CoV-2 infection or indicated treatment, epithelial cells (ACE2-A549, Caco-2, Vero E6 cells) and BMDMs were fixed for 15 minutes at room temperature with 4% PFA/PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (#X100, Sigma-Aldrich) for 15 minutes or 0.3% Triton X-100 for 5 minutes, respectively, and saturated with 5% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS (BSA/PBS) for 1 hour at room temperature. Cells were incubated with the following antibodies overnight at 4°C: anti-TMS1/ASC antibody (ASC) (#ab155970 rabbit, Abcam, 1/200 dilution), anti-spike (Spike) antibody (#GTX632604 mouse, Genetex, 1/100 dilution), anti-ASC antibody (ASC) (clone 2E1-7, #04-147 mouse, Millipore, 1/100 dilution) and anti-NLRP3/NALP3 (NLRP3) antibody (#MAB7578 rat, R&D Systems, 1/100 dilution) in 5% BSA/PBS. ACE2-A549 cells were incubated with anti-spike S antibody for 2 hours at room temperature and appropriate secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (#A11034, Invitrogen, 1/500) or Alexa Fluor 546 (#A11030, Invitrogen, 1/500) at room temperature for 1 hour. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (#1874027, Invitrogen, 1/1000 dilution). Then, cells were mounted with Fluoromount G medium (Southern biotech), analyzed and imaged by Leica DMI8 microscope using a 60X objective. For immunofluorescence analysis of mouse lungs, 4- μ m sections were cut from the paraffin blocks of the PFA-fixed tissues from mice. After paraffin removal, slides were subjected to antigen retrieval by microwave boiling in 1 mmol/L EDTA pH 9.0. After permeabilization with 0.3% Triton (for 5 minutes) and saturation in PBS containing 20% FBS (for 1 hour), slides were stained with (green) TUNEL assay (#Roche, #11684809910) during 1 hour at 37°C according to the manufacturer's instructions and incubated with anti-CD40 (#14-0401, ebioscience) or anti-CASP1 p10 (#sc-22164, Santa Cruz) overnight at 4°C. Then, cells were incubated with anti-rat IgG conjugated to Alexa Fluor 546 (#A11081, Invitrogen) or anti-goat IgG conjugated to Alexa Fluor 647 (#A21447, Invitrogen) fluorochromes at room temperature for 1 hour and 30 minutes. Cells were analyzed by fluorescent confocal

microscopy on Leica SPE (using a 63X objective). Z series of optical sections at 0.4- μ m increments were acquired.

Flow cytometry

Lung macrophages were extracted from mice (using Lung Dissociation kit from Miltenyi Biotech) and analysed using LSRFortessa (BD) flow cytometer. Mice alveolar macrophages were analyzed using anti-CD11b (APC-Cy7) (#557657, BD Pharmingen), anti-CD11c (PE-Cy7) (#117318, BioLegend), anti-CD40 (eFluo710) (#46-0401, ebioscience), anti-F4/80 (FITC) (#11-4801, ebioscience), and anti-Ly-6G (GR-1-PE) (#12-5931, ebioscience) antibodies and interstitial macrophages were identified using anti-CD45 (APC-Vio 770) (#130-110-662, Miltenyi), anti-CD11b (BUV395) (#563553, BD Horizon), anti-Ly-6G (PerCP-Vio 700) (#130-117-500, Miltenyi), anti-Ly-6C (Alexa Fluor 700) (#128024, BioLegend) and anti-CD64 (BV605) (#139323, BioLegend) antibodies, as previously reported [25].

Western blots

Total cellular proteins were extracted from ACE2-A549, Caco-2 and Vero E6 cells in a lysis buffer containing 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 1 M HEPES, 1 M KCl, 10% glycerol and the protease and phosphatase inhibitors (Roche). For PMA-THP1 and BMDM cells, total cellular proteins were extracted in a lysis buffer containing 1M Tris-HCl (pH=7.4), 5M NaCl, 1% CHAPS and the protease and phosphatase inhibitors. 10-40 μ g of protein extracts were run on 12% SDS-PAGE and transferred at 4°C onto 0.2 μ m pore size nitrocellulose membrane. After 1 hour saturation at room temperature with 5% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20 (TBS-Tween), nitrocellulose membranes were incubated with primary antibody at 4°C overnight and for 1 hour with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (Southern Biotech) antibodies. Enhanced ECL detection system (GE Healthcare) was used for western blot revelation. For supernatant proteins, supernatants were centrifuged 5 min at 1500 RPM at 4°C and proteins were run on 4-12% SDS-PAGE. The primary antibody against Spike (#GTX632604) was from Genetex. Primary antibodies against IL-1 β (#ab2105) and β -Actin-HRP (#ab49900) were purchased from Abcam. Anti-NLRP3 (Cryo-2, #AG-20B-0014), anti-Caspase-1 (CASP1) (#2225) and anti-GAPDH (clone 6C5, #MAB374) were from Adipogen, Cell Signaling and Millipore, respectively. Antibody for p24 was obtained through the NIH HIV Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH: Polyclonal Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 SF2 p24 (antiserum, Rabbit), ARP-4250, contributed by DAIDS/NIAID; produced by BioMolecular Technologies).

Quantitative RT-PCR

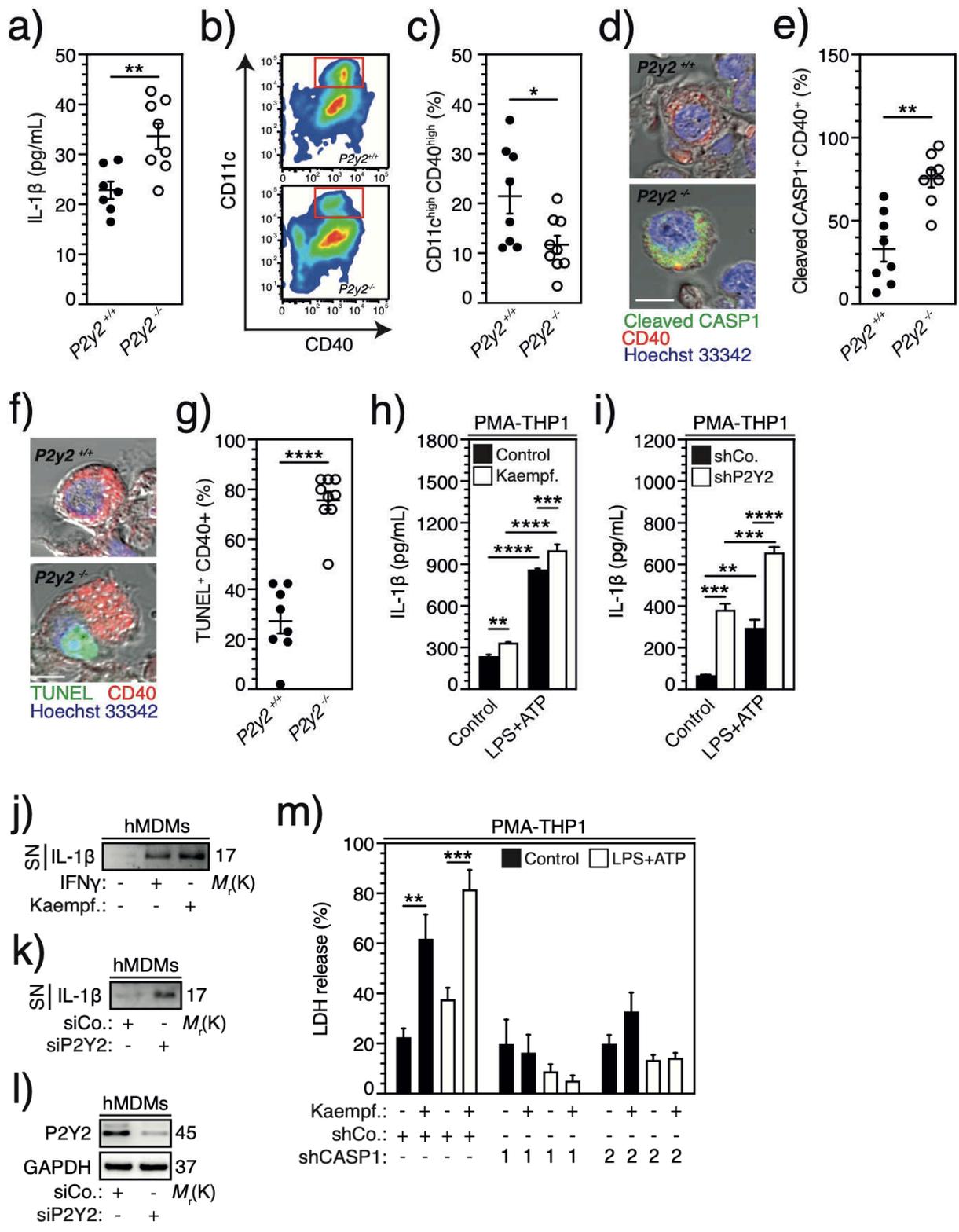
Total cell RNA from SARS-CoV-2-infected cells was obtained using either QIAshredder kit (#79654, Qiagen) and the RNeasy kit plus Mini kit (#74134, Qiagen) or using NucleoSpin RNA Plus XS, Micro kit for RNA purification with DNA removal column (#740990.250, Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. RNA was submitted to reverse transcription before PCR amplification. Quantifications were performed by real-time PCR on a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the second- derivative-maximum method provided by the Light Cycler quantification software (version 3.5 (Roche Diagnostics)) or using CFX Maestro (BioRad). Sequences of the oligonucleotides and probes used to quantify the RdRp, E gene and β -actin are given in Table S2. The amplification of RdRp and E genes was obtained after 5 minutes of reverse transcription, 5 minutes of denaturation and 45 to 50 cycles with the following steps (95°C during 5 seconds, 60°C during 15 seconds and 72°C during 15 seconds or 95°C for 15 seconds and 58°C for 30 seconds to 1 minute), as previously described [16]. The amplification of NLRP3 (Catalog #4331182 Assay ID Hs00918082_m1, ThermoFisher Scientific), PYCARD (ASC) (Catalog #4331182 Assay ID Hs01547324_gH, ThermoFisher Scientific), CASP-1 (pro-CASP1) (Catalog #4331182 Assay ID Hs00354836_m1, ThermoFisher Scientific), IL1B (pro-IL-1 β) (Catalog #4331182 Assay ID Hs01555410_m1, ThermoFisher Scientific) and ACTB (β -actin) (Catalog #4331182 Assay ID Hs01060665_g1, ThermoFisher Scientific) was obtained after 5 minutes at 65°C for annealing primer to the template RNA, 2 minutes at 50°C of reverse transcription, 10 minutes at 95°C of denaturation and 44 cycles with the following steps (95°C for 15 seconds and 60°C for 1 min). Data are presented as fold changes and were calculated with relative quantification of Δ CT obtained from quantitative RT-PCR.

Detection of cytokines release

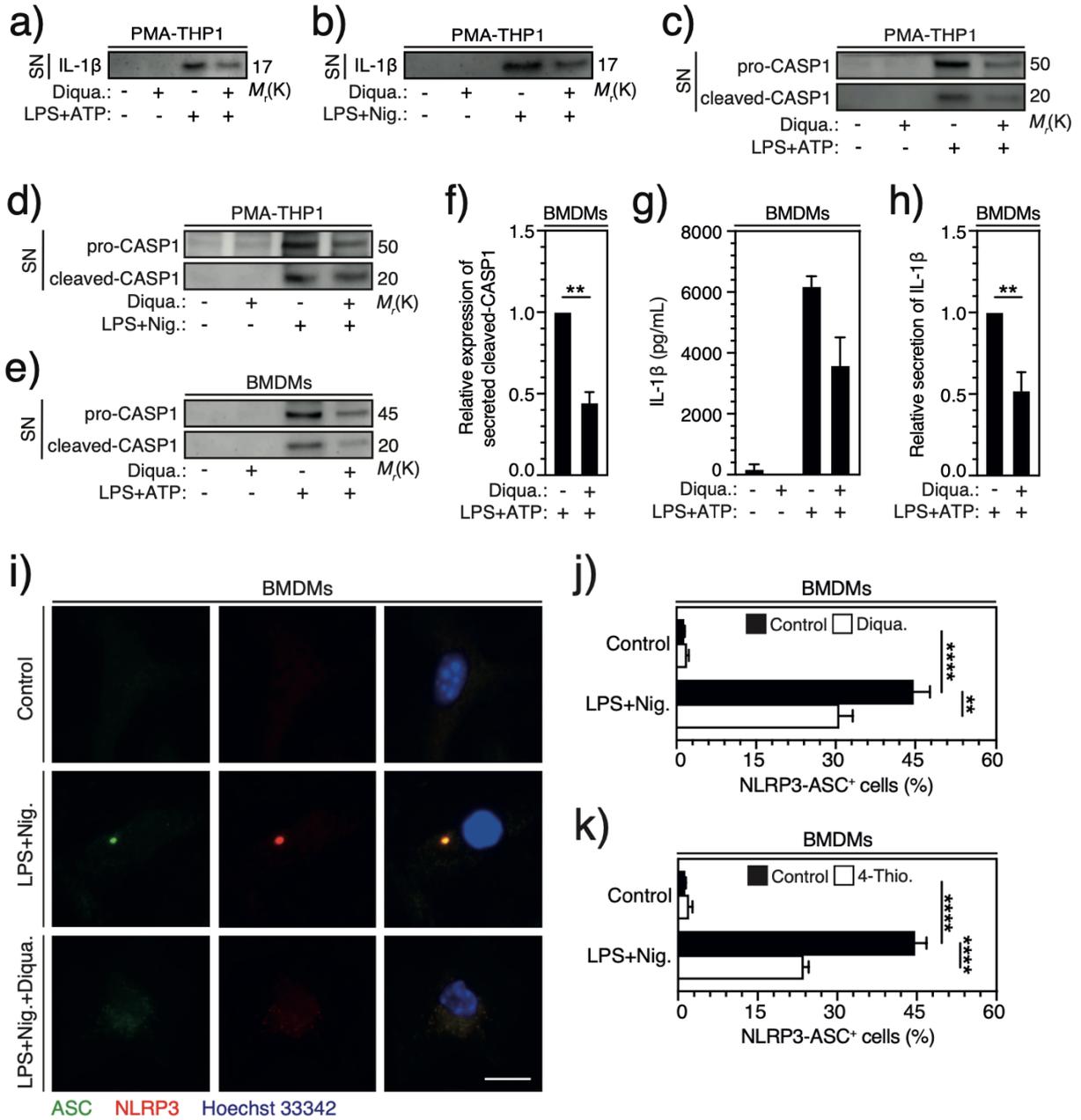
Plasma serum from P2y2^{+/+} and P2y2^{-/-} mice and supernatants harvested from PMA-stimulated THP1 macrophages, hMDMs or BMDMs that were stimulated as indicated with LPS and Nigericin, or IFN γ , or LPS and ATP, and/or depleted for P2Y2, in presence or in absence of 100 μ M Kaempferol, 100 μ M Diquafosol or 100 μ M 4-Thio-UTP at indicated times were analyzed using western blots or ELISA assays for IL-1 β and IL-18 according to the manufacturers' instructions. IL-1 β secretion from PMA-THP1 and hMDMs was detected using Human IL-1 β ELISA Kit (#BMS224-2, Invitrogen), Mouse IL-1 beta ELISA Kit (#BMS6002, Invitrogen) was used for the detection of IL-1 β secretion from mice plasma serum and BMDMs and Mouse IL-18 ELISA (#BMS618-3, Invitrogen) was used for the detection of IL-18 secretion from BMDMs.

Cell viability assays

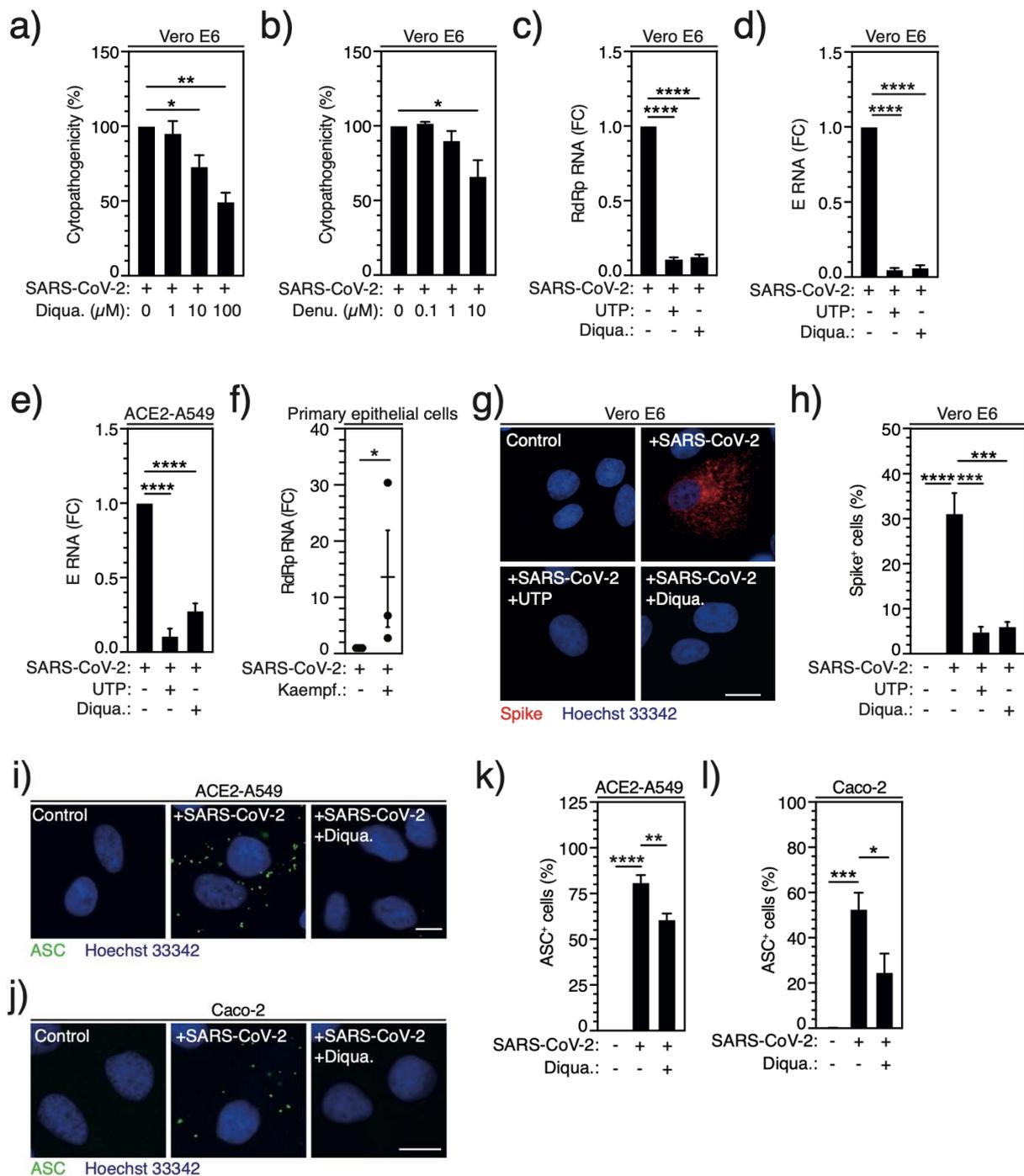
Vero E6 cells were treated with indicated concentrations of Diquafosol or Denufosol during 4 hours before infection and infected or not with SARS-CoV-2 (BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain) with a multiplicity of infection between 1 and 2. Cell viability was determined after 72 hours using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (#M5655, Sigma) following manufacturer's instructions. Cell viability was also measured in Vero E6 cells treated with the same compounds for 48 hours and in absence of infection using MTT assay. Human PMA-THP1 macrophages depleted or not for CASP1 were stimulated for 3 hours with ultrapure LPS from *E. coli* (10 ng/mL, Sigma) and for 6 hours with ATP (5 mM, Sigma) in presence or in absence of 100 μ M Kaempferol and analyzed for LDH release using Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (#04744934001, Roche, Sigma-Aldrich).



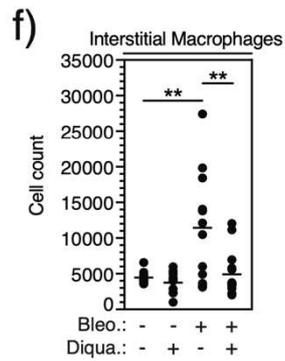
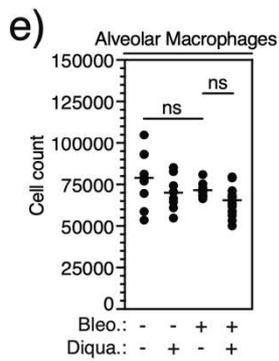
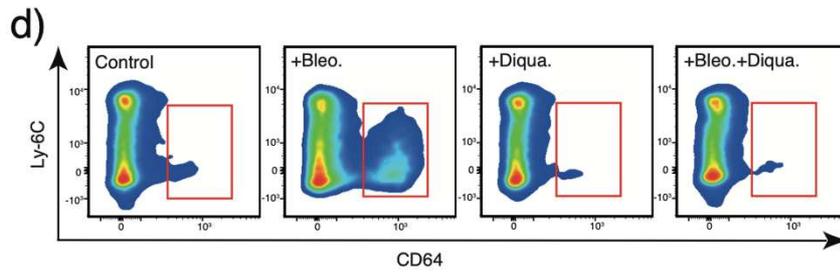
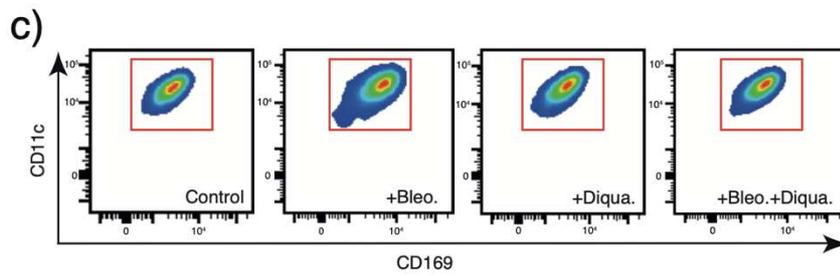
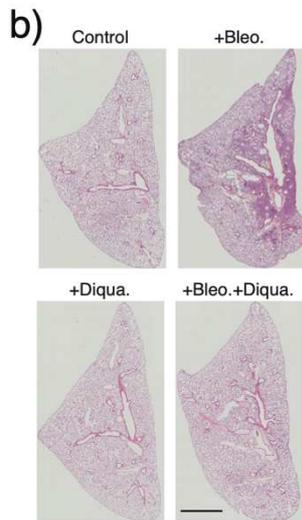
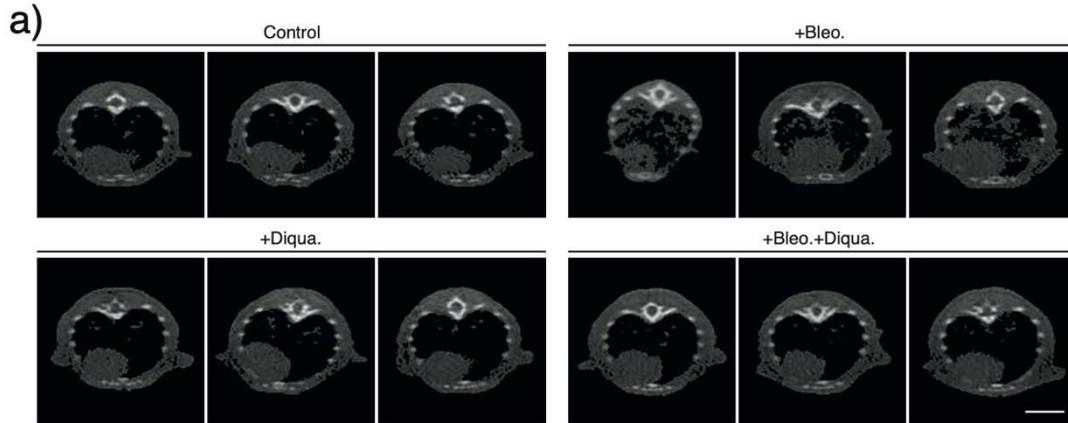
GUTIERREZ-MATEYRON#1



GUTIERREZ-MATEYRON#2

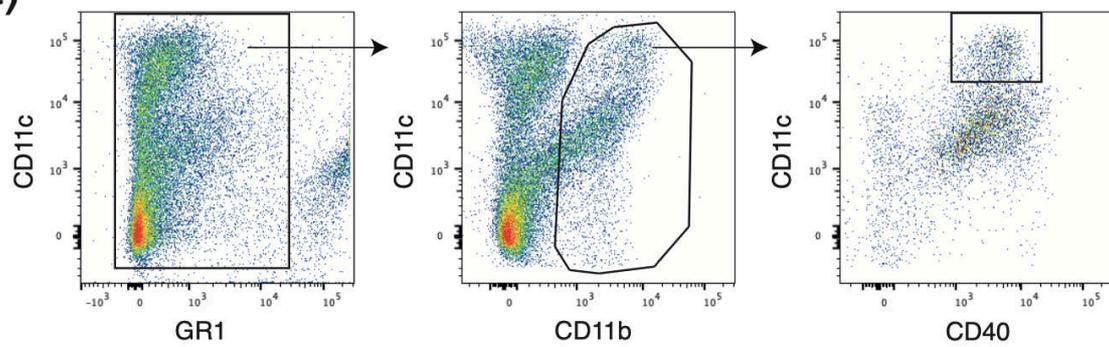


GUTIERREZ-MATEYRON#3

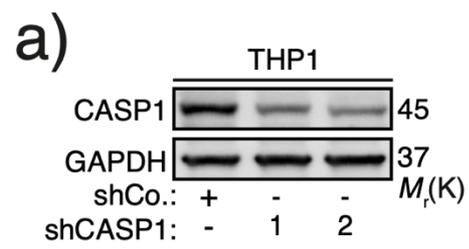


GUTIERREZ-MATEYRON#4

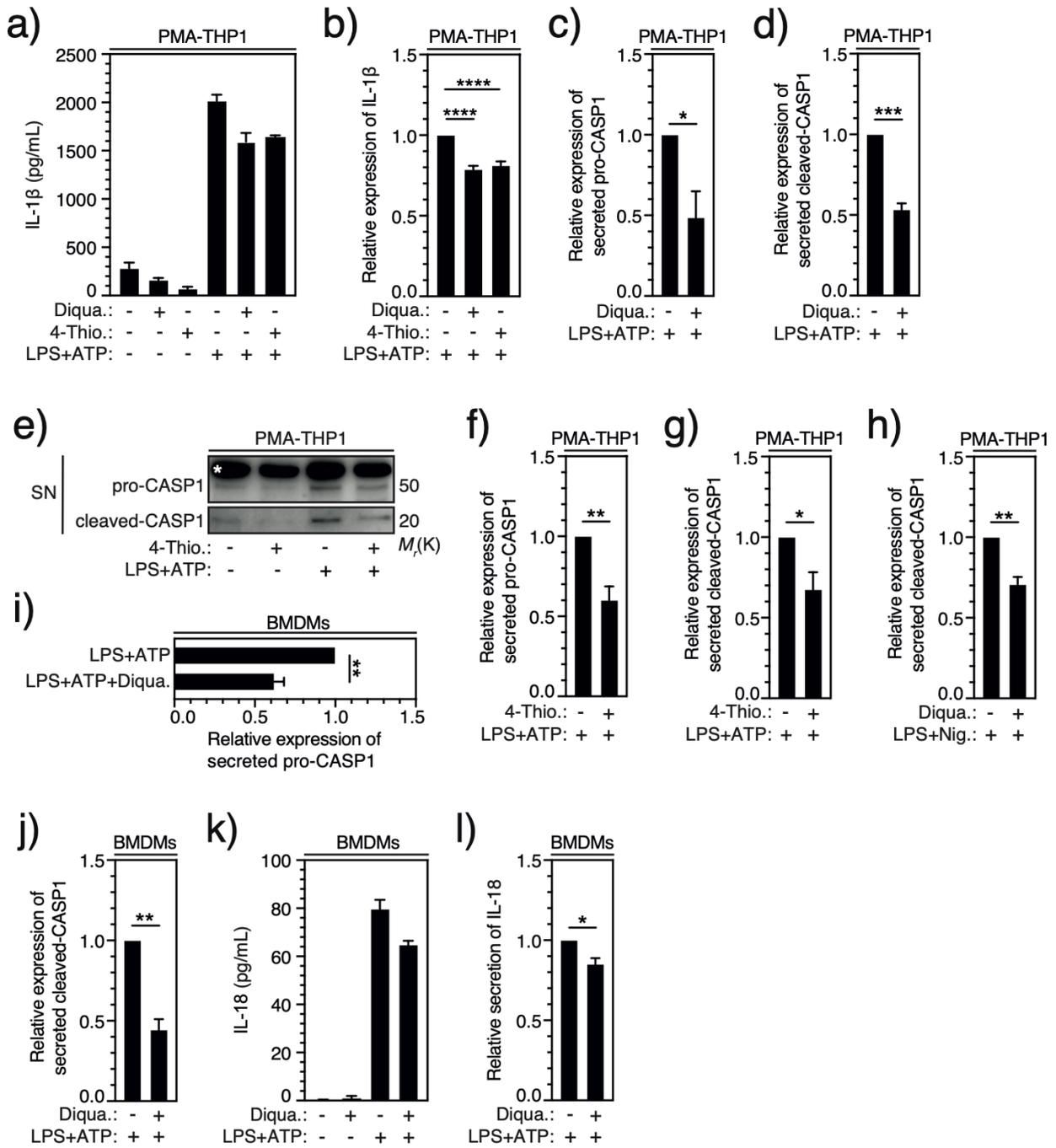
a)



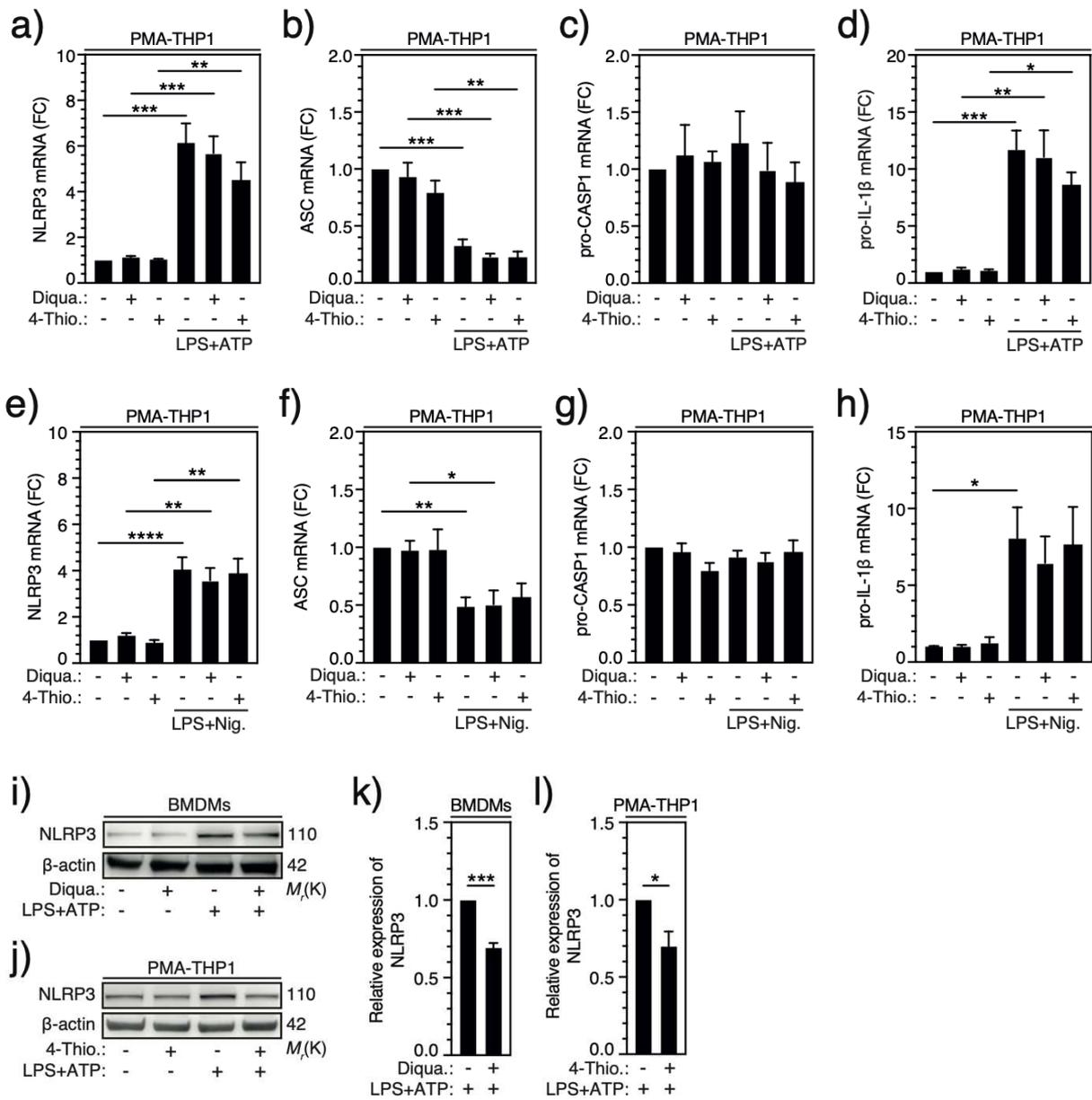
GUTIERREZ-MATEYRON#S1



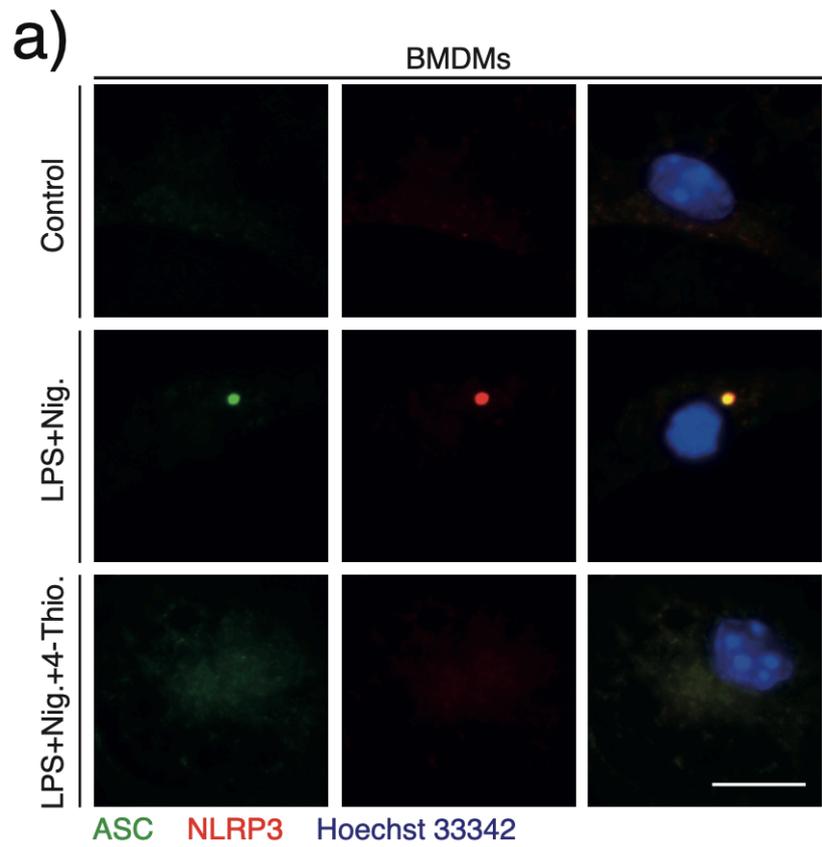
GUTIERREZ-MATEYRON#S2



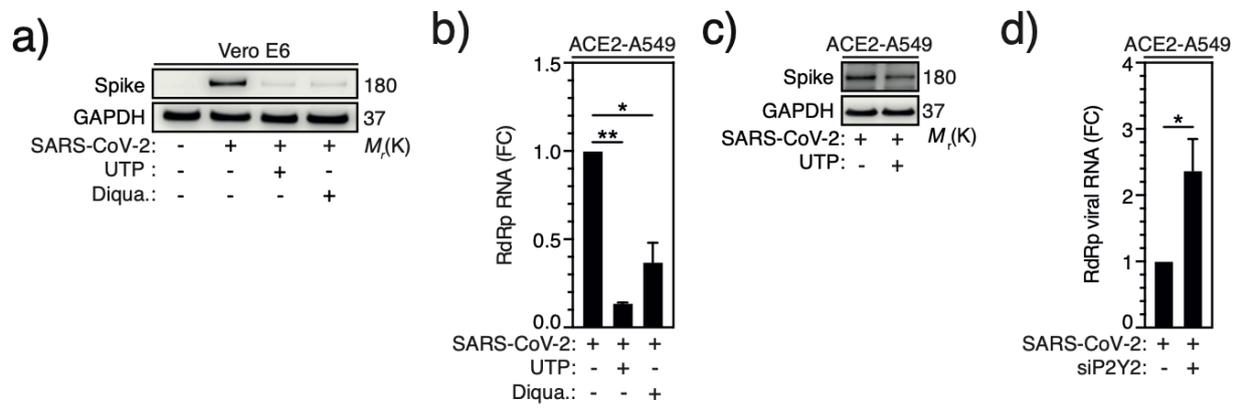
GUTIERREZ-MATEYRON#S3



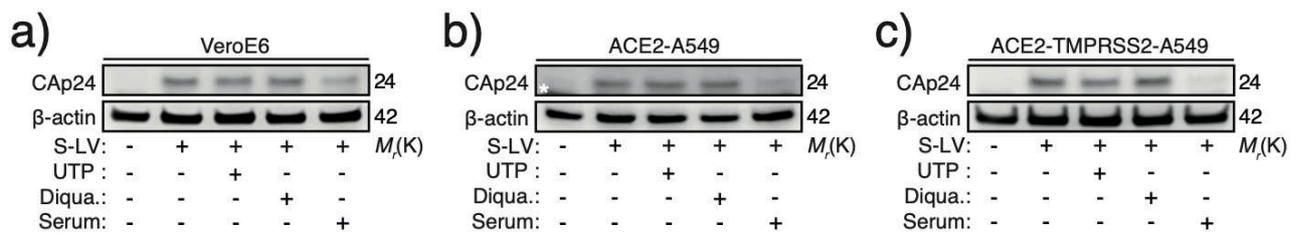
GUTIERREZ-MATEYRON#S4



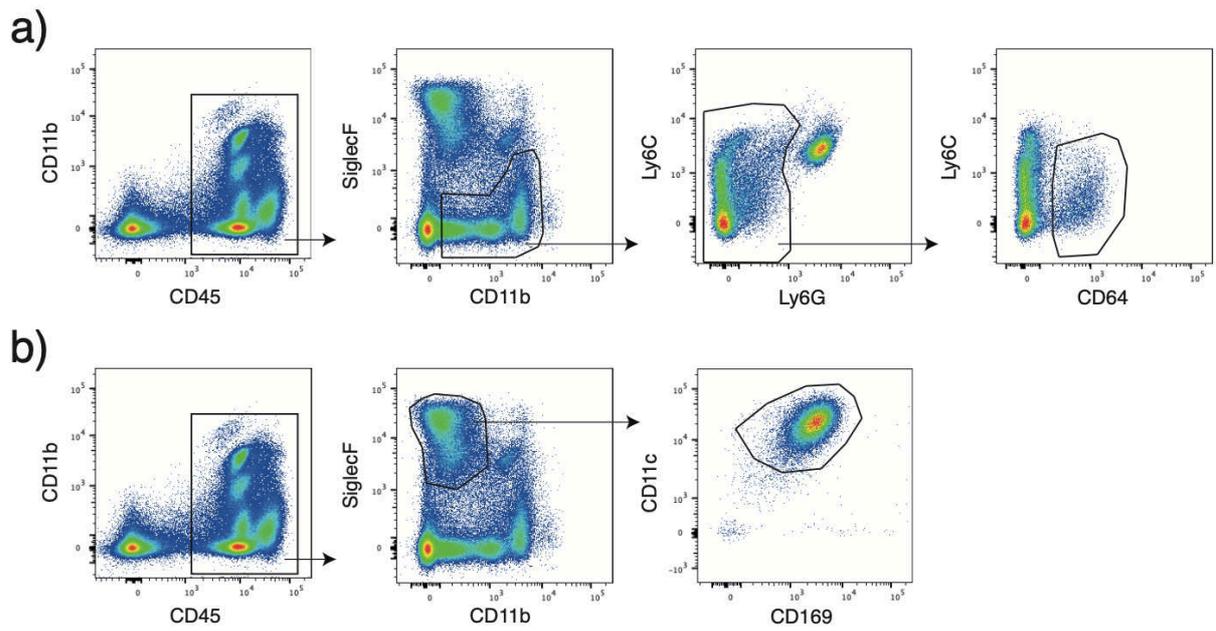
GUTIERREZ-MATEYRON#S5



GUTIERREZ-MATEYRON#S6



GUTIERREZ-MATEYRON#S7



GUTIERREZ-MATEYRON#S8

Discussion et perspectives

Depuis plus de 2 décennies maintenant, les inflammasomes ont été caractérisés et étudiés pour leurs fonctions immunitaires. Ils font partie d'un arsenal d'armes cellulaires capables à la fois de détecter un signal de danger et de déclencher une réponse de défense aboutissant à l'élimination du danger. Ce processus physiologique permet par ailleurs d'avertir les cellules voisines et de mobiliser les cellules du système immunitaire inné pour monter une réponse efficace, contrôlée et limitée dans le temps. Ainsi, il a été montré que l'activation des inflammasomes mène, par exemple, à l'élimination de pathogènes en provoquant la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et la mort de la cellule infectée par pyroptose [1]. L'inflammasome NLRP3 est le plus étudié d'entre eux, certainement du fait de la multitude de dangers qu'il est capable de reconnaître, qu'ils soient endogènes, exogènes stériles ou pathogènes (**Table 1**). Les découvertes scientifiques à ce sujet ne cessent de croître, permettant de comprendre de mieux en mieux la séquence d'activation de ce complexe multiprotéique et les réponses cellulaires qui en découlent. En particulier, un intérêt majeur a été suscité par les mécanismes moléculaires qui régulent finement l'activation de l'inflammasome NLRP3 comme les modifications post-traductionnelles des acteurs protéiques de l'inflammasome. Or, l'activation pathologique de l'inflammasome NLRP3 a été associée à plusieurs maladies humaines telles que la COVID-19 [124] et les lésions pulmonaires [536]. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'activation de l'inflammasome, notamment en contexte pathologique, est une étape clé pour l'identification de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les maladies liées à une dérégulation de l'activité de l'inflammasome NLRP3.

L'équipe a précédemment montré qu'un autre acteur majeur de l'immunité innée, le récepteur purinergique P2Y2, interagit de manière constitutive avec la protéine NLRP3 au cours de l'infection par le SIV et le VIH. Leur interaction est accrue sur les monocytes, les macrophages et les lymphocytes infectés par le VIH-1 au cours des premières étapes aiguës et chroniques de l'infection virale. Nous avons montré que P2Y2 et NLRP3 régulent la sensibilité des cellules hôtes au VIH-1 par la modulation de l'entrée virale. P2Y2 facilite l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles et, inversement, NLRP3 la réprime par l'inhibition du remodelage du cytosquelette de l'hôte. Il est intéressant de noter que l'équipe a démontré que la voie de signalisation P2Y2-dépendante, qui est déclenchée par la liaison de l'enveloppe du VIH-1 aux co-récepteurs CD4 des cellules cibles, induit l'ubiquitinylation et la dégradation de NLRP3, permettant ainsi l'entrée du virus. Cette étude a également révélé que l'activation de P2Y2 antagonise les activités biologiques de NLRP3 [517]. Plus récemment, l'équipe a mis en cause l'inflammasome NLRP3 dans la pathogenèse du SARS-CoV-2 et a montré qu'il facilite la réplication du virus dans les cellules infectées (**Annexe 3**) [339].

Dans la présente étude, nous avons précisé le rôle de l'interaction entre P2Y2R et NLRP3 pendant l'activation de l'inflammasome, et plus particulièrement l'impact du récepteur purinergique sur l'activité de l'inflammasome NLRP3 en contexte inflammatoire. Nous rapportons que P2Y2R agit comme un répresseur endogène de l'activation de l'inflammasome NLRP3. De plus, nous avons proposé l'activation du récepteur P2Y2 par un agoniste spécifique, le Diquafosol, comme une stratégie thérapeutique pour réduire la réplication du SARS-CoV-2 dans les cellules épithéliales et l'inflammation médiées par l'inflammasome NLRP3 au cours d'une fibrose pulmonaire.

Dans cette section, nous discuterons de l'impact du récepteur P2Y2 sur l'activation des inflammasomes, et de quelle façon il influence celle de l'inflammasome NLRP3. De plus, les conséquences de la modulation de l'inflammasome NLRP3 par P2Y2 sur la réplication du SARS-CoV-2 seront abordées. Enfin, nous discuterons du potentiel clinique offert par les agonistes du récepteur P2Y2 sur les syndromes liés à une inflammation excessive médiée par NLRP3 comme la fibrose pulmonaire déclenchée au cours de la COVID-19.

1 L'impact du récepteur P2Y2 sur l'activité des inflammasomes

Afin d'étudier l'impact du récepteur P2Y2 sur l'activité des inflammasomes, un modèle murin déplété pour le gène *P2y2* a été généré, ainsi que des modèles cellulaires pour lesquels le récepteur était inhibé soit de façon pharmacologique soit de façon génétique. L'activation des inflammasomes, notamment l'inflammasome NLRP3, est observée dans un nombre grandissant de types cellulaires, parmi lesquels les macrophages sont particulièrement compétents étant donné leur importance majeure dans la défense de l'hôte face à un danger [537]. De nombreuses études ont montré que l'activation des inflammasomes canoniques aboutit, d'une part, à la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 médiée par l'activation de la pro-caspase-1 en caspase-1. D'autre part, un marqueur fort des réponses cellulaires déclenchées à la suite de l'engagement de ces complexes est l'induction de la mort cellulaire par pyroptose. Celle-ci mène à la sécrétion de multiples composants inflammatoires comme les IL-1 β et IL-18, ainsi que des molécules intra-cellulaires comme la LDH, un marqueur de la pyroptose. Nous avons donc mesuré plusieurs de ces paramètres pour évaluer les signes de l'activation de l'inflammasome, à savoir la sécrétion d'IL-1 β , l'activation de la caspase-1 et la libération de LDH. Dans les souris KO pour *P2y2*, nous avons observé une augmentation significative des taux plasmatiques d'IL-1 β et la mort par pyroptose des macrophages alvéolaires chez les souris *P2y2*^{-/-}, par rapport aux souris *P2y2*^{+/+}. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* après l'inhibition pharmacologique par le Kaempférol ou la déplétion génétique de P2Y2 dans les macrophages humains (macrophages dérivés de monocytes THP1 traités avec la PMA (PMA-THP1) et macrophages dérivés de monocytes humains (hMDM)), indiquant ainsi que le récepteur purinergique P2Y2 agit comme un répresseur endogène de l'activation de l'inflammasome.

Il est important de noter que la sécrétion d'IL-1 β nécessite deux étapes successives, les mêmes que celles nécessaires à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, la première étape d'amorçage en réponse à des signaux stimulants (tels que le LPS) déclenche l'expression des protéines pro-IL-1 β et NLRP3. Ensuite, une étape d'assemblage du complexe protéique en réponse à des signaux d'activation (tels que l'ATP ou la nigéricine) mène à l'activation de la caspase-1 et à la libération d'IL-1 β qui y est associée [197]. Pourtant, à l'état basal, sans aucune stimulation, nous observons que l'inhibition du récepteur P2Y2 induit à elle seule une augmentation de l'activité des inflammasomes, révélé par l'ensemble des marqueurs évoqués précédemment (sécrétion d'IL-1 β , activation de la caspase-1 et sécrétion de LDH). Nous rapportons alors que l'inactivation de P2Y2 est suffisante pour déclencher les 2 étapes nécessaires à la sécrétion de l'IL-1 β , ainsi que pour l'activation des inflammasomes, interrogeant ainsi les voies de signalisation déclenchées par l'inactivation de P2Y2. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déchiffrer précisément les voies de

signalisation dépendantes de P2Y2 impliquées dans la régulation de l'activation de l'inflammasome, qui semble influencer aussi bien l'étape d'amorçage que celle d'activation. En outre, étant donné que la signalisation P2Y2 affecte la sécrétion d'IL-1 β , la pyroptose et l'activation de la caspase-1, l'influence du récepteur P2Y2 pourrait affecter l'activation de plusieurs inflammasomes, dont NLRP3.

Par ailleurs, nous montrons qu'en conditions de stimulation de l'inflammasome NLRP3 (LPS+ATP), l'inactivation du récepteur P2Y2 potentialise également l'activation de l'inflammasome, illustré par l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β et de LDH caspase-1 dépendante. Nous avons confirmé ces résultats en montrant également que les agonistes de P2Y2R tels que le 4-Thio-UTP ou le Diquafosol inhibaient de manière significative l'activation protéolytique de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β par des macrophages stimulés par LPS+ATP ou LPS+Nigéricine, révélant ainsi que la stimulation de P2Y2R peut inhiber l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cependant, une étude suggère que l'activation de P2Y2R dans les macrophages péritonéaux murins induit l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β pendant l'infection par *L. amazonensis* [538]. Cela pourrait être dû à la présence différentielle du récepteur P2Y2 dans les différents types de macrophages ou il pourrait ne pas être couplé de la même manière aux voies de signalisation activées en aval, ou bien encore les conditions d'activation du récepteur pourraient entraîner des réponses spécifiques contradictoires d'un contexte physiologique à un autre. En effet, De la Rosa et al. montrent que suite à la stimulation de P2Y2R par de faibles concentrations de nucléotides, la production d'IL-1 β est augmentée seulement dans les macrophages péritonéaux murins mais pas dans les THP1 ni les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDMs) [485]. De plus, cet effet n'est présent que dans des conditions cellulaires précises, uniquement à des concentrations cellulaires de faible densité. Cela n'est pas sans rappeler que le rôle du récepteur P2Y2 n'est pas clair dans les processus inflammatoires, avec des réponses paradoxales. Il a été impliqué dans le processus d'attachement des monocytes aux cellules endothéliales, contribuant à l'inflammation vasculaire [466]. Cependant, il a également été démontré que P2Y2R protège contre l'inflammation. Il participe notamment aux processus d'élimination cellulaire, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie aussi bien en périphérie qu'au niveau du SNC [425,426]. Récemment, il a été décrit que la suractivation de ce récepteur conduit à diminuer l'inflammation dans la maladie inflammatoire de l'intestin (MICI) en induisant la production d'apyrase, une enzyme qui dégrade l'ATP [539]. Cela suggère que dans certains contextes physiologiques, la signalisation P2Y2 mène à une réponse anti-inflammatoire, comme indiqué dans nos résultats.

2 La modulation de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur P2Y2

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est un processus qui nécessite deux signaux successifs, d'abord le *priming* ou signal d'amorçage, puis le signal d'activation. La régulation de son activation est multiple et peut ainsi survenir aussi bien durant l'étape d'amorçage, qu'au cours de l'assemblage de l'inflammasome [70,197]. Étant donné que l'équipe a initialement décrit une interaction fonctionnelle entre P2Y2R et NLRP3 [517], nous avons ensuite étudié l'impact de P2Y2 au cours de ces deux étapes afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires à travers lesquels P2Y2R module l'activation de l'inflammasome NLRP3.

La stimulation du récepteur P2Y2 avec ses agonistes (Diquafosol et 4-Thio-UTP) nous permet de révéler dans un premier temps que P2Y2R ne module pas l'expression transcriptionnelle des acteurs protéiques de l'inflammasome NLRP3 (NLRP3, ASC, pro-IL-1 β et pro-caspase-1). Ainsi, le priming transcriptionnel ne semble pas être la cible du récepteur P2Y2. Néanmoins, il a été rapporté que le priming transcriptionnel est un processus cellulaire tardif qui se manifeste au plus tôt deux heures à la suite du signal d'amorçage jusqu'à 12h après [70]. Des recherches supplémentaires à des temps de mesures différents sont nécessaires afin de confirmer l'action des agonistes du P2Y2R sur l'expression transcriptionnelle des protéines de l'inflammasome. Par ailleurs, au regard des augmentations du taux plasmatique d'IL-1 β et de l'activation de la caspase-1 chez les souris déplétées pour P2Y2R en absence de toute stimulation, il est possible que celui-ci agisse au niveau post-transcriptionnel. Paoletti et al. ont notamment démontré que le récepteur P2Y2 est capable d'induire l'ubiquitination et la dégradation de la protéine NLRP3 [517]. Nous avons alors mesuré le niveau d'expression protéique de NLRP3 dans les macrophages humains et murins en conditions de stimulation de l'inflammasome NLRP3 (LPS+ATP). Nous avons ainsi confirmé que l'inhibition de l'activation de l'inflammasome induite par les agonistes du récepteur P2Y2 est associée avec une diminution des niveaux d'expression de la protéine NLRP3. Dans ce contexte, d'autres explorations peuvent être effectuées pour mieux comprendre comment P2Y2R réprime la protéine NLRP3 en conditions inflammatoires, en évaluant notamment les niveaux d'ubiquitination, de phosphorylation de NLRP3.

Afin de caractériser de quelle façon les agonistes de P2Y2R affectent l'inflammasome NLRP3, nous avons stimulé spécifiquement cet inflammasome (LPS+Nigéricine) dans des cellules compétentes pour l'inflammasome NLRP3, les BMDMs [540]. Les macrophages étaient marqués par immunofluorescence pour les protéines NLRP3 et ASC, nous permettant de visualiser la localisation de ces protéines et leur capacité à s'assembler par oligomérisation, révélée en cas de colocalisation. Dans ce rapport, nous avons montré que les agonistes de P2Y2R répriment de façon significative l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 par l'inhibition de l'oligomérisation de ASC et de NLRP3. Il est important de rappeler que la nucléation des protéines ASC dépend à la fois de la capacité de la protéine NLRP3 à s'oligomériser pour recruter ASC, ainsi que des régulations, notamment post-traductionnelles, de la protéine ASC elle-même [51,236]. Ainsi, il n'est pas certain ici que la stimulation du récepteur P2Y2 cible directement l'oligomérisation de ASC, mais peut être uniquement celle de NLRP3, inhibant par conséquent la formation de pyroptosomes ASC. De la même façon, la répression de l'oligomérisation de NLRP3 peut être consécutive à sa moindre expression protéique médiée par la signalisation P2Y2.

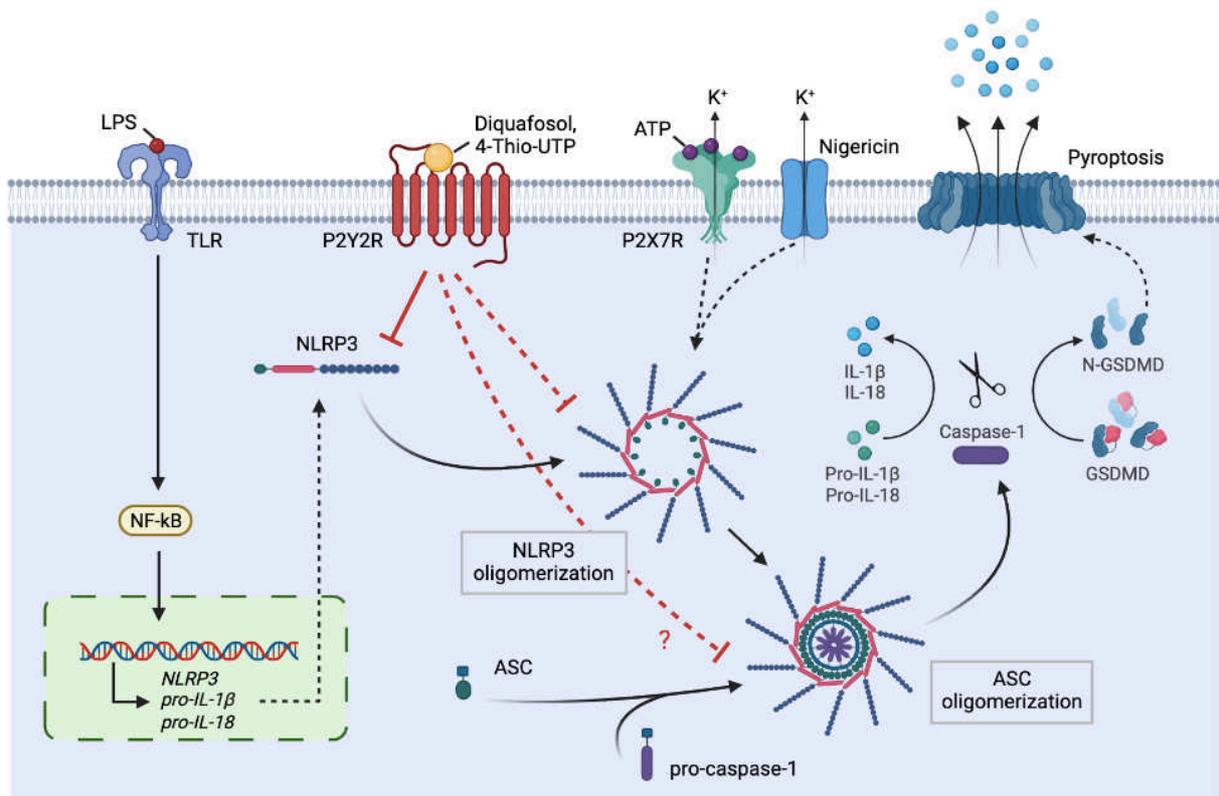


Figure 37. Illustration de la répression de l'inflammasome NLRP3 par les agonistes du récepteur P2Y2. En conditions de stimulation de l'inflammasome NLRP3 (LPS+ATP ou LPS+Nigéricine), les protéines NLRP3 et ASC s'oligomérisent pour former les pyroptosomes ASC, recrutent la pro-caspase-1 qui en retour s'active et mène à la libération de l'IL-1 β et l'IL-18 associée à la pyroptose. En présence des agonistes du récepteur P2Y2 (Diquafosol, 4-Thio-UTP), l'expression protéique de NLRP3 est inhibée et associée à la répression de l'assemblage de l'inflammasome, à la moindre activation de la caspase-1 ainsi qu'à la diminution des niveaux de cytokines sécrétés. (Les traits rouges représentent les différents niveaux de régulation de l'inflammasome NLRP3 observée dans ces travaux). Créée sur BioRender.com

Une autre hypothèse concerne la protéine kinase PYK2. Cette dernière, qui régule l'adhésion, la migration [440] et l'activation des macrophages [438] et peut être activée par P2Y2 [442], a récemment été impliquée dans l'induction de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine [541]. De plus, en réponse à la stimulation LPS+Nigéricine, PYK2 interagit avec ASC et NLRP3, et contrôle la phosphorylation de la protéine adaptatrice et son oligomérisation, favorisant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 [238]. La kinase PYK2 s'accumule également dans l'anneau des podosomes des macrophages entourant les noyaux de F-actine ou alors elle colocalise avec la F-actine irrégulière lorsque l'interaction avec ASC est réduite [541]. La colocalisation de PYK2 avec la F-actine est en corrélation négative avec l'activation de l'inflammasome NLRP3, ce qui suggère que NLRP3, ASC et la F-actine sont en compétition pour PYK2. En conséquence, la dégradation de NLRP3 dépendante de P2Y2 s'est avérée permissive pour la réorganisation du cytosquelette dépendante de PYK2, qui est nécessaire pour l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles [517]. D'autres recherches visant à évaluer les effets des agonistes P2Y2 sur la localisation de PYK2 sont nécessaires. Ainsi, l'activation de P2Y2R pourrait réprimer doublement l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. D'une part, la dégradation de NLRP3 est favorisée, ce qui empêche son oligomérisation et celle de ASC.

D'autre part, en mobilisant PYK2 au niveau de la F-actine, le récepteur P2Y2 empêche la phosphorylation de ASC par cette kinase nécessaire à la formation de l'inflammasome (**Figure 38**). Étant donné que P2Y2 [428] et PYK2 [542] peuvent être activés par des contraintes de traction telles que la contrainte de cisaillement des fluides, une meilleure compréhension des voies de signalisation impliquant P2Y2, NLRP3, ASC et PYK2 devrait aider à spécifier le lien moléculaire entre la transduction mécanique et l'activation des macrophages et pourrait avoir des implications significatives pour plusieurs maladies inflammatoires humaines.

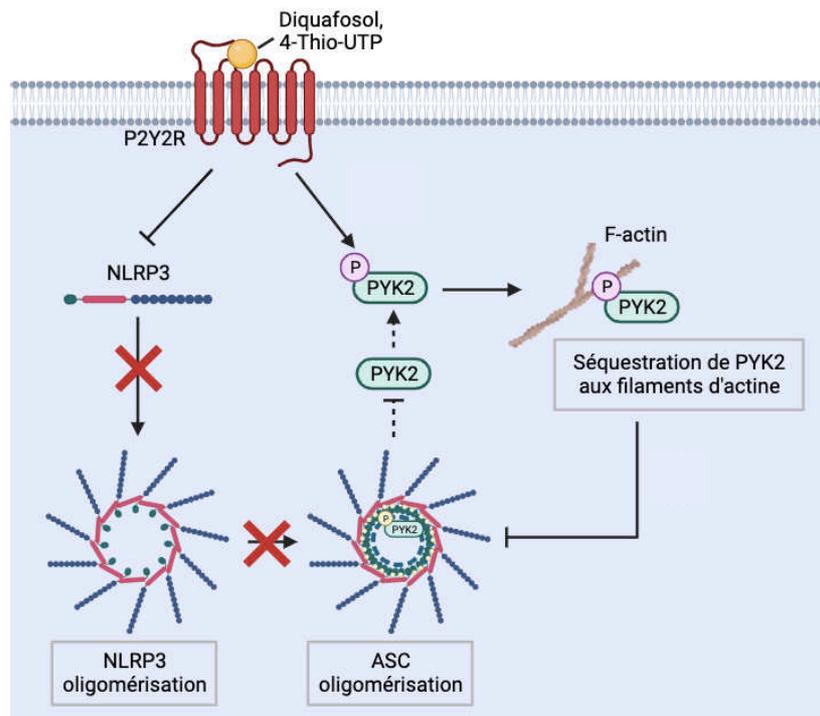


Figure 38. Régulation négative suggérée de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur P2Y2. L'activation du récepteur P2Y2 induit, d'une part, l'inhibition de la protéine NLRP3, diminuant l'oligomérisation des protéines NLRP3 et ASC. D'autre part, en activant la kinase PYK2, le récepteur P2Y2 séquestre cette protéine aux filaments d'actine, l'empêchant de favoriser la formation de l'inflammasome NLRP3 par la phosphorylation de la protéine ASC.

Dans l'ensemble, nos résultats identifient un rôle inattendu de P2Y2 dans la régulation de l'expression de la protéine NLRP3 (au niveau post-transcriptionnel) ainsi que dans l'oligomérisation de ASC et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus restent à élucider et devraient ouvrir la voie à l'identification de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement des maladies inflammatoires liées à NLRP3.

3 L'impact de la modulation de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur P2Y2 sur l'infection par le SARS-CoV-2

Afin d'évaluer le potentiel de l'activation de P2Y2 pour le traitement des maladies humaines déclenchées par une activation excessive de l'inflammasome NLRP3, nous avons tout d'abord analysé la capacité des agonistes de P2Y2R (Denufosol, Diquafosol et UTP) à réprimer l'activité de l'inflammasome NLRP3 dans des situations physiopathologiques.

Compte tenu de la contribution de P2Y2 et NLRP3 à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles [517], nous avons étudié les effets biologiques de P2Y2R et NLRP3 sur les premières étapes de l'infection par le SARS-COV-2. Les cellules épithéliales des voies aériennes supérieures et inférieures étant les premières ciblées de ce virus lors de l'infection [543], nous avons réalisé ce travail sur des cellules épithéliales. De nombreuses équipes de recherche ont clairement établi l'activation directe de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules épithéliales par le SARS-CoV-2, comme les protéines NSP6 et ORF3a du virus [338,344]. Notre équipe a d'abord démontré que NLRP3 agit en aval de l'entrée du virus dans la cellule et favorise la réplication virale dans les lignées cellulaires épithéliales qui surexpriment ou expriment constitutivement ACE2 (telles que les cellules ACE2-A549, les cellules Vero E6, les cellules Caco-2 ou les cellules épithéliales primaires) (**Annexe 3**) [339]. En effet, lors de cette précédente étude, notre équipe avait déjà démontré que l'inhibition pharmacologique de l'inflammasome NLRP3 par le Tranilast affecte la réplication virale du SARS-CoV-2 en diminuant notamment l'expression de la protéine virale Spike et de l'ARNm de la protéine d'enveloppe (E). Les résultats ont été confirmés par la diminution de l'expression de l'ARN viral de la RdRp à la suite de l'inhibition génétique de NLRP3 dans les cellules épithéliales. De plus, l'étude démontre que l'activation de l'inflammasome NLRP3 favorise la réplication du SARS-CoV-2 dans les cellules cibles sans moduler l'entrée virale. Il a également été démontré que le récepteur purinergique P2X7, qui peut agir en amont de l'inflammasome NLRP3, contrôle la réplication du SARS-CoV-2.

Compte tenu du rôle précédemment décrit de P2Y2R dans la modulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3, nous avons déterminé ici l'impact de la modulation de P2Y2 sur la réplication du SARS-CoV-2 qui dépend de l'inflammasome NLRP3. De manière surprenante, les agonistes du récepteur P2Y2 répriment la réplication du SARS-COV-2 et, inversement, un inhibiteur pharmacologique de P2Y2R (Kaempférol) stimule la réplication virale, révélant ainsi que P2Y2 agit comme un facteur de restriction de l'hôte pour le SARS-CoV-2. En effet, d'après nos résultats, la stimulation du récepteur P2Y2 inhibe fortement la production d'ARN des protéines E et RdRp ainsi que l'expression protéique de Spike, mimant les résultats précédemment obtenus par l'équipe lorsque NLRP3 était désactivée par le Tranilast [339]. Nous confirmons également, que les effets répressifs de la signalisation P2Y2 sur la réplication du SARS-CoV-2 dépendante de l'inflammasome NLRP3 se manifeste en aval de l'entrée virale.

Nous avons ensuite montré l'influence négative de P2Y2R sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 au cours de l'infection par le SARS-CoV-2, au travers de l'inhibition de la formation des pyroptosomes ASC par le Diquafosol. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu marquer directement la protéine NLRP3 par immunofluorescence dans les cellules épithéliales infectées. La protéine ASC participant à la formation d'autres inflammasomes, nous aurions voulu nous assurer que la formation des pyroptosomes ASC dépend de l'inflammasome NLRP3. D'autres études ont notamment mis en évidence l'activation d'un autre inflammasome

dépendant de ASC, RIG-I, au cours de l'infection par le SARS-CoV-2 [544,545]. La même expérience pourrait être réalisée en ajoutant une condition supplémentaire dans laquelle les cellules seraient également traitées avec du Tranilast, ce qui nous permettrait de statuer quant à l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la formation des pyroptosomes ASC observés. Néanmoins, étant donné l'inhibition de la réplication virale et de l'inflammasome NLRP3 par les agonistes de P2Y2R, d'une part, et l'inhibition des pyroptosomes ASC par le Diquafosol, d'autre part, nous pouvons raisonnablement conclure que P2Y2 régule négativement les fonctions biologiques de NLRP3 dans les cellules épithéliales et agit comme un facteur de restriction de l'hôte contre le SARS-CoV-2.

Par ailleurs, Junqueira et al. révélaient récemment ne pas avoir observé de pyroptosomes ASC au niveau des cellules épithéliales et endothéliales de biopsies de poumons de patients atteints de la COVID-19, contrairement aux macrophages et monocytes [340]. Il est envisageable que l'activation de cet inflammasome dans les cellules épithéliales ne soit pas constante tout au long de l'infection, mais qu'elle intervienne plutôt en début d'infection comme nous l'observons, participant à la mise en place d'un contexte inflammatoire.

4 Le traitement de la fibrose pulmonaire par un agoniste du récepteur P2Y2

Une autre manifestation pathologique de l'activation excessive de l'inflammasome NLRP3 est la fibrose pulmonaire (FP) associée à une inflammation chronique [546]. Celle-ci constitue d'ailleurs l'une des séquelles observées chez les patients atteints de COVID-19 ayant développés des complications pulmonaires à la suite de l'infection par le SARS-CoV-2. Cette atteinte pulmonaire se caractérise par la production et le dépôt excessif de matrice extracellulaire (MEC) au niveau des poumons, ce qui induit un épaississement des parois alvéolaires, conduisant finalement à la destruction des structures alvéolaires et à l'insuffisance respiratoire. La FP peut survenir lors d'une résolution inefficace des lésions pulmonaires ou d'une exagération du processus de réparation. Dans les deux cas, la production excessive de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et IL-6 par les cellules épithéliales pulmonaires dans un premier temps puis par les macrophages, active les fibroblastes qui sécrètent et régulent la MEC [547,548]. Joshi et al. rapportent également qu'en réponse à leur activation, les fibroblastes sécrèteraient à leur tour des molécules inflammatoires qui recrutent des cellules immunitaires comme les macrophages [549]. Dans le cadre de la COVID-19, l'activation de l'inflammasome NLRP3 participe à établir un environnement inflammatoire par la sécrétion notamment d'IL-1 β , favorisant l'établissement d'une FP [550]. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'infection virale par le SARS-CoV-2 s'accompagne souvent d'une infection pulmonaire secondaire qui favoriserait un contexte inflammatoire et l'échec du processus de réparation, augmentant d'autant plus le risque de fibrose [551].

Dans ce contexte, nous avons étudié les activités biologiques des agonistes du récepteur P2Y2 au cours de l'inflammation pulmonaire et de la fibrose induites par la bléomycine chez la souris. L'instillation intratrachéale de bléomycine chez les rongeurs est largement utilisée comme modèle expérimental *in vivo* de fibrose pulmonaire [552], qui est dépendant de l'inflammasome NLRP3 [546]. 300 μ g de Diquafosol étaient injectés 3 jours avant d'instiller la bléomycine à 50 UI dans la trachée des souris, puis la même injection de Diquafosol était réalisée tous les 3 jours après l'administration de la bléomycine jusqu'au 21^{ème} jour. Nous avons

révélé que le Diquafosol réduisait les lésions pulmonaires et l'infiltration de cellules immunitaires chez les animaux traités avec la bléomycine. Le pourcentage de macrophages interstitiels (IMs), qui jouent un rôle clé dans les premiers stades des lésions pulmonaires induites par la bléomycine [553], était significativement réduit chez les souris traitées avec l'agoniste de P2Y2R. Nos résultats soulignent donc un mécanisme qui dépend de l'activation de P2Y2 et limite les lésions pulmonaires induites par la bléomycine.

L'influence du nombre de macrophages au cours de la fibrose pulmonaire sur le développement de la maladie a également été rapportée par Gibbons et al. qui montrent que la déplétion des macrophages pendant la phase pro-fibrotique dans un modèle murin de FP induite par la bléomycine supprimait la pathologie [554]. Le rôle pro-fibrotique des macrophages interstitiels (Siglec^{lo}CD11b^{high}) dans la fibrose a notamment été mis en évidence dans un modèle murin de FP dans lequel la pathologie était aussi réduite lorsque ces cellules étaient déplétées [555]. D'après nos résultats, la proportion de macrophages alvéolaires (AMs) ne semble pas être affectée par le traitement avec la bléomycine ni par le Diquafosol. Pourtant, Libório-Ramos et al. ont récemment révélé une diminution du nombre d'AMs suite à l'injection de bléomycine et suggéraient que ces macrophages ne jouaient qu'un rôle résiduel dans le processus de fibrogenèse. En accord avec ces résultats, une autre étude a montré que la déplétion des AMs résidents n'affectait pas la FP induite par bléomycine [556]. D'ailleurs, cette étude de Misharin et al. montrait également que le nombre de AMs augmentaient à partir du 21^{ème} jour après le traitement avec la bléomycine et que cette augmentation était totalement due aux macrophages alvéolaires dérivés des monocytes. Ces divergences de résultats par rapport à ce que nous avons observé peuvent être dues à des différences dans les modèles de FP, notamment le moment de l'intervention et les protocoles utilisés. Il serait ainsi intéressant que nous réalisions cette même expérience à des temps multiples, notamment plus précoces mais aussi plus tardifs pour établir une cinétique concernant la dynamique des populations de macrophages en fonction du traitement par le Diquafosol. Ceci nous permettrait également de mieux évaluer l'effet de la stimulation de P2Y2R sur la population des neutrophiles puisqu'ils semblent être transitoirement augmentés dès le 3^{ème} jour post-bléomycine [552], alors que nous n'avons observé aucune différence significative de leur proportion au 21^{ème} jour (résultats non montrés).

Nos résultats sont d'autant plus intéressants que la littérature fait état d'un rôle contradictoire du récepteur P2Y2 dans le développement de la fibrose pulmonaire. Des travaux ont rapporté son implication dans la pathogenèse des maladies pulmonaires à composantes inflammatoires. Notamment, le recrutement des neutrophiles dans les poumons par chimiotaxie induit par la signalisation P2Y2 participerait à l'installation d'un environnement inflammatoire [557]. De plus, Müller et al. ont observé que le récepteur P2Y2 soutient la migration et la prolifération des fibroblastes pulmonaires, mais aussi la sécrétion d'IL-6 alors qu'à l'inverse la déplétion du récepteur inhibe l'inflammation et la fibrose pulmonaire. Étant donné la dépendance des fonctions cellulaires induites par le récepteur aux conditions physiologiques, cela pourrait être dû à la différence des protocoles et des modèles de FP utilisés. Dans ce contexte, d'autres explorations pourraient être effectuées afin d'élucider les voies de signalisations déclenchées par le Diquafosol et l'activation du récepteur P2Y2 pour mieux comprendre de quelle façon ce traitement supprime l'inflammation pulmonaire. D'après nos résultats précédents, cet agoniste est capable de réprimer l'inflammasome NLRP3, diminuant par conséquent la sécrétion de cytokines et autres molécules inflammatoires qui ont été impliquées dans la survenue de la fibrose pulmonaire. Pour rappel, l'IL-1 β peut déclencher la surexpression de P2Y2R [433], qui

agirait alors comme un rétrocontrôle négatif. Ceci n'est pas sans rappeler que la suractivation du récepteur P2Y2 favorise une réponse anti-inflammatoire à travers la production d'apyrase dans le cadre du traitement des MICI [539]. Ainsi, la suractivation induite par les agonistes de P2Y2R favoriserait une réponse anti-inflammatoire et la résolution des lésions pulmonaires à travers l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 mais aussi peut être par d'autres mécanismes associés.

Par ailleurs, notre étude ne permet pas ici de conclure quant au rôle préventif ou curatif du Diquafosol puisque nous avons traité les souris à la fois en amont de l'injection de la bléomycine (3 jours avant) ainsi qu'en aval (tous les 3 jours après). D'autres explorations *vivo* sont donc nécessaires pour mieux appréhender l'effet protecteur du Diquafosol et du récepteur P2Y2 contre les lésions pulmonaires et l'inflammation induites par la bléomycine, qui dépendent de NLRP3 et imitent les lésions pulmonaires associées à l'infection par le SARS-COV-2.

Perspectives

Dans ce travail, nous avons clairement observé que la stimulation du récepteur P2Y2 réprime l'activation et l'activité biologique de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages. Les mécanismes moléculaires à travers lesquels la signalisation P2Y2 inhibe l'expression de la protéine NLRP3 et l'assemblage de l'inflammasome en contexte inflammatoire doivent être étudiés. Il s'agirait, d'abord, d'explorer de quelle façon P2Y2R entraîne la diminution de la quantité de protéines NLRP3 dans des conditions d'activation de l'inflammasome, pour voir si nous confirmons la capacité de ce récepteur à induire la dégradation de la protéine NLRP3 par ubiquitination comme observé par Paoletti et al. Cela peut se faire, entre autres, par une co-immunoprécipitation des différents acteurs protéiques impliqués. Il serait également intéressant d'évaluer si cette dégradation est la cause principale de la diminution de l'oligomérisation de la protéine NLRP3 induite par P2Y2R en inhibant la dégradation de celle-ci.

Nous avons également observé que l'oligomérisation de la protéine adaptatrice ASC est perturbée par les agonistes de P2Y2R. Récemment, Joshi et al. ont démontré que l'interaction entre la kinase PYK2 et ASC stabilisée par la L-plastine est essentielle à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'inflammation qui en découle induites par la bléomycine [541]. L'équipe a précédemment rapporté que P2Y2R était en compétition avec la protéine NLRP3 pour le recrutement de PYK2 puisque c'est suite à la dégradation de NLRP3 que le récepteur permettait l'activation et la relocalisation de la kinase à la F-actine [444,517]. Dans ce contexte, nous voudrions investiguer l'hypothèse selon laquelle les agonistes de P2Y2R favorisent le recrutement et éventuellement la relocalisation de PYK2 qui deviendrait alors inaccessible pour la protéine ASC, empêchant sa phosphorylation et l'oligomérisation qui en découle. Ainsi, la dégradation préalable de NLRP3 par P2Y2R empêcherait d'une part l'oligomérisation de NLRP3 et d'autre part, celle de ASC en la privant d'interaction avec PYK2.

Cibler l'inflammasome NLRP3 dans les maladies liées à un excès d'inflammation, comme la COVID-19 et les fibroses pulmonaires, est une stratégie thérapeutique largement adoptée pour réduire l'inflammation qui caractérise ses maladies. Les inhibiteurs de NLRP3 et de l'inflammasome du même nom peuvent bloquer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la mort cellulaire inflammatoire pyroptotique, responsables du recrutement de cellules immunitaires qui participent à la mise en place d'une inflammation. De nombreuses études pré-cliniques et cliniques ont été réalisées et sont en cours (www.clinicaltrials.gov) mais de

nombreux patients atteints par des pathologies liées à une dérégulation de l'inflammasome NLRP3 attendent encore un traitement efficace. Étant donné les résultats prometteurs que nous avons obtenus dans notre étude pré-clinique, nous voudrions aller plus loin et réaliser un essai pré-clinique préventif afin d'évaluer la capacité du Diquafosol, l'agoniste de P2Y2, à prévenir le développement de la fibrose pulmonaire. Ceci pourrait avoir un intérêt tout particulier pour les patients infectés par le SARS-CoV-2 par exemple, afin d'empêcher la survenue de complications pulmonaires tardives. En outre, d'autres études pré-cliniques curatives sont nécessaires pour mieux caractériser les effets anti-inflammatoires tissulaires, cellulaires et moléculaires avant d'envisager le transfert de ce travail en clinique.

Dans l'ensemble, notre étude fournit la première justification pour tester les agonistes du récepteur P2Y2 tels que le Diquafosol et le Denufosol qui ont été précédemment approuvés ou proposés pour le traitement de la sécheresse oculaire [525] et de la mucoviscidose [529] respectivement, comme modulateurs négatifs de NLRP3. Ceci pour bloquer la réplication virale et l'hyper-inflammation associée à la COVID-19 chez les patients infectés par le SARS-CoV-2 ou pour limiter les lésions pulmonaires chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique [558], du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) [536] ou développant une toxicité pulmonaire aiguë ou retardée après une radiothérapie [559]. Le repositionnement des agonistes du récepteur P2Y2 pour le traitement des maladies humaines associées à une activation excessive de l'inflammasome NLRP3, telles que les syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS) [300], la polyarthrite rhumatoïde [324], l'obésité [560], ou la maladie d'Alzheimer [320] devrait être étudié.

Annexe 1. Liste des inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3.

Inhibiteur	Cible	Mécanisme	Indications (statut clinique)	Réf
Inhibition directe de NLRP3				
MCC950 (CP-456,773 ou CRID3)	NLRP3	Inhibition de l'activité ATPase Maintien de la conformation inactive	PR, CAPS, MICI, la goutte, MA, PD (<i>in vivo</i>)	[355,358, 561]
CY-09	NLRP3	Inhibition de l'activité ATPase par compétition avec la liaison de l'ATP	CAPS, Diabète de type 2 (<i>in vivo</i>) Goutte (<i>ex vivo</i>)	[562,563]
HS-203873	NLRP3	Inhibition de l'activité ATPase par compétition avec la liaison de l'ATP	-	[564]
C77	NLRP3	Inhibition de l'activité ATPase par compétition avec la liaison de l'ATP	MA, PD, sclérose en plaques	[355]
MNS	NLRP3	Inhibition de l'activité ATPase en liant les domaines NACHT et LRR	-	[565]
BAY 11-7082	NLRP3/ IKK β	Inhibition de l'activité ATPase / Inhibition de la signalisation NF κ B	Psoriasis (<i>in vivo</i>)	[361,566]
Parthenolide	NLRP3	Inhibition de l'activité ATPase par alkylation du domaine NACHT	Diabète, colite (<i>in vivo</i>)	[361,567, 568]
BOT-4-one	NLRP3/ IKK β	Inhibition de l'activité ATPase par alkylation et favorise l'ubiquitination NLRP3 / Inhibe NF κ B	Péritonite, dermatite et arthrite (<i>in vivo</i>)	[233,569]
Dapansutril (OLT1177)	NLRP3	Inhibition de l'activité ATPase Inhibition de l'interaction NLRP3-ASC	COVID-19 (Phase II), Arthrose (Phase II), Goutte (Phase II/III)	[356,362]
Oridonine	NLRP3	Inhibition de l'interaction NLRP3-NEK7 en liant le domaine NACHT	Péritonite, arthrite goutteuse et diabète de type 2 (<i>in vivo</i>)	[564,570]
RRx-001	NLRP3	Inhibition de l'interaction NLRP3-NEK7 en liant le domaine NACHT	Maladies inflammatoires (<i>in vivo</i>) Cancers (essais cliniques)	[564]
JC-171	NLRP3	Inhibition de l'interaction NLRP3-ASC en liant NLRP3	Sclérose en plaques (<i>in vivo</i>)	[564,571]
Tranilast	NLRP3	Inhibition de l'oligomérisation NLRP3 en liant le domaine NACHT	Arthrite goutteuse, CAPS et diabète de type 2 (<i>in vivo</i>)	[572]
INF39	NLRP3	Inhibition de NLRP3 en liant le domaine NACHT	MICI (colite) (<i>in vivo</i>)	[573]
DFV890 (IFM-2427)	NLRP3	Inhibition de NLRP3 en maintenant une conformation inactive	COVID-19 (Phase II), FCAS (Phase II), Maladie de Crohn, goutte (Phase I)	[356,363]
Somalix	NLRP3	Inhibition de NLRP3	Arthrose, maladie de Parkinson (Phase II)	[356]
NT-0167	NLRP3	Inhibition de NLRP3	Fibrose pulmonaire (Phase I)	[356]
Inzomelid	NLRP3	Inhibition de NLRP3	MA, PD, CAPS (Phase II)	[574,575]
JC124	NLRP3	Inhibition de la formation des pyroptosomes ASC	MA, lésions cérébrales, sclérose en plaques (<i>in vivo</i>)	[355]
Glyburide	NLRP3	Inhibition de NLRP3	-	[576]
Inhibition indirecte de NLRP3				
SP600125	JNK1	Inhibition de la phosphorylation activatrice (S198) de NLRP3	CAPS (<i>in vivo</i>)	[222]
CC-90001	JNK	Inhibition de la phosphorylation activatrice (S198) de NLRP3	Fibrose pulmonaire idiopathique	[114]
CRT0066101	PKD	Inhibition de la phosphorylation activatrice (S295) de NLRP3	Lésion pulmonaire (<i>in vivo</i>)	[364,577]
kb NB 142-70	PKD	Inhibition de la phosphorylation activatrice (S295) de NLRP3	-	[577]
Dibutyryl cAMP	PKA	Inhibition de NLRP3 en favorisant sa phosphorylation (S295)	-	[114]
Ibrutinib	BTK	Inhibition de la phosphorylation nécessaire à l'interaction NLRP3-ASC	MWS (<i>ex vivo</i>) Lésions cérébrales, maladies métaboliques (<i>in vivo</i>)	[226,228, 578]
Evobrutinib	BTK	Inhibition de la phosphorylation nécessaire à l'interaction NLRP3-ASC	Sclérose en plaques (Phase II)	[365]
Fenebrutinib	BTK	Inhibition de la phosphorylation nécessaire à l'interaction NLRP3-ASC	PR (Phase II)	[366]
Acide okadaïque	PP2A	Inhibition de la déphosphorylation activatrice (S5) de NLRP3	-	[213]
LB-100	PP2A	Inhibition de la déphosphorylation activatrice (S5) de NLRP3	Cancers (Phase I/II)	[579]
PR-619	DUBs	Inhibition de la déubiquitination de NLRP3	-	[115]

Annexe 1 (suite 1) : Liste des inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3.

Inhibiteur	Cible	Mécanisme	Indications (statut clinique)	Réf
G5	BRCC3	Inhibition de la déubiquitination de NLRP3	-	[199]
bAP15	DUBs	Inhibition de la déubiquitination activatrice de NLRP3	-	[200]
WP1130	DUBs	Inhibition de la déubiquitination activatrice de NLRP3	Choc septique (<i>in vivo</i>)	[115,200,580]
P22077	USP7/USP47	Inhibition de la déubiquitination activatrice de NLRP3	Maladies cardiovasculaires (<i>in vivo</i>)	[210,367]
P5091	USP7	Inhibition de la déubiquitination activatrice de NLRP3	-	[210]
HBX19818	USP7	Inhibition de la déubiquitination activatrice de NLRP3	-	[210]
BC-1215 (KT-1002)	FBXO3	Dégradation de NLRP3 en inhibant la dégradation de FBXL2	MICI (Phase I)	[201]
NU9056	KAT5	Inhibition de l'acétylation activatrice de NLRP3	Encéphalopathie associée au sepsis (<i>in vivo</i>)	[581,582]
Inhibition des autres composants de l'inflammasome NLRP3				
IC100	ASC	Anticorps anti-ASC : inhibition de ASC et de l'assemblage de l'inflammasome	Sclérose en plaques, lésions pulmonaires aiguës (<i>in vivo</i>)	[368,583]
BAY61-3606	Syk	Inhibition de la phosphorylation activatrice de ASC	Néphropathie diabétique, MA (<i>in vivo</i>)	[584-586]
Fostamatinib (Tavalisse, R788)	Syk	Inhibition de la phosphorylation activatrice de ASC	PR (Phase II), COVID-19 (Phase III)	[369]
Cerdulatinib	Syk	Inhibition de la phosphorylation activatrice de ASC	Phase I PR et SLE (Phase II planifiée)	[356]
Evobrutinib	BTK	Inhibition de la phosphorylation nécessaire à l'interaction NLRP3-ASC	Sclérose en plaques (Phase II)	[365]
Fenebrutinib	BTK	Inhibition de la phosphorylation nécessaire à l'interaction NLRP3-ASC	PR (Phase II)	[366]
Ibrutinib	BTK	Inhibition de la phosphorylation nécessaire à l'interaction NLRP3-ASC	MWS (<i>ex vivo</i>) Lésions cérébrales, maladies métaboliques (<i>in vivo</i>)	[226,228,578]
C1-27	GSTO1	Bloque la déglutathionylation de NEK7 : inhibe l'activation de l'inflammasome	-	[243]
VX-765 (Belnacasan)	Caspase-1	Inhibition de la caspase-1 Réduction des dommages mitochondriaux	Athérosclérose, MA (<i>in vivo</i>) COVID-19 (Phase II)	[356,587,588]
VX-740 (Pralnacasan)	Caspase-1	Inhibition de la caspase-1	PR (Phase II)	[356,589]
Emricasan	Caspase-1	Inhibition de la caspase-1	Fibrose hépatique (Phase II/III), diabète (Phase I/II), COVID-19 (Phase I)	[346,590]
Inhibition de la cascade de signalisation en aval de l'inflammasome NLRP3				
Disulfirame	GSDMD	Liaison inhibitrice de la formation des pores de GSDMD	COVID-19 (Phase II) SLE (<i>in vivo</i>)	[370,591]
Diméthylfumarate	GSDMD	Succination inhibitrice de la formation des pores de GSDMD	Sclérose en plaques COVID-19 (Phase II/III) FMF, encéphalite auto-immune (<i>in vivo</i>)	[592]
Gevokizumab	IL-1 β	Anticorps anti-IL-1 β : neutralisation de l'IL-1 β	PR, Diabète type 1 et 2, maladies auto-immunes, cancers	[593,594]
Canakinumab	IL-1 β	Anticorps anti-IL-1 β : neutralisation de l'IL-1 β	CAPS, arthrite juvénile et goutteuse (AMM), COVID-19 (Phase III)	[190,302,356]
Anakinra	IL-1R	Antagoniste de l'IL-1R	PR, CAPS (AMM) COVID-19 (Phase III)	[190,302,337,356]
Riloncept	IL-1 β	Récepteur leurre capable de lier et neutraliser l'IL-1 β	CAPS (FDA)	[356]
GSK1070806	IL-18	Anticorps anti-IL-18 : neutralisation de l'IL-18	MICI, maladie de Crohn (Phase II),	[93]
Tadekinig- α	IL-18	Protéine recombinante de l'IL-18BP : neutralisation de l'IL-18	Maladie de Still (Phase II)	[93]

Annexe 1 (suite 2) : Liste des inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3.

Inhibiteur	Cible	Mécanisme	Indications (statut clinique)	Réf
Inhibition des cascades de signalisation en amont de l'inflammasome NLRP3				
Diacéréine (AC-203)	-	Inhibition de l'expression de ASC et NLRP3	Arthrose (AMM), épidermolyse bulleuse, COVID-19 (Phase II)	[356]
PF-06650833	IRAK4	Inhibition de la signalisation NFκB	PR, COVID-19 (Phase II), SLE (<i>in vivo</i>)	[595,596]
2-deoxyglucose	Glycolyse	Inhibition de la transcription pro-IL-1β	Maladies métaboliques	[114]
Quinine	TWIK2	Inhibition de l'efflux de K ⁺	Lésions pulmonaires inflammatoires (<i>in vivo</i>), COVID-19	[129]
β-hydroxybutyrate (BHB)	-	Inhibition de l'efflux de K ⁺ , réduit l'oligomérisation de ASC et la formation des pyroptosomes	CAPS, MA (<i>in vivo</i>) Diabète type 1 (Phase I), Sclérose	[597,598]
Acide dihydrolipoiïque	Expression de LAMP1	Inhibition des dommages induits par la rupture des lysosomes via CAMK2	Lésions cérébrales (<i>in vivo</i>)	[372]
Chlorure d'ammonium	Cathepsine	Inhibition de la rupture lysosomale	Neuro-inflammation (<i>in vivo</i>)	[356,599]
Chloroquine	Cathepsine	Inhibition de la rupture lysosomale	COVID-19 (<i>in vivo</i> , essais cliniques)	[343,356]
Apocynine mitotique	NOX	Antioxydant ciblant les mitochondries : moindre ROS	Lésions pulmonaires, diabète néphrotique (<i>in vivo</i>)	[356,600,601]
Colchicine	Microtubules	Inhibition de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3	Goutte (AMM), CAPS, FMF (<i>ex vivo</i>), athérosclérose, COVID-19	[346,373]

Annexe 2. Distribution tissulaire des principaux récepteurs P1 et P2.
(G. Burnstock 2019)

<i>Neurons</i>	
Sympathetic neurons	P2X1-7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, A1
Parasympathetic neurons	P2X2, P2X3, P2X4, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y11, A1
Sensory neurons	P2X1-7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, A2A
Enteric neurons	P2X3, P2X4, P2X7, P2Y1, P2Y6, P2Y12, A1, A2A, A2B
CNS neurons	P2X4, P2X6, P2Y1, P2Y6, P2Y12, A1, A2A, A2B, A3
<i>Glia</i>	
Astrocytes	P2X1/5, P2X7 (reactive astroglia), P2Y, A1
Oligodendrocytes	P2X7, P2Y1, P2Y11
Microglia	P2Y4, P2Y7, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, A1, A2
<i>Special senses</i>	
Inner ear	P2X1, P2X2, P2X3, P2X7, P2Y2, P2Y4, A1
Eye	P2X2, P2X7, P2Y2, A1, A2, A3
Tongue	P2X2, P2X3, P2Y1, A1
Olfactory organ	P2X2, P2X4, P2Y1, P2Y2, A2A, A3
<i>Muscle cells</i>	
Smooth muscle	P2X1-7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, A1, A2A, A2B, A3
Skeletal muscle	
– Developing	P2X2, P2X5, P2X6, P2Y1, P2Y2
– Adult	P2X1-7, P2Y2, A2A
Cardiac muscle	P2X1-6, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, A1, A3
<i>Nonneuronal cells</i>	
Osteoblasts	P2X7, P2Y1, P2Y2
Cartilage	P2X2, P2Y1, P2Y2, A2A, A2B
Keratinocytes	P2X5, P2X2, P2X3, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, A2B
Fibroblasts	P2X7, P2Y1, P2Y2, A2A
Adipocytes	P2X1, P2Y1, P2Y2, P2Y4, A1
Epithelial cells	P2X4-7, P2Y1, P2Y2, P2Y11, A1, A2A, A3
Hepatocytes	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y13, A2A, A3
Sperm	P2X2, P2X7, P2Y2, A1
Endothelial cells	P2X1, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, A1, A2A
Erythrocytes	P2X2, P2X4, P2X7, P2Y1
Platelets	P2X1, P2Y1, P2Y12, A2A
Immune cells	P2X4, P2X7, P2Y1, P2Y2, A2A, A3
Exocrine secretory cells	P2X1, P2X4, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, A1, A2A
Endocrine secretory cells	P2X1-7, P2Y2, P2Y4, A1, A2A, A2B, A3

Annexe 3. The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection (Front. Immunol. 2023)

The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection

Déborah Lécuyer^{1,2}, Roberta Nardacci^{3,4}, Désirée Tannous^{1,2,5}, Emie Gutierrez-Mateyron^{1,2}, Aurélia Deva-Nathan^{1,2}, Frédéric Subra⁶, Cristina Di Primio^{7,8}, Paola Quaranta^{7,9}, Vanessa Petit¹⁰, Clémence Richetta⁶, Ali Mostefa-Kara^{1,2}, Franca Del Nonno³, Laura Falasca³, Romain Marlin¹¹, Pauline Maisonnasse¹¹, Julia Delahousse^{1,2}, Juliette Pascaud^{11,12}, Eric Deprez⁶, Marie Naigeon^{2,13,14}, Nathalie Chaput¹³⁻¹⁵, Angelo Paci^{1,2,14,16}, Véronique Saada¹⁶, David Ghez^{1,17}, Xavier Mariette^{11,12,18}, Mario Costa^{7,8,19}, Mauro Pistello^{9,20}, Awatef Allouch^{1,2,5}, Olivier Delelis⁶, Mauro Piacentini^{3,21}, Roger Le Grand¹¹ and Jean-Luc Perfettini^{1,2*}

¹ Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Villejuif, 94805, France;

² Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

³ National Institute for Infectious Diseases "Lazzaro Spallanzani", Via Portuense 292, Rome, 00149, Italy;

⁴ UniCamillus - Saint Camillus International University of Health and Medical Sciences, Rome, 00131, Italy;

⁵ NH TherAguix SAS, Meylan, 38240, France;

⁶ Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS UMR 8113, IDA FR3242, Laboratory of Biology and Applied Pharmacology (LBPA), Gif-sur-Yvette, 91190, France;

⁷ Institute of Neuroscience, Italian National Research Council, Via Moruzzi 1, Pisa, 56124, Italy;

⁸ Laboratory of Biology BIO@SNS, Scuola Normale Superiore, Piazza di Cavalieri 7, Pisa, 56124, Italy;

⁹ Retrovirus Center, Department of Translational Research, Università of Pisa, Pisa, 56126, Italy;

¹⁰ Université Paris-Saclay, Inserm U1274, CEA, Genetic Stability, Stem Cells and Radiation, Le Kremlin Bicêtre and Fontenay aux roses, 92260, France;

¹¹ Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial diseases (IMVA-HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses, 92265, France;

¹² Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, 94270, France;

¹³ Université Paris-Saclay, Inserm, CNRS, Analyse moléculaire, modélisation et imagerie de la maladie cancéreuse, Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, Villejuif, 94805, France;

¹⁴ Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, 92296, France;

¹⁵ Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Center, CNRS, Stabilité génétique et oncogénèse, Villejuif, 94805, France;

¹⁶ Gustave Roussy Cancer Center, Department of Biology and Pathology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

¹⁷ Gustave Roussy Cancer Center, Department of Hematology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

¹⁸ Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, 94270, France;

¹⁹ Centro Pisano ricerca e implementazione clinical Flash Radiotherapy "CPFR@CISUP", "S. Chiara" Hospital, Via Roma 67, Pisa, 56126, Italy;

²⁰ Virology Operative Unit, Pisa University Hospital, Via Roma 67, Pisa, 56126, Italy;

²¹ Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica 1, Rome, 00133, Italy;

*Correspondence to:

Dr. Jean-Luc PERFETTINI

Cell death, Immunity and Therapeutic Innovation team

Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Inserm UMR1030

Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Pavillon de Recherche 1

114, rue Edouard Vaillant

94805 Villejuif, France

Tel. 33-1-42 11 54 24

Fax 33-1-42 11 52 36

e-mail: jean-luc.perfettini@gustaveroussy.fr

One Sentence Summary: Purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome govern SARS-CoV-2 replication.

Abstract

Purinergic receptors and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome regulate inflammation and viral infection, but their effects on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection remain poorly understood. Here, we report that the purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome are cellular host factors required for SARS-CoV-2 infection. Lung autopsies from patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) reveal that NLRP3 expression is increased in host cellular targets of SARS-CoV-2 including alveolar macrophages, type II pneumocytes and syncytia arising from the fusion of infected macrophages, thus suggesting a potential role of NLRP3 and associated signaling pathways to both inflammation and viral replication. In vitro studies demonstrate that NLRP3-dependent inflammasome activation is detected upon macrophage abortive infection. More importantly, a weak activation of NLRP3 inflammasome is also detected during the early steps of SARS-CoV-2 infection of epithelial cells and promotes the viral replication in these cells. Interestingly, the purinergic receptor P2X7, which is known to control NLRP3 inflammasome activation, also favors the replication of D614G and alpha SARS-CoV-2 variants. Altogether, our results reveal an unexpected relationship between the purinergic receptor P2X7, the NLRP3 inflammasome and the permissiveness to SARS-CoV-2 infection that offers novel opportunities for COVID-19 treatment.

Introduction

The rapid worldwide spread of SARS-CoV-2 poses a global health emergency that has not been resolved. Despite the use of preventive COVID-19 vaccination, neutralizing monoclonal antibodies, steroid or IL-6-targeted treatment that drastically reduced the risk of severe symptoms and death due to SAR-CoV-2 infection (1-6), people who are vaccinated or treated, may still get infected with SARS-CoV-2. Thus, there is an urgent need to combine anti-inflammatory therapies with highly effective antivirals for treating COVID-19. Three antiviral compounds, remdesivir (7), molnupiravir (8, 9), and nirmatrelvir (10) were authorized by the US Food and Drug administration for an emergency use for the treatment of COVID-19 (<https://www.fda.gov>). These drugs are proposed as therapeutic options, alone or in combination with modifiers of inflammatory responses (such as tocilizumab (11), the Janus kinase inhibitor baricitinib (12)) for patients suffering from severe COVID-19 or for those with high risk of severe disease progression. Nevertheless, selection pressures exerted by these antivirals in patients with prolonged infection have been shown to increase viral diversity, to lead to drug resistance and to favor the emergence of mutated variants (13). To prevent further massive outbreaks with emerging variants, a better understanding of mechanisms whereby SARS-CoV-2 hijacks cellular host factors for viral replication and dysregulates anti-viral immune responses is still required and should pave the way for the identification of novel cellular or viral targets, thus offering alternative therapeutic opportunities for SARS-CoV-2-infected patients.

The SARS-CoV-2 entry into host cells begins with the binding of viral spike (S) glycoprotein to angiotensin converting enzyme 2 (ACE-2) and triggers through two distinct pathways, the proteolytic cleavage of S glycoprotein by the serine protease TMPRSS2 at cell surface or by cathepsin B/L in the host cell endosomes (14-16). This process ultimately allows the fusion of viral membranes with host cellular membranes (15, 17) and leads to viral RNA release into host cytosol, to the viral replication using specialized enzymes (such as RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (18)), to viral structural protein expression (such as E and S proteins), and finally, to the assembly and release of the viral progeny (19). Host factors (such as RAB7A, p38MAPK, CK2, AXL and PIFYVE kinases) are involved in the regulation of early and late steps of SARS-CoV-2 infection (20, 21), but the host cellular pathways used by SARS-COV- 2 to establish a viral infection are still poorly understood. Even though SARS-CoV-2-infected people are mainly asymptomatic or exhibit mild to moderate symptoms, approximately 15% of patients experience severe disease with atypical pneumonia and 5% develop an acute respiratory distress syndrome (ARDS) and/or multiple organ

failure that is associated with a high mortality rate (around 20-30%) (22). Studies of COVID-19 patients with severe disease revealed a high level of plasma pro-inflammatory cytokines (including IL- β , IL-6, IL-10, IL-18 and TNF) (23) and lactate dehydrogenase (LDH) (24), indicating overt hyper-inflammation during COVID-19, sometimes improperly termed “cytokine storm” or “cytokine release syndrome”. Until now, few molecular mechanisms driving COVID-19 associated hyper-inflammation have been identified and proposed to explain COVID-19 pathogenesis.

SARS-CoV-2 infection activates several microbe-sensing receptors called pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) and C-Type lectin receptors (CLRs). Their activations lead to antiviral immune responses driven by the nuclear factor NF- κ B, type I interferon secretion and interferon stimulated genes (ISGs) expression (25). Among those PRRs, nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing receptor (NLRs) proteins were widely found to be involved in SARS-CoV-2-mediated hyper-inflammation. NLR proteins and purinergic (P2) receptors are the main germline-encoded pattern recognition receptors regulating the secretion of IL-1 family members in response to microbial infection, inflammation, and inflammatory diseases. Upon activation, NLR protein 3 (NLRP3), which is the most studied NLR protein (26), forms large complexes with the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain), called inflammasomes, which activate caspase-1, induce the release of mature cytokines IL-1 β and IL-18 (26, 27) and can lead to the inflammatory cell death of stimulated, stressed or infected host cells, which is also known as pyroptosis (28). High levels of IL-1 β , IL-18 and LDH positively correlate with disease severity in COVID-19 patients (29), suggesting that inflammasomes participate in SARS-CoV-2 pathogenesis. More recently, NLRP3 inflammasome was found activated in response to SARS-CoV-2 infection and identified as critical driver of COVID-19 (30). In addition, SARS-CoV-2 viral proteins such as viral spike (S) glycoprotein (31), SARS-CoV open reading frame-8b (ORF8b) (32) and the transmembrane pore-forming viral Viroporin 3a (also known as SARS-COV 3a) (33) were shown to activate the NLRP3 inflammasome (30), thus revealing that NLRP3 inflammasome is potentially an interesting molecular target for the treatment of COVID-19. Purinergic receptors are membrane-bound innate receptors that bind extracellular nucleotides (such as adenosine triphosphate (ATP)), and control numerous cellular functions (such as cytokine secretion and migration) mainly in immune cells, but also on other cell types that are involved in SARS-CoV-2 pathogenesis such as type 1 and 2 pneumocytes, endothelial cells, platelets, cardiomyocytes and kidney cells (34, 35). Purinergic P2 receptors are divided into two families, the ionotropic P2X receptors and the metabotropic P2Y receptors, which can

regulate the NLRP3 inflammasome (35-37). P2X7 activation was extensively shown to control NLRP3 inflammasome activation and cytokine release in response to danger signals (38). We previously revealed that purinergic receptors (such as P2Y2 and P2X7), NLRP3 inflammasome and associated signaling pathways also control viral replication through the modulation of the fusogenic activity of HIV-1 envelope (37, 39, 40) or the pre-integrative steps of HIV-1 life cycle (41). The contribution of purinergic receptors to viral infection has been confirmed with other purinergic receptors and with several viruses (such as human cytomegalovirus and hepatitis B, C and D viruses) (42). In this context, we hypothesized that the purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome activation could contribute to SARS-CoV-2 pathogenesis and thus, the therapeutic modulation of P2X7 and NLRP3 could regulate the permissiveness of host cells to SARS-CoV-2 infection.

Results

Increased NLRP3 expression level in alveolar macrophages, pneumocytes and syncytia detected in lung autopsies of patients with SARS-CoV-2 pneumonia

To study the potential contribution of NLRP3 to SARS-CoV-2 pathogenesis, we first analyzed the expression of NLRP3 in lung tissue samples obtained from three uninfected carriers and seven SARS-CoV-2-infected patients who died from COVID-19. Autopsies were stained with hematoxylin and eosin, or incubated with antibody against NLRP3 and analyzed. As previously described (43), parenchymal multifocal damages with intra-alveolar inflammation, fibrin and hyaline membrane formation that are consistent with a diagnosis of diffuse alveolar damage were observed in all SARS-CoV-2-infected carriers. The pattern of developed pneumonia (with fibrotic organization and type 2 pneumocyte hyperplasia) and fibroblastic foci formed by the loss of organized connective tissue consistent with alveolar duct fibrosis were also detected (Fig. 1A). Besides, the presence of inflammatory cells (composed mainly of macrophages and lymphocytes) was the main characteristic of COVID-19 patient autopsies (Fig. 1A). NLRP3 expression was then examined on these samples, and immuno-reactive NLRP3 was mainly detected in Type II pneumocytes (Fig. 1, B and C) and alveolar macrophages (Fig. 1, B and D) from both SARS-CoV-2 patients and uninfected specimens, which have been previously shown to be cellular targets of SARS-CoV-2 (44, 45). Interestingly, we also detected in SARS-CoV-2-infected lung tissues, some syncytia that expressed macrophage marker, CD68 (Fig. 1E), NLRP3 (Fig. 1F) and viral RNA (Fig. 1G), revealing a potential link between NLRP3 expression and viral infection.

Increased IL-1 β secretion is associated with NLRP3 inflammasome activation during abortive macrophage infection with SARS-CoV-2

Given that macrophages are key cellular players for COVID-19 pathogenesis (46) and inflammasome activation was detected in SARS-CoV-2-infected macrophages (30), we first analyzed the expression of NLRP3 during the infection of macrophages with SARS-CoV-2. Interestingly, we found that NLRP3 expression level increased 24 hours after SARS-CoV-2 infection in phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) – differentiated human THP1 macrophages with different multiplicities of infection (MOI) (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A) or at different time points after infection with a MOI of 0.2 (Fig. 2B and Supplementary Fig. 1B). Increased NLRP3 expression level was observed in the absence of detectable intracellular SARS-CoV-2 spike (S) protein expression, indicating a lack of viral replication (Fig. 2, A and B). These results thus confirm, as previously published (30), that NLRP3 expression level is increased during the abortive SARS-CoV-

2 infection in macrophages. Then, we evaluated the effect of SARS-CoV-2 infection on two hallmarks of inflammasome activation, the oligomerization of the adaptor protein ASC and the production of mature IL-1 β (47). The oligomerization of ASC, revealed by the quantification of ASC speck formation (Fig. 2, C and D), and the release of mature IL-1 β (Fig. 2, E and F) were increased in PMA- THP1 macrophages that were infected with SARS-CoV-2, as compared to uninfected cells (Fig. 2, C-F). Inactivation of NLRP3 inflammasome with a pharmacological inhibitor MCC950 (Fig. 2G and Supplementary Fig. 1C) or using specific NLRP3 CRISPR guide RNAs (gRNAs) and the CAS9 gene (CrNLRP3) (Fig. 2H and Supplementary Fig. 1D) significantly reduced the release of mature IL-1 β by PMA-THP1 macrophages that were infected with SARS-CoV-2 during 24 hours (Fig. 2, I and J). These results reveal that NLRP3 inflammasome is activated during abortive SARS-CoV-2 infection in macrophages. Given that the purinergic receptor P2X7 has been extensively involved in the activation of NLRP3 inflammasome (47), we also investigated the impact of P2X7 antagonist oxidized ATP (OxATP) or agonist 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) on NLRP3 inflammasome activation elicited by SARS-CoV-2. Pharmacological inhibition or activation of P2X7 with respectively, OxATP or BzATP (Fig. 2, K and L), did not modulate increased expression level of NLRP3 (Fig. 2K and Supplementary Fig. 1E) nor IL-1 β release (Fig. 2L) from PMA-treated THP1 macrophages that were infected with SARS-CoV-2. Results reveal that the activation of NLRP3 inflammasome detected during the infection of PMA-treated THP1 macrophages with SARS-CoV-2 does not require the purinergic receptor P2X7. Taken together, these results indicate that NLRP3 inflammasome activation is detected during the early steps of human macrophage infection with SARS-CoV-2.

NLRP3 acts as a proviral host factor for SARS-CoV-2 infection

Considering that epithelial cells, which have been identified as primary targets of viral replication in the lung and the nasal epithelium of SARS-CoV-2-infected patients (44, 48, 49), also express NLRP3 inflammasome (50), we then analyzed the activation of NLRP3 inflammasome during the infection of permissive host Caco-2 cells and ACE2-overexpressing A549 (ACE2-A549) cells. Surprisingly, a weak, but significant SARS-CoV-2-MOI- dependent release of IL-1 β was detected in response to Caco-2 (Fig. 3, A) and ACE2-A549 (Fig. 3, C) infection during 24 hours. The IL-1 β secretion was also detected at a MOI of 4 up to 48 hours after infection with SARS-CoV-2 at the same target cells (Fig. 3, B and D). IL-1 β secretion is reduced when SARS-CoV-2 was preincubated and neutralized with COVID-19 patient's serum before infection of ACE2-A549 cells (Fig. 3E), thus revealing that NLRP3 inflammasome is activated after viral entry into permissive host cells. We next evaluated whether the activation of NLRP3

inflammasome in epithelial cells might affect viral replication, as previously shown during SARS-CoV-2 infection of macrophages (30). We determined the impact of MCC950 and another NLRP3 inhibitor, Tranilast, on viral replication. Despite the fact MCC950 did not modulate viral replication in ACE2-A549 cells (Fig. 3K and Supplementary Fig. 2, A-C), Tranilast significantly reduced the replication of SARS-CoV-2 in Caco-2 cells (Fig. 3, F and H and Supplementary Fig. 2, D) and ACE2-A549 cells (Fig. 3, G, I-K and Supplementary Fig. 2, E). These results were revealed by detecting the intracellular expression of spike (S) protein (Fig. 3, F and G and Supplementary Fig. 2, A, B, D and E), the detection of viral E RNA expression (Fig. 3, H and I), the frequency of spike (S)-positive cells (Fig. 3, J and K and Supplementary Fig. 2, C) and the cellular viability of treated cells (Supplementary Fig. 2, F-H). As expected, SARS-CoV-2 that was preincubated with serum of convalescent COVID-19 patients did not infect host cells (Fig. 3, J and K). We also examined the impact of NLRP3 depletion on viral replication using small interfering RNA (Fig. 3, L-O). Importantly, the depletion of NLRP3 in Caco-2 and ACE2-A549 cells (Fig. 3, L and N) decreased the replication of SARS-CoV-2, as revealed by the decrease of viral RdRp RNA (Fig. 3, M and O). Altogether, these results demonstrate that NLRP3 acts as a proviral host factor that is required for SARS-CoV-2 infection and replication in target epithelial cells.

Caspase-1 activation is also required for SARS-CoV-2 replication

Considering that caspase-1, which is a substrate of NLRP3 inflammasome activation (51, 52) mainly involved in the protection of host cells against microbial infection (53), was also shown to promote host cell survival in response to microbial virulence factors such as *Aeromonas aerolysin* (54), we examined the contribution of caspase-1 to SARS-CoV-2 viral replication. The pharmacological inhibition of caspase-1 using YVAD inhibitor in Caco-2 (Fig. 4, A and C) and ACE2-A549 (Fig. 4, B and D) cells reduced SARS-CoV-2 infection, as revealed by the frequency of spike (S)-positive cells at 24 hours after infection (Fig. 4, A-D), without affecting cellular viability (Supplementary Fig. 3, A and B). Accordingly, the depletion of caspase-1 using small interfering RNA in Caco-2 (Fig. 4, E) and ACE2-A549 (Fig. 4, G) cells also significantly reduced the detection of viral RdRp mRNA (Fig. 4, F) and intracellular spike (S) protein (Fig. 4 H and Supplementary Fig. 3C) in CASP-1-depleted cells, as compared to control cells. Altogether, these results reveal that caspase-1 also contributes to SARS-CoV-2 infection and replication.

Purinergic receptor P2X7 dictates NLRP3 inflammasome activation for SARS-CoV-2 replication

As previously published (37, 39, 55), we initially revealed the contribution of purinergic receptors to the early steps of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. To evaluate the possibility that P2X7, an important partner of NLRP3 inflammasome activation, might also affect SARS-CoV-2 viral replication, we next examined the impact of a non-selective antagonist of purinergic receptors P2X, the pyridoxal-phosphate-6-azopheny-2',4'-disulfonate (PPADS) and the P2X7-specific antagonist OxATP, on SARS-CoV-2 viral replication and related cellular damage. The inhibition of P2X and P2X7 activities by PPADS and/or OxATP reduced the frequency of spike (S)-positive cells (Fig. 5, A-D) and the expression level of viral E RNA (Fig. 5, E) elicited by SARS-CoV-2 in Vero E6 cells (Fig. 5, A and C) and ACE2-A549 (Fig. 5, B, D and E). PPADS and OxATP partially affected viability of uninfected Vero E6 cells (Supplementary Fig. 4, A and B) at the concentration of 100 μ M, but not at working concentration (10 μ M). Moreover, OxATP did not show any effect on the viability of ACE2-A549 cells (Supplementary Fig. 4C). Accordingly, P2X7 depletion using small interfering RNA significantly reduced intracellular spike (S) expression level detected after 48-hour infection of ACE2-A549 cells with SARS-CoV-2 (Fig. 5F and Supplementary Fig. 4, D and E). Conversely, the activation of P2X7 with BzATP increased replication of SARS-CoV-2, as revealed by the increase of intracellular spike (S) expression levels (Fig. 5, B and D) and viral E expression level (Fig. 5G), but did not show a significant impact on cellular viability (Supplementary Fig. 4F). We then analyzed impact of OxATP on the replication of SARS-CoV-2 into primary salivary gland epithelial cells, which have been identified as primary targets for SARS-CoV-2 in SARS-CoV-2-infected patients (56), and confirmed that OxATP significantly reduced SARS-CoV-2 replication, as revealed by the reduction of RdRp mRNA expression level in primary salivary gland epithelial cells that were treated with OxATP and infected during 48 hours with SARS-CoV-2 (Fig. 5H). This process occurs without affecting the viability of primary salivary gland epithelial cells (Supplementary Fig. 4G). Finally, we analyzed the effect of P2X7 inhibition on the replication of SARS-CoV-2 Alpha variant and determined the amount of viral RdRp RNA released in the supernatant of liver Huh7 cells that were infected with SARS-CoV-2 Alpha variant in presence or in absence of OxATP. We observed that OxATP significantly reduced the release of viral particles in the supernatant of SARS-CoV-2-infected Huh7 cells (Fig. 5I), thus revealing that purinergic receptor P2X7 also regulates the replication of SARS-CoV-2 Alpha variant. To determine whether the purinergic receptor P2X7 may act upstream of NLRP3 inflammation activation, ACE2-A549 cells were infected during 48 hours with SARS-CoV-2 in presence of indicated concentrations of BzATP and/or Tranilast. As previously shown (Fig. 3, F-K and Fig. 5, B,

D and G), the intracellular expression of spike (S) protein elicited by the infection of ACE2-A549 cells with SARS-CoV-2 was increased or decreased in presence of BzATP or Tranilast, respectively (Fig. 5J). Interestingly, we observed that the treatment of ACE2-A549 cells with both BzATP and Tranilast significantly reduced the intracellular spike (S) expression level detected after 48 hours of infection, as compared to ACE2-A549 cells that were infected in presence of BzATP (Fig. 5J), thus demonstrating that the purinergic receptor P2X7 acts upstream to NLRP3 inflammasome activation and dictates viral replication.

Purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome regulate SARS-CoV-2 replication at a post-entry level

Then, we determined whether purinergic receptor P2X7 and NLRP3 might control SARS-CoV-2 replication through the modulation of viral entry. We analyzed viral entry by using SARS-CoV-2 spike (S) pseudotyped HIV-1. Thus, we incubated ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) highly permissive cells with OxATP, BzATP or serum of convalescent COVID-19 patients during 4 hours before their infection with green fluorescent protein (GFP)-tagged HIV-1NL4-3 Δ Env variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-GFP-LV) (Fig. 6, A-E). Then, we analyzed the viral entry by detecting after 48-hour infection, the frequency of GFP⁺ cells and observed that OxATP and BzATP did not reduce the frequency of GFP⁺ cells detected in S-GFP-LV-infected ACE2-TMPRSS2-A549 cells (Fig. 6, A-D and F). Of note, serum of convalescent COVID-19 patients efficiently reduced the frequency of GFP⁺ cells detected after 48 hours of infection (Fig. 6, E and F). These results were confirmed by detecting the intracellular HIV-1 Cap24 capsid in ACE2-TMPRSS2-A549 cells (Fig. 6G and Supplementary Fig. 5A), ACE2-A549 cells (Supplementary Fig. 5B) and Vero E6 cells (Fig. 6H and Supplementary Fig. 5C) that were infected by S-GFP-LV during 4 hours in presence (or not) of OxATP, BzATP or serum of convalescent COVID-19 patients (Fig. 6, G, H and Supplementary Fig. 5, A-C) and revealed that purinergic receptor P2X7 does not regulate SARS-CoV-2 entry into host cells. Similarly, we analyzed the frequency of GFP⁺ cells detected after 48-hour infection of ACE2-TMPRSS2-A549 cells with S-GFP-LV in presence (or not) of Tranilast, YVAD or serum of convalescent patients. We observed that Tranilast and YVAD did not reduce the frequency of GFP⁺ cells, as compared to cells treated with serum of convalescent patients (Fig. 6, I-N). These results were confirmed by detecting the intracellular HIV-1 Cap24 capsid in ACE2-TMPRSS2-A549 cells (Fig. 6O and Supplementary Fig. 5D) and ACE2-A549 cells (Fig. 6P and Supplementary Fig. 5E) that were infected with S-GFP-LV during 4 hours in presence (or not) of Tranilast. Since

ACE2 expression was shown to control viral entry (57), Vero E6 cells (Supplementary Fig. 6, A and B) and ACE2-A549 cells (Supplementary Fig. 6, C-F) were treated with OxATP, BzATP, Tranilast and/or YVAD, for 6 hours (Supplementary Fig. 6, A and B), 4 hours (Supplementary Fig. 6, C and D), or 24 hours (Supplementary Fig. 6, E and F), and ACE2 membrane expression was analyzed by flow cytometry. The expression of ACE2 did not change in the presence of the agonist of P2X7 (BzATP), the selective antagonist of P2X7 (OxATP), the selective inhibitor of NLRP3 (Tranilast) and the selective inhibitor of caspase-1 (YVAD), implying that the purinergic receptor P2X7, the protein NLRP3 and the caspase-1 do not affect the membrane expression of ACE2. Altogether, these results demonstrate that the activation of the purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome supports SARS-CoV-2 replication into target cells without modulating viral entry.

Discussion

With the goal of studying the potential contribution of the purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome to the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection, our study revealed that these two major sensors of danger signals participate to the early steps of SARS-CoV-2 infection. The activation of inflammasomes was detected during COVID-19 and positively correlates with disease severity in humans (29). Despite the fact that several inflammasomes were proposed to be activated and to contribute to organ dysfunction and disease severity during COVID-19 (29), the activation of NLRP3 inflammasome was recently associated with chronic stages of COVID-19 in humans (29) and in preclinical mouse models (30, 58). Several host targets (such as neutrophils, monocytes/macrophages and lymphocytes), which have been associated with the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection (59), exhibited NLRP3 inflammasome activation during severe COVID-19. NLRP3-dependent inflammasome activation and uncontrolled extracellular traps (NET) production by neutrophils have been proposed to contribute to hyper-inflammation and dysregulated coagulation in COVID-19 patients with severe disease (60-62). Activation of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis have been detected in monocytes and macrophages during SARS-CoV-2 infection (30, 31) and COVID-19 (29, 30, 63, 64). In addition, danger signals such as calprotectin recently associated with COVID-19 disease severity (65), are known to activate the NLRP3 inflammasome (66) or to be released as a consequence of its activation (67) and may contribute to pyroptosis (67). Accordingly, we detected the increased expression level of NLRP3 in alveolar macrophages and syncytium from autopsies of COVID-19 patients with severe disease, and observed the activation of NLRP3 inflammasome during the abortive infection of PMA-treated THP1 macrophages *in vitro*. Interestingly, our study also revealed that the NLRP3 inflammasome activation can also be detected in permissive host epithelial cells during early steps of SARS-CoV-2 infection and is required for SARS-CoV-2 replication. This process is rapidly induced after the interaction of SARS-CoV-2 with target cells, requires the activation of caspase-1 and acts positively at post-entry level on viral replication steps. Precise effects of NLRP3 inflammasome activation on cellular events (such as viral translation, polyprotein processing, double membrane vesicle (DMV) formation, replication organelle formation and activity) regulating SARS-CoV-2 replication (68) remain to be defined. In addition to its well-established role in triggering inflammation during microbial infection (53), our results highlighted an unexpected contribution of NLRP3 inflammasome activation to SARS-CoV-2 pathogenesis through the promotion of viral replication. Our results are in agreement with recent report revealing that

pharmacological inhibition of NLRP3 inflammasome with MCC950 or knockout of NLRP3 abrogate both SARS-CoV-2 replication and associated inflammation during infection of human ACE2 mice (69). Considering the ability of the caspase-1 to regulate the activation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs), whose expressions have been detected increased in patients with severe COVID-19 (70) and genetic manipulations revealed their contributions to SARS-CoV-2 life cycle (68, 71, 72), further investigations to define the potential interplay between NLRP3 inflammasome activation, fatty acid and cholesterol metabolism and SARS-CoV-2 replication would be of interest and should help to identify key mechanisms regulating the replication of the SARS-CoV-2 that could be druggable targeted for COVID-19 treatment.

Our study demonstrated that the purinergic receptor P2X7 is also a key host factor in the SARS-CoV-2 replication cycle. The activation of purinergic receptor P2X7 supports SARS-CoV-2 replication without interfering with ACE2 membrane expression and viral entry. By deciphering the relationship between purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome activation during the early steps of SARS-CoV-2 infection, our study demonstrated that purinergic receptor P2X7 acts upstream the activation of NLRP3 inflammasome. Since we previously observed that the purinergic receptors control HIV-1 envelope-elicited fusion (37, 39), it is conceivable that upon the interaction of spike (S) protein with host cell receptors and/or in response to the fusogenic activity of spike (S) protein, ATP is released from SARS-CoV-2 target cells and acts in an autocrine fashion on purinergic receptor P2X7 present at the membrane of SARS-CoV-2 target cells to stimulate NLRP3 inflammasome activation and to regulate viral replication.

The therapeutic inhibition of the key host factors of the signaling pathway that we identified in this study (P2X7→NLRP3→Caspase-1) could block the SARS-CoV-2 life cycle at the level of viral replication. Ivermectin, which is known to potentiate the activity of the purinergic receptor P2X4 (73), which can form heterotrimeric receptors with P2X7 (74), was recently found to inhibit the replication of SARS-CoV-2 in vitro (75), but did not shown benefits for COVID-19 patients (76). Nevertheless, further molecular investigations are required to fully understand the role of purinergic receptor family members and associated signaling pathways during early steps of SARS-CoV-2 infection and COVID-19-associated hyper-inflammation.

The clinical randomized clinical trials (RCT) having evaluating IL-1 inhibitors in severe COVID-19 yielded to controversial results. One RCT (NCT04362813) with canakinumab

(a monoclonal antibody against anti-IL1 β) was negative (77). With anakinra, an IL-1 receptor antagonist, one study (NCT04680949) in patients with increased soluble urokinase plasminogen receptor (suPAR) plasma level was positive (78), whereas 2 other trials (NCT04341584, NCT04364009) were negative (79). Our work suggests that targeting inflammasome-dependent IL-1 β /IL-18 and/or purinergic signaling pathways may offer a novel opportunity for the treatment of viral infection and hyper-inflammation associated with COVID-19. Our study provides the first rationale for testing specific P2X7 antagonists such as CE-224,535 or JNJ-54175446, which were assessed without success for the treatment of rheumatoid arthritis (NCT00628095) and are under evaluation for the treatment of major depressive disorders (NCT04116606), respectively, alone or in combination with specific antagonists of NLRP3 such as Tranilast or Dapansutrile, which were assessed for the treatment of Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome (CAPS) (NCT03923140) or systolic heart failures (NCT03534297), respectively. Repurposing of these existing drugs for blocking both viral replication and COVID-19-associated hyper-inflammation should rapidly improve the health of COVID-19 patients.

Materials and methods

Cell lines

The African green monkey kidney Vero E6 cells were purchased from ATCC (ATCC CRL-1587), ACE2-overexpressing A549 (ACE2-A549) cells were a gift from Dr. Olivier Schwartz (Institut Pasteur, France), ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) cells were from Invivogen (#a549-hace2tpsa) and HEK293T were from ATCC (#CRL-11268). These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 UI/ml penicillin (Life technology), and 100 µg/ml streptomycin (Life technology) at 37°C. Caco-2 cells were kindly provided by Pr. Guido Kroemer (Gustave Roussy, France) and were cultured in EMEM (30-2003, ATCC) with 20% heat inactivated FBS, 100 UI/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C. Monocyte THP1 cells (TIB2002, ATCC) were differentiated in macrophages with phorbol-12 myristate-13-acetate (PMA) (#tlrl-pma, Invivogen), as previously described (80) and maintained in RPMI-1640- Glutamax medium supplemented with 10% heat inactivated FBS, 100 UI/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. All cell lines used were mycoplasma-free.

Primary cells

Minor salivary gland biopsy specimens were obtained from patients referred for suspected primary Sjögren's syndrome diagnosis to the rheumatology department of Bicêtre Hospital (AP-HP, Université Paris-Saclay). The subjects selected for this study were patients who presented with sicca symptoms but without any autoantibodies and with normal or subnormal minor salivary gland findings (i.e., focus score <1), and thus were considered as controls. Primary cultures of salivary gland epithelial cells were established from minor salivary glands based on previously described protocol (81). Briefly, the minor salivary gland biopsy was cut into small fragments, which were placed in 75-cm² flasks (BD Falcon) (prehydrated with 3 ml of s-BEM medium during 30 minutes at 37°C) with 1 ml of s-BEM medium. The supplemented-Basal Epithelial Medium (s-BEM) consisted of 3:1 mix of Ham's F12 (Gibco, Life Technologies, UK) and DMEM (Gibco, Life Technologies, UK), supplemented with 2,5% FBS (PAN BIOTECH, Aidenbach, Germany), 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Gibco), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Upjohn 100mg SERB), 0.5 µg/ml insulin (Novo Nordisk, Novorapid Flexpen) and 1X penicillin/streptomycin (LONZA, Verviers, Belgium). The flasks were incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humidified incubator. The day after, 3ml of s-BEM were added slowly in the flasks. At day 6, 5 ml of s-BEM were added. Then, cultures

were fed with fresh medium twice a week. After biopsy, 2-3 small pieces were seeded into T75 flask and cultured in a DMEM-F12 medium supplemented with 2.5% FBS, 100 UI/ml penicillin/streptomycin, 0.4 µg/ml hydrocortisone, 0.5 µg/ml insulin and 10 ng/ml EGF. Once tissues had expanded, cells were harvested and 1×10^5 cells per well were plated in 48-well plates that were pretreated with collagen for 1 hour at 37°C. Twenty-four hours later, cells were treated with OxATP and infected with SARS-CoV-2 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 for 48 hours. Cellular RNA was collected and extracted with NucleoSpin RNA Plus XS, Micro kit for RNA purification with DNA removal column (#740990.250, Macherey- Nagel), according to manufacturer instructions. Samples were then subjected to reverse transcription and PCR using probes against RdRp and β -actin. Data were normalized to β -actin and to control condition following the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Human autopsies and patients' serum

Post-mortem lung sections were obtained from 3 non-COVID-19 patients and 7 COVID-19 patients with severe disease. Controls (n=3) were patients deceased after hemorrhagia, cardiorespiratory failure or interstitial pneumonia associated with pulmonary capillaritis. All COVID-19 patients (n=7) deceased after cardiorespiratory failure and exhibited in their vast majority diffuse alveolar damage (n=6) or fibrosis (n=1). Detection of SARS-CoV-2 was performed by RT-PCR on all patients using nasopharyngeal swabs. Convalescent COVID-19 serum was obtained from patients that received three doses of COVID-19 mRNA vaccine (Pfizer). Serum was collected one month after the last injection. All patients had a titer > 40 000 units/ml. The serum was obtained from Dr. Samuel Lebourgeois and Dr. Nadhira Houhou-Fidouh (Hôpital Bichat Claude Bernard, France).

Virus, pseudoviral constructs and viral production

The SARS-CoV-2 BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain (D614G) was provided by Dr. Benoit Visseaux from the group of Prof. Diane Descamps (UMR S 1135, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris) and by the National Reference Center For Respiratory Viruses (Institut Pasteur, Paris, France). The SARS-CoV-2 Alpha variant (lineage B.1.1.7) was obtained from Pr. Mauro Pistello. Viral stocks were prepared by propagation in African green monkey kidney epithelial (Vero E6) cells in a biosafety level-3 (BLS-3) laboratory and titrated using lysis plaque assay as previously described (82). SARS-CoV-2 stock titer was 2×10^6 PFU/ml. After 72 hours of infection, the supernatant was centrifuged at 1500 rpm, 12°C, for 5 minutes to remove dead cells and then centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes at 12°C. Supernatant was then aliquoted and stored at -80°C. For the production of green fluorescent protein (GFP)-tagged HIV-1NL4-3 Δ_{env} variant

(defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-GFP-LV), the plasmid NLENG1-ES-IRES coding for defective virus carrying two stop codons in the reading frame of the envelope and expressing the fluorescent reporter gene EGFP (GFP) was derived from the HIV-1 virus NL4-3 as previously published (83). Envelope defective virus was pseudotyped with HU-1 SARS-CoV-2 Spike protein (pLV-Spike, Invivogen) and used for single round infection assays. To produce viral stocks, 293T cells were transfected with virus-encoding plasmids by the calcium phosphate method. Briefly, 293T cells were transfected using 20 µg of NLENG1-ES-IRES and 4 µg of the corresponding plasmid encoding spike (S) envelope. Two days post-transfection, supernatants containing the viruses were submitted to a low-speed centrifugation step, filtered through a 0.45-µm low-protein-binding Durapore filter (Millipore), and stored at -80°C until use. Viral stocks were titrated using HIV-1 P24 ELISA assay (#NEK05001KT, Perkin Elmer) and the concentration was 200 ng/ml.

Viral infections

Vero E6 cells, ACE2-TMPRSS2-A549, ACE2-A549 and Caco-2 cells were infected during indicated times with SARS-CoV-2 (BetaCoV/France/IDF0372/2020) at a MOI from 0.1 to 0.2 for qPCR experiments, MOI of 0.1 for WB experiments, and from MOI 1 to 2 for cytopathogenic analyses, in absence or in presence of 50 µM pyridoxal-phosphate-6-azopheny-2',4'-disulfonate (PPADS) (#P178, Sigma-Aldrich), 100 µM oxidized ATP (OxATP) (#A6779, Sigma-Aldrich), 100 µM 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) (#B6396, Sigma-Aldrich), 20 µM MCC950 (#inh-mcc, InvivoGen), 100 µM Tranilast (S-1439, DIVBIOSCIENCE) or 100 µM Ac-YVAD-cmk (#inh-yvad, InvivoGen), unless stated otherwise. The virus was also neutralized by mixing 1 µL of convalescent COVID-19 serum with 30 µL of virus for 40 minutes at room temperature, before added to the cells and incubated for 48 hours at 37°C. As previously described, primary salivary gland epithelial cells were obtained and infected in 48-wells and infected with SARS-CoV-2 at MOI 0.5 for 48 hours. For viral yielding experiment, Huh7 cells were inoculated with SARS-CoV-2 Alpha variant (lineage B.1.1.7) at MOI 0.001 for 3 hours. Then, the viral inoculum was removed and cells were gently washed with ice-cold phosphate buffer saline (PBS). Fresh cell culture medium was added and cells were incubated for 24 hours. Supernatants were then collected and the viral RNA was extracted by automated RNA extractor EZ1 (Quiagen) and quantified using quantitative RT-PCR.

RNA interference

The small interfering RNAs (siRNAs) against NLRP3 (siNLRP3) (5'-UGCAAGAUCUCUCAGCAAA-3') and the corresponding control siRNAs (siControl) (5'-

UUCAAUAAAUUCUUGAGGU-5') were synthesized from Sigma. The siGenome smart pool siRNAs and siON Target plus siRNAs were purchased from Dharmacon and are composed of a pool of four siRNAs. Sequences of indicated siRNAs are following: siGenome smart pool siRNAs against CASP-1 (siCASP-1, #M-004401-03-0010): (1) 5'-GACUCAUUGAACAUUUGCA-3', (2) 5'-AGACAUCCCACAAUGGGCU-3', (3) 5'-GAAUAUGCCUGUUCUGUG-3', (4) 5'-CCGCAAGGUUCGAUUUUCA-3', siGenome smart pool non-targeting siRNAs (siCo., #D-001206-14-05): (1) 5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3', (2) 5'-AUGUAUUGGCCUGUAUUAG-3', (3) 5'-AUGAACGUGAAUUGCUCAA-3', (4) 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3', siON-Target plus siRNAs against P2X7 (siP2X7, #L-003728-00-0005): (1) 5'-GCGGUUGUGUCCCGAGUAU-3', (2) 5'-GGAUCCAGAGCAUGAAUUA-3', (3) 5'-GCUUUGCUCUGGUGAGUGA-3', (4) 5'-GGAUAGCAGAGGUGAAAGA-3', and the siON-Target plus non-targeting siRNAs (siCo., #D-001810-10-20): (1) 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3', (2) 5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3', (3) 5'-UGGUUUACAUGUUUUCUGA-3', (4) 5'-UGGUUUACAUGUUUCCUA-3'. Cells were seeded (10^5 cells/well of 12 well-plate) and let be attached for 4 hours before siRNAs transfection. The siRNAs transfections were performed using lipofectamine RNAimax (#13778075, ThermoFisher Scientific) and OptiMEM (#31985-062, ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. After 48 hours of transfection, cell were infected and analyzed for gene expression (by RT-PCR) or protein expression (by western blot).

LentiCRISPR targeting

The generation of NLRP3-depleted THP1 cell line (CrNLRP3) was performed with two predesigned and validated CRISPR NLRP3 gRNAs (84) (gRNA1: CGAAGCAGCACTCATGCGAG; gRNA2: GTCTGATTCCGAAGTCACCG) which were cloned into the pLentiCRISPR v2 lentiviral vector expressing CAS9 gene (GenScript). The control THP1 cell line (CrCo.) was obtained with the empty pLentiCRISPR v2 lentiviral vector. For the production of the lentiviral vectors (LentiCRISPR v2, LentiCRISPR v2-gRNA1-NLRP3 and LentiCRISPR v2-gRNA2-NLRP3), 10×10^6 HEK293T (ATCC#CRL-3216) cells in a T300 plate and 20 ml DMEM medium (Gibco, #31966-021) (containing 2% heat inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) were transfected with 8 μ g pDM2-VSV-G, 20 μ g p Δ 8.91 packaging and 16 μ g lentiviral vector plasmid using Fugene (Promega, #E2312) according manufacturer's instructions. After 24 hours of transfection, cell supernatants were removed and replaced by 20 ml fresh DMEM medium (containing 2% heat inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin) for additional 96 hours. The viral stocks in the cell supernatants were then harvested, filtered through a 0.45- μ m-pore size filter and quantified for viral

Cap24 content using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Perkin Elmer, # NEK050A) as previously published (41, 85). CrCo. THP1 cells (1×10^6) were transduced with 10 μg Cap24 LentiCRISPR v2 lentiviral vector and CrNLRP3 THP1 cells (1×10^6) were transduced with 5 μg Cap24 of each lentiviral vector (LentiCRISPR v2-gRNA1-NLRP3 and LentiCRISPR v2-gRNA2-NLRP3). Transductions were performed in the presence of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene (Sigma, #H9268) by 2-hour spinoculation (1200 g at 25 °C) and 2-hour incubation at 37°C. Then, THP1 cells were washed and cultured for 72 hours after transduction before puromycin (InvivoGen, #ant-pr) selection (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and validation of NLRP3 depletion by western blot analysis and qPCR.

Immunofluorescence

Cells were fixed for 20 minutes with 4% paraformaldehyde-PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (#X100, Sigma-Aldrich) for 15 minutes and incubated with 5% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS for 1 hour at room temperature. After saturation, cells were incubated overnight at 4°C with anti-TMS1/ASC antibody (ASC) (#ab155970 rabbit, Abcam, 1/200 dilution) or anti-spike (S) antibody (#GTX632604 mouse, Genetex, 1/100 dilution) in PBS-BSA 5%. Then, cells were incubated with appropriate secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (#A11034, Invitrogen, 1/500) or Alexa Fluor 546 (#A11030, Invitrogen, 1/500) at room temperature for 1 hour. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (#1874027, Invitrogen, 1/1000 dilution) for 30 minutes at room temperature. After three PBS washes, cells were mounted with Fluoromount G medium (Southern biotech). Cells were analyzed and imaged by Leica Dmi8 microscope using a 60X objective.

Western blots

Total cellular proteins were extracted in a lysis buffer containing 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1% glycerol and the protease and phosphatase inhibitors (Roche). 10-40 μg of protein extracts were run on 4–12% SDS-PAGE and transferred at 4°C onto a nitrocellulose membrane (0.2 Micron). After 1 hour saturation at room temperature with 5% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20 (TBS-Tween), nitrocellulose membranes were incubated with primary antibody at 4°C overnight. Horseradish peroxidase (HRP)- conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (SouthernBiotech) antibodies were then incubated for 1 hour and revealed with the enhanced ECL detection system (GE Healthcare). The primary antibody against P2X7 (#APR-004) was obtained from Alomone laboratories. Primary antibodies against ACE2 (#AF933) and Spike (S) (#GTX632604) were from R&D Systems and Genetex, respectively. Primary antibody against β -Actin-HRP (#ab49900) was purchased from Abcam. Anti-NLRP3 (Cryo-2, #AG-20B-0014) was from Adipogen. P24 antibody was

obtained through the NIH HIV Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH: Polyclonal Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 SF2 p24 (antiserum, Rabbit), ARP-4250, contributed by DAIDS/NIAID; produced by BioMolecular Technologies).

Flow cytometry

Control, treated-ACE2-A549 and treated-Vero E6 cells were harvested in DMEM medium, washed three times in PBS and saturated with 2% PBS-BSA at 4°C for 20 minutes. Primary anti-human ACE-2 antibody (#AF933, R&D systems) or isotype-matched antibody (#AB-108-C, R&D systems) was incubated at 0.2 µg/10⁶ cells for ACE2-A549 and at 0.4 µg/10⁶ cells for Vero E6 cells during 30 minutes at room temperature in 2% PBS-BSA. Cells were washed three times with 2% PBS-BSA and incubated with secondary anti-goat IgG (H+L) APC-conjugated antibody (F0108, R&D systems) in 2% PBS-BSA for 20 minutes at room temperature at 0.05 µg/10⁶ cells for ACE2-A549 cells or at 0.1 µg/10⁶ cells for Vero E6 cells. Cells were then washed three times with 2% PBS-BSA, resuspended in 200 µl 2% PBS-BSA and analyzed for mean fluorescence intensity (MFI) of ACE2 expression with CytoFLEX flow cytometer (Beckman). To determine the biological effects of the purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome on viral entry, ACE2-TMPRSS2-A549 cells were pretreated for 4 hours with indicated drugs and infected for 24 hours with SPIKE-GFP-LVs. As negative control, spike-GFP-LVs were preincubated with convalescent COVID19 patient's serum during 40 minutes at room temperature. After extensive washes, ACE2-TMPRSS2-A549 cells were incubated in complete medium for 24 hours, fixed with 4% PFA and GFP-positive cells were analyzed using BD FACSCelesta flow cytometer (BD Biosciences).

Quantitative RT-PCR

After infection, total cell RNA was extracted using either QIAshredder kit (#79654, Qiagen) and the RNeasy kit plus Mini kit (#74134, Qiagen) or using NucleoSpin RNA Plus XS, Micro kit for RNA purification with DNA removal column (#740990.250, Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. RNA was first submitted to reverse transcription before PCR amplification. Quantifications were performed by real-time PCR on a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the second-derivative-maximum method provided by the Light Cycler quantification software (version 3.5 (Roche Diagnostics)) or using CFX Maestro (BioRad). Standard curves for SARS-CoV-2 RNA quantifications were provided in the quantification kit and were generated by amplification of serial dilutions of the provided positive control. Sequences of the oligonucleotides and probes used to quantify the RdRp (F: 5'-GGTAACTGGTATGATTT-3'; R: 5'-CTGGTCAAGGTTAATATA-3'; Probe: 5'-[FAM]TCATACAAACCACGCCAGG[BHQ1]-

3'), E gene (F: 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' ; ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' ; Probe: 5'-[FAM]CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC[BBQ]-3') and β -actin CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' ; R 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3' ; SYBR-Green) are respectively obtained from Eurofins, TIB MolBiol or Origene (NM_001101). The amplification of RdRp and E genes was obtained after 5 minutes of reverse transcription, 5 minutes of denaturation and 45 to 50 cycles with the following steps (95°C during 5 seconds, 60°C during 15 seconds and 72°C during 15 seconds or 95°C for 15 seconds and 58°C for 30 seconds to 1 minute). The amplification of CASP-1 (Catalog #4331182 Assay ID Hs00354836_m1, ThermoFisher Scientific) and NLRP3 (Catalog #4331182 Assay ID Hs00918082_m1, ThermoFisher Scientific) was obtained after 5 minutes at 65°C for annealing primer to the template RNA, 2 minutes at 50°C of reverse transcription, 10 minutes at 95°C of denaturation and 44 cycles with the following steps (95°C for 15 seconds and 60°C for 1 min). Cq results were normalized by the total amount of RNA in the sample or by β -actin mRNA expression levels and reported to the condition without any compound (control condition). Data are presented as fold changes and were calculated with relative quantification of ΔCT obtained from quantitative RT-PCR. For the detection of SARS-CoV-2 in the supernatant of infected Huh7 cells, the viral RNA was extracted by automated RNA extractor EZ1 (Quiagen) and real-time RT-PCR was performed by targeting the SARS-CoV-2 RdRp gene as follows: each 20 μ l sample consisted of 12.5 μ l One Step PrimeScriptTM III RT-PCR Kit (Takara Bio, Shiga, Japan), 0.5 μ M Sars-CoV-2 CRV forward primer (5'-TCACCTAATTTAGCATGGCCTCT-3'), 0.5 μ M SARS-CoV-2 CRV reverse primer (5'-CGTAGTGCAACAGGACTAAGC-3'), 0.1 μ M SARS-CoV-2 CRV probe (5'- FAM-ACAGCAGAATTGGCCCTTAAAGCT-BHQ1-3'), 4 μ l of purified nucleic acid and nuclease-free water. The in-house one-step RT-PCR reaction mixtures were run in a CFX Connect Real-Time PCR instrument (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using previously standardized thermal conditions (52°C for 5 minutes, 95°C for 10 seconds, 45 cycles of 10 seconds at 95°C, and 62°C for 30 seconds).

Detection of IL-1 β cytokine release

Supernatants harvested from PMA-stimulated THP1 macrophages, Caco-2 cells or ACE2-A549 cells that were treated with MCC950, depleted for NLRP3 or incubated with COVID-19 patient's serum, and infected as indicated with SARS-CoV-2, or from control uninfected cells were analyzed using ELISA assay for IL-1 β , according to the manufacturers' instructions. IL-1 β secretion from PMA-THP1 was detected using IL-1 beta Human ELISA kit (#KHC0011, ThermoFisher Scientific) and IL-1 beta Human ELISA

kit, High Sensitivity (#BMS224HS, ThermoFisher Scientific) was used for the detection of IL-1 β secretion from epithelial cells.

Cell viability assays

Vero E6 cells and ACE2-A549 cells were pretreated with indicated concentrations of PPADS, OxATP and/or BzATP during 4 hours before infection and infected or not with SARS-CoV-2 BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain with a multiplicity of infection between 1 and 2. Cell viability was determined after 72 hours using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (#M5655, Sigma) following manufacturer's instructions. Cell viability was also performed in uninfected Vero E6 cells, Caco-2 cells, ACE2-A549 cells and primary salivary gland epithelial cells with the same compounds incubated for 48 hours.

Immunohistochemistry

Post-mortem lung specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, incubated in 10 mM sodium citrate, pH 6.0, microwaved for antigen retrieval and treated with 3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase activity. Then, mouse antibodies against NLRP3/NALP3 (#AG-20B-0014, AdipoGen) (1:100), CD68 (#KP-1, Ventana) (prediluted), or double-stranded RNA (#J2-2004, Scicons J2) (1:500) and biotinylated goat anti-mouse IgG (#BA-9200, Vector) were incubated with lung sections. Immuno-reactivities were visualized using avidin-biotin complex-based peroxidase system (#PK-7100, Vector) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) peroxidase (HRP) substrate Kit (#SK-4100, Vector). Lung sections were also stained with hematoxylin and eosin, as previously described (86) and assessed by two independent observers without the knowledge of clinical diagnosis, using a Leica DM2500 LED Optical microscope and a 63x objective.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad). Statistical tests and calculated p values ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, and $****p < 0.0001$) are indicated in each figure and corresponding figure legend.

References

1. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384(5):403-16.
2. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-15.
3. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cardenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(23):2187-201.
4. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(3):229-37.
5. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Moya J, Falci DR, et al. Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *N Engl J Med.* 2021;385(21):1941-50.
6. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(3):238-51.
7. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med.* 2020;383(19):1813-26.
8. Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, Yao W, Kovarova M, Dinnon KH, 3rd, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801. *Nature.* 2021;591(7850):451-7.
9. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med.* 2022;386(6):509-20.
10. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, Abreu P, Bao W, Wisemandle W, et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med.* 2022;386(15):1397-408.
11. Hermine O, Mariette X, Tharaux PL, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P, et al. Effect of Tocilizumab vs Usual Care in Adults Hospitalized With COVID-19 and Moderate or Severe Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2021;181(1):32-40.

12. Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, Tomashek KM, Wolfe CR, Ghazaryan V, et al. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(9):795-807.
13. Heyer A, Günther T, Robitaille A, Lütgehetmann M, Addo MM, Jarczack D, et al. Remdesivir-induced emergence of SAR-CoV2 variants in patients with prolonged infection. *Cell Reports Medicine*. 2022.
14. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(1):3-20.
15. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80 e8.
16. Zang R, Gomez Castro MF, McCune BT, Zeng Q, Rothlauf PW, Sonnek NM, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci Immunol*. 2020;5(47).
17. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(13):7001-3.
18. Hillen HS, Kokic G, Farnung L, Dienemann C, Tegunov D, Cramer P. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature*. 2020;584(7819):154-6.
19. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):523-34.
20. Bouhaddou M, Memon D, Meyer B, White KM, Rezelj VV, Correa Marrero M, et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*. 2020;182(3):685-712 e19.
21. Daniloski Z, Jordan TX, Wessels HH, Hoagland DA, Kasela S, Legut M, et al. Identification of Required Host Factors for SARS-CoV-2 Infection in Human Cells. *Cell*. 2021;184(1):92-105 e16.
22. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):269-70.
23. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463-9.

24. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(12):11245-58.
25. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 2022;375(6585):1122-7.
26. Cassel SL, Sutterwala FS. Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol*. 2010;40(3):607-11.
27. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):477-89.
28. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(3):151-64.
29. Rodrigues TS, de Sa KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med*. 2021;218(3).
30. Sefik E, Qu R, Junqueira C, Kaffe E, Mirza H, Zhao J, et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature*. 2022;606(7914):585-93.
31. Ratajczak MZ, Bujko K, Ciechanowicz A, Sielatycka K, Cymer M, Marlicz W, et al. SARS-CoV-2 Entry Receptor ACE2 Is Expressed on Very Small CD45(-) Precursors of Hematopoietic and Endothelial Cells and in Response to Virus Spike Protein Activates the Nlrp3 Inflammasome. *Stem Cell Rev Rep*. 2020.
32. Shi CS, Nabar NR, Huang NN, Kehrl JH. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discov*. 2019;5:101.
33. Chen IY, Moriyama M, Chang MF, Ichinohe T. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroprotein 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front Microbiol*. 2019;10:50.
34. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(3):177-92.
35. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*. 2004;240:31-304.
36. He Y, Franchi L, Nunez G. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1beta production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J Immunol*. 2013;190(1):334-9.

37. Paoletti A, Allouch A, Caillet M, Saidi H, Subra F, Nardacci R, et al. HIV-1 Envelope Overcomes NLRP3-Mediated Inhibition of F-Actin Polymerization for Viral Entry. *Cell Rep.* 2019;28(13):3381-94 e7.
38. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 2017;47(1):15-31.
39. Seror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saidi H, et al. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2011;208(9):1823-34.
40. Paoletti A, Raza SQ, Voisin L, Law F, Caillet M, Martins I, et al. Editorial: Pannexin-1 - the hidden gatekeeper for HIV-1. *J Leukoc Biol.* 2013;94(3):390-2.
41. Allouch A, Di Primio C, Paoletti A, Le-Bury G, Subra F, Quercioli V, et al. SUGT1 controls susceptibility to HIV-1 infection by stabilizing microtubule plus-ends. *Cell Death Differ.* 2020.
42. Ferrari D, Idzko M, Muller T, Manservigi R, Marconi P. Purinergic Signaling: A New Pharmacological Target Against Viruses? *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(11):926-36.
43. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2020.
44. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell.* 2020;181(5):1016-35 e19.
45. Chu H, Chan JF, Wang Y, Yuen TT, Chai Y, Hou Y, et al. Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2020;71(6):1400-9.
46. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):355-62.
47. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(9):465-72.
48. Ahn JH, Kim J, Hong SP, Choi SY, Yang MJ, Ju YS, et al. Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J Clin Invest.* 2021;131(13).

49. Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH, 3rd, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell*. 2020;182(2):429-46 e14.
50. Santana PT, Martel J, Lai HC, Perfettini JL, Kanellopoulos JM, Young JD, et al. Is the inflammasome relevant for epithelial cell function? *Microbes Infect*. 2016;18(2):93-101.
51. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417- 26.
52. Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell*. 2006;126(4):659-62.
53. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*. 2012;13(4):325-32.
54. Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*. 2006;126(6):1135-45.
55. Paoletti A, Raza SQ, Voisin L, Law F, Pipoli da Fonseca J, Caillet M, et al. Multifaceted roles of purinergic receptors in viral infection. *Microbes Infect*. 2012;14(14):1278-83.
56. Matuck BF, Dolhnikoff M, Duarte-Neto AN, Maia G, Gomes SC, Sendyk DI, et al. Salivary glands are a target for SARS-CoV-2: a source for saliva contamination. *J Pathol*. 2021;254(3):239-43.
57. Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Muench MO, et al. Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *J Virol*. 2010;84(2):1198-205.
58. Sefik E, Israelow B, Mirza H, Zhao J, Qu R, Kaffe E, et al. A humanized mouse model of chronic COVID-19. *Nat Biotechnol*. 2022;40(6):906-20.
59. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(5):270-84.
60. Aymonnier K, Ng J, Fredenburgh LE, Zambrano-Vera K, Munzer P, Gutch S, et al. Inflammasome activation in neutrophils of patients with severe COVID-19. *Blood Adv*. 2022;6(7):2001-13.
61. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*. 2020;58:102925.

62. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med*. 2020;217(12).
63. Kroemer A, Khan K, Plassmeyer M, Alpan O, Haseeb MA, Gupta R, et al. Inflammasome activation and pyroptosis in lymphopenic liver patients with COVID-19. *J Hepatol*. 2020.
64. Junqueira C, Crespo A, Ranjbar S, de Lacerda LB, Lewandrowski M, Ingber J, et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*. 2022;606(7914):576-84.
65. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell*. 2020.
66. Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, Tardif M, Antoine F, Girard D, et al. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-κB(1). *PLoS One*. 2013;8(8):e72138.
67. Basiorka AA, McGraw KL, Eksioglu EA, Chen X, Johnson J, Zhang L, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a driver of the myelodysplastic syndrome phenotype. *Blood*. 2016;128(25):2960-75.
68. Baggen J, Vanstreels E, Jansen S, Daelemans D. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat Microbiol*. 2021;6(10):1219-32.
69. Zeng J, Xie X, Feng XL, Xu L, Han JB, Yu D, et al. Specific inhibition of the NLRP3 inflammasome suppresses immune overactivation and alleviates COVID-19 like pathology in mice. *EBioMedicine*. 2022;75:103803.
70. Lee W, Ahn JH, Park HH, Kim HN, Kim H, Yoo Y, et al. COVID-19-activated SREBP2 disturbs cholesterol biosynthesis and leads to cytokine storm. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):186.
71. Wang R, Simoneau CR, Kulsuptrakul J, Bouhaddou M, Travisano KA, Hayashi JM, et al. Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses. *Cell*. 2021;184(1):106-19 e14.
72. Schneider WM, Luna JM, Hoffmann HH, Sanchez-Rivera FJ, Leal AA, Ashbrook AW, et al. Genome-Scale Identification of SARS-CoV-2 and Pan-coronavirus Host Factor Networks. *Cell*. 2021;184(1):120-32 e14.

73. Stokes L, Layhadi JA, Bibic L, Dhuna K, Fountain SJ. P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology. *Front Pharmacol.* 2017;8:291.
74. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* 2007;72(6):1447-56.
75. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res.* 2020;178:104787.
76. Naggie S, Boulware DR, Lindsell CJ, Stewart TG, Gentile N, Collins S, et al. Effect of Ivermectin vs Placebo on Time to Sustained Recovery in Outpatients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2022;328(16):1595-603.
77. Caricchio R, Abbate A, Gordeev I, Meng J, Hsue PY, Neogi T, et al. Effect of Canakinumab vs Placebo on Survival Without Invasive Mechanical Ventilation in Patients Hospitalized With Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2021;326(3):230-9.
78. Kyriazopoulou E, Poulakou G, Milionis H, Metallidis S, Adamis G, Tsiakos K, et al. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. *Nat Med.* 2021;27(10):1752-60.
79. group C-C. Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2021;9(3):295-304.
80. Wu Q, Allouch A, Paoletti A, Leteur C, Mirjolet C, Martins I, et al. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy. *Cell Death Differ.* 2017;24(9):1632-44.
81. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(1):21-30.
82. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020;583(7816):459-68.
83. Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4204-9.

84. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. 2014;11(8):783-4.
85. Allouch A, Voisin L, Zhang Y, Raza SQ, Lecluse Y, Calvo J, et al. CDKN1A is a target for phagocytosis-mediated cellular immunotherapy in acute leukemia. *Nat Commun*. 2022;13(1):6739.
86. Falasca L, Nardacci R, Colombo D, Lalle E, Di Caro A, Nicastri E, et al. Post-Mortem Findings in Italian Patients with COVID-19 - a Descriptive Full Autopsy Study of cases with and without co-morbidities. *J Infect Dis*. 2020.
87. Hanley B, Lucas SB, Youd E, Swift B, Osborn M. Autopsy in suspected COVID-19 cases. *J Clin Pathol*. 2020;73(5):239-42.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge NH TherAguix and ENS Paris-Saclay for supporting our effort against COVID-19 pandemic, Dr. F. Griscelli and Dr. E. Gallois from Biology and Pathology department at Gustave Roussy hospital, Y. Lecluse and S. Salome-Desnoullez from Gustave Roussy's imaging and cytometry platform (PFIC) for their technical support. We thank the staff of the animal facility of IDMIT, particularly B. Delache, M. Pottier, S. Langlois, JM. Robert and F. Relouzat.

Conflict of interest

Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Awatef Allouch, Frédéric Subra, Olivier Delelis and Jean-Luc Perfettini are listed as co-inventors on a patent application related to SARS-CoV-2 therapy. Angelo Paci and Jean-Luc Perfettini are founding members of Findimmune SAS, an Immuno-Oncology Biotech company. Jean-Luc Perfettini disclosed research funding not related to this work from NH TherAguix and Wonna Therapeutics. Nathalie Chaput disclosed research funding not related to this work from GlaxoSmithKline, Roche, Cytune pharma and Sanofi.

Author contribution

Jean-Luc Perfettini provided financial support. Jean-Luc Perfettini designed and conducted the study. Déborah Lécuyer, Roberta Nardacci, Désirée Tannous, Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva-Nathan, Frédéric Subra, Cristina Di Primio, Paola Quaranta, Vanessa Petit, Clémence Richetta, Ali Mostefa-Kara, Franca Del Nonno, Laura Falasca, Romain Marlin, Pauline Maisonnasse, Julia Delahousse, Juliette Pascaud, Marie Naigeon, Olivier Delelis and Awatef Allouch performed experiments. Xavier Mariette provided cultures of salivary gland epithelial cells. Déborah Lécuyer, Roberta Nardacci, Désirée Tannous, Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva-Nathan, Frédéric Subra, Cristina Di Primio, Paola Quaranta, Vanessa Petit, Ali Mostefa-Kara, Franca Del Nonno, Laura Falasca, Eric Deprez, Nathalie Chaput, Angelo Paci, Véronique Saada, David Ghez, Xavier Mariette, Mario Costa, Mauro Pistello, Awatef Allouch, Olivier Delelis, Mauro Piacentini, Roger Le Grand and Jean-Luc Perfettini analyzed the results. Déborah Lécuyer, Aurélia Deva-Nathan, Emie Gutierrez-Mateyron and Désirée Tannous assembled the figures. Déborah Lécuyer, Awatef Allouch, Frédéric Subra and Jean-Luc Perfettini wrote the initial draft. Roberta Nardacci, Cristina Di Primio, Paola Quaranta, Vanessa Petit, Eric Deprez, Nathalie Chaput, Angelo Paci, Véronique Saada, David Ghez,

Xavier Mariette, Mario Costa, Mauro Pistello, Olivier Delelis, Mauro Piacentini and Roger Le Grand provided advice and edited the initial draft.

Ethics

This non-interventional study received approval by the institutional review board of the National Institute for Infectious Disease « Lazzaro Spallanzani » and following the principles stated in the Declaration of Helsinki. Human autopsies were performed at the National Institute for Infectious Diseases Lazzaro Spallanzani-IRCCS Hospital (Rome, Italy) according to guidance for post-mortem collection and submission of specimens and biosafety practices (CDC March 2020, Interim Guidance and (87)) to reduce the risk of transmission of infectious pathogens during and after the post-mortem examination. Autopsies were performed in accordance with the law owing to the unknown cause of death, and to both scientific and public interest in a pandemic novel disease. No informed consent was obtained from the families. All performed procedures and investigations were in accordance with the ethical standards of the Institutional Review Board of Lazzaro Spallanzani National Institute for Infectious Disease (Ethics Committee Approval number: n° 9/2020).

Funding

This work was supported by funds from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-IBHU- 0001, ANR-10-LABX33, ANR-11-IDEX-003-01 and ANR Flash COVID-19 "MacCOV"), Fondation de France (alliance "tous unis contre le virus"), Electricité de France, Fondation Gustave Roussy, Institut National du Cancer (INCa 9414 and INCa 16087), The SIRIC Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE), Fédération Hopitalo-Universitaire (FHU) CARE (Cancer and Autoimmunity Relationships) (directed by X. Mariette, Hôpital Bicêtre, AP-HP) and Université Paris-Saclay (to Jean-Luc Perfettini), MIUR (PRIN 2012 and FIRB), the ministry of Health of Italy "Ricerca Corrente" and "Ricerca Finalizzata" (COVID-2020-12371817 and COVID-2020-12371675) (to Mauro Piacentini), REACTing and the Fondation pour la Recherche Médicale (AM-CoV-Path program) (to Roger Le Grand). We thank the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM, Paris, France) "One Health" and "Immunothérapies, auto-immunité et Cancer" (ITAC) for its support. The Infectious Disease Models and Innovative Therapies research infrastructure (IDMIT) is supported by the "Programmes Investissements d'Avenir" (PIA), managed by the ANR under references ANR-11-INBS-0008 and ANR-10-EQPX-02-01. Déborah Lécuyer and Désirée Tannous are recipients

of PhD fellowships from LabEx LERMIT and Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Cifre#2019/0639), respectively. Aurélia Deva- Nathan and Emie Gutierrez-Mateyron are recipient of PhD fellowships from French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. Ali Mostefa-Kara is recipient of PhD fellowship from Ecole et Loisir.

Availability of Data and Materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Figure legends

Fig. 1 Pathological changes and NLRP3 expression in the lungs of COVID-19 patients with severe disease. **A** Parenchymal damage (with inflammation and fibrous proliferative phase) and hyperplastic amphophilic type II pneumocytes are detected in COVID-19 patients as compared to non-COVID-19 patients (insert). Hematoxylin and eosin staining is shown (bars, 22 μm and 50 μm). **B** NLRP3 expression is detected into alveolar septa and lumen in both COVID-19 and non-COVID-19 patients (bars, 45 μm and 50 μm). **C** Type II pneumocytes with cytoplasmic NLRP3 expression (bar, 3 μm). **D** NLRP3 positive alveolar macrophage in lumen (bar, 3 μm). **E-G** Syncytium detected on COVID-19 patients express macrophage marker CD68 (**E**) (bars, 8 μm and 3 μm), NLRP3 (**F**) (bars, 8 μm and 3 μm) and cytoplasmic double strand RNA, indicative of viral infection (**G**) (bars, 12 μm and 4 μm). Positive stainings (brown) for NLRP3, CD68 or double strand RNA are shown in **B-G**. Magnifications are shown in **E-G**.

Fig. 2 SARS-CoV-2 infection induces NLRP3 inflammasome activation independently of P2X7 in macrophages. **A-F** PMA-differentiated THP1 cells were infected with SARS-CoV-2 for 24 hours at indicated multiplicity of infection (MOI) (**A**) or during indicated hours post-infection (Hpi) (MOI = 0.2) (**B**) and evaluated for Spike (S), NLRP3 and β -actin expression (**A, B**) or IL-1 β secretion (**E, F**). Representative images (bars, 20 μm and 10 μm , from left to right) (**C**) and percentages (**D**) of control or PMA-differentiated THP1 cells infected for 24 hours (MOI = 0.2), with ASC speck formation (ASC⁺) are shown. DNA is detected using Hoechst 33342. (**C, D**). **G-J** PMA-differentiated THP1 cells that were incubated with the NLRP3 inflammasome inhibitor, MCC950 (20 μM) (**G, I**), and PMA-differentiated, control (CrCo.) or NLRP3-depleted (CrNLRP3) THP1 cells (**H, J**) were infected with SARS-CoV-2 for 24 hours (MOI = 0.2) and evaluated for NLRP3 and β -actin expression (**G, H**) or IL-1 β secretion (**I, J**). **K, L** PMA-differentiated THP1 cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2) for 24 hours, in presence of control vehicle, the P2X7 inhibitor OxATP, or the P2X7 activator BzATP, and evaluated for NLRP3 and β -actin expression (**K**) or IL-1 β secretion (**L**). In (**A**), the asterisk (*) is indicating a non-specific band. Data are presented as means \pm SEM from at least 3 independent experiments. p values (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 and **** p < 0.0001) were determined using unpaired t-test (**D**) and one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (**E, F, I, J** and **L**).

Fig. 3 NLRP3 inflammasome activation dictates permissiveness of epithelial cells to SARS-CoV-2 infection. **A-D** Caco-2 (**A, B**) or ACE2-A549 (**C, D**) cells were infected

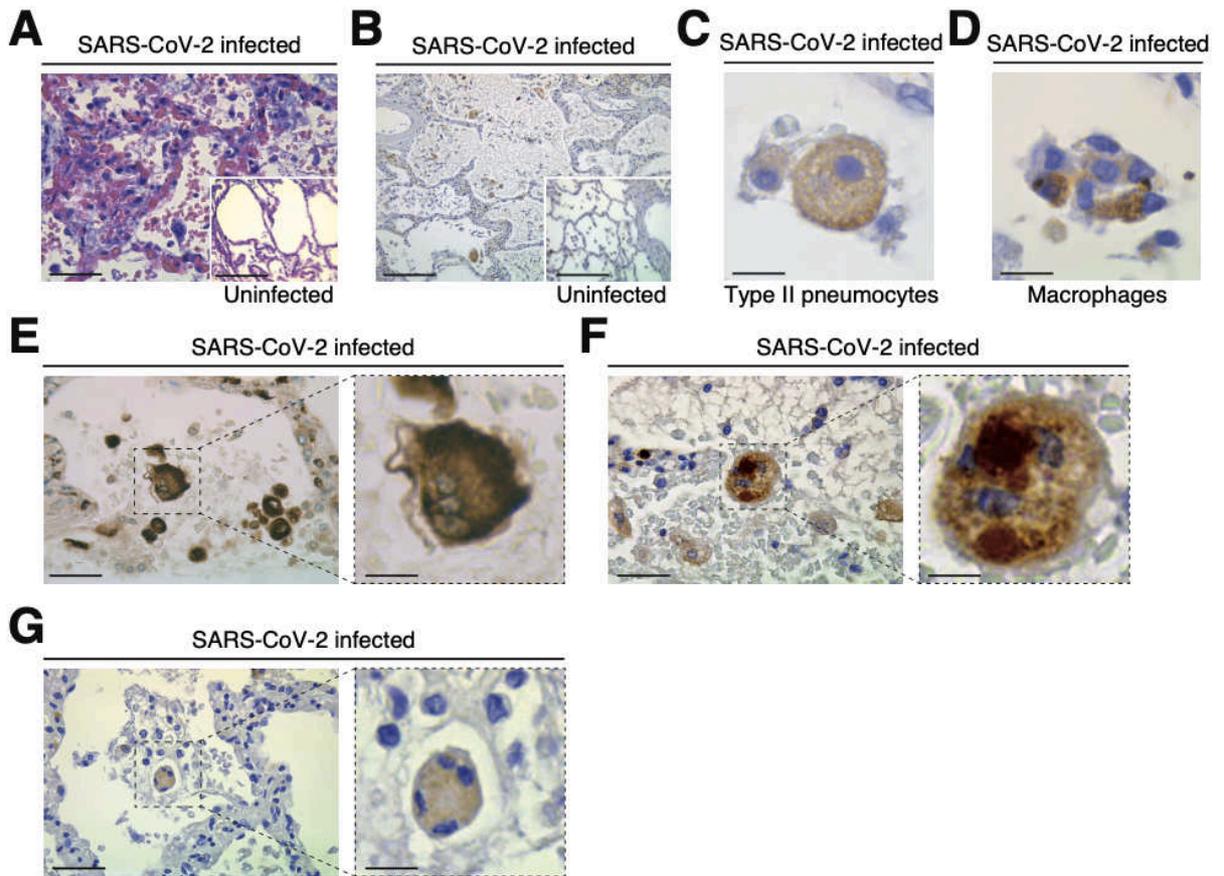
with SARS-CoV-2 for 48 hours at indicated MOI (**A, C**) or during indicated hours post-infection (hpi) (MOI = 4) (**B, D**) and IL-1 β secretion was monitored. **E** ACE2-A549 cells were infected during 48 hours with SARS-CoV-2 or with SARS-CoV-2 neutralized with convalescent COVID-19 patient serum. IL-1 β secretion was then monitored. **F, G** Caco-2 (**F**) and ACE2- A549 (**G**) cells were infected (or not) with SARS-CoV-2 (MOI = 2) during 48 hours in presence of indicated concentrations of Tranilast and evaluated for Spike (S) and β -actin expressions. **H, I** Caco-2 (**H**) or ACE2-A549 (**I**) cells were infected for 48 hours with SARS- CoV-2 (MOI = 0.2) in presence of 100 μ M Tranilast, and analyzed for SARS-CoV-2 E RNA expression using quantitative RT-PCR. Fold changes (FC) are indicated. **J, K** ACE2-A549 cells were infected for 48 hours with SARS-CoV-2 (MOI = 2) in presence of 20 μ M MCC950, 100 μ M Tranilast or with SARS-CoV-2 neutralized with convalescent COVID-19 patient serum and analyzed for spike (S) expression by fluorescence microscopy. Representative images (bar, 20 μ m) (**J**) and percentages of spike (S)-positive (S^+) cells (**K**) are shown. DNA is detected using Hoechst 33342. **L-O** Caco-2 (**L, M**) or ACE2-A549 (**N, O**) cells were subjected to siRNA against NLRP3 for 48 hours and analyzed for NLRP3 mRNA expression (**L, N**) or infected with SARS-CoV-2 for 48 hours and evaluated for SARS-CoV-2 RdRp RNA expression, by quantitative RT-PCR (**M, O**). RT-PCR samples were first normalized by β -actin mRNA level in each sample, and then normalized to the control condition. The data are presented as means \pm SEM from at least 3 independent experiments. *p* values ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ and $****p < 0.0001$) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (**A-E** and **K**) and unpaired t-test (**H, I** and **L-O**).

Fig. 4 Caspase-1 activity regulates SARS-CoV-2 replication. **A-D** Caco-2 (**A, C**) or ACE2- A549 (**B, D**) were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 2) in presence 50 μ M of caspase-1 inhibitor, Ac-YVAD-cmk (YVAD), for 48 hours and analyzed for spike (S) expression by fluorescence microscopy. Representative images (bar, 20 μ m) (**A, B**) and percentages of spike (S)-positive (S^+) cells (**C, D**) are shown. DNA is detected using Hoechst 33342. **E-H** Caco-2 (**E, F**) and ACE2-A549 (**G, H**) were treated with siRNA against caspase-1 (CASP-1) for 48 hours and analyzed for CASP-1 mRNA quantification by RT-PCR (**E, G**), or infected with SARS-CoV-2 at MOI = 0.2 (**F**) or MOI = 2 (**H**) during 48 hours, and analyzed for SARS- CoV-2 RdRp RNA expression by quantitative RT-PCR (**F**) or for spike (S) and β -actin expressions (**H**). The data are presented as means \pm SEM from at least 3 independent experiments. *p* values ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ and $****p < 0.0001$) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (**C, D**) and unpaired t- test (**E-G**).

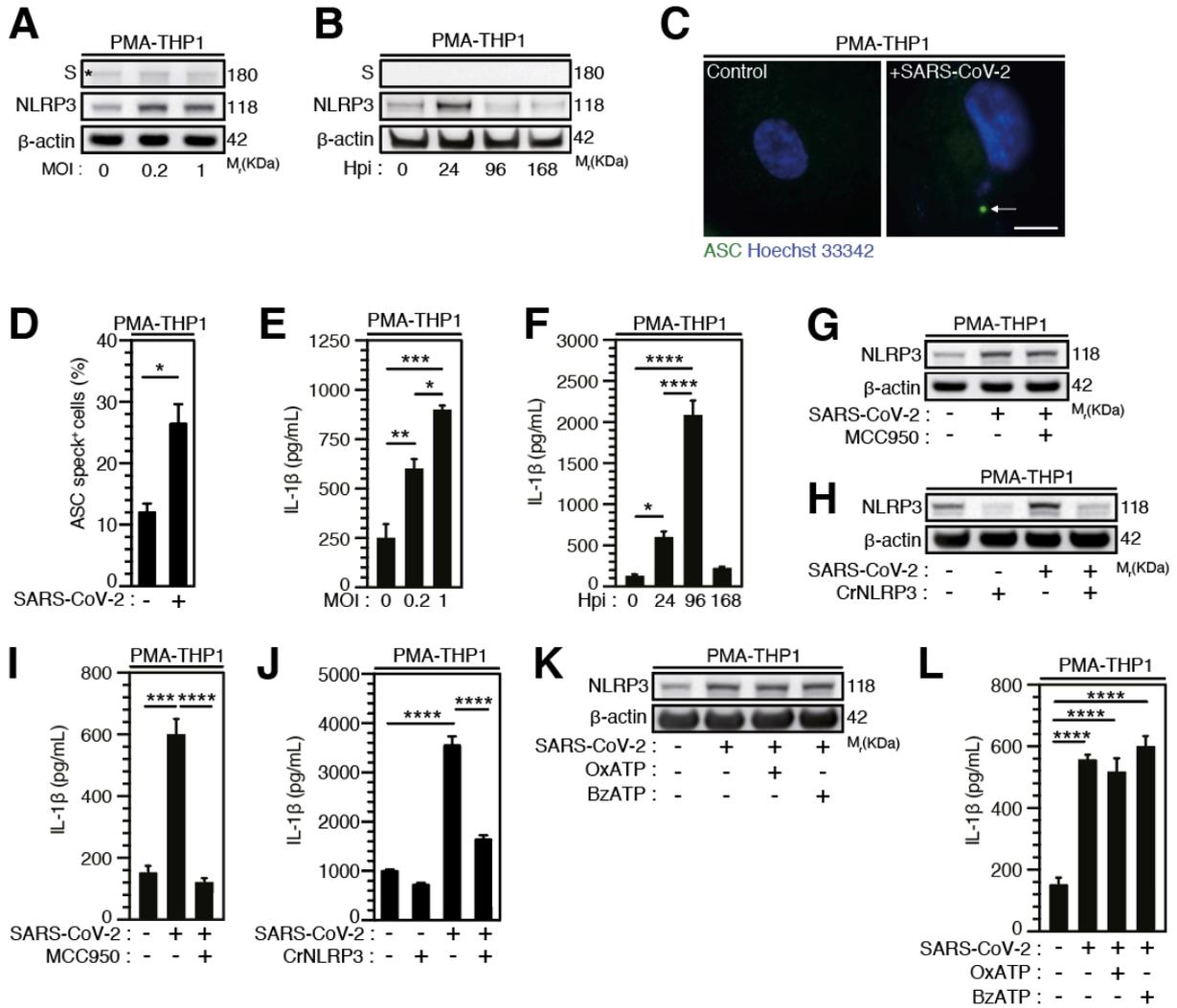
Fig. 5 Purinergic receptor P2X7 modulates SARS-CoV-2 replication through NLRP3 inflammasome activation. **A-D** Vero E6 (**A, C**) or ACE2-A549 (**B, D**) cells were infected with SARS-CoV-2 at MOI = 0.1 for 24 hours (**A, C**) or at MOI = 2 for 48 hours (**B, D**), with 10 μ M OxATP and 50 μ M PPADS (**A, C**) or with 100 μ M OxATP and 100 μ M BzATP (**B, D**) and analyzed for spike (S) expression by fluorescence microscopy. Representative images (bar, 20 μ m) (**A, B**) and percentages of spike (S)-positive (S⁺) cells (**C, D**) are shown. DNA is detected using Hoechst 33342. **E** ACE2-A549 cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2) for 48 hours in presence of 100 μ M OxATP and analyzed for SARS-CoV-2 E RNA expression by quantitative RT-PCR. **F** ACE2-A549 cells were treated with siRNA against P2X7 for 48 hours and analyzed for spike (S), P2X7 and β -actin expression. **G** ACE2-A549 cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2) for 48 hours in presence of 100 μ M BzATP and analyzed for SARS-CoV-2 E RNA expression by quantitative RT-PCR. **H** Primary salivary gland epithelial cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.5) for 48 hours in presence of 100 μ M OxATP and analyzed for SARS-CoV-2 RdRp RNA expression by quantitative RT-PCR. **I** Huh7 cells were infected with SARS-CoV-2 Alpha variant in presence of 100 μ M OxATP for 48 hours. Then, the viral yielding was determined by detecting RdRp RNA expression by quantitative RT-PCR in the supernatant (SN) of control and SARS-CoV-2 Alpha variant infected Huh7 cells. Fold changes (FC) are indicated in (**E**) and (**G-I**). **J** ACE2-A549 cells were infected with SARS-CoV-2 during 48 hours (MOI = 2) in presence of control, 50 or 100 μ M BzATP, 100 μ M Tranilast, or the combination of either 50 μ M BzATP and 100 μ M Tranilast or 100 μ M BzATP and 100 μ M Tranilast, and analyzed for spike (S) and β -actin expression. All experiments are representative of at least 3 independent experiments. The data are presented as means \pm SEM from at least 3 independent experiments. *p* values (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 and *****p* < 0.0001) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (**C, D**) and unpaired t- test (**E, G-I**).

Fig. 6 Purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome control SARS-CoV-2 replication without affecting viral entry. **A-H** ACE2-TMPRSS2-A549 (**A-G**) or Vero E6 (**H**) cells were incubated during 4 hours with control (**A, B**), 100 μ M OxATP (**C**), 100 μ M BzATP (**D**), and infected for 48 hours (**B-F**) or 4 hours (**G, H**) with green fluorescent protein (GFP)-tagged HIV-1NL4-3 Δ Env variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-GFP-LV) or convalescent COVID-19 serum neutralized S-GFP-LV (**E-H**), and analyzed for GFP fluorescence by flow cytometry (**A-F**) or for intracellular HIV-1 CAp24 capsid and β -actin expression (**G, H**). Representative flow cytometry analysis (**A-E**) and percentages of GFP⁺ cells (**F**) are shown. **I-P** ACE2-TMPRSS2-A549 (**I-O**) or ACE2-A549 (**P**) cells were incubated during 4 hours with

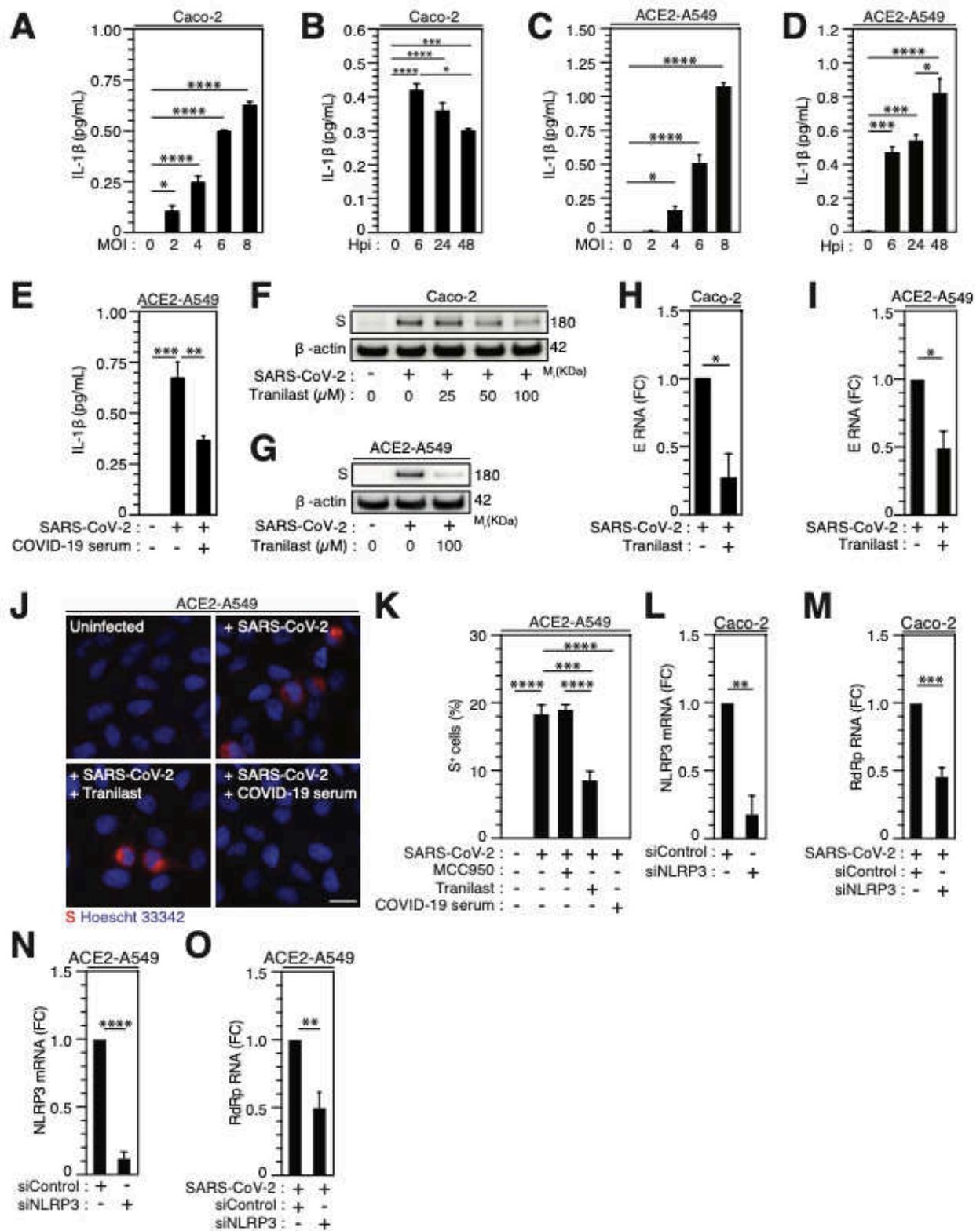
control (**I, J**), 100 μ M Tranilast (**K**) or 100 μ M YVAD (**L**) and infected for 48 hours (**J-L**) or 4 hours (**O, P**) with S-GFP-LV (**J-L, N-P**) or with convalescent COVID-19 serum neutralized S- GFP-LV (**M, N**). Then, cells were analyzed for GFP fluorescence by flow cytometry (**I-N**) or for intracellular HIV-1 CAp24 capsid and β -actin expression (**O, P**). Representative flow cytometry analysis (**I-M**) and percentages of GFP⁺ cells (**N**) are shown. In (**P**), the asterisk (*) is indicating a non-specific band. The data are presented as means \pm SEM from at least 3 independent experiments. *p* values (*****p* < 0.0001) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (**F, N**).



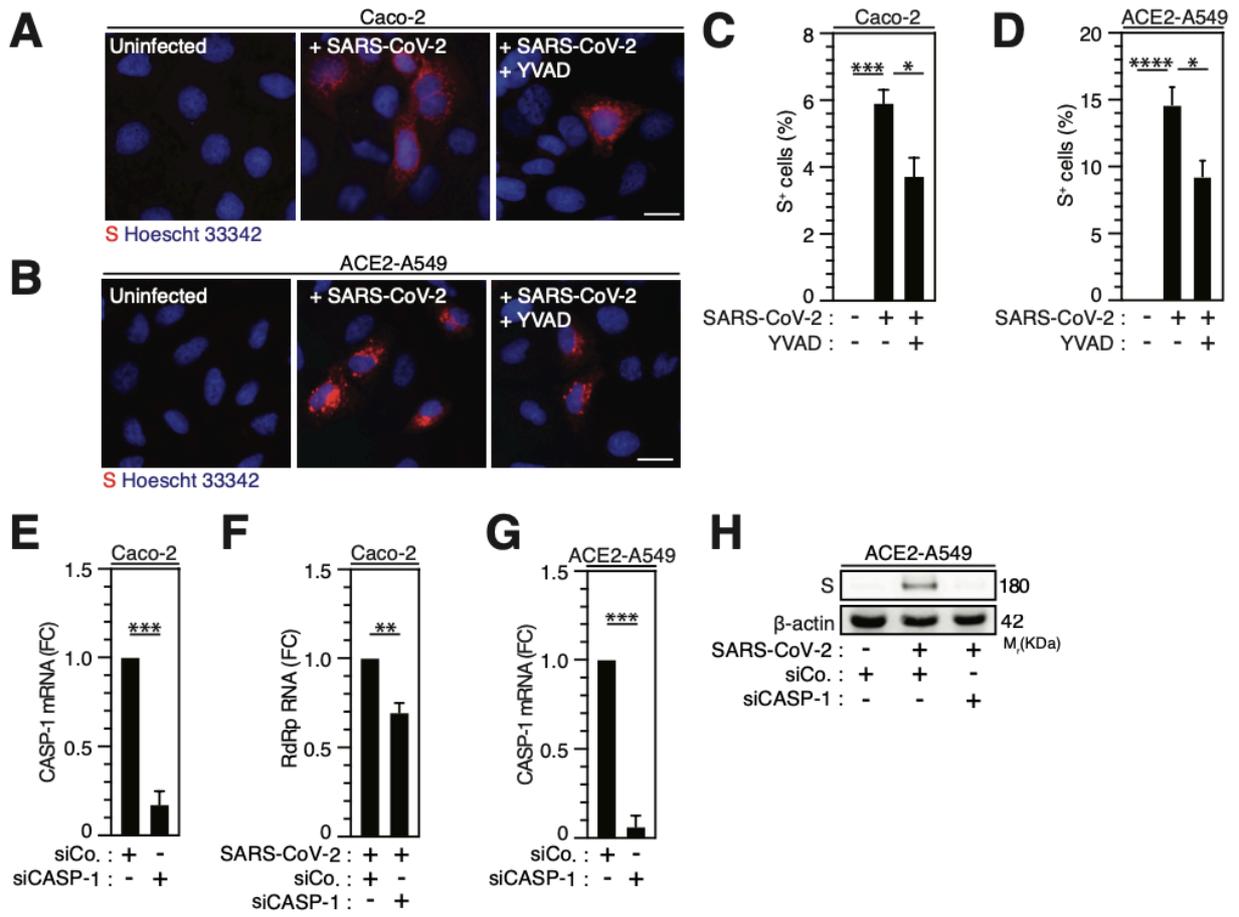
LECUYER#1



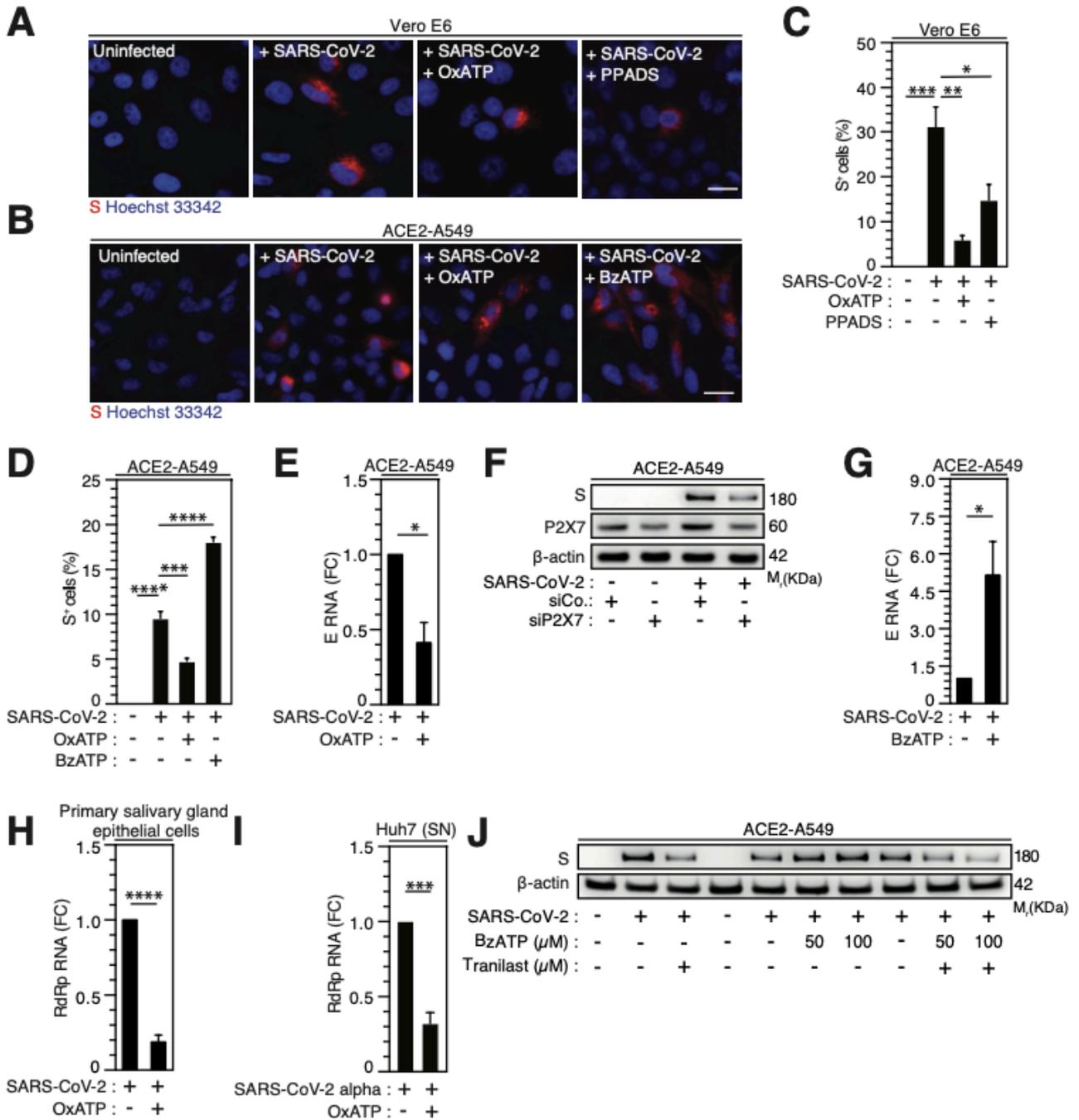
LECUYER#2



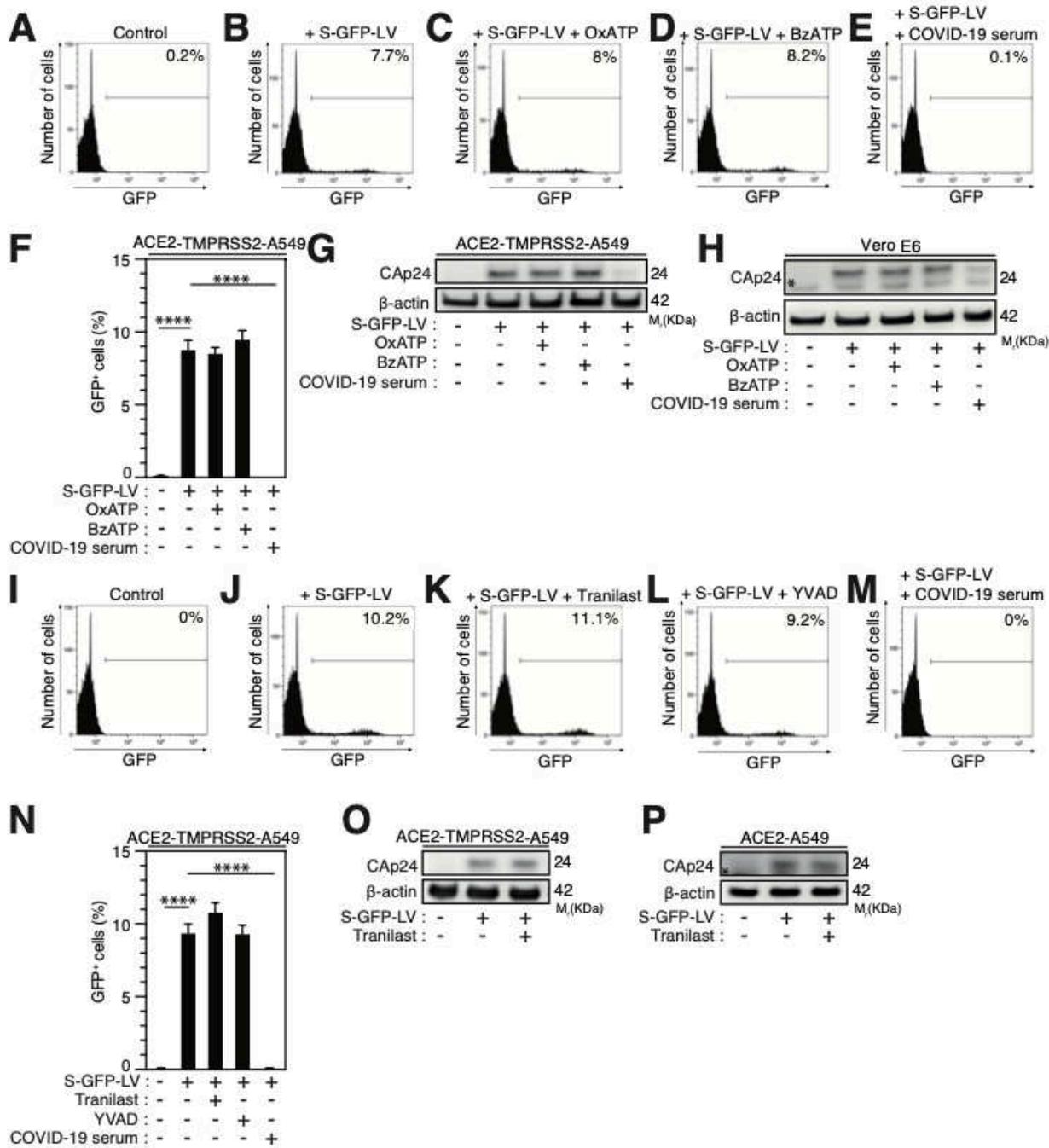
LECUYER#3



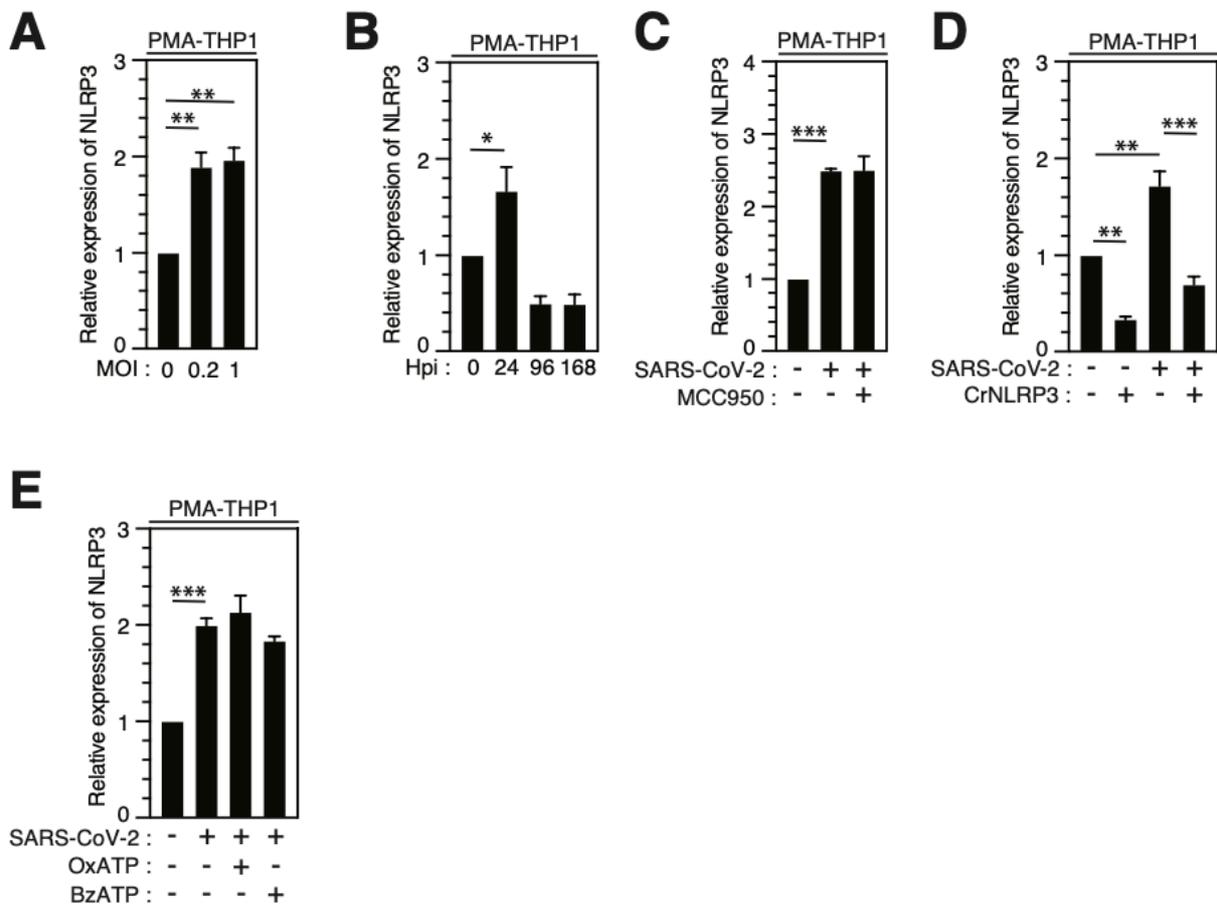
LECUYER#4



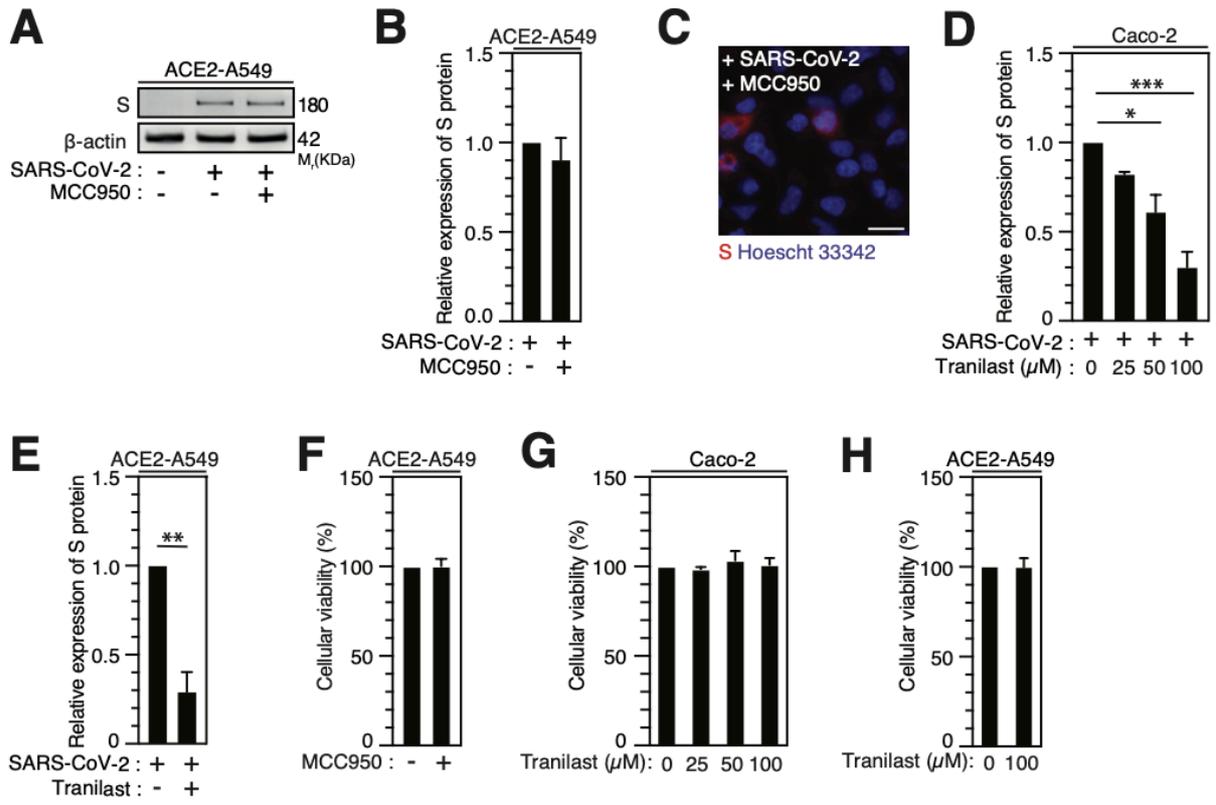
LECUYER#5



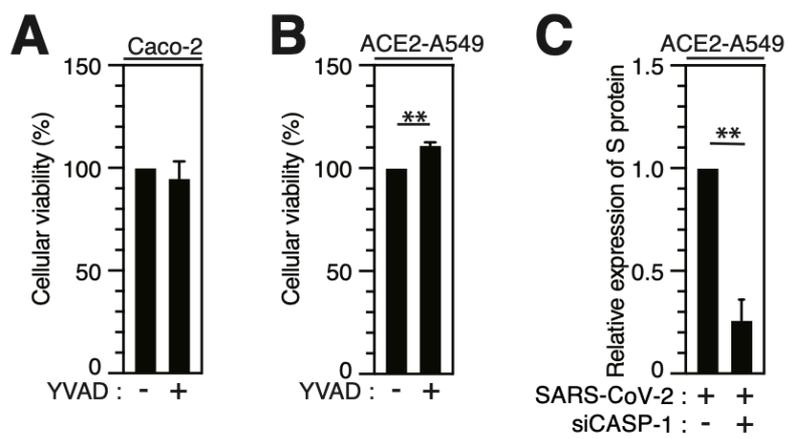
LECUYER#6



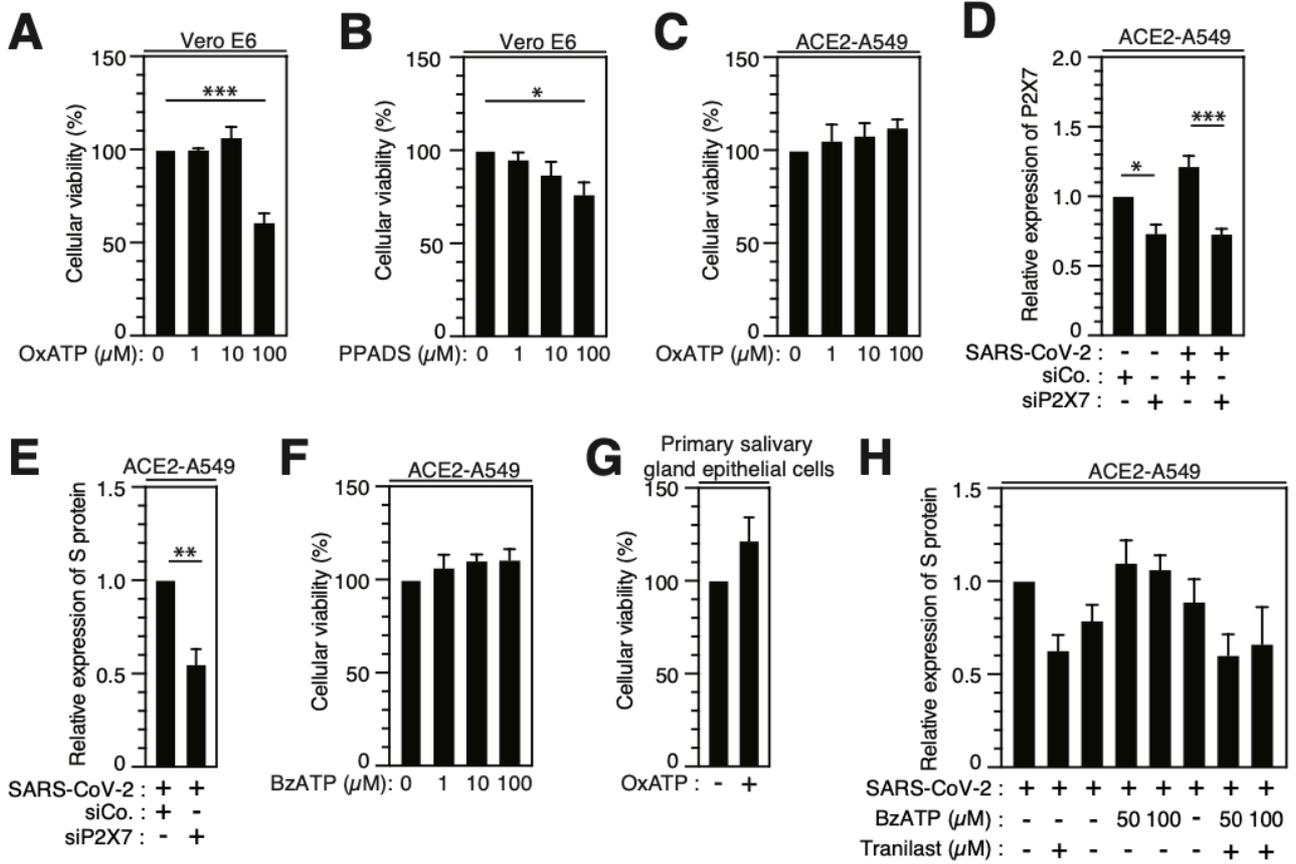
LECUYER#S1



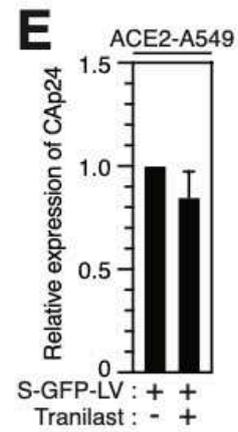
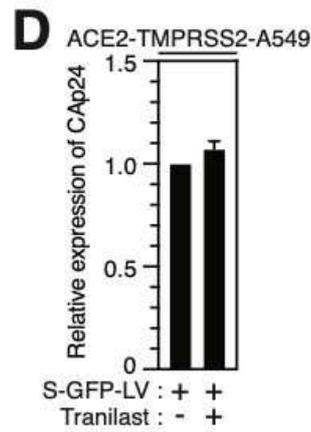
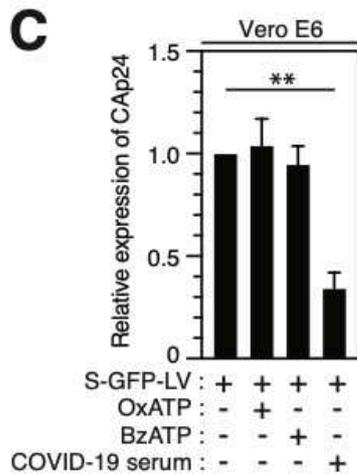
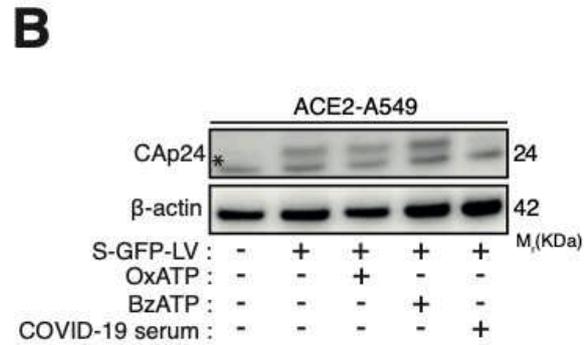
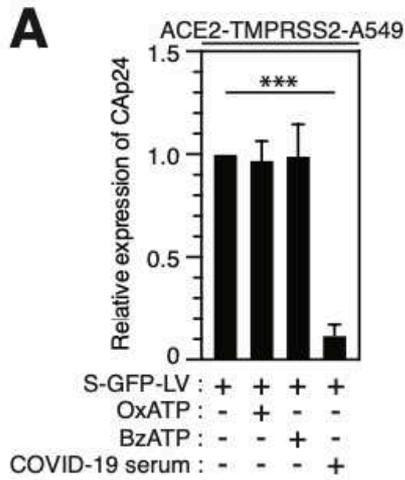
LECUYER#S2



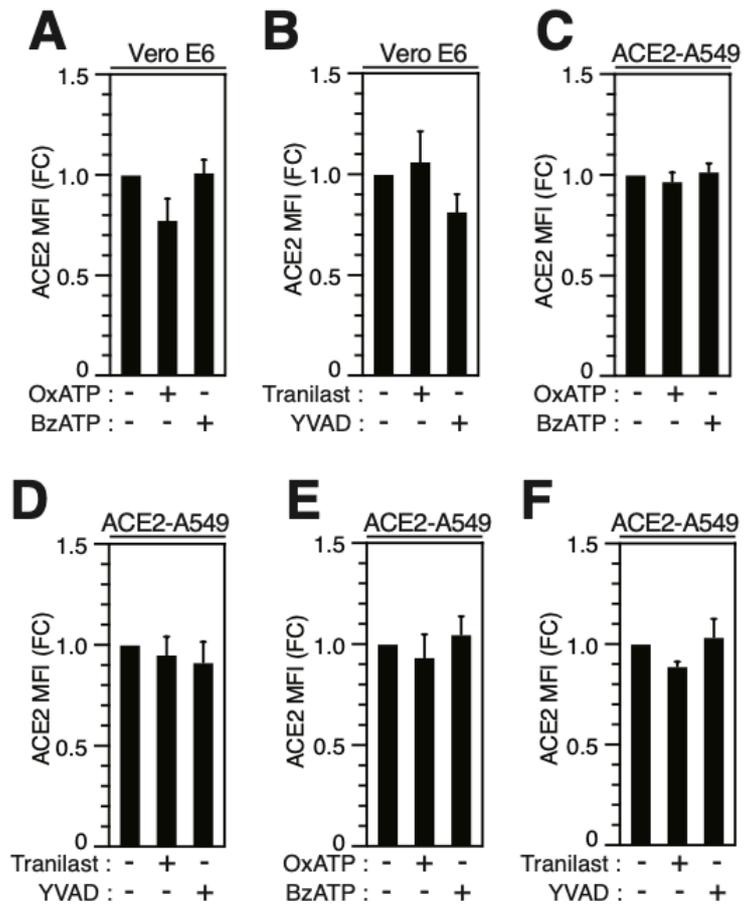
LECUYER#S3



LECUYER#S4



LECUYER#S5



LECUYER#S6

Références bibliographiques

- [1] Jamilloux Y, Henry T. Les inflammasomes - Plates-formes de l'immunité innée. *médecine/sciences* 2013;29:975–84. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132911013>.
- [2] The human inflammasomes. *Mol Aspects Med* 2022;88:101100. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101100>.
- [3] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Mol Cell* 2002;10:417–26. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3).
- [4] Downs KP, Nguyen H, Dorfleutner A, Stehlik C. An overview of the non-canonical inflammasome. *Mol Aspects Med* 2020;76:100924. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100924>.
- [5] Pandey A, Shen C, Feng S, Man SM. Cell biology of inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 2021;31:924–39. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.06.010>.
- [6] Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015;526:660–5. <https://doi.org/10.1038/nature15514>.
- [7] Vanaja SK, Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol* 2015;25:308–15. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.009>.
- [8] Malik A, Kanneganti T-D. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J Cell Sci* 2017;130:3955–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.207365>.
- [9] Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>.
- [10] Jacobs SR, Damania B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. *J Leukoc Biol* 2012;92:469–77. <https://doi.org/10.1189/jlb.0312132>.
- [11] Jamilloux Y, Sève P, Henry T. Les inflammasomes et les maladies humaines. *Rev Médecine Interne* 2014;35:730–41. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2014.04.017>.
- [12] Gavrilin MA, Abdelaziz DHA, Mostafa M, Abdulrahman BA, Grandhi J, Akhter A, et al. Activation of the Pyrin Inflammasome by Intracellular Burkholderia cenocepacia. *J Immunol* 2012;188:3469–77. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102272>.
- [13] Ball DP, Taabazuig CY, Griswold AR, Orth EL, Rao SD, Kotliar IB, et al. Caspase-1 interdomain linker cleavage is required for pyroptosis. *Life Sci Alliance* 2020;3:e202000664. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000664>.
- [14] Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 2014;156:1193–206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008>.
- [15] Gros Lambert M, Py BF. NLRP3, un inflammasome sous contrôle. *médecine/sciences* 2018;34:47–53. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183401013>.
- [16] Heim VJ, Stafford CA, Nachbur U. NOD Signaling and Cell Death. *Front Cell Dev Biol* 2019;7.
- [17] Motta V, Soares F, Sun T, Philpott DJ. NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. *Physiol Rev* 2015;95:149–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2014>.
- [18] Lei-Leston AC, Murphy AG, Maloy KJ. Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. *Front Immunol* 2017;8.
- [19] Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Regulation of immune pathways by the NOD-like receptor NLRC5. *Immunobiology* 2012;217:13–6. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.08.011>.
- [20] Sun D, Xu J, Zhang W, Song C, Gao C, He Y, et al. Negative regulator NLRC3: Its potential role and regulatory mechanism in immune response and immune-related diseases. *Front Immunol* 2022;13:1012459. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1012459>.
- [21] Liu M, Liu K, Cheng D, Zheng B, Li S, Mo Z. The regulatory role of NLRX1 in innate immunity and human disease. *Cytokine* 2022;160:156055. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.156055>.
- [22] Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J* 2016;57:5. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>.
- [23] Tenthorey JL, Kofoed EM, Daugherty MD, Malik HS, Vance RE. Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Mol Cell* 2014;54:17–29.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.018>.

- [24] Zhao Y, Shi J, Shi X, Wang Y, Wang F, Shao F. Genetic functions of the NAIP family of inflammasome receptors for bacterial ligands in mice. *J Exp Med* 2016;213:647–56. <https://doi.org/10.1084/jem.20160006>.
- [25] Schneider M, Zimmermann AG, Roberts RA, Zhang L, Swanson KV, Wen H, et al. The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF- κ B. *Nat Immunol* 2012;13:823–31. <https://doi.org/10.1038/ni.2378>.
- [26] Chen L, Cao S, Lin Z, He S, Zuo J. NOD-like receptors in autoimmune diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2021;42:1742–56. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00603-2>.
- [27] Goldberger A, Hnilica LS, Casey SB, Briggs RC. Properties of a nuclear protein marker of human myeloid cell differentiation. *J Biol Chem* 1986;261:4726–31.
- [28] Schattgen SA, Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunol Rev* 2011;243:109–18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01053.x>.
- [29] Cagliani R, Forni D, Biasin M, Comabella M, Guerini FR, Riva S, et al. Ancient and Recent Selective Pressures Shaped Genetic Diversity at AIM2-Like Nucleic Acid Sensors. *Genome Biol Evol* 2014;6:830–45. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu066>.
- [30] Tupik JD, Markov Madanick JW, Ivester HM, Allen IC. Detecting DNA: An Overview of DNA Recognition by Inflammasomes and Protection against Bacterial Respiratory Infections. *Cells* 2022;11:1681. <https://doi.org/10.3390/cells11101681>.
- [31] Chen PA, Shrivastava G, Balcom EF, McKenzie BA, Fernandes J, Branton WG, et al. Absent in melanoma 2 regulates tumor cell proliferation in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2019;144:265–73. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03230-y>.
- [32] Wang S, Bai J. Functions and roles of IFIX, a member of the human HIN-200 family, in human diseases. *Mol Cell Biochem* 2022;477:771–80. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04297-w>.
- [33] Bae JH, Jo S, Kim SJ, Lee JM, Jeong JH, Kang JS, et al. Circulating Cell-Free mtDNA Contributes to AIM2 Inflammasome-Mediated Chronic Inflammation in Patients with Type 2 Diabetes. *Cells* 2019;8:328. <https://doi.org/10.3390/cells8040328>.
- [34] Xu L, Zhou J, Che J, Wang H, Yang W, Zhou W, et al. Mitochondrial DNA enables AIM2 inflammasome activation and hepatocyte pyroptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2021;320:G1034–44. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00431.2020>.
- [35] Karki R, Man SM, Kanneganti T-D. Inflammasomes and Cancer. *Cancer Immunol Res* 2017;5:94–9. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0269>.
- [36] Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* 2020;20:537–51. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>.
- [37] Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 β production. *Nat Immunol* 2010;11:63–9. <https://doi.org/10.1038/ni.1824>.
- [38] Radzikowska U, Eljaszewicz A, Tan G, Stocker N, Heider A, Westermann P, et al. Rhinovirus-induced epithelial RIG-I inflammasome suppresses antiviral immunity and promotes inflammation in asthma and COVID-19. *Nat Commun* 2023;14:2329. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37470-4>.
- [39] Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur J Immunol* 2018;48:230–8. <https://doi.org/10.1002/eji.201746947>.
- [40] Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL, Aksentijevich I. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Front Immunol* 2019;10:1745. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01745>.
- [41] Ozato K, Shin D-M, Chang T-H, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:849–60. <https://doi.org/10.1038/nri2413>.
- [42] Bernot A. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 1998;7:1317–25. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.8.1317>.
- [43] Gavrilin MA, Abdelaziz DHA, Mostafa M, Abdulrahman BA, Grandhi J, Akhter A, et al. Activation of the Pyrin Inflammasome by Intracellular Burkholderia cenocepacia. *J Immunol* 2012;188:3469–77. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102272>.
- [44] Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 2014;513:237–41. <https://doi.org/10.1038/nature13449>.
- [45] Gao W, Yang J, Liu W, Wang Y, Shao F. Site-specific phosphorylation and microtubule

- dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E4857–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601700113>.
- [46] Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin Inflammasome Activation and RhoA Signaling in the Autoinflammatory Diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol* 2016;17:914–21. <https://doi.org/10.1038/ni.3457>.
- [47] Clark KM, Pal P, Kim JG, Wang Q, Shan L. The CARD8 inflammasome in HIV infection. *Adv. Immunol.*, vol. 157, Elsevier; 2023, p. 59–100. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2022.11.001>.
- [48] Wang Q, Gao H, Clark KM, Mugisha CS, Davis K, Tang JP, et al. CARD8 is an inflammasome sensor for HIV-1 protease activity. *Science* 2021;371:eabe1707. <https://doi.org/10.1126/science.abe1707>.
- [49] Taabazuing CY, Griswold AR, Bachovchin DA. The NLRP1 and CARD8 inflammasomes. *Immunol Rev* 2020;297:13–25. <https://doi.org/10.1111/imr.12884>.
- [50] Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, Matsuzawa S, Kim H, Okada K, et al. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J Biol Chem* 2001;276:32220–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100433200>.
- [51] Hoss F, Rodriguez-Alcazar JF, Latz E. Assembly and regulation of ASC specks. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:1211–29. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2396-6>.
- [52] Li Y, Jiang Q. Uncoupled pyroptosis and IL-1 β secretion downstream of inflammasome signaling. *Front Immunol* 2023;14:1128358. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1128358>.
- [53] Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM. TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers. *Cancer Res* 2000;60:6236–42.
- [54] Daussy CF, Monard SC, Guy C, Muñoz-González S, Chazal M, Anthonsen MW, et al. The Inflammasome Components NLRP3 and ASC Act in Concert with IRGM To Rearrange the Golgi Apparatus during Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 2021;95:e00826-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00826-20>.
- [55] Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC). *J Immunol Baltim Md* 1950 2009;182:3173–82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802367>.
- [56] Knight ERW, Patel EY, Flowers CA, Crowther AJ, Ting JP, Miller CR, et al. ASC deficiency suppresses proliferation and prevents medulloblastoma incidence. *Oncogene* 2015;34:394–402. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.577>.
- [57] Koizumi M, Watanabe T, Masumoto J, Sunago K, Imamura Y, Kanemitsu K, et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD regulates the growth of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* 2021;11:22351. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01465-2>.
- [58] Wu C-S, Chang IY-F, Hung J, Liao W-C, Lai Y-R, Chang K-P, et al. ASC modulates HIF-1 α stability and induces cell mobility in OSCC. *Cell Death Dis* 2020;11:721. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02927-7>.
- [59] Watanabe S, Usui-Kawanishi F, Komada T, Karasawa T, Kamata R, Yamada N, et al. ASC regulates platelet activation and contributes to thrombus formation independent of NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;531:125–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.063>.
- [60] Cheong M, Gartlan KH, Lee JS, Tey S-K, Zhang P, Kuns RD, et al. ASC Modulates CTL Cytotoxicity and Transplant Outcome Independent of the Inflammasome. *Cancer Immunol Res* 2020;8:1085–98. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0653>.
- [61] Chen H, Pei Q, Tao L, Xia J, Lu G, Zong Y, et al. ASC Regulates Subcutaneous Adipose Tissue Lipogenesis and Lipolysis via p53/AMPK α Axis. *Int J Mol Sci* 2022;23:10042. <https://doi.org/10.3390/ijms231710042>.
- [62] Lu A, Magupalli V, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos M, et al. Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-dependent Inflammasomes. *Cell* 2014;156:1193–206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008>.
- [63] Ross C, Chan AH, Von Pein JB, Maddugoda MP, Boucher D, Schroder K. Inflammatory Caspases: Toward a Unified Model for Caspase Activation by Inflammasomes. *Annu Rev Immunol* 2022;40:249–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101220-030653>.
- [64] Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, et al. The adaptor ASC

- has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 2014;15:727–37. <https://doi.org/10.1038/ni.2913>.
- [65] Kesavardhana S, Malireddi RKS, Kanneganti T-D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Gasdermin-Induced Pyroptosis. *Annu Rev Immunol* 2020;38:567–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-073119-095439>.
- [66] Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med* 2018;215:827–40. <https://doi.org/10.1084/jem.20172222>.
- [67] Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* 2014;15:738–48. <https://doi.org/10.1038/ni.2919>.
- [68] Groß O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, et al. Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Immunity* 2012;36:388–400. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.018>.
- [69] Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol* 2016;100:961–7. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0516-224R>.
- [70] Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res* 2018;11:359–74. <https://doi.org/10.2147/JIR.S141220>.
- [71] Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 2014;514:187–92. <https://doi.org/10.1038/nature13683>.
- [72] Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 2013;341:1250–3. <https://doi.org/10.1126/science.1240988>.
- [73] Broz P, Ruby T, Belhocine K, Bouley DM, Kayagaki N, Dixit VM, et al. Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. *Nature* 2012;490:288–91. <https://doi.org/10.1038/nature11419>.
- [74] Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci* 2018;19:2155. <https://doi.org/10.3390/ijms19082155>.
- [75] Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 2011;479:117–21. <https://doi.org/10.1038/nature10558>.
- [76] Agnew A, Nulty C, Creagh EM. Regulation, Activation and Function of Caspase-11 during Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2021;22:1506. <https://doi.org/10.3390/ijms22041506>.
- [77] Py BF, Jin M, Desai BN, Penumaka A, Zhu H, Kober M, et al. Caspase-11 Controls Interleukin-1 β Release through Degradation of TRPC1. *Cell Rep* 2014;6:1122–8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.015>.
- [78] Balakrishnan A, Karki R, Berwin B, Yamamoto M, Kanneganti T-D. Guanylate binding proteins facilitate caspase-11-dependent pyroptosis in response to type 3 secretion system-negative *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Death Discov* 2018;4:66. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0068-z>.
- [79] Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, et al. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* 2014;509:366–70. <https://doi.org/10.1038/nature13157>.
- [80] Fisch D, Bando H, Clough B, Hornung V, Yamamoto M, Shenoy AR, et al. Human GBP1 is a microbe-specific gatekeeper of macrophage apoptosis and pyroptosis. *EMBO J* 2019;38:e100926. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018100926>.
- [81] Santos JC, Boucher D, Schneider LK, Demarco B, Dilucca M, Shkarina K, et al. Human GBP1 binds LPS to initiate assembly of a caspase-4 activating platform on cytosolic bacteria. *Nat Commun* 2020;11:3276. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16889-z>.
- [82] Wandel MP, Kim B-H, Park E-S, Boyle KB, Nayak K, Lagrange B, et al. Guanylate-Binding Proteins (GBPs) convert cytosolic bacteria into caspase-4 signaling platforms. *Nat Immunol* 2020;21:880–91. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0697-2>.
- [83] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 2013;341:1246–9. <https://doi.org/10.1126/science.1240248>.
- [84] Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O’Rourke K, Anderson K, Warming S, et al. Caspase-11

- cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 2015;526:666–71. <https://doi.org/10.1038/nature15541>.
- [85] Baker PJ, Boucher D, Bierschenk D, Tebartz C, Whitney PG, D’Silva DB, et al. NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. *Eur J Immunol* 2015;45:2918–26. <https://doi.org/10.1002/eji.201545655>.
- [86] Zhang C-J, Jiang M, Zhou H, Liu W, Wang C, Kang Z, et al. TLR-stimulated IRAKM activates caspase-8 inflammasome in microglia and promotes neuroinflammation. *J Clin Invest* n.d.;128:5399–412. <https://doi.org/10.1172/JCI121901>.
- [87] Rong W, Liu C, Li X, Wan N, Wei L, Zhu W, et al. Caspase-8 Promotes Pulmonary Hypertension by Activating Macrophage-Associated Inflammation and IL-1 β (Interleukin 1 β) Production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2022;42:613–31. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.317168>.
- [88] Chan AH, Schroder K. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J Exp Med* 2019;217:e20190314. <https://doi.org/10.1084/jem.20190314>.
- [89] Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 2018;281:8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>.
- [90] Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. *Immunity* 2019;50:778–95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012>.
- [91] Dinarello CA. An Expanding Role for Interleukin-1 Blockade from Gout to Cancer. *Mol Med* 2014;20:S43–58. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00232>.
- [92] Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2019;20:649. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>.
- [93] Park SY, Hisham Y, Shin HM, Yeom SC, Kim S. Interleukin-18 Binding Protein in Immune Regulation and Autoimmune Diseases. *Biomedicines* 2022;10:1750. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071750>.
- [94] Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>.
- [95] He W, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res* 2015;25:1285–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>.
- [96] Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J* 2016;35:1766–78. <https://doi.org/10.15252/embj.201694696>.
- [97] Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 2016;535:153–8. <https://doi.org/10.1038/nature18629>.
- [98] Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2020;20:143–57. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0228-2>.
- [99] Tsuchiya K. Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications. *Microbiol Immunol* 2020;64:252–69. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12771>.
- [100] Mulvihill E, Sborgi L, Mari SA, Pfreundschuh M, Hiller S, Müller DJ. Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. *EMBO J* 2018;37:e98321. <https://doi.org/10.15252/embj.201798321>.
- [101] Heilig R, Dick MS, Sborgi L, Meunier E, Hiller S, Broz P. The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *Eur J Immunol* 2018;48:584–92. <https://doi.org/10.1002/eji.201747404>.
- [102] Martín-Sánchez F, Diamond C, Zeitler M, Gomez AI, Baroja-Mazo A, Bagnall J, et al. Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation. *Cell Death Differ* 2016;23:1219–31. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.176>.
- [103] Kayagaki N, Kornfeld OS, Lee BL, Stowe IB, O’Rourke K, Li Q, et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature* 2021;591:131–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03218-7>.
- [104] DiPeso L, Ji DX, Vance RE, Price JV. Cell death and cell lysis are separable events during pyroptosis. *Cell Death Discov* 2017;3:17070. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.70>.

- [105] Volchuk A, Ye A, Chi L, Steinberg BE, Goldenberg NM. Indirect regulation of HMGB1 release by gasdermin D. *Nat Commun* 2020;11:4561. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18443-3>.
- [106] Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Aging Neurosci* 2022;14:879021. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879021>.
- [107] Andreeva L, David L, Rawson S, Shen C, Pasricha T, Pelegrin P, et al. NLRP3 cages revealed by full-length mouse NLRP3 structure control pathway activation. *Cell* 2021;184:6299-6312.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.011>.
- [108] Xu J, Núñez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation. *Trends Biochem Sci* 2023;48:331–44. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.10.002>.
- [109] Sharif H, Wang L, Wang WL, Magupalli VG, Andreeva L, Qiao Q, et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature* 2019;570:338–43. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1295-z>.
- [110] Duan Y, Zhang L, Angosto-Bazarra D, Pelegrín P, Núñez G, He Y. RACK1 Mediates NLRP3 Inflammasome Activation by Promoting NLRP3 Active Conformation and Inflammasome Assembly. *Cell Rep* 2020;33:108405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108405>.
- [111] Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, et al. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8041–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611496104>.
- [112] Zhan X, Li Q, Xu G, Xiao X, Bai Z. The mechanism of NLRP3 inflammasome activation and its pharmacological inhibitors. *Front Immunol* 2022;13:1109938. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1109938>.
- [113] Schroder K, Coll RC. Caging NLRP3 tames inflammasome activity. *Cell* 2021;184:6224–6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.035>.
- [114] McKee CM, Coll RC. NLRP3 inflammasome priming: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *J Leukoc Biol* 2020;108:937–52. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0720-513R>.
- [115] Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem* 2012;287:36617–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407130>.
- [116] Lin K-M, Hu W, Troutman TD, Jennings M, Brewer T, Li X, et al. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:775–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320294111>.
- [117] Gurung P, Anand PK, Malireddi RKS, Vande Walle L, Van Opendenbosch N, Dillon CP, et al. FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. *J Immunol* 2014;192:1835–46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302839>.
- [118] Niu T, De Rosny C, Chautard S, Rey A, Patoli D, Gros Lambert M, et al. NLRP3 phosphorylation in its LRR domain critically regulates inflammasome assembly. *Nat Commun* 2021;12:5862. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26142-w>.
- [119] Bauernfeind F, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol Baltim Md 1950* 2009;183:787–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>.
- [120] Zhu Q, Kanneganti T-D. Cutting Edge: Distinct Regulatory Mechanisms Control Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1 β . *J Immunol* 2017;198:4210–5. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700352>.
- [121] Lemmers B, Salmena L, Bidère N, Su H, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, et al. Essential Role for Caspase-8 in Toll-like Receptors and NF κ B Signaling *. *J Biol Chem* 2007;282:7416–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606721200>.
- [122] Kim S-J, Cha J-Y, Kang HS, Lee J-H, Lee JY, Park J-H, et al. Corosolic acid ameliorates acute inflammation through inhibition of IRAK-1 phosphorylation in macrophages. *BMB Rep* 2016;49:276–81. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.5.241>.
- [123] Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F, Diaz-del-Olmo I, Nichols E-M, Davis DM, et al. Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Front Immunol* 2020;11:565924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.565924>.
- [124] Sefik E, Qu R, Junqueira C, Kaffe E, Mirza H, Zhao J, et al. Inflammasome activation in infected

macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature* 2022;606:585–93. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04802-1>.

[125] Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 2013;38:1142–53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>.

[126] Rühl S, Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁽⁺⁾ efflux. *Eur J Immunol* 2015;45:2927–36. <https://doi.org/10.1002/eji.201545772>.

[127] Xu Z, Chen Z, Wu X, Zhang L, Cao Y, Zhou P. Distinct Molecular Mechanisms Underlying Potassium Efflux for NLRP3 Inflammasome Activation. *Front Immunol* 2020;11:609441. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609441>.

[128] Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 1986;233:309–19.

[129] Di A, Xiong S, Ye Z, Malireddi RKS, Kometani S, Zhong M, et al. The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-induced Inflammation. *Immunity* 2018;49:56–65.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.032>.

[130] Tapia-Abellán A, Angosto-Bazarra D, Alarcón-Vila C, Baños MC, Hafner-Bratkovič I, Oliva B, et al. Sensing low intracellular potassium by NLRP3 results in a stable open structure that promotes inflammasome activation. *Sci Adv* 2021;7:eabf4468. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf4468>.

[131] He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. Nek7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 2016;530:354–7. <https://doi.org/10.1038/nature16959>.

[132] Groß CJ, Mishra R, Schneider KS, Médard G, Wettmarshausen J, Dittlein DC, et al. K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* 2016;45:761–73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.010>.

[133] Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* 2016;44:833–46. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012>.

[134] Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:11282–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109>.

[135] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* 2019;20:3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>.

[136] Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* 2012;492:123–7. <https://doi.org/10.1038/nature11588>.

[137] Csordás G, Hajnóczky G. SR/ER-mitochondrial local communication: Calcium and ROS. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:1352–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.004>.

[138] Jäger E, Murthy S, Schmidt C, Hahn M, Strobel S, Peters A, et al. Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome response to calciprotein particles drives inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Commun* 2020;11:4243. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17749-6>.

[139] Rossol M, Pierer M, Raulien N, Quandt D, Meusch U, Rothe K, et al. Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun* 2012;3:1329. <https://doi.org/10.1038/ncomms2339>.

[140] Katsnelson MA, Rucker LG, Russo HM, Dubyak GR. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *J Immunol Baltim Md* 1950 2015;194:3937–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402658>.

[141] Schorn C, Frey B, Lauber K, Janko C, Stryio M, Keppeler H, et al. Sodium Overload and Water Influx Activate the NALP3 Inflammasome. *J Biol Chem* 2011;286:35–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139048>.

[142] Verhoef PA, Kertesz SB, Lundberg K, Kahlenberg JM, Dubyak GR. Inhibitory effects of chloride on the activation of caspase-1, IL-1β secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;175:7623–34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7623>.

[143] Perregaux DG, Laliberte RE, Gabel CA. Human monocyte interleukin-1β posttranslational processing. Evidence of a volume-regulated response. *J Biol Chem* 1996;271:29830–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.47.29830>.

[144] Tang T, Lang X, Xu C, Wang X, Gong T, Yang Y, et al. CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* 2017;8:202.

<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00227-x>.

- [145] Domingo-Fernández R, Coll RC, Kearney J, Breit S, O'Neill LAJ. The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 β transcription and activate the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem* 2017;292:12077–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797126>.
- [146] Green JP, Yu S, Martín-Sánchez F, Pelegrin P, Lopez-Castejon G, Lawrence CB, et al. Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E9371–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812744115>.
- [147] Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011;12:222–30. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- [148] Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome During Apoptosis. *Immunity* 2012;36:401–14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>.
- [149] Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, He F, Shalapour S, Lin X, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2018;560:198–203. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0372-z>.
- [150] Billingham LK, Stoolman JS, Vasan K, Rodriguez AE, Poor TA, Szibor M, et al. Mitochondrial electron transport chain is necessary for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Immunol* 2022;23:692–704. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01185-3>.
- [151] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- [152] Liu Q, Zhang D, Hu D, Zhou X, Zhou Y. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Mol Immunol* 2018;103:115–24. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.09.010>.
- [153] Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011;12:408–15. <https://doi.org/10.1038/ni.2022>.
- [154] Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science* 2008;320:674–7. <https://doi.org/10.1126/science.1156995>.
- [155] Moon J-S, Nakahira K, Chung K-P, DeNicola GM, Koo MJ, Pabón MA, et al. NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Nat Med* 2016;22:1002–12. <https://doi.org/10.1038/nm.4153>.
- [156] Ma MW, Wang J, Dhandapani KM, Brann DW. NADPH Oxidase 2 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Traumatic Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:6057609. <https://doi.org/10.1155/2017/6057609>.
- [157] Shi H, Wang Y, Li X, Zhan X, Tang M, Fina M, et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol* 2016;17:250–8. <https://doi.org/10.1038/ni.3333>.
- [158] Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Núñez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol Baltim Md 1950* 2011;187:613–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100613>.
- [159] Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 2013;39:311–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>.
- [160] Elliott EI, Miller AN, Banoth B, Iyer SS, Stotland A, Weiss JP, et al. Cutting Edge: Mitochondrial Assembly of the NLRP3 Inflammasome Complex Is Initiated at Priming. *J Immunol Baltim Md 1950* 2018;200:3047–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701723>.
- [161] Wolf AJ, Reyes CN, Liang W, Becker C, Shimada K, Wheeler ML, et al. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* 2016;166:624–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.076>.
- [162] Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 2013;153:348–61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.054>.
- [163] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Ozkurede U, Kim Y-G, Arindam C, et al. Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane

- permeabilization and K⁺ efflux. *J Immunol Baltim Md* 1950 2014;193:4214–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400582>.
- [164] Park S, Juliana C, Hong S, Datta P, Hwang I, Fernandes-Alnemri T, et al. The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. *J Immunol Baltim Md* 1950 2013;191:4358–66. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301170>.
- [165] Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17963–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312571110>.
- [166] Guan K, Wei C, Zheng Z, Song T, Wu F, Zhang Y, et al. MAVS Promotes Inflammasome Activation by Targeting ASC for K63-Linked Ubiquitination via the E3 Ligase TRAF3. *J Immunol* 2015;194:4880–90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402851>.
- [167] Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2013;14:454–60. <https://doi.org/10.1038/ni.2550>.
- [168] Zhang Z, Meszaros G, He W, Xu Y, de Fatima Magliarelli H, Maily L, et al. Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med* 2017;214:2671–93. <https://doi.org/10.1084/jem.20162040>.
- [169] Chen J, Chen ZJ. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2018;564:71–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0761-3>.
- [170] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9:847–56. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>.
- [171] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237–41. <https://doi.org/10.1038/nature04516>.
- [172] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464:1357–61. <https://doi.org/10.1038/nature08938>.
- [173] Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol* 2008;9:857–65. <https://doi.org/10.1038/ni.1636>.
- [174] Orłowski GM, Colbert JD, Sharma S, Bogoy M, Robertson SA, Rock KL. Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 β Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 β Activation. *J Immunol Baltim Md* 1950 2015;195:1685–97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500509>.
- [175] Katsnelson MA, Lozada-Soto KM, Russo HM, Miller BA, Dubyak GR. NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: roles for K⁺ efflux and Ca²⁺ influx. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2016;311:C83–100. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2015>.
- [176] Okada M, Matsuzawa A, Yoshimura A, Ichijo H. The lysosome rupture-activated TAK1-JNK pathway regulates NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* 2014;289:32926–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.579961>.
- [177] Guo C, Chi Z, Jiang D, Xu T, Yu W, Wang Z, et al. Cholesterol Homeostatic Regulator SCAP-SREBP2 Integrates NLRP3 Inflammasome Activation and Cholesterol Biosynthetic Signaling in Macrophages. *Immunity* 2018;49:842–856.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.021>.
- [178] Lee B, Hoyle C, Wellens R, Green JP, Martin-Sanchez F, Williams DM, et al. Disruptions in endocytic traffic contribute to the activation of the NLRP3 inflammasome. *Sci Signal* 2023;16:eabm7134. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abm7134>.
- [179] Zhang Z, Venditti R, Ran L, Liu Z, Vivot K, Schürmann A, et al. Distinct changes in endosomal composition promote NLRP3 inflammasome activation. *Nat Immunol* 2023;24:30–41. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01355-3>.
- [180] Chen KW, Boucher D, Broz P. Divide to conquer: NLRP3 is activated on dispersed trans-Golgi network. *Cell Res* 2019;29:181–2. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0138-z>.
- [181] Magupalli VG, Negro R, Tian Y, Hauenstein AV, Caprio GD, Skillern W, et al. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. *Science* 2020;369:eaas8995. <https://doi.org/10.1126/science.aas8995>.
- [182] Schmid-Burgk JL, Gaidt MM, Schmidt T, Ebert TS, Bartok E, Hornung V. Caspase-4 mediates

- non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol* 2015;45:2911–7. <https://doi.org/10.1002/eji.201545523>.
- [183] Yang D, He Y, Muñoz-Planillo R, Liu Q, Núñez G. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock. *Immunity* 2015;43:923–32. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.009>.
- [184] Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 2006;25:5071–82. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>.
- [185] Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8067–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709684105>.
- [186] Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146720>.
- [187] O'Brien M, Moehring D, Muñoz-Planillo R, Núñez G, Callaway J, Ting J, et al. A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells. *J Immunol Methods* 2017;447:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.03.004>.
- [188] He Y, Franchi L, Núñez G. Toll-like Receptor Agonists Stimulate Nlrp3-dependent IL-1 β Production Independently of the purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and in Vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013;190:334–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202737>.
- [189] Conos SA, Chen KW, De Nardo D, Hara H, Whitehead L, Núñez G, et al. Active MLKL triggers the NLRP3 inflammasome in a cell-intrinsic manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E961–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613305114>.
- [190] Gicquel T, Robert S, Victoni T, Lagente V. L'inflammasome NLRP3 : physiopathologie et application thérapeutique. *Presse Médicale* 2016;45:438–46. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2016.01.006>.
- [191] Wang Y, Liu X, Shi H, Yu Y, Yu Y, Li M, et al. NLRP3 inflammasome, an immune-inflammatory target in pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases. *Clin Transl Med* 2020;10:91–106. <https://doi.org/10.1002/ctm2.13>.
- [192] Li Z, Guo J, Bi L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2020;130:110542. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110542>.
- [193] Sharma BR, Kanneganti T-D. NLRP3 Inflammasome in Cancer and Metabolic Diseases. *Nat Immunol* 2021;22:550–9. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00886-5>.
- [194] Paerewijck O, Lamkanfi M. The human inflammasomes. *Mol Aspects Med* 2022;88:101100. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101100>.
- [195] Yang J, Liu Z, Xiao TS. Post-translational regulation of inflammasomes. *Cell Mol Immunol* 2017;14:65–79. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.29>.
- [196] Moretti J, Blander JM. Increasing complexity of NLRP3 inflammasome regulation. *J Leukoc Biol* 2021;109:561–71. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0520-104RR>.
- [197] Swanson KV, Deng M, Ting JP-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2019;19:477–89. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.
- [198] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 2012;81:203–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>.
- [199] Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell* 2013;49:331–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.009>.
- [200] Lopez-Castejon G, Luheshi NM, Compan V, High S, Whitehead RC, Flitsch S, et al. Deubiquitinases Regulate the Activity of Caspase-1 and Interleukin-1 β Secretion via Assembly of the Inflammasome. *J Biol Chem* 2013;288:2721–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422238>.
- [201] Han S, Lear TB, Jerome JA, Rajbhandari S, Snavely CA, Gulick DL, et al. Lipopolysaccharide Primes the NALP3 Inflammasome by Inhibiting Its Ubiquitination and Degradation Mediated by the SCFFBXL2 E3 Ligase. *J Biol Chem* 2015;290:18124–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645549>.
- [202] Tang J, Tu S, Lin G, Guo H, Yan C, Liu Q, et al. Sequential ubiquitination of NLRP3 by

- RNF125 and Cbl-b limits inflammasome activation and endotoxemia. *J Exp Med* 2020;217:e20182091. <https://doi.org/10.1084/jem.20182091>.
- [203] Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Kimura H, Kamata R, Usui-Kawanishi F, et al. ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. *J Immunol* 2017;199:3614–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700184>.
- [204] Song H, Liu B, Huai W, Yu Z, Wang W, Zhao J, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat Commun* 2016;7:13727. <https://doi.org/10.1038/ncomms13727>.
- [205] Yan Y, Jiang W, Liu L, Wang X, Ding C, Tian Z, et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 2015;160:62–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.047>.
- [206] Wan P, Zhang Q, Liu W, Jia Y, Ai S, Wang T, et al. Cullin1 binds and promotes NLRP3 ubiquitination to repress systematic inflammasome activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2019;33:5793–807. <https://doi.org/10.1096/fj.201801681R>.
- [207] Mayor A, Martinon F, De Smedt T, Pétrilli V, Tschopp J. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* 2007;8:497–503. <https://doi.org/10.1038/ni1459>.
- [208] Humphries F, Bergin R, Jackson R, Delagic N, Wang B, Yang S, et al. The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun* 2018;9:1560. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03669-z>.
- [209] Xing Y, Yao X, Li H, Xue G, Guo Q, Yang G, et al. Cutting Edge: TRAF6 Mediates TLR/IL-1R Signaling-Induced Nontranscriptional Priming of the NLRP3 Inflammasome. *J Immunol Baltim Md* 1950 2017;199:1561–6. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700175>.
- [210] Palazón-Riquelme P, Worboys JD, Green J, Valera A, Martín-Sánchez F, Pellegrini C, et al. USP7 and USP47 deubiquitinases regulate NLRP3 inflammasome activation. *EMBO Rep* 2018;19:e44766. <https://doi.org/10.15252/embr.201744766>.
- [211] Wang W, Hu D, Wu C, Feng Y, Li A, Liu W, et al. STING promotes NLRP3 localization in ER and facilitates NLRP3 deubiquitination to activate the inflammasome upon HSV-1 infection. *PLoS Pathog* 2020;16:e1008335. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008335>.
- [212] Zhao W, Shi C-S, Harrison K, Hwang I-Y, Nabar NR, Wang M, et al. AKT Regulates NLRP3 Inflammasome Activation by Phosphorylating NLRP3 Serine 5. *J Immunol Baltim Md* 1950 2020;205:2255–64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000649>.
- [213] Stutz A, Kolbe C-C, Stahl R, Horvath GL, Franklin BS, van Ray O, et al. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med* 2017;214:1725–36. <https://doi.org/10.1084/jem.20160933>.
- [214] Fischer FA, Mies LFM, Nizami S, Pantazi E, Danielli S, Demarco B, et al. TBK1 and IKK ϵ act like an OFF switch to limit NLRP3 inflammasome pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118:e2009309118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009309118>.
- [215] Mao L, Kitani A, Hiejima E, Montgomery-Recht K, Zhou W, Fuss I, et al. Bruton tyrosine kinase deficiency augments NLRP3 inflammasome activation and causes IL-1 β -mediated colitis. *J Clin Invest* 2020;130:1793–807. <https://doi.org/10.1172/JCI128322>.
- [216] Spalinger MR, Lang S, Gottier C, Dai X, Rawlings DJ, Chan AC, et al. PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner. *Autophagy* 2017;13:1590–601. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1341453>.
- [217] Spalinger MR, Kasper S, Gottier C, Lang S, Atrott K, Vavricka SR, et al. NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22. *J Clin Invest* n.d.;126:1783–800. <https://doi.org/10.1172/JCI83669>.
- [218] Huang Y, Wang H, Hao Y, Lin H, Dong M, Ye J, et al. Myeloid PTEN promotes chemotherapy-induced NLRP3-inflammasome activation and antitumour immunity. *Nat Cell Biol* 2020;22:716–27. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0510-3>.
- [219] Mortimer L, Moreau F, MacDonald JA, Chadee K. NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. *Nat Immunol* 2016;17:1176–86. <https://doi.org/10.1038/ni.3538>.
- [220] Sokolowska M, Chen L-Y, Liu Y, Martinez-Anton A, Qi H-Y, Logun C, et al. Prostaglandin E2 Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation through EP4 Receptor and Intracellular Cyclic AMP in

- Human Macrophages. *J Immunol Baltim Md* 1950 2015;194:5472–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401343>.
- [221] Guo C, Xie S, Chi Z, Zhang J, Liu Y, Zhang L, et al. Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Immunity* 2016;45:802–16. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.008>.
- [222] Song N, Liu Z-S, Xue W, Bai Z-F, Wang Q-Y, Dai J, et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol Cell* 2017;68:185-197.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.017>.
- [223] Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004;20:319–25. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00046-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00046-9).
- [224] Dufies O, Doye A, Courjon J, Torre C, Michel G, Loubatier C, et al. Escherichia coli Rho GTPase-activating toxin CNF1 mediates NLRP3 inflammasome activation via p21-activated kinases-1/2 during bacteraemia in mice. *Nat Microbiol* 2021;6:401–12. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00832-5>.
- [225] Ghonime MG, Shamaa OR, Das S, Eldomany RA, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, et al. Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. *J Immunol Baltim Md* 1950 2014;192:3881–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301974>.
- [226] Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat Commun* 2015;6:7360. <https://doi.org/10.1038/ncomms8360>.
- [227] Bittner ZA, Liu X, Mateo Tortola M, Tapia-Abellán A, Shankar S, Andreeva L, et al. BTK operates a phospho-tyrosine switch to regulate NLRP3 inflammasome activity. *J Exp Med* 2021;218:e20201656. <https://doi.org/10.1084/jem.20201656>.
- [228] Liu X, Pichulik T, Wolz O-O, Dang T-M, Stutz A, Dillen C, et al. Human NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activity is regulated by and potentially targetable through Bruton tyrosine kinase. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:1054-1067.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.017>.
- [229] Barry R, John SW, Liccardi G, Tenev T, Jaco I, Chen C-H, et al. SUMO-mediated regulation of NLRP3 modulates inflammasome activity. *Nat Commun* 2018;9:3001. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05321-2>.
- [230] Hernandez-Cuellar E, Tsuchiya K, Hara H, Fang R, Sakai S, Kawamura I, et al. Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J Immunol Baltim Md* 1950 2012;189:5113–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202479>.
- [231] Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res* 2013;23:201–12. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.6>.
- [232] He M, Chiang H-H, Luo H, Zheng Z, Qiao Q, Wang L, et al. An Acetylation Switch of the NLRP3 Inflammasome Regulates Aging-Associated Chronic Inflammation and Insulin Resistance. *Cell Metab* 2020;31:580-591.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.009>.
- [233] Shim D-W, Shin W-Y, Yu S-H, Kim B-H, Ye S-K, Koppula S, et al. BOT-4-one attenuates NLRP3 inflammasome activation: NLRP3 alkylation leading to the regulation of its ATPase activity and ubiquitination. *Sci Rep* 2017;7:15020. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15314-8>.
- [234] Bose S, Segovia JA, Somarajan SR, Chang T-H, Kannan TR, Baseman JB. ADP-Ribosylation of NLRP3 by Mycoplasma pneumoniae CARDS Toxin Regulates Inflammasome Activity. *mBio* 2014;5:e02186-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02186-14>.
- [235] Martin BN, Wang C, Willette-Brown J, Herjan T, Gulen MF, Zhou H, et al. IKK α negatively regulates ASC-dependent inflammasome activation. *Nat Commun* 2014;5:4977. <https://doi.org/10.1038/ncomms5977>.
- [236] Gavrilin MA, Prather ER, Vompe AD, McAndrew CC, Wewers MD. cAbl Kinase Regulates Inflammasome Activation and Pyroptosis via ASC Phosphorylation. *J Immunol Baltim Md* 1950 2021;206:1329–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000969>.
- [237] Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y, et al. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat Immunol* 2013;14:1247–55. <https://doi.org/10.1038/ni.2749>.

- [238] Chung I-C, OuYang C-N, Yuan S-N, Li H-P, Chen J-T, Shieh H-R, et al. Pyk2 activates the NLRP3 inflammasome by directly phosphorylating ASC and contributes to inflammasome-dependent peritonitis. *Sci Rep* 2016;6:36214. <https://doi.org/10.1038/srep36214>.
- [239] Mambwe B, Neo K, Javanmard Khameneh H, Leong KWK, Colantuoni M, Vacca M, et al. Tyrosine Dephosphorylation of ASC Modulates the Activation of the NLRP3 and AIM2 Inflammasomes. *Front Immunol* 2019;10:1556. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01556>.
- [240] Lee JY, Seo D, You J, Chung S, Park JS, Lee J-H, et al. The deubiquitinating enzyme, ubiquitin-specific peptidase 50, regulates inflammasome activation by targeting the ASC adaptor protein. *FEBS Lett* 2017;591:479–90. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12558>.
- [241] Rodgers MA, Bowman JW, Fujita H, Orazio N, Shi M, Liang Q, et al. The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med* 2014;211:1333–47. <https://doi.org/10.1084/jem.20132486>.
- [242] Yang X-D, Li W, Zhang S, Wu D, Jiang X, Tan R, et al. PLK4 deubiquitination by Spata2-CYLD suppresses NEK7-mediated NLRP3 inflammasome activation at the centrosome. *EMBO J* 2020;39:e102201. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102201>.
- [243] Hughes MM, Hooftman A, Angiari S, Tummala P, Zaslona Z, Runtsch MC, et al. Glutathione Transferase Omega-1 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation through NEK7 Deglutathionylation. *Cell Rep* 2019;29:151-161.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.072>.
- [244] Labbé K, McIntire CR, Doiron K, Leblanc PM, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity* 2011;35:897–907. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.016>.
- [245] Douglas T, Saleh M. Cross-regulation between LUBAC and caspase-1 modulates cell death and inflammation. *J Biol Chem* 2020;295:5216–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011622>.
- [246] Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Mandal D, Pathak S, Kundu M. NF-kappaB- and C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1beta release from Helicobacter pylori lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* 2005;280:4279–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412820200>.
- [247] Duong BH, Onizawa M, Osés-Prieto JA, Advincula R, Burlingame A, Malynn BA, et al. A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity* 2015;42:55–67. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.031>.
- [248] Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Jacques P, Fossoul A, Verheugen E, Vogel P, et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature* 2014;512:69–73. <https://doi.org/10.1038/nature13322>.
- [249] Schmid-Burgk JL, Chauhan D, Schmidt T, Ebert TS, Reinhardt J, Endl E, et al. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem* 2016;291:103–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.700492>.
- [250] Salem H, Rachmin I, Yissachar N, Cohen S, Amiel A, Haffner R, et al. Nek7 kinase targeting leads to early mortality, cytokinesis disturbance and polyploidy. *Oncogene* 2010;29:4046–57. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.162>.
- [251] Xiao L, Magupalli VG, Wu H. Cryo-EM structures of the active NLRP3 inflammasome disc. *Nature* 2023;613:595–600. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05570-8>.
- [252] Priming enables a NEK7-independent route of NLRP3 activation | bioRxiv n.d. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/799320v1> (accessed May 21, 2023).
- [253] Indramohan M, Stehlik C, Dorfleutner A. COPs and POPs patrol inflammasome activation. *J Mol Biol* 2018;430:153–73. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.10.004>.
- [254] Matusiak M, Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. CARD- and pyrin-only proteins regulating inflammasome activation and immunity. *Immunol Rev* 2015;265:217–30. <https://doi.org/10.1111/imr.12282>.
- [255] Dorfleutner A, Chu L, Stehlik C. Inhibiting the inflammasome: one domain at a time. *Immunol Rev* 2015;265:205–16. <https://doi.org/10.1111/imr.12290>.
- [256] Stehlik C, Krajewska M, Welsh K, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochem J* 2003;373:101–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20030304>.
- [257] de Almeida L, Khare S, Misharin AV, Patel R, Ratsimandresy RA, Wallin MC, et al. The

PYRIN domain-only protein POP1 inhibits inflammasome assembly and ameliorates inflammatory disease. *Immunity* 2015;43:264–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.018>.

[258] Dorfleutner A, Bryan NB, Talbott SJ, Funya KN, Rellick SL, Reed JC, et al. Cellular Pyrin Domain-Only Protein 2 Is a Candidate Regulator of Inflammasome Activation. *Infect Immun* 2007;75:1484–92. <https://doi.org/10.1128/IAI.01315-06>.

[259] Bedoya F, Sandler LL, Harton JA. Pyrin-only protein 2 modulates NF-kappaB and disrupts ASC:CLR interactions. *J Immunol Baltim Md* 1950 2007;178:3837–45. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3837>.

[260] Ratsimandresy RA, Chu LH, Khare S, de Almeida L, Gangopadhyay A, Indramohan M, et al. The PYRIN domain-only protein POP2 inhibits inflammasome priming and activation. *Nat Commun* 2017;8:15556. <https://doi.org/10.1038/ncomms15556>.

[261] Periasamy S, Porter KA, Atianand MK, T. Le H, Earley S, Duffy EB, et al. Pyrin-only protein 2 limits inflammation but improves protection against bacteria. *Nat Commun* 2017;8:15564. <https://doi.org/10.1038/ncomms15564>.

[262] Druilhe A, Srinivasula SM, Razmara M, Ahmad M, Alnemri ES. Regulation of IL-1 β generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins. *Cell Death Differ* 2001;8:649–57. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400881>.

[263] Lee SH, Stehlik C, Reed JC. Cop, a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing. *J Biol Chem* 2001;276:34495–500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101415200>.

[264] Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer JL, Mattmann C, et al. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol CB* 1998;8:885–8. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00352-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00352-1).

[265] Karasawa T, Kawashima A, Usui F, Kimura H, Shirasuna K, Inoue Y, et al. Oligomerized CARD16 promotes caspase-1 assembly and IL-1 β processing. *FEBS Open Bio* 2015;5:348–56. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2015.04.011>.

[266] Lamkanfi M, Denecker G, Kalai M, D'hondt K, Meeus A, Declercq W, et al. INCA, a Novel Human Caspase Recruitment Domain Protein That Inhibits Interleukin-1 β Generation*. *J Biol Chem* 2004;279:51729–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407891200>.

[267] Lu A, Li Y, Schmidt FI, Yin Q, Chen S, Fu T-M, et al. Molecular basis of caspase-1 polymerization and its inhibition by a novel capping mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 2016;23:416–25. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3199>.

[268] Humke EW, Shriver SK, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM. ICEBERG: a novel inhibitor of interleukin-1beta generation. *Cell* 2000;103:99–111. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00108-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00108-2).

[269] Bryan NB, Dorfleutner A, Kramer SJ, Yun C, Rojanasakul Y, Stehlik C. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. *J Inflamm Lond Engl* 2010;7:23. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-23>.

[270] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010;11:136–40. <https://doi.org/10.1038/ni.1831>.

[271] Shenoy AR, Wellington DA, Kumar P, Kassa H, Booth CJ, Cresswell P, et al. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* 2012;336:481–5. <https://doi.org/10.1126/science.1217141>.

[272] Samir P, Kesavardhana S, Patmore DM, Gingras S, Malireddi RKS, Karki R, et al. DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome. *Nature* 2019;573:590–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1551-2>.

[273] Allam R, Lawlor KE, Yu EC-W, Mildenhall AL, Moujalled DM, Lewis RS, et al. Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO Rep* 2014;15:982–90. <https://doi.org/10.15252/embr.201438463>.

[274] Antonopoulos C, Russo HM, El Sanadi C, Martin BN, Li X, Kaiser WJ, et al. Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling. *J Biol Chem* 2015;290:20167–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652321>.

[275] Malireddi RKS, Gurung P, Mavuluri J, Dasari TK, Klco JM, Chi H, et al. TAK1 restricts spontaneous NLRP3 activation and cell death to control myeloid proliferation. *J Exp Med*

- 2018;215:1023–34. <https://doi.org/10.1084/jem.20171922>.
- [276] Yang C-S, Kim J-J, Kim TS, Lee PY, Kim SY, Lee H-M, et al. Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun* 2015;6:6115. <https://doi.org/10.1038/ncomms7115>.
- [277] Martine P, Chevriaux A, Derangère V, Apetoh L, Garrido C, Ghiringhelli F, et al. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death Dis* 2019;10:256. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1491-7>.
- [278] Shi C-S, Kehrl JH. Cytochrome c Negatively Regulates NLRP3 Inflammasomes. *PLoS One* 2016;11:e0167636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167636>.
- [279] Li X, Thome S, Ma X, Amrute-Nayak M, Finigan A, Kitt L, et al. MARK4 regulates NLRP3 positioning and inflammasome activation through a microtubule-dependent mechanism. *Nat Commun* 2017;8:15986. <https://doi.org/10.1038/ncomms15986>.
- [280] Hwang I, Lee E, Jeon S-A, Yu J-W. Histone deacetylase 6 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;467:973–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.033>.
- [281] Hu Y, Mao K, Zeng Y, Chen S, Tao Z, Yang C, et al. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;185:7699–705. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001099>.
- [282] Gurung P, Li B, Subbarao Malireddi RK, Lamkanfi M, Geiger TL, Kanneganti T-D. Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Sci Rep* 2015;5:14488. <https://doi.org/10.1038/srep14488>.
- [283] Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalapour S, Wong J, et al. NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* 2016;164:896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.057>.
- [284] McGeough MD, Wree A, Inzaugarat ME, Haimovich A, Johnson CD, Peña CA, et al. TNF regulates transcription of NLRP3 inflammasome components and inflammatory molecules in cryopyrinopathies. *J Clin Invest* 2017;127:4488–97. <https://doi.org/10.1172/JCI90699>.
- [285] Boxberger N, Hecker M, Zettl UK. Dysregulation of Inflammasome Priming and Activation by MicroRNAs in Human Immune-Mediated Diseases. *J Immunol* 2019;202:2177–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801416>.
- [286] Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;189:4175–81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201516>.
- [287] Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, Rainey A-A, Pich D, McInnes IB, et al. Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;189:3795–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200312>.
- [288] Xiao L, Jiang L, Hu Q, Li Y. MicroRNA-133b Ameliorates Allergic Inflammation and Symptom in Murine Model of Allergic Rhinitis by Targeting Nlrp3. *Cell Physiol Biochem* 2017;42:901–12. <https://doi.org/10.1159/000478645>.
- [289] Lou J, Wang Y, Zhang Z, Qiu W. MiR-20b inhibits mycobacterium tuberculosis induced inflammation in the lung of mice through targeting NLRP3. *Exp Cell Res* 2017;358:120–8. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.007>.
- [290] Zhou Y, Lu M, Du R-H, Qiao C, Jiang C-Y, Zhang K-Z, et al. MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 2016;11:28. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0094-3>.
- [291] Li D, Yang H, Ma J, Luo S, Chen S, Gu Q. MicroRNA-30e regulates neuroinflammation in MPTP model of Parkinson's disease by targeting Nlrp3. *Hum Cell* 2018;31:106–15. <https://doi.org/10.1007/s13577-017-0187-5>.
- [292] Chen M-L, Lin K, Lin S-K. NLRP3 inflammasome signaling as an early molecular response is negatively controlled by miR-186 in CFA-induced prosopalgia mice. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 2018;51:e7602. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187602>.
- [293] Han C, Guo L, Yang Y, Guan Q, Shen H, Sheng Y, et al. Mechanism of microRNA-22 in regulating neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Brain Behav* 2020;10:e01627. <https://doi.org/10.1002/brb3.1627>.

- [294] Guo S, Chen R, Zhang L, Wu M, Wei Y, Dai W, et al. microRNA-22-3p plays a protective role in a murine asthma model through the inhibition of the NLRP3-caspase-1-IL-1 β axis. *Exp Physiol* 2021;106:1829–38. <https://doi.org/10.1113/EP089575>.
- [295] Zhou T, Xiang D-K, Li S-N, Yang L-H, Gao L-F, Feng C. MicroRNA-495 Ameliorates Cardiac Microvascular Endothelial Cell Injury and Inflammatory Reaction by Suppressing the NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2018;49:798–815. <https://doi.org/10.1159/000493042>.
- [296] Haneklaus M, O’Neil JD, Clark AR, Masters SL, O’Neill LAJ. The RNA-binding protein Tristetraprolin (TTP) is a critical negative regulator of the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem* 2017;292:6869–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772947>.
- [297] Arakelyan A, Nersisyan L, Poghosyan D, Khondkaryan L, Hakobyan A, Löffler-Wirth H, et al. Autoimmunity and autoinflammation: A systems view on signaling pathway dysregulation profiles. *PLoS ONE* 2017;12:e0187572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187572>.
- [298] Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. Autoinflammatory Disease Reloaded: A Clinical Perspective. *Cell* 2010;140:784–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.002>.
- [299] Van Gorp H, Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Inflammasome-Dependent Cytokines at the Crossroads of Health and Autoinflammatory Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019;11:a028563. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028563>.
- [300] Booshehri LM, Hoffman HM. CAPS and NLRP3. *J Clin Immunol* 2019;39:277–86. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00638-z>.
- [301] Kuemmerle-Deschner JB, Ozen S, Tyrrell PN, Kone-Paut I, Goldbach-Mansky R, Lachmann H, et al. Diagnostic criteria for cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS). *Ann Rheum Dis* 2017;76:942–7. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209686>.
- [302] Quartier P, Rodrigues F, Georgin-Lavialle S. Cryopyrinopathies. *Rev Médecine Interne* 2018;39:287–96. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2017.09.002>.
- [303] Wanderer AA, Hoffman HM. The spectrum of acquired and familial cold-induced urticaria/urticaria-like syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004;24:259–86, vii. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2004.01.001>.
- [304] Samson JM, Ravindran Menon D, Vaddi PK, Kalani Williams N, Domenico J, Zhai Z, et al. Computational Modeling of NLRP3 Identifies Enhanced ATP Binding and Multimerization in Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes. *Front Immunol* 2020;11:584364. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584364>.
- [305] Aksentijevich I, Putnam CD, Remmers EF, Mueller JL, Le J, Kolodner RD, et al. The Clinical Continuum of Cryopyrinopathies. *Arthritis Rheum* 2007;56:1273–85. <https://doi.org/10.1002/art.22491>.
- [306] Hu J, Zhu Y, Zhang J-Z, Zhang R-G, Li H-M. A Novel Mutation in the Pyrin Domain of the NOD-like Receptor Family Pyrin Domain Containing Protein 3 in Muckle-Wells Syndrome. *Chin Med J (Engl)* 2017;130:586–93. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.200537>.
- [307] Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 β inhibition. *N Engl J Med* 2006;355:581–92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055137>.
- [308] de Boysson H. Actualités sur l’inhibition de l’interleukine-1. *Rev Médecine Interne* 2012;33:235–7. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2012.01.012>.
- [309] Tassi S, Carta S, Delfino L, Caorsi R, Martini A, Gattorno M, et al. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1 β secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9789–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000779107>.
- [310] Lavieri R, Rubartelli A, Carta S. Redox stress unbalances the inflammatory cytokine network: role in autoinflammatory patients and healthy subjects. *J Leukoc Biol* 2016;99:79–86. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0415-159R>.
- [311] Carta S, Penco F, Lavieri R, Martini A, Dinarello CA, Gattorno M, et al. Cell stress increases ATP release in NLRP3 inflammasome-mediated autoinflammatory diseases, resulting in cytokine imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:2835–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424741112>.
- [312] Vento-Tormo R, Álvarez-Erriico D, Garcia-Gomez A, Hernández-Rodríguez J, Buján S, Basagaña M, et al. DNA demethylation of inflammasome-associated genes is enhanced in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:202-211.e6.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.016>.

- [313] Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, et al. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Science* 2016;352:aad1210. <https://doi.org/10.1126/science.aad1210>.
- [314] Ballbach M, Hall T, Brand A, Neri D, Singh A, Schaefer I, et al. Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes. *J Innate Immun* 2016;8:493–506. <https://doi.org/10.1159/000446615>.
- [315] Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1 β secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with MEFV genotype. *Ann Rheum Dis* 2014;73:462–9. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202774>.
- [316] Kolly L, Busso N, von Scheven-Gete A, Bagnoud N, Moix I, Holzinger D, et al. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome is linked to dysregulated monocyte IL-1 β production. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1635–43. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.043>.
- [317] Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2016;11:23. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0088-1>.
- [318] Italiani P, Puxeddu I, Napoletano S, Scala E, Melillo D, Manocchio S, et al. Circulating levels of IL-1 family cytokines and receptors in Alzheimer's disease: new markers of disease progression? *J Neuroinflammation* 2018;15:342. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1376-1>.
- [319] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:756357. <https://doi.org/10.1100/2012/756357>.
- [320] Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2013;493:674–8. <https://doi.org/10.1038/nature11729>.
- [321] Parajuli B, Sonobe Y, Horiuchi H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* 2013;4:e975. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.503>.
- [322] Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt SV, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 2019;575:669–73. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1769-z>.
- [323] Trudler D, Nazor KL, Eisele YS, Grabauskas T, Dolatabadi N, Parker J, et al. Soluble α -synuclein-antibody complexes activate the NLRP3 inflammasome in hiPSC-derived microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118:e2025847118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025847118>.
- [324] Guo C, Fu R, Wang S, Huang Y, Li X, Zhou M, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2018;194:231–43. <https://doi.org/10.1111/cei.13167>.
- [325] Zhao C, Gu Y, Zeng X, Wang J. NLRP3 inflammasome regulates Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Orlando Fla* 2018;197:154–60. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.09.007>.
- [326] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436–44. <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
- [327] Bodnar-Wachtel M, Huber A-L, Gorry J, Hacot S, Burlet D, Gérossier L, et al. Inflammasome-independent NLRP3 function enforces ATM activity in response to genotoxic stress. *Life Sci Alliance* 2023;6:e202201494. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201494>.
- [328] Dupaul-Chicoine J, Arabzadeh A, Dagenais M, Douglas T, Champagne C, Morizot A, et al. The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity* 2015;43:751–63. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.013>.
- [329] Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 2012;491:259–63. <https://doi.org/10.1038/nature11535>.
- [330] Segovia M, Russo S, Jeldres M, Mahmoud YD, Perez V, Duhalde M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell* 2019;35:767–781.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.003>.

- [331] Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009;15:1170–8. <https://doi.org/10.1038/nm.2028>.
- [332] Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmaeilzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med* 2021;23:e3303. <https://doi.org/10.1002/jgm.3303>.
- [333] Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. *Postgrad Med J* 2020;97:312–20. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138577>.
- [334] Sallard E, Halloy J, Casane D, Helden J van, Decroly É. Retrouver les origines du SARS-CoV-2 dans les phylogénies de coronavirus. *médecine/sciences* 2020;36:783–96. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020123>.
- [335] Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022;23:3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
- [336] Akamatsu MA, de Castro JT, Takano CY, Ho PL. Off balance: Interferons in COVID-19 lung infections. *EBioMedicine* 2021;73:103642. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103642>.
- [337] Yin M, Marrone L, Peace CG, O'Neill LAJ. NLRP3, the inflammasome and COVID-19 infection. *QJM Int J Med* 2023;hcad011. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcad011>.
- [338] Sun X, Liu Y, Huang Z, Xu W, Hu W, Yi L, et al. SARS-CoV-2 non-structural protein 6 triggers NLRP3-dependent pyroptosis by targeting ATP6A1. *Cell Death Differ* 2022;29:1240–54. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00916-7>.
- [339] Lécuyer D, Nardacci R, Tannous D, Gutierrez-Mateyron E, Deva-Nathan A, Subra F, et al. The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection. *Microbiology*; 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.04.05.531513>.
- [340] Junqueira C, Crespo A, Ranjbar S, de Lacerda LB, Lewandrowski M, Ingber J, et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature* 2022;606:576–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04702-4>.
- [341] Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* 2021;218:e20201707. <https://doi.org/10.1084/jem.20201707>.
- [342] Ferreira AC, Soares VC, De Azevedo-Quintanilha IG, Dias SDSG, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, et al. SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. *Cell Death Discov* 2021;7:43. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00428-w>.
- [343] Zeng J, Xie X, Feng X-L, Xu L, Han J-B, Yu D, et al. Specific inhibition of the NLRP3 inflammasome suppresses immune overactivation and alleviates COVID-19 like pathology in mice. *EBioMedicine* 2022;75:103803. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103803>.
- [344] Xu H, Akinyemi IA, Chitre SA, Loeb JC, Lednický JA, McIntosh MT, et al. SARS-CoV-2 viroporin encoded by ORF3a triggers the NLRP3 inflammatory pathway. *Virology* 2022;568:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.01.003>.
- [345] Campbell GR, To RK, Hanna J, Spector SA. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway. *iScience* 2021;24:102295. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102295>.
- [346] Chemarin M, Dufies O, Mazet A, Mellan E, Coudereau R, Py BF, et al. L'inflammasome NLRP3 dans la physiopathologie des infections virales - Un focus sur la COVID-19. *médecine/sciences* 2022;38:545–52. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022080>.
- [347] Nieto-Torres JL, Verdía-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Castaño-Rodríguez C, Fernandez-Delgado R, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* 2015;485:330–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.010>.
- [348] Pan P, Shen M, Yu Z, Ge W, Chen K, Tian M, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat Commun* 2021;12:4664. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25015-6>.
- [349] Shi C-S, Nabar NR, Huang N-N, Kehrl JH. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discov* 2019;5:101. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0181-7>.
- [350] Kucia M, Ratajczak J, Bujko K, Adamiak M, Ciechanowicz A, Chumak V, et al. An evidence

that SARS-Cov-2/COVID-19 spike protein (SP) damages hematopoietic stem/progenitor cells in the mechanism of pyroptosis in Nlrp3 inflammasome-dependent manner. *Leukemia* 2021;35:3026–9. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01332-z>.

[351] Vora SM, Lieberman J, Wu H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2021;21:694–703. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00588-x>.

[352] Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging* 2020;12:11245–58. <https://doi.org/10.18632/aging.103372>.

[353] Wang C, Wang Z, Wang G, Lau JY-N, Zhang K, Li W. COVID-19 in early 2021: current status and looking forward. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:114. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00527-1>.

[354] Ma J, Zhu F, Zhao M, Shao F, Yu D, Ma J, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid suppresses host pyroptosis by blocking Gasdermin D cleavage. *EMBO J* 2021;40:e108249. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108249>.

[355] Ma Q. Pharmacological Inhibition of the NLRP3 Inflammasome: Structure, Molecular Activation, and Inhibitor-NLRP3 Interaction. *Pharmacol Rev* 2023;75:487–520. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.122.000629>.

[356] Schwaid AG, Spencer KB. Strategies for Targeting the NLRP3 Inflammasome in the Clinical and Preclinical Space. *J Med Chem* 2021;64:101–22. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01307>.

[357] Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Hawryluk N, Peurano H, Stam E, et al. Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:187–97.

[358] Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 2015;21:248–55. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>.

[359] Vande Walle L, Stowe IB, Šácha P, Lee BL, Demon D, Fossoul A, et al. MCC950/CRID3 potently targets the NACHT domain of wild-type NLRP3 but not disease-associated mutants for inflammasome inhibition. *PLoS Biol* 2019;17:e3000354. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000354>.

[360] Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol* 2019;15:556–9. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7>.

[361] Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu J-W, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem* 2010;285:9792–802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082305>.

[362] Marchetti C, Swartzwelter B, Gamboni F, Neff CP, Richter K, Azam T, et al. OLT1177, a β -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E1530–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716095115>.

[363] Madurka I, Vishnevsky A, Soriano JB, Gans SJ, Ore DJS, Rendon A, et al. DFV890: a new oral NLRP3 inhibitor-tested in an early phase 2a randomised clinical trial in patients with COVID-19 pneumonia and impaired respiratory function. *Infection* 2023;51:641–54. <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01904-w>.

[364] Cui B, Liu Y, Chen J, Chen H, Feng Y, Zhang P. Small molecule inhibitor CRT0066101 inhibits cytokine storm syndrome in a mouse model of lung injury. *Int Immunopharmacol* 2023;120:110240. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110240>.

[365] Montalban X, Arnold DL, Weber MS, Staikov I, Piasecka-Stryczynska K, Willmer J, et al. Placebo-Controlled Trial of an Oral BTK Inhibitor in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2019;380:2406–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1901981>.

[366] Cohen S, Tuckwell K, Katsumoto TR, Zhao R, Galanter J, Lee C, et al. Fenebrutinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis: A Randomized, Double-Blind, Phase II Trial (ANDES Study). *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2020;72:1435–46. <https://doi.org/10.1002/art.41275>.

[367] Gu Y-H, Ren K-W, Wang Y, Wang S-H, Yu X-H, Xu L-W, et al. Administration of USP7 inhibitor P22077 inhibited cardiac hypertrophy and remodeling in Ang II-induced hypertensive mice. *Front Pharmacol* 2022;13:1021361. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1021361>.

[368] Desu HL, Plastini M, Illiano P, Bramlett HM, Dietrich WD, de Rivero Vaccari JP, et al. IC100:

- a novel anti-ASC monoclonal antibody improves functional outcomes in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2020;17:143. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01826-0>.
- [369] Das B, Sarkar C, Rawat VS, Kalita D, Deka S, Agnihotri A. Promise of the NLRP3 Inflammasome Inhibitors in In Vivo Disease Models. *Molecules* 2021;26:4996. <https://doi.org/10.3390/molecules26164996>.
- [370] Hu JJ, Liu X, Xia S, Zhang Z, Zhang Y, Zhao J, et al. FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation. *Nat Immunol* 2020;21:736–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0669-6>.
- [371] Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Di Lucrezia R, Kordes S, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol* 2018;3:eaar6689. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6689>.
- [372] Zhou K, Enkhjargal B, Xie Z, Sun C, Wu L, Malaguit J, et al. Dihydrolipoic acid inhibits lysosomal rupture and NLRP3 through LAMP1/CaMKII/TAK1 pathways after subarachnoid hemorrhage in rat. *Stroke* 2018;49:175–83. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018593>.
- [373] Martínez GJ, Celermajer DS, Patel S. The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation. *Atherosclerosis* 2018;269:262–71. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.12.027>.
- [374] Burnstock G. Purinergic Nerves. *Pharmacol Rev* 1972;24:509–81.
- [375] Ledderose C, Junger WG. Mitochondria Synergize With P2 Receptors to Regulate Human T Cell Function. *Front Immunol* 2020;11:549889. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.549889>.
- [376] Kroemer G, Verkhratsky A. Mitochondrial Localization and Function of the Purinergic Receptor P2X7. *Function* 2021;2:zqab006. <https://doi.org/10.1093/function/zqab006>.
- [377] Mahmood A, Iqbal J. Purinergic receptors modulators: An emerging pharmacological tool for disease management. *Med Res Rev* 2022;42:1661–703. <https://doi.org/10.1002/med.21888>.
- [378] Burnstock G. Introduction to Purinergic Signaling. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2020;2041:1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1.
- [379] Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol Lett* 2019;205:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.11.006>.
- [380] Menzies RI, Tam FW, Unwin RJ, Bailey MA. Purinergic signaling in kidney disease. *Kidney Int* 2017;91:315–23. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.029>.
- [381] Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* 2018;25:4–12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>.
- [382] Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y. Regulation, Signaling and Physiological Functions of G-proteins. *J Mol Biol* 2016;428:3850–68. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>.
- [383] Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol Rev* 2005;85:1159–204. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>.
- [384] Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, et al. The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* 2005;280:11134–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411322200>.
- [385] Jiang Y, Ma W, Wan Y, Kozasa T, Hattori S, Huang XY. The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature* 1998;395:808–13. <https://doi.org/10.1038/27454>.
- [386] Meigs TE, Fields TA, McKee DD, Casey PJ. Interaction of Gα12 and Gα13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for β-catenin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:519–24.
- [387] Smrcka AV. G protein βγ subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2008;65:2191–214. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8006-5>.
- [388] Saini A, Patel R, Gaba S, Singh G, Gupta GD, Monga V. Adenosine receptor antagonists: Recent advances and therapeutic perspective. *Eur J Med Chem* 2022;227:113907. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113907>.
- [389] Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev* 2018;98:1591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>.
- [390] Sachdeva S, Gupta M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharm J SPJ* 2013;21:245–53. <https://doi.org/10.1016/j.jsp.2012.05.011>.
- [391] Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein

- kinases. *Cell Signal* 2003;15:813–27. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00058-5).
- [392] Franco R, Cordero A, Llinas Del Torrent C, Lillo A, Serrano-Marín J, Navarro G, et al. Structure and function of adenosine receptor heteromers. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2021;78:3957–68. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03761-6>.
- [393] Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7617–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.121587098>.
- [394] Fuxe K, Ferré S, Genedani S, Franco R, Agnati LF. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav* 2007;92:210–7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.034>.
- [395] North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002;82:1013–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>.
- [396] Sheng D, Hattori M. Recent progress in the structural biology of P2X receptors. *Proteins* 2022;90:1779–85. <https://doi.org/10.1002/prot.26302>.
- [397] Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 2005;280:10759–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412265200>.
- [398] Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:162. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>.
- [399] Schmid R, Evans RJ. ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annu Rev Physiol* 2019;81:43–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114259>.
- [400] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517–29. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>.
- [401] Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi É, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal* 2012;8:375–417. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9314-7>.
- [402] Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 2009;71:333–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>.
- [403] Caseley EA, Muench SP, Roger S, Mao H-J, Baldwin SA, Jiang L-H. Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in the P2X Receptor Genes: Association with Diseases, Impact on Receptor Functions and Potential Use as Diagnosis Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2014;15:13344–71. <https://doi.org/10.3390/ijms150813344>.
- [404] Burnstock G, Kennedy C. Chapter 11 - P2X Receptors in Health and Disease. In: Jacobson KA, Linden J, editors. *Adv. Pharmacol.*, vol. 61, Academic Press; 2011, p. 333–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00011-4>.
- [405] Erb L, Weisman GA. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2012;1:789–803. <https://doi.org/10.1002/wmts.62>.
- [406] Savi P, Zacharyus J-L, Delesque-Touchard N, Labouret C, Hervé C, Uzabiaga M-F, et al. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11069–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510446103>.
- [407] D'Ambrosi N, Iafrate M, Saba E, Rosa P, Volonté C. Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:1592–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.020>.
- [408] Shenoy SK, Lefkowitz RJ. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:521–33. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.002>.
- [409] Gutierrez AM, Lou X, Erik A, Persson G, Ring A. Growth hormones reverse desensitization of P2Y(2) receptors in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:594–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2461>.
- [410] Weick M, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. Resensitization of P2Y receptors by growth factor-mediated activation of the phosphatidylinositol-3 kinase in retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1525–32. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0417>.
- [411] Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006;58:281–341. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3>.

- [412] Hillmann P, Ko G-Y, Spinrath A, Raulf A, von Kügelgen I, Wolff SC, et al. Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y(2) receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *J Med Chem* 2009;52:2762–75. <https://doi.org/10.1021/jm801442p>.
- [413] Rafehi M, Neumann A, Baqi Y, Malik EM, Wiese M, Namasivayam V, et al. Molecular Recognition of Agonists and Antagonists by the Nucleotide-Activated G Protein-Coupled P2Y2 Receptor. *J Med Chem* 2017;60:8425–40. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00854>.
- [414] Xu P, Feng X, Luan H, Wang J, Ge R, Li Z, et al. Current knowledge on the nucleotide agonists for the P2Y2 receptor. *Bioorg Med Chem* 2018;26:366–75. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.043>.
- [415] Jasmer KJ, Muñoz Forti K, Woods LT, Cha S, Weisman GA. Therapeutic potential for P2Y2 receptor antagonism. *Purinergic Signal* 2023;19:401–20. <https://doi.org/10.1007/s11302-022-09900-3>.
- [416] Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 1996;50:224–9.
- [417] Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA. Site-directed Mutagenesis of P2U Purinoceptors: POSITIVELY CHARGED AMINO ACIDS IN TRANSMEMBRANE HELICES 6 AND 7 AFFECT AGONIST POTENCY AND SPECIFICITY (*). *J Biol Chem* 1995;270:4185–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4185>.
- [418] Liao Z, Seye CI, Weisman GA, Erb L. The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with alpha v integrins to access and activate G12. *J Cell Sci* 2007;120:1654–62. <https://doi.org/10.1242/jcs.03441>.
- [419] Bagchi S, Liao Z, Gonzalez FA, Chorna NE, Seye CI, Weisman GA, et al. The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alphav integrins to activate Go and induce cell migration. *J Biol Chem* 2005;280:39050–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504819200>.
- [420] Erb L, Liu J, Ockerhausen J, Kong Q, Garrad RC, Griffin K, et al. An Rgd Sequence in the P2y2 Receptor Interacts with α V β 3 Integrins and Is Required for Go-Mediated Signal Transduction. *J Cell Biol* 2001;153:491–502.
- [421] Santiago-Pérez LI, Flores RV, Santos-Berríos C, Chorna NE, Krugh B, Garrad RC, et al. P2Y(2) nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* 2001;187:196–208. <https://doi.org/10.1002/jcp.1063>.
- [422] Qi A-D, Wolff SC, Nicholas RA. The Apical Targeting Signal of the P2Y2 Receptor Is Located in Its First Extracellular Loop*. *J Biol Chem* 2005;280:29169–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501301200>.
- [423] Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, et al. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science* 2006;314:1792–5. <https://doi.org/10.1126/science.1132559>.
- [424] Müller T, Robaye B, Vieira RP, Ferrari D, Grimm M, Jakob T, et al. The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 2010;65:1545–53. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02426.x>.
- [425] Elliott MR, Cheken FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009;461:282–6. <https://doi.org/10.1038/nature08296>.
- [426] Kim HJ, Ajit D, Peterson TS, Wang Y, Camden JM, Gibson Wood W, et al. Nucleotides released from $A\beta_{1-42}$ -treated microglial cells increase cell migration and $A\beta_{1-42}$ uptake through P2Y2 receptor activation. *J Neurochem* 2012;121:228–38. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07700.x>.
- [427] Minns MS, Trinkaus-Randall V. Purinergic Signaling in Corneal Wound Healing: A Tale of 2 Receptors. *J Ocul Pharmacol Ther* 2016;32:498–503. <https://doi.org/10.1089/jop.2016.0009>.
- [428] Wang S, Iring A, Strilic B, Albarrán Juárez J, Kaur H, Troidl K, et al. P2Y₂ and Gq/G₁₁ control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *J Clin Invest* 2015;125:3077–86. <https://doi.org/10.1172/JCI81067>.
- [429] Leipziger J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F419-432. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00075.2002>.
- [430] Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA. P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:19138–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505913102>.

- [431] Hoebertz A, Mahendran S, Burnstock G, Arnett TR. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: A novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. *J Cell Biochem* 2002;86:413–9. <https://doi.org/10.1002/jcb.10236>.
- [432] El-Sayed FG, Camden JM, Woods LT, Khalafalla MG, Petris MJ, Erb L, et al. P2Y2 nucleotide receptor activation enhances the aggregation and self-organization of dispersed salivary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;307:C83-96. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00380.2013>.
- [433] Eun SY, Ko YS, Park SW, Chang KC, Kim HJ. IL-1 β enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration via P2Y2 receptor-mediated RAGE expression and HMGB1 release. *Vascul Pharmacol* 2015;72:108–17. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.04.013>.
- [434] Miyagi Y, Kobayashi S, Ahmed A, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. P2U purinergic activation leads to the cell cycle progression from the G1 to the S and M phases but not from the G0 to G1 phase in vascular smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:652–8. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0750>.
- [435] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskeleton* Hoboken Nj 2010;67:545–54. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>.
- [436] Yu N, Erb L, Shivaji R, Weisman GA, Seye CI. Binding of the P2Y2 Nucleotide Receptor to Filamin A Regulates Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 2008;102:581–8. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.162271>.
- [437] Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The filamins. *Cell Adhes Migr* 2011;5:160–9. <https://doi.org/10.4161/cam.5.2.14401>.
- [438] Okigaki M, Davis C, Falasca M, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP, et al. Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10740–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834348100>.
- [439] Collins M, Bartelt RR, Houtman JCD. T cell receptor activation leads to two distinct phases of Pyk2 activation and actin cytoskeletal rearrangement in human T cells. *Mol Immunol* 2010;47:1665–74. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.03.009>.
- [440] Du Q-S, Ren X-R, Xie Y, Wang Q, Mei L, Xiong W-C. Inhibition of PYK2-induced actin cytoskeleton reorganization, PYK2 autophosphorylation and focal adhesion targeting by FAK. *J Cell Sci* 2001;114:2977–87. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.16.2977>.
- [441] Lipinski CA, Tran NL, Menashi E, Rohl C, Kloss J, Bay RC, et al. The tyrosine kinase pyk2 promotes migration and invasion of glioma cells. *Neoplasia N Y N* 2005;7:435–45. <https://doi.org/10.1593/neo.04712>.
- [442] Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin KD, Garrad RC, Santiago-Pérez LI, et al. Src Homology 3 Binding Sites in the P2Y2 Nucleotide Receptor Interact with Src and Regulate Activities of Src, Proline-rich Tyrosine Kinase 2, and Growth Factor Receptors. *J Biol Chem* 2004;279:8212–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312230200>.
- [443] Zhao M, Finlay D, Zharkikh I, Vuori K. Novel Role of Src in Priming Pyk2 Phosphorylation. *PLoS ONE* 2016;11:e0149231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149231>.
- [444] Séror C, Melki M-T, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saïdi H, et al. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J Exp Med* 2011;208:1823–34. <https://doi.org/10.1084/jem.20101805>.
- [445] Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC. Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 1998;273:2653–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.2653>.
- [446] Paniagua-Herranz L, Gil-Redondo JC, Queipo MJ, González-Ramos S, Boscá L, Pérez-Sen R, et al. Prostaglandin E2 Impairs P2Y2/P2Y4 Receptor Signaling in Cerebellar Astrocytes via EP3 Receptors. *Front Pharmacol* 2017;8:937. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00937>.
- [447] Través PG, Pimentel-Santillana M, Carrasquero LMG, Pérez-Sen R, Delicado EG, Luque A, et al. Selective Impairment of P2Y Signaling by Prostaglandin E2 in Macrophages: Implications for Ca²⁺-Dependent Responses. *J Immunol* 2013;190:4226–35. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203029>.
- [448] Murthy KS, Makhlof GM. Coexpression of ligand-gated P2X and G protein-coupled P2Y receptors in smooth muscle. Preferential activation of P2Y receptors coupled to phospholipase C (PLC)-beta1 via Galphaq/11 and to PLC-beta3 via Gbetagamma3. *J Biol Chem* 1998;273:4695–704.

<https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4695>.

- [449] Werry TD, Christie MI, Dainty IA, Wilkinson GF, Willars GB. Ca²⁺ signalling by recombinant human CXCR2 chemokine receptors is potentiated by P2Y nucleotide receptors in HEK cells. *Br J Pharmacol* 2002;135:1199–208. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704566>.
- [450] Filippov AK, Webb TE, Barnard EA, Brown DA. P2Y2 Nucleotide Receptors Expressed Heterologously in Sympathetic Neurons Inhibit Both N-Type Ca²⁺ and M-Type K⁺ Currents. *J Neurosci* 1998;18:5170–9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-14-05170.1998>.
- [451] Kellerman D, Evans R, Mathews D, Shaffer C. Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1463–74. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00154-0).
- [452] Zhang J, Lin L, Chen X, Wang S, Wei Y, Zhou W, et al. Conjunctival Fluid Secretion Impairment via CaCC-CFTR Dysfunction Is the Key Mechanism in Environmental Dry Eye. *Int J Mol Sci* 2022;23:14399. <https://doi.org/10.3390/ijms232214399>.
- [453] Rieg T, Bunday RA, Chen Y, Deschenes G, Junger W, Insel PA, et al. Mice lacking P2Y2 receptors have salt-resistant hypertension and facilitated renal Na⁺ and water reabsorption. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2007;21:3717–26. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8807.com>.
- [454] Zhang Y, Listhrop R, Ecelbarger CM, Kishore BK. Renal sodium transporter/channel expression and sodium excretion in P2Y2 receptor knockout mice fed a high-NaCl diet with/without aldosterone infusion. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2011;300:F657–68. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00549.2010>.
- [455] Rajagopal M, Kathpalia PP, Thomas SV, Pao AC. Activation of P2Y1 and P2Y2 receptors induces chloride secretion via calcium-activated chloride channels in kidney inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2011;301:F544–53. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00709.2010>.
- [456] Vallon V, Rieg T. Regulation of renal NaCl and water transport by the ATP/UTP/P2Y₂ receptor system. *Am J Physiol-Ren Physiol* 2011;301:F463–75. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00236.2011>.
- [457] Matos JE, Robaye B, Boeynaems JM, Beauwens R, Leipziger J. K⁺ secretion activated by luminal P2Y2 and P2Y4 receptors in mouse colon. *J Physiol* 2005;564:269–79. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.080002>.
- [458] Mark MD, Ruppertsberg JP, Herlitze S. Regulation of GIRK channel deactivation by Galpha(q) and Galpha(i/o) pathways. *Neuropharmacology* 2000;39:2360–73. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00080-0).
- [459] Filippov AK, Fernández-Fernández JM, Marsh SJ, Simon J, Barnard EA, Brown DA. Activation and Inhibition of Neuronal G Protein-Gated Inwardly Rectifying K⁺ Channels by P2Y Nucleotide Receptors. *Mol Pharmacol* 2004;66:468–77.
- [460] Lee SY, Wolff SC, Nicholas RA, O'Grady SM. P2Y Receptors Modulate Ion Channel Function through Interactions Involving The C-Terminal Domain. *Mol Pharmacol* 2003;63:878–85. <https://doi.org/10.1124/mol.63.4.878>.
- [461] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2010;661:3–38. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_1.
- [462] Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflug Arch - Eur J Physiol* 2006;452:552–62. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0069-2>.
- [463] Katz S, Boland R, Santillán G. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: Involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:2082–91. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.018>.
- [464] Gendron F-P, Newbold NL, Vivas-Mejia P, Wang M, Neary JT, Sun G, et al. Signal transduction pathways for P2Y2 and P2X7 nucleotide receptors that mediate neuroinflammatory responses in astrocytes and microglial cells. *Biomed Res* 2003;14:47–61.
- [465] Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, Sun GY, et al. P2Y2 Nucleotide Receptor-Mediated Responses in Brain Cells. *Mol Neurobiol* 2010;41:356–66. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8115-7>.
- [466] Seye CI, Yu N, González FA, Erb L, Weisman GA. The P2Y2 Nucleotide Receptor Mediates Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression through Interaction with VEGF Receptor-2 (KDR/Flk-1)*. *J Biol Chem* 2004;279:35679–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401799200>.
- [467] Yin J, Xu K, Zhang J, Kumar A, Yu F-SX. Wound-induced ATP release and EGF receptor

- activation in epithelial cells. *J Cell Sci* 2007;120:815–25. <https://doi.org/10.1242/jcs.03389>.
- [468] Ratchford AM, Baker OJ, Camden JM, Rikka S, Petris MJ, Seye CI, et al. P2Y2 Nucleotide Receptors Mediate Metalloprotease-dependent Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor and ErbB3 in Human Salivary Gland Cells. *J Biol Chem* 2010;285:7545–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.078170>.
- [469] Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 2005;118:2997–3002. <https://doi.org/10.1242/jcs.02505>.
- [470] Hoffmann C, Ziegler N, Reiner S, Krasel C, Lohse MJ. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* 2008;283:30933–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801472200>.
- [471] Yuan X, Ferrari D, Mills T, Wang Y, Czopik A, Doursout M-F, et al. Editorial: Purinergic Signaling and Inflammation. *Front Immunol* 2021;12:699069. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699069>.
- [472] Le Duc D, Schulz A, Lede V, Schulze A, Thor D, Brüser A, et al. P2Y Receptors in Immune Response and Inflammation. *Adv. Immunol.*, vol. 136, Elsevier; 2017, p. 85–121. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.05.006>.
- [473] Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, et al. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 2010;3:ra55. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000588>.
- [474] Stober CB, Lammas DA, Li CM, Kumararatne DS, Lightman SL, McArdle CA. ATP-mediated killing of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin within human macrophages is calcium dependent and associated with the acidification of mycobacteria-containing phagosomes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001;166:6276–86. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.10.6276>.
- [475] Meshki J, Tuluc F, Bredeteau O, Ding Z, Kunapuli SP. Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y2 receptor. *Am J Physiol-Cell Physiol* 2004;286:C264–71. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2003>.
- [476] Meshki J, Tuluc F, Bredeteau O, Garcia A, Kunapuli SP. Signaling pathways downstream of P2 receptors in human neutrophils. *Purinergic Signal* 2006;2:537–44. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9007-1>.
- [477] Immler R, Simon SI, Sperandio M. Calcium signaling and related ion channels in neutrophil recruitment and function. *Eur J Clin Invest* 2018;48:e12964. <https://doi.org/10.1111/eci.12964>.
- [478] Douillet CD, Robinson WP, Milano PM, Boucher RC, Rich PB. Nucleotides induce IL-6 release from human airway epithelia via P2Y2 and p38 MAPK-dependent pathways. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L734–46. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00389.2005>.
- [479] Schulman ES, Glaum MC, Post T, Wang Y, Raible DG, Mohanty J, et al. ATP Modulates Anti-IgE-Induced Release of Histamine from Human Lung Mast Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:530–7. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.3.3387>.
- [480] Le T-TT, Berg NK, Harting MT, Li X, Eltzschig HK, Yuan X. Purinergic Signaling in Pulmonary Inflammation. *Front Immunol* 2019;10:1633. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01633>.
- [481] Baker OJ, Camden JM, Rome DE, Seye CI, Weisman GA. P2Y2 Nucleotide Receptor Activation Up-regulates Vascular Cell Adhesion Molecular-1 Expression and Enhances Lymphocyte Adherence to a Human Submandibular Gland Cell Line. *Mol Immunol* 2008;45:65–75. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.05.009>.
- [482] Cowen DS, Berger M, Nuttle L, Dubyak GR. Chronic Treatment With P2-Purinergic Receptor Agonists Induces Phenotypic Modulation of the HL-60 and U937 Human Myelogenous Leukemia Cell Lines. *J Leukoc Biol* 1991;50:109–22. <https://doi.org/10.1002/jlb.50.2.109>.
- [483] Marques-da-Silva C, Chaves MM, Chaves SP, Figliuolo VR, Meyer-Fernandes JR, Corte-Real S, et al. Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. *Cell Microbiol* 2011;13:1410–28. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01630.x>.
- [484] Eun SY, Seo J, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. LPS potentiates nucleotide-induced inflammatory gene expression in macrophages via the upregulation of P2Y2 receptor. *Int Immunopharmacol* 2014;18:270–6. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.026>.
- [485] de la Rosa G, Gómez AI, Baños MC, Pelegrín P. Signaling Through Purinergic Receptor P2Y2

- Enhances Macrophage IL-1 β Production. *Int J Mol Sci* 2020;21:4686. <https://doi.org/10.3390/ijms21134686>.
- [486] Thorstenberg ML, Ferreira MVR, Amorim N, Canetti C, Morrone FB, Filho JCA, et al. Purinergic Cooperation Between P2Y2 and P2X7 Receptors Promote Cutaneous Leishmaniasis Control: Involvement of Pannexin-1 and Leukotrienes. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01531>.
- [487] Bremond-Gignac D, Gicquel J-J, Chiambaretta F. Pharmacokinetic evaluation of diquafosol tetrasodium for the treatment of Sjögren's syndrome. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014;10:905–13. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.915026>.
- [488] Endo K, Sakamoto A, Fujisawa K. Diquafosol tetrasodium elicits total cholesterol release from rabbit meibomian gland cells via P2Y2 purinergic receptor signalling. *Sci Rep* 2021;11:6989. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86433-6>.
- [489] Zhang X, Jeyalatha M V, Qu Y, He X, Ou S, Bu J, et al. Dry Eye Management: Targeting the Ocular Surface Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2017;18:1398. <https://doi.org/10.3390/ijms18071398>.
- [490] Jumblatt JE, Jumblatt MM. Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva. *Exp Eye Res* 1998;67:341–6. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0520>.
- [491] Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, et al. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3275–9.
- [492] Paradiso AM, Ribeiro CMP, Boucher RC. Polarized Signaling via Purinoceptors in Normal and Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *J Gen Physiol* 2001;117:53–68.
- [493] Ehre C, Zhu Y, Abdullah LH, Olsen J, Nakayama KI, Nakayama K, et al. nPKC ϵ , a P2Y2-R downstream effector in regulated mucin secretion from airway goblet cells. *Am J Physiol-Cell Physiol* 2007;293:C1445–54. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00051.2007>.
- [494] Shihan M, Novoyatleva T, Lehmeier T, Sydykov A, Schermuly RT. Role of the Purinergic P2Y2 Receptor in Pulmonary Hypertension. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:11009. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111009>.
- [495] McEnaney RM, Shukla A, Madigan MC, Sachdev U, Tzeng E. P2Y2 Nucleotide Receptor Mediates Arteriogenesis in a Murine Model of Hindlimb Ischemia. *J Vasc Surg* 2016;63:216–25. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2014.06.112>.
- [496] Hochhauser E, Cohen R, Waldman M, Maksin A, Isak A, Aravot D, et al. P2Y2 receptor agonist with enhanced stability protects the heart from ischemic damage in vitro and in vivo. *Purinergic Signal* 2013;9:633–42. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9374-3>.
- [497] Cohen R, Shainberg A, Hochhauser E, Cheporko Y, Tobar A, Birk E, et al. UTP reduces infarct size and improves mice heart function after myocardial infarct via P2Y2 receptor. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1126–33. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.094>.
- [498] Qian S, Regan JN, Shelton MT, Hoggatt A, Mohammad KS, Herring PB, et al. The P2Y2 nucleotide receptor is an inhibitor of vascular calcification. *Atherosclerosis* 2017;257:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.12.014>.
- [499] Rieg T, Gerasimova M, Boyer JL, Insel PA, Vallon V. P2Y₂ receptor activation decreases blood pressure and increases renal Na⁺ excretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R510–518. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00148.2011>.
- [500] Li A, Xiong C, Gong C, Gou M, Wang Y, Yang Y, et al. Genetic polymorphisms of purinergic P2Y2 receptor were associated with the susceptibility to essential hypertension in Chinese postmenopausal women. *Purinergic Signal* 2023. <https://doi.org/10.1007/s11302-023-09921-6>.
- [501] Wang Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Ohta M, et al. The purinergic receptor P2Y₂, G-protein coupled, 2 (P2RY2) gene associated with essential hypertension in Japanese men. *J Hum Hypertens* 2010;24:327–35. <https://doi.org/10.1038/jhh.2009.67>.
- [502] Seye CI, Yu N, Jain R, Kong Q, Minor T, Newton J, et al. The P2Y2 Nucleotide Receptor Mediates UTP-induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Coronary Artery Endothelial Cells *. *J Biol Chem* 2003;278:24960–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301439200>.
- [503] Burnstock G. Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:364–73. <https://doi.org/10.1161/hq0302.105360>.
- [504] Weisman GA, Ajit D, Garrad R, Peterson TS, Woods LT, Thebeau C, et al. Neuroprotective roles of the P2Y2 receptor. *Purinergic Signal* 2012;8:559–78. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9307->

6.

- [505] Camden JM, Schrader AM, Camden RE, González FA, Erb L, Seye CI, et al. P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 2005;280:18696–702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500219200>.
- [506] Ajit D, Woods LT, Camden JM, Thebeau CN, El-Sayed FG, Glen WG, et al. Loss of P2Y2 Nucleotide Receptors Enhances Early Pathology in the TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2014;49:1031–42. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8577-5>.
- [507] Potthoff SA, Stegbauer J, Becker J, Wagenhaeuser PJ, Duvnjak B, Rump LC, et al. P2Y2 receptor deficiency aggravates chronic kidney disease progression. *Front Physiol* 2013;4:234. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00234>.
- [508] Zhang Y, Pop IL, Carlson NG, Kishore BK. Genetic deletion of the P2Y2 receptor offers significant resistance to development of lithium-induced polyuria accompanied by alterations in PGE2 signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:F70-77. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00444.2011>.
- [509] Zhang Y, Li L, Kohan DE, Ecelbarger CM, Kishore BK. Attenuation of lithium-induced natriuresis and kaliuresis in P2Y₂ receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305:F407-416. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00464.2012>.
- [510] H H, Cm C, A L, R U, G B. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 2000;57. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00911.x>.
- [511] Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell* 2013;24:130–7. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.008>.
- [512] Künzli BM, Berberat PO, Giese T, Csizmadia E, Kaczmarek E, Baker C, et al. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G223-230. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00259.2006>.
- [513] Bellefeuille SD, Molle CM, Gendron F-P. Reviewing the role of P2Y receptors in specific gastrointestinal cancers. *Purinergic Signal* 2019;15:451–63. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09678-x>.
- [514] White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:211–7. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.02.004>.
- [515] Zaparte A, Cappellari AR, Brandão CA, de Souza JB, Borges TJ, Kist LW, et al. P2Y2 receptor activation promotes esophageal cancer cells proliferation via ERK1/2 pathway. *Eur J Pharmacol* 2021;891:173687. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173687>.
- [516] Jacobson KA, Delicado EG, Gachet C, Kennedy C, von Kügelgen I, Li B, et al. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol* 2020;177:2413–33. <https://doi.org/10.1111/bph.15005>.
- [517] Paoletti A, Allouch A, Caillet M, Saïdi H, Subra F, Nardacci R, et al. HIV-1 Envelope Overcomes NLRP3-Mediated Inhibition of F-Actin Polymerization for Viral Entry. *Cell Rep* 2019;28:3381-3394.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.095>.
- [518] Chen S, Shenk T, Nogalski MT. P2Y2 purinergic receptor modulates virus yield, calcium homeostasis, and cell motility in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:18971–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907562116>.
- [519] Vanderstocken G, Van de Paar E, Robaye B, di Pietrantonio L, Bondue B, Boeynaems J-M, et al. Protective Role of P2Y2 Receptor against Lung Infection Induced by Pneumonia Virus of Mice. *PLoS ONE* 2012;7:e50385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050385>.
- [520] Johnson FL, Donohue JF, Shaffer CL. Improved Sputum Expectoration Following a Single Dose of INS316 in Patients with Chronic Bronchitis. *Chest* 2002;122:2021–9. <https://doi.org/10.1378/chest.122.6.2021>.
- [521] Appy L, Chardet C, Peyrottes S, Roy B. Synthetic Strategies for Dinucleotides Synthesis. *Molecules* 2019;24:4334. <https://doi.org/10.3390/molecules24234334>.
- [522] Brunschweiler A, Müller CE. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr Med Chem* 2006;13:289–312. <https://doi.org/10.2174/092986706775476052>.
- [523] Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, Nakata K. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:96–100.

- [524] Nakamura M, Imanaka T, Sakamoto A. Diquafosol ophthalmic solution for dry eye treatment. *Adv Ther* 2012;29:579–89. <https://doi.org/10.1007/s12325-012-0033-9>.
- [525] Keating GM. Diquafosol ophthalmic solution 3 %: a review of its use in dry eye. *Drugs* 2015;75:911–22. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0409-7>.
- [526] Ohashi Y, Munesue M, Shimazaki J, Takamura E, Yokoi N, Watanabe H, et al. Long-Term Safety and Effectiveness of Diquafosol for the Treatment of Dry Eye in a Real-World Setting: A Prospective Observational Study. *Adv Ther* 2020;37:707–17. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01188-x>.
- [527] Kellerman D, Rossi Mospan A, Engels J, Schaberg A, Gorden J, Smiley L. Denufosol: a review of studies with inhaled P2Y(2) agonists that led to Phase 3. *Pulm Pharmacol Ther* 2008;21:600–7. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.12.003>.
- [528] Olivença DV, Fonseca LL, Voit EO, Pinto FR. Thickness of the airway surface liquid layer in the lung is affected in cystic fibrosis by compromised synergistic regulation of the ENaC ion channel. *J R Soc Interface* 2019;16:20190187. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0187>.
- [529] Accurso FJ, Moss RB, Wilmott RW, Anbar RD, Schaberg AE, Durham TA, et al. Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:627–34. <https://doi.org/10.1164/rccm.201008-1267OC>.
- [530] Jacobson KA, Costanzi S, Ivanov AA, Tchilibon S, Besada P, Gao Z-G, et al. Structure activity and molecular modeling analyses of ribose- and base-modified uridine 5'-triphosphate analogues at the human P2Y2 and P2Y4 receptors. *Biochem Pharmacol* 2006;71:540–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.11.010>.
- [531] Sakuma K, Nakagawa H, Oikawa T, Noda M, Ikeda S. Effects of 4(1H)-quinolinone derivative, a novel non-nucleotide allosteric purinergic P2Y 2 agonist, on cardiomyocytes in neonatal rats. *Sci Rep* 2017;7:6050. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06481-9>.
- [532] Kaulich M, Streicher F, Mayer R, Müller I, Müller CE. Flavonoids — novel lead compounds for the development of P2Y2 receptor antagonists. *Drug Dev Res* 2003;59:72–81. <https://doi.org/10.1002/ddr.10203>.
- [533] Kindon N, Davis A, Dougall I, Dixon J, Johnson T, Walters I, et al. From UTP to AR-C118925, the discovery of a potent non nucleotide antagonist of the P2Y2 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27:4849–53. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.043>.
- [534] Conroy S, Kindon ND, Glenn J, Stoddart LA, Lewis RJ, Hill SJ, et al. Synthesis and Evaluation of the First Fluorescent Antagonists of the Human P2Y2 Receptor Based on AR-C118925. *J Med Chem* 2018;61:3089–113. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00139>.
- [535] The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection | bioRxiv n.d. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.04.05.531513v1> (accessed May 29, 2023).
- [536] Grailer JJ, Canning BA, Kalbitz M, Haggadone MD, Dhond RM, Andjelkovic AV, et al. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. *J Immunol Baltim Md* 1950 2014;192:5974–83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400368>.
- [537] Kanneganti T-D. The inflammasome: firing up innate immunity. *Immunol Rev* 2015;265:1–5. <https://doi.org/10.1111/imr.12297>.
- [538] Thorstenberg ML, Martins MDA, Figliuolo V, Silva CLM, Savio LEB, Coutinho-Silva R. P2Y2 Receptor Induces L. amazonensis Infection Control in a Mechanism Dependent on Caspase-1 Activation and IL-1 β Secretion. *Mediators Inflamm* 2020;2020:2545682. <https://doi.org/10.1155/2020/2545682>.
- [539] Scott BM, Gutiérrez-Vázquez C, Sanmarco LM, da Silva Pereira JA, Li Z, Plasencia A, et al. Self-tunable engineered yeast probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Med* 2021;27:1212–22. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01390-x>.
- [540] Erlich Z, Shlomovitz I, Edry-Botzer L, Cohen H, Frank D, Wang H, et al. Macrophages, rather than DCs, are responsible for inflammasome activity in the GM-CSF BMDC model. *Nat Immunol* 2019;20:397–406. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0313-5>.
- [541] Joshi H, Almgren-Bell A, Anaya EP, Todd EM, Van Dyken SJ, Seth A, et al. L-plastin enhances NLRP3 inflammasome assembly and bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Rep* 2022;38:110507. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110507>.
- [542] Young SRL, Hum JM, Rodenberg E, Turner CH, Pavalko FM. Non-Overlapping Functions for Pyk2 and FAK in Osteoblasts during Fluid Shear Stress-Induced Mechanotransduction. *PLoS ONE*

- 2011;6:e16026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016026>.
- [543] Bridges JP, Vladar EK, Huang H, Mason RJ. Respiratory epithelial cell responses to SARS-CoV-2 in COVID-19. *Thorax* 2022;77:203–9. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217561>.
- [544] Yamada T, Sato S, Sotoyama Y, Orba Y, Sawa H, Yamauchi H, et al. RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells. *Nat Immunol* 2021;22:820–8. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00942-0>.
- [545] Thorne LG, Reuschl A-K, Zuliani-Alvarez L, Whelan MVX, Turner J, Noursadeghi M, et al. SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. *EMBO J* 2021;40:e107826. <https://doi.org/10.15252/embj.2021107826>.
- [546] Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:903–13. <https://doi.org/10.1164/rccm.200808-1274OC>.
- [547] Ogawa T, Shichino S, Ueha S, Matsushima K. Macrophages in lung fibrosis. *Int Immunol* 2021;33:665–71. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab040>.
- [548] Mylvaganam RJ, Bailey JI, Sznajder JI, Sala MA. Recovering from a pandemic: pulmonary fibrosis after SARS-CoV-2 infection. *Eur Respir Rev* 2021;30:210194. <https://doi.org/10.1183/16000617.0194-2021>.
- [549] Joshi N, Watanabe S, Verma R, Jablonski RP, Chen C-I, Cheresch P, et al. A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2020;55:1900646. <https://doi.org/10.1183/13993003.00646-2019>.
- [550] Gholaminejhad M, Forouzes M, Ebrahimi B, Mahdavi SA, Mirtorabi SD, Liaghat A, et al. Formation and activity of NLRP3 inflammasome and histopathological changes in the lung of corpses with COVID-19. *J Mol Histol* 2022;53:883–90. <https://doi.org/10.1007/s10735-022-10101-w>.
- [551] Chong WH, Saha BK, Ananthakrishnan Ramani, Chopra A. State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. *Infection* 2021;49:591–605. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01602-z>.
- [552] Izbicki G, Segel M, Christensen T, Conner M, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2002;83:111–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2002.00220.x>.
- [553] Libório-Ramos S, Barbosa-Matos C, Fernandes R, Borges-Pereira C, Costa S. Interstitial Macrophages Lead Early Stages of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Induce Fibroblasts Activation. *Cells* 2023;12:402. <https://doi.org/10.3390/cells12030402>.
- [554] Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, Dhaliwal K, Duffin R, Phythian-Adams AT, et al. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:569–81. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1719OC>.
- [555] McCubbrey AL, Barthel L, Mohning MP, Redente EF, Mould KJ, Thomas SM, et al. Deletion of c-FLIP from CD11bhi Macrophages Prevents Development of Bleomycin-induced Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58:66–78. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0154OC>.
- [556] Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med* 2017;214:2387–404. <https://doi.org/10.1084/jem.20162152>.
- [557] Müller T, Fay S, Vieira RP, Karmouty-Quintana H, Cicko S, Ayata K, et al. The purinergic receptor subtype P2Y2 mediates chemotaxis of neutrophils and fibroblasts in fibrotic lung disease. *Oncotarget* 2017;8:35962–72. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16414>.
- [558] Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, Samara KD, Margaritopoulos GA, Choulaki C, et al. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung. *Eur Respir J* 2016;47:910–8. <https://doi.org/10.1183/13993003.00564-2015>.
- [559] Rao X, Zhou D, Deng H, Chen Y, Wang J, Zhou X, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in lung epithelial cells triggers radiation-induced lung injury. *Respir Res* 2023;24:25. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02331-7>.
- [560] Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MdH, van de Veerdonk FL, Perera D, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:15324–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100255108>.
- [561] Akbal A, Dernst A, Lovotti M, Mangan MSJ, McManus RM, Latz E. How location and cellular signaling combine to activate the NLRP3 inflammasome. *Cell Mol Immunol* 2022;19:1201–14. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00922-w>.

- [562] Jiang H, He H, Chen Y, Huang W, Cheng J, Ye J, et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *J Exp Med* 2017;214:3219–38. <https://doi.org/10.1084/jem.20171419>.
- [563] Fan Y, Xue G, Chen Q, Lu Y, Dong R, Yuan H. CY-09 Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation to Relieve Pain via TRPA1. *Comput Math Methods Med* 2021;2021:9806690. <https://doi.org/10.1155/2021/9806690>.
- [564] Coll RC, Schroder K, Pelegrín P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2022;43:653–68. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.04.003>.
- [565] He Y, Varadarajan S, Muñoz-Planillo R, Burberry A, Nakamura Y, Núñez G. 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J Biol Chem* 2014;289:1142–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515080>.
- [566] Irrera N, Vaccaro M, Bitto A, Pallio G, Pizzino G, Lentini M, et al. BAY 11-7082 inhibits the NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways and protects against IMQ-induced psoriasis. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2017;131:487–98. <https://doi.org/10.1042/CS20160645>.
- [567] Chinta PK, Tambe S, Umrani D, Pal AK, Nandave M. Effect of parthenolide, an NLRP3 inflammasome inhibitor, on insulin resistance in high-fat diet-obese mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2022;100:272–81. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2021-0116>.
- [568] Liu L, Feng L, Gao J, Hu J, Li A, Zhu Y, et al. Parthenolide targets NLRP3 to treat inflammasome-related diseases. *Int Immunopharmacol* 2023;119:110229. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110229>.
- [569] Kim BH, Roh E, Lee HY, Lee I-J, Ahn B, Jung S-H, et al. Benzoxathiole Derivative Blocks Lipopolysaccharide-Induced Nuclear Factor- κ B Activation and Nuclear Factor- κ B-Regulated Gene Transcription through Inactivating Inhibitory κ B Kinase β . *Mol Pharmacol* 2008;73:1309–18. <https://doi.org/10.1124/mol.107.041251>.
- [570] He H, Jiang H, Chen Y, Ye J, Wang A, Wang C, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nat Commun* 2018;9:2550. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04947-6>.
- [571] Guo C, Fulp JW, Jiang Y, Li X, Chojnacki JE, Wu J, et al. Development and Characterization of a Hydroxyl-Sulfonamide Analogue, 5-Chloro-N-[2-(4-hydroxysulfamoyl-phenyl)-ethyl]-2-methoxybenzamide, as a Novel NLRP3 Inflammasome Inhibitor for Potential Treatment of Multiple Sclerosis. *ACS Chem Neurosci* 2017;8:2194–201. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00124>.
- [572] Huang Y, Jiang H, Chen Y, Wang X, Yang Y, Tao J, et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases. *EMBO Mol Med* 2018;10:e8689. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708689>.
- [573] Cocco M, Pellegrini C, Martínez-Banaclocha H, Giorgis M, Marini E, Costale A, et al. Development of an Acrylate Derivative Targeting the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem* 2017;60:3656–71. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01624>.
- [574] Barczuk J, Siwecka N, Lusa W, Rozpędek-Kamińska W, Kucharska E, Majsterek I. Targeting NLRP3-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer’s Disease Treatment. *Int J Mol Sci* 2022;23:8979. <https://doi.org/10.3390/ijms23168979>.
- [575] Nguyen LTN, Nguyen HD, Kim YJ, Nguyen TT, Lai TT, Lee YK, et al. Role of NLRP3 Inflammasome in Parkinson’s Disease and Therapeutic Considerations. *J Park Dis* n.d.;12:2117–33. <https://doi.org/10.3233/JPD-223290>.
- [576] Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 2009;187:61–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903124>.
- [577] Zhang Z, Meszaros G, He W-T, Xu Y, de Fatima Magliarelli H, Mailly L, et al. Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med* 2017;214:2671–93. <https://doi.org/10.1084/jem.20162040>.
- [578] Purvis GSD, Collino M, Aranda-Tavio H, Chiazza F, O’Riordan CE, Zeboudj L, et al. Inhibition of Bruton’s TK regulates macrophage NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation in metabolic inflammation. *Br J Pharmacol* 2020;177:4416–32. <https://doi.org/10.1111/bph.15182>.
- [579] O’Connor CM, Perl A, Leonard D, Sangodkar J, Narla G. Therapeutic Targeting of PP2A. *Int J Biochem Cell Biol* 2018;96:182–93. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.10.008>.

- [580] Lu L, Liu D, Yang Y, Wang F. [WP1130 relieves septic shock in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2022;42:1747–54. <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2022.12.01>.
- [581] Zhao K, Zhang Y, Xu X, Liu L, Huang L, Luo R, et al. Acetylation is required for NLRP3 self-aggregation and full activation of the inflammasome 2019:2019.12.31.891556. <https://doi.org/10.1101/2019.12.31.891556>.
- [582] Chen L, Qing W, Yi Z, Lin G, Peng Q, Zhou F. NU9056, a KAT 5 Inhibitor, Treatment Alleviates Brain Dysfunction by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation, Affecting Gut Microbiota, and Derived Metabolites in LPS-Treated Mice. *Front Nutr* 2021;8:701760. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.701760>.
- [583] Chen Q-L, Yin H-R, He Q-Y, Wang Y. Targeting the NLRP3 inflammasome as new therapeutic avenue for inflammatory bowel disease. *Biomed Pharmacother* 2021;138:111442. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111442>.
- [584] Qiao Y, Tian X, Men L, Li S, Chen Y, Xue M, et al. Spleen tyrosine kinase promotes NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion via c-Jun N-terminal kinase activation and cell apoptosis during diabetic nephropathy. *Mol Med Rep* 2018;18:1995–2008. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9164>.
- [585] Jung ES, Suh K, Han J, Kim H, Kang H-S, Choi W-S, et al. Amyloid- β activates NLRP3 inflammasomes by affecting microglial immunometabolism through the Syk-AMPK pathway. *Aging Cell* 2022;21:e13623. <https://doi.org/10.1111/ace1.13623>.
- [586] Lin Y-C, Huang D-Y, Wang J-S, Lin Y-L, Hsieh S-L, Huang K-C, et al. Syk is involved in NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation through adaptor ASC phosphorylation and enhanced oligomerization. *J Leukoc Biol* 2015;97:825–35. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0814-371RR>.
- [587] Stack JH, Beaumont K, Larsen PD, Straley KS, Henkel GW, Randle JCR, et al. IL-converting enzyme/caspase-1 inhibitor VX-765 blocks the hypersensitive response to an inflammatory stimulus in monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;175:2630–4. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2630>.
- [588] Jin Y, Liu Y, Xu L, Xu J, Xiong Y, Peng Y, et al. Novel role for caspase 1 inhibitor VX765 in suppressing NLRP3 inflammasome assembly and atherosclerosis via promoting mitophagy and efferocytosis. *Cell Death Dis* 2022;13:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04966-8>.
- [589] Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol* 2019;10.
- [590] Yu L, Hong W, Lu S, Li Y, Guan Y, Weng X, et al. The NLRP3 Inflammasome in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis: Therapeutic Targets and Treatment. *Front Pharmacol* 2022;13.
- [591] Zhuang L, Luo X, Wu S, Lin Z, Zhang Y, Zhai Z, et al. Disulfiram alleviates pristane-induced lupus via inhibiting GSDMD-mediated pyroptosis. *Cell Death Discov* 2022;8:379. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01167-2>.
- [592] Humphries F, Shmuel-Galia L, Ketelut-Carneiro N, Li S, Wang B, Nemmara VV, et al. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science* 2020;369:1633–7. <https://doi.org/10.1126/science.abb9818>.
- [593] Geiler J, McDermott MF. Gevokizumab, an anti-IL-1 β mAb for the potential treatment of type 1 and 2 diabetes, rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Curr Opin Mol Ther* 2010;12:755–69.
- [594] Knickelbein JE, Tucker WR, Bhatt N, Armbrust K, Valent D, Obiyor D, et al. Gevokizumab in the treatment of autoimmune, non-necrotizing, anterior scleritis: Results of a phase I/II clinical trial. *Am J Ophthalmol* 2016;172:104–10. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2016.09.017>.
- [595] Winkler A, Sun W, De S, Jiao A, Sharif MN, Symanowicz PT, et al. The Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 Inhibitor PF-06650833 Blocks Inflammation in Preclinical Models of Rheumatic Disease and in Humans Enrolled in a Randomized Clinical Trial. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2021;73:2206–18. <https://doi.org/10.1002/art.41953>.
- [596] Efficacy and Safety of the Selective Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4 Inhibitor, PF-06650833, in Patients with Active Rheumatoid Arthritis and Inadequate Response to Methotrexate. *ACR Meet Abstr* n.d. <https://acrabstracts.org/abstract/efficacy-and-safety-of-the-selective-interleukin-1-receptor-associated-kinase-4-inhibitor-pf-06650833-in-patients-with-active-rheumatoid-arthritis-and-inadequate-response-to-methotrexate/> (accessed May 30, 2023).

- [597] Youm Y-H, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, et al. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med* 2015;21:263–9. <https://doi.org/10.1038/nm.3804>.
- [598] Shippy DC, Wilhelm C, Viharkumar PA, Raife TJ, Ulland TK. β -Hydroxybutyrate inhibits inflammasome activation to attenuate Alzheimer's disease pathology. *J Neuroinflammation* 2020;17:280. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01948-5>.
- [599] Wang D, Zhang J, Jiang W, Cao Z, Zhao F, Cai T, et al. The role of NLRP3-CASP1 in inflammasome-mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in manganese-induced, hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability. *Autophagy* 2017;13:914–27. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1293766>.
- [600] Jin H-Z, Yang X-J, Zhao K-L, Mei F-C, Zhou Y, You Y-D, et al. Apocynin alleviates lung injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling in acute pancreatitis. *Int Immunopharmacol* 2019;75:105821. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105821>.
- [601] Xin R, Sun X, Wang Z, Yuan W, Jiang W, Wang L, et al. Apocynin inhibited NLRP3/XIAP signalling to alleviate renal fibrotic injury in rat diabetic nephropathy. *Biomed Pharmacother* 2018;106:1325–31. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.036>.

Titre : Caractérisation de la régulation négative de l'inflammasome NLRP3 par le récepteur purinergique P2Y2 dans le cadre du traitement des maladies liées à un excès d'inflammation

Mots clés : NLRP3, inflammasome, récepteurs purinergiques, P2Y2, inflammation, COVID-19

Résumé : Les inflammasomes sont des complexes multi-protéiques essentiels à la réponse immunitaire innée qui sont mis en œuvre en réponse à des agents pathogènes ainsi qu'à divers signaux de dangers. La dérégulation de l'activation de ces complexes immunomodulateurs participe au développement de multiples maladies humaines liées à un excès d'inflammation. Mes travaux de thèse portent sur la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui est caractérisée par la libération de cytokines pro-inflammatoires (telles que les interleukines-1 β et -18) ainsi que l'induction d'une mort cellulaire inflammatoire

également connue sous le nom de pyroptose. Notre équipe a récemment identifié un lien fonctionnel existant entre le récepteur purinergique P2Y2 et la protéine NLRP3. Lors de précédents travaux, nous avons révélé qu'au cours de l'infection à VIH-1, l'activation du récepteur P2Y2 réprime l'activité biologique de la protéine NLRP3. A la suite de ces travaux, nous avons porté notre attention sur l'influence de ce lien fonctionnel sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 et sur les conséquences de sa modulation sur le cycle réplicatif du SARS-CoV-2 ainsi que lors du développement d'une fibrose pulmonaire, deux processus biologiques qui participent à l'établissement de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19).

Title : Characterisation of the negative regulation of the NLRP3 inflammasome by the P2Y2 purinergic receptor in the treatment of inflammation-related diseases

Keywords : NLRP3, inflammasome, purinergic receptors, P2Y2, inflammation, COVID-19

Abstract : Inflammasomes are multi-protein complexes that are essential to the innate immune response and are activated in response to pathogens and various danger signals. Dysregulation of the activation of these immunomodulatory complexes is involved in the development of many human inflammation-related diseases. My thesis work focuses on understanding the cellular and molecular mechanisms involved in regulating the activation of the NLRP3 inflammasome, which is characterised by the release of pro-inflammatory cytokines (such as interleukins 1 β and 18) and the induction of inflammatory cell death, also known as pyroptosis.

Our team has recently identified a functional link between the P2Y2 purinergic receptor and the NLRP3 protein. In previous work, we revealed that during HIV-1 infection, activation of the P2Y2 receptor represses the biological activity of the NLRP3 protein. Following this work, we investigated the influence of this functional link on the activation of the NLRP3 inflammasome and the consequences of its modulation on the replicative cycle of SARS-CoV-2 and during the development of pulmonary fibrosis, two biological processes involved in the establishment of coronavirus 2019 disease (COVID-19).

