



**HAL**  
open science

# Rôle de la protéine PCNA cytoplasmique dans la régulation de l'inflammasome NLRP3

Chloé Lopes

► **To cite this version:**

Chloé Lopes. Rôle de la protéine PCNA cytoplasmique dans la régulation de l'inflammasome NLRP3. Immunologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5259 . tel-04765415

**HAL Id: tel-04765415**

**<https://theses.hal.science/tel-04765415v1>**

Submitted on 4 Nov 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.

Université Paris Cité

Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC) : ED 562

Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Cité UMR-S1016

# Rôle de la protéine PCNA cytoplasmique dans la régulation de l'inflammasome NLRP3

Présentée par **Chloé LOPES**

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par **Léa REMY-TOURNEUR**

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2023

**Devant un jury composé de :**

Mme. Léa REMY-TOURNEUR, MCU-HDR, Université Paris Cité, **Directrice de thèse**

Mme. Bénédicte PY, CR INSERM, Université Claude Bernard-Lyon 1, **Rapporteur**

M. Christophe PAGET, DR INSERM, Université de Tours, **Rapporteur**

M. Sylvain LATOUR, DR INSERM, Université Paris Cité, **Examineur**

M. Hang Korng EA, PU-PH, Université Paris Cité, **Examineur**

Mme. Agnès TISSIER, CR INSERM, Université Claude Bernard-Lyon 1, **Examineur**

Mme. Marjolaine GOSSET, PU-PH, Université Paris Cité, **Membre invité**

# Résumé

**Mots-clés : Inflammasome, NLRP3, PCNA, NEK7, macrophages, échafaudage.**

L'inflammasome NLRP3 est composé du capteur NLRP3, de l'adaptateur ASC et de l'effecteur Caspase-1. Un grand nombre de protéines sont impliquées dans son amorçage, son activation et sa régulation. Parmi eux, la sérine/thréonine kinase NEK7, impliquée dans la mitose, interagit avec NLRP3 pour gérer l'assemblage et l'activation de l'inflammasome.

PCNA est une protéine d'échafaudage nucléaire essentielle à la réplication de l'ADN dont les fonctions dépendent des protéines associées. Dans le neutrophile, cellule différenciée qui ne prolifère pas, la protéine PCNA est exclusivement cytoplasmique et régule les fonctions des neutrophiles par interaction avec différents partenaires protéiques. Cela inclut les pro-Caspases-3/8/9/10 pour réguler l'apoptose, et la sous-unité p47phox de la NADPH oxydase pour réguler la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la protéine PCNA cytoplasmique pourrait servir de plateforme de régulation de l'inflammasome NLRP3 via son interaction avec ses composants. Nous avons étudié son rôle dans les cellules THP-1 humaines différenciées en macrophages, dans lesquels la protéine PCNA est principalement relocalisée dans le cytoplasme, et les voies de signalisation des inflammasomes NLRP3 sont clairement définies. Le peptide p21 se lie à PCNA avec une forte affinité et permet la dissociation des interactions de PCNA avec ses autres partenaires. Nous avons montré que le peptide p21 inhibait la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par la nigéricine, le clivage de la pro-Caspase-1 et le clivage de la gasdermine D activant la pyroptose. En revanche, seul le T2AA, qui se lie à PCNA sur des sites différents de ceux du peptide p21, inhibait l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les cristaux d'urate monosodique. Cependant, le peptide p21 et le T2AA inhibaient la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par la phagocytose d'*Escherichia coli* entéropathogènes. Ces résultats démontraient que la prévention de l'interaction de PCNA avec ses partenaires inhibait l'activation des inflammasomes NLRP3 canonique et non canonique dans les macrophages THP-1. De plus, nous avons montré que la protéine PCNA cytoplasmique pouvait interagir avec NLRP3 dans les macrophages THP-1 au repos, et que la stimulation par la nigéricine entraînait la liaison de PCNA cytoplasmique à la fois à NLRP3 et à NEK7. Le peptide p21, qui altère l'activation de l'inflammasome, diminuait l'interaction PCNA-NEK7. Enfin, en utilisant des macrophages dérivés de la moelle osseuse de

souris knock-out p21, nous avons montré que la protéine p21 pouvait être un répresseur naturel de l'inflammasome NLRP3. Nos résultats identifient ainsi PCNA et p21 comme de nouveaux régulateurs de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages.



# Summary

## Role of cytoplasmic PCNA protein in the regulation of the NLRP3 inflammasome

**Keywords:** Inflammasome, NLRP3, PCNA, NEK7, macrophages, scaffold.

The NLRP3 inflammasome is composed of the NLRP3 sensor, the ASC adaptor and the Caspase-1 effector. However, a large number of proteins are involved in its priming, activation and regulation. Among them, the serine/threonine kinase NEK7, implicated in mitosis, interacts with NLRP3 to manage inflammasome assembly and activation. PCNA is a nuclear scaffolding protein essential for DNA replication whose functions depend on associated proteins. In the neutrophil, a differentiated cell that does not proliferate, the PCNA is exclusively cytoplasmic and regulates neutrophil functions through interaction with different protein partners. That includes pro-Caspases-3/8/9/10 to regulate apoptosis and the p47phox subunit of NADPH oxidase to regulate the production of reactive oxygen species. We therefore hypothesize that cytoplasmic PCNA could serve as a regulatory platform for the NLRP3 inflammasome via its interaction with its components. We investigated its role in PMA-differentiated THP-1 macrophages, in which PCNA was mainly relocated in the cytoplasm and the signaling pathways of NLRP3 inflammasomes were clearly defined. The p21 peptide binds to PCNA with high affinity and allows the dissociation of the interactions of PCNA with its other partners. We showed that the p21 peptide inhibited nigericin-induced IL-1 $\beta$  secretion, pro-Caspase-1 cleavage and pyroptosis-activating gasdermin D cleavage. By contrast, only the chemical T2AA, which binds to PCNA at different sites than p21 peptide, inhibited NLRP3 inflammasome activation by monosodium urate crystals. However, both p21 peptide and T2AA inhibited IL-1 $\beta$  secretion induced by phagocytosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. These results demonstrated that preventing the interaction of PCNA with its partners inhibited the activation of both the canonical and non-canonical NLRP3 inflammasomes in THP-1 macrophages. Moreover, we showed that cytoplasmic PCNA could interact with NLRP3 in resting THP-1 macrophages, and that nigericin-stimulation resulted in binding of cytoplasmic PCNA to both NLRP3 and NEK7. The p21 peptide that impaired inflammasome activation disrupted the PCNA-NEK7 interaction. Finally, using bone marrow-derived macrophages from p21 knockout mice, we showed that the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 can be a natural

repressor of the NLRP3 inflammasome. Our results thus identify PCNA and p21 as new regulators of the NLRP3 inflammasome activation in macrophages.

# Remerciements

Je tiens à remercier Léa Remy-Tourneur d'avoir dirigé mon travail de thèse. Je te remercie pour ton soutien, tes conseils et pour tout ce que tu m'as transmis. Je te remercie également pour ta patience et ton aide précieuse pour la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie Bénédicte Py et Christophe Paget d'avoir accepté mon invitation en tant que membre de mon jury et rapporteur de mon manuscrit de thèse. Je voudrais leur exprimer toute ma gratitude pour avoir pris du temps pour lire mon mémoire.

Je voudrais également remercier Agnès Tissier et Hang Korng Ea d'avoir accepté mon invitation en tant qu'examineur au sein de mon jury de thèse ainsi que Marjolaine Gosset d'avoir accepté mon invitation en tant que membre invité au sein de mon jury.

J'adresse tous mes remerciements à Marjolaine Gosset et Hang Korng Ea d'avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi individuel et d'avoir partagé des discussions scientifiques intéressantes. Je les remercie pour leur précieux temps, leurs conseils éclairés et leurs critiques constructives qui ont grandement contribué à l'amélioration de mon travail.

Je remercie tous les membres présents et passés du laboratoire pour leur soutien et leur aide au cours de ces longues années de thèse. En particulier, merci à Céline, Vaarany et Nathalie de m'avoir formée techniquement et de m'avoir permis de m'intégrer dans l'équipe à mon arrivée en M2. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre soutien, votre patience et votre qualité de travail. Merci à Karen, Lucie, Manon, Rodrigo, Giovanni, Jenny, Roland, Pierre, Pascal et bien d'autres pour leur aide et leur bonne humeur sans lesquelles ces dernières années n'auraient pas été aussi agréables.

Je remercie particulièrement Lucie et Karen « les mégères de Cochin » sans qui je n'aurais probablement pas fini cette thèse. Je tiens à prendre un moment pour exprimer ma profonde gratitude envers vous deux. Votre contribution à cette thèse a été bien plus que professionnelle, elle a été le reflet de l'amitié et du soutien inestimable. Merci pour tous les moments intérieurs ou extérieurs au laboratoire que nous avons passés ensemble, les verres et les fous rires partagés.

Karen, ta force, ta perspicacité et ton expertise ont enrichi mon travail. Maintenant, dans cette période difficile que tu traverses, je tiens à te témoigner tout mon soutien et mes vœux sincères pour un prompt rétablissement. Je sais que tu es une personne d'une grande résilience et que tu vas traverser cette épreuve avec courage et détermination. Je te souhaite une guérison rapide, une santé retrouvée, et une vie future remplie de bonheur, de succès et de moments précieux. Tu es une personne extraordinaire, et je suis honorée de t'avoir rencontrée. Prends bien soin de toi, Karen.

Lucie, ton organisation, ta « bonne humeur » et ton soutien émotionnel ont été une source constante d'inspiration. Je tiens également à te féliciter pour ton travail et ta persévérance dans ta propre thèse. La fin de cette étape importante de ta vie approche, et je sais que tu vas la traverser avec la même détermination et le même professionnalisme qui t'ont toujours caractérisée. Je te souhaite tout le courage du monde pour cette dernière ligne droite. Que cette période de rédaction et de soutenance soit couronnée de succès, et que tu puisses enfin profiter pleinement des fruits de ton dur labeur. N'oublie pas que je suis là pour toi, pour t'apporter mon soutien, discuter de tes travaux, ou simplement partager un moment de détente lorsque tu en auras besoin. Je suis ravie d'avoir dépassé cette première impression froide et d'avoir découvert cette fille forte, marrante et attentive.

Je tiens à vous remercier toutes les deux du fond du cœur pour votre engagement, votre soutien et votre amitié. Cette thèse porte la marque indélébile de votre contribution.

Merci à Laurence Bénit, pour ton soutien depuis ma première année de thèse ainsi que pour ton suivi durant ces trois longues années. Je tiens à t'exprimer ma plus profonde gratitude pour le rôle essentiel que tu joues pour nous, les doctorants. Ton engagement et ta capacité à faciliter la communication ont eu un impact significatif, et je tiens à te remercier du fond du cœur pour ton travail exceptionnel. Merci d'avoir assumé ce rôle important avec tant de compétence et de compassion. Ton influence positive n'est pas passée inaperçue.

Merci à toute l'équipe Berlioz-Emiliani, vous m'avez été d'un grand soutien et d'un grand réconfort pour survivre à ces longues années. Les échanges scientifiques et les moments partagés ont enrichi mon expérience de recherche. Merci à Delphine de m'avoir aidée à mettre au point mon protocole de co-immunoprécipitation.

Merci à Anne-Sophie Dangeard, de l'équipe Arrieumerlou, de m'avoir formée à la culture bactérienne et de m'avoir permis de réaliser mes expériences d'activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique par bactéries *E.coli* sous leur PSM.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à cette thèse notamment les différentes plateformes de l'Institut Cochin.

Pour finir, je tiens aussi à remercier ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel, leur patience et leur encouragement constant pendant ma thèse. Votre présence et vos mots d'encouragement ont été ma bouée de sauvetage, et je vous en suis profondément reconnaissante.

Je remercie tout particulièrement mes parents pour leur amour inconditionnel, leur compréhension et leur soutien indéfectible. Votre foi en moi a été mon moteur, et je suis honorée de vous avoir à mes côtés. Merci de m'avoir encouragée à continuer dans les moments difficiles, sans vous je n'aurais jamais été aussi loin dans mes études.

Et enfin, merci à Camille et Brice pour leur soutien émotionnel et pour m'avoir donné la force de continuer. Vos encouragements, votre écoute et nos moments de détente m'ont permis de préserver un minimum mon équilibre mental dans les moments les plus difficiles de cette thèse. Je ne pourrais pas avoir demandé de meilleurs amis.

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Résumé .....   | 2         |
| Summary.....   | 4         |
| Remerciements.....   | 6         |
| Liste des figures .....  | 13        |
| Liste des abréviations .....   | 14        |
| <b>Introduction .....</b>  | <b>19</b> |
| Partie 1: L'inflammation .....   | 20        |
| I. La réponse inflammatoire .....  | 20        |
| 1) L'initiation de la réponse inflammatoire : la phase vasculaire.....                 | 23        |
| 2) Amplification de la réponse inflammatoire : la phase cellulaire.....                | 24        |
| a. Les neutrophiles .....  | 25        |
| b. Les autres cellules recrutées : macrophages, mastocytes, cellules dendritiques..... | 25        |
| c. La réponse immune adaptative : les lymphocytes .....                                | 26        |
| 3) Résolution de la réponse inflammatoire .....  | 26        |
| 4) L'inflammation chronique .....  | 28        |
| II. Activation de l'inflammation par des signaux de danger .....                       | 30        |
| 1) Les signaux de danger : DAMPs/PAMPs.....  | 30        |
| a. La découverte des PAMPs et des DAMPs.....   | 30        |
| b. Description des PAMPs et des DAMPs .....  | 32        |
| 2) Les Pattern Recognition Receptors (PRR).....  | 35        |
| a. Les Toll-like receptors: TLR .....  | 37        |
| b. Les NOD-like receptors: NLR.....  | 38        |
| c. Les RIG-I-like receptors: RLR.....  | 40        |
| d. Les C-type lectin receptors: CLR .....  | 41        |

|   |    |
|---|----|
| e. Les récepteurs senseurs de l'ADN: CDS (Cytosolic DNA Sensor) et ALR (AIM-2 Like Receptor)..... | 42 |
| III. Les inflammasomes : acteur majeur de l'immunité innée .....                                  | 43 |
| 1) L'inflammasome NLRP1 .....   | 46 |
| 2) L'inflammasome NLRP3 .....   | 48 |
| 3) L'inflammasome NLRP6 .....   | 49 |
| 4) L'inflammasome NLRP7 .....   | 50 |
| 5) L'inflammasome NLRP12 .....  | 51 |
| 6) L'inflammasome NLRC4 .....   | 53 |
| 7) L'inflammasome AIM2.....   | 54 |
| 8) L'inflammasome IFI16.....  | 55 |
| 9) L'inflammasome PYRIN.....  | 56 |
| IV. L'inflammasome NLRP3 .....  | 57 |
| 1) Description et structure.....  | 57 |
| 2) Amorçage/Priming de l'inflammasome NLRP3 .....   | 61 |
| 3) Inflammasome NLRP3 canonique.....  | 64 |
| a. Signaux d'activation de l'inflammasome canonique.....  | 64 |
| b. Mécanismes d'activation de l'inflammasome canonique .....                                      | 66 |
| i. Les flux ioniques .....  | 66 |
| ii. Dysfonctionnement des organites .....   | 69 |
| ❖ Les lysosomes .....   | 70 |
| ❖ Les mitochondries.....  | 71 |
| ❖ Le réticulum endoplasmique .....  | 73 |
| ❖ L'appareil de golgi.....  | 74 |
| c. Les protéines extérieures .....  | 76 |
| 4) Inflammasome NLRP3 non canonique .....   | 76 |

|  |     |
|--|-----|
| 5) Inflammasome NLRP3 alternatif.....  | 79  |
| 6) Sécrétion d'IL-1 $\beta$ /IL-18 et pyroptose .....                            | 81  |
| a. Sécrétion d'IL-1 $\beta$ /IL-18 .....   | 81  |
| b. Mort inflammatoire pyroptotique.....  | 82  |
| 7) La régulation de l'inflammasome NLRP3 canonique.....                          | 85  |
| a. Disponibilité des composants et localisation subcellulaire.....               | 85  |
| b. Régulation lors du priming .....  | 86  |
| i. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelles.....                | 87  |
| ii. Régulation par modifications post-traductionnelles .....                     | 87  |
| c. Régulation lors de l'activation .....   | 89  |
| i. Les régulateurs .....   | 89  |
| ii. Régulation par modifications post-traductionnelles .....                     | 90  |
| d. Contrôle autophagique.....  | 95  |
| V. Inflammasome NLRP3 et pathologies .....                                       | 97  |
| 1) Syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS) .....                   | 97  |
| 2) Inflammasome NLRP3 et maladies articulaires.....                              | 98  |
| 3) Inflammasome NLRP3 et vascularites .....                                      | 100 |
| 4) Inflammasome NLRP3 et autres pathologies .....                                | 101 |
| Partie 2: Proliferating Cell Nuclear Antigen « PCNA ».....                       | 104 |
| I. PCNA: une protéine d'échafaudage .....  | 104 |
| 1) Découverte de la protéine PCNA.....   | 104 |
| 2) Description et structure.....   | 105 |
| 3) Motifs de liaison .....   | 107 |
| II. Fonctions de la protéine PCNA nucléaire .....                                | 108 |
| III. Relocalisation cytoplasmique et fonctions de la protéine PCNA cytoplasmique | 113 |
| 1) Relocalisation cytoplasmique .....  | 113 |



|  |            |
|--|------------|
| 2) Fonctions de la protéine PCNA cytoplasmique .....                             | 114        |
| IV. Régulation de la protéine PCNA.....  | 117        |
| V. Molécules inhibitrices de l'interaction PCNA/partenaires .....                | 124        |
| 1) Peptide p21.....  | 124        |
| 2) T2AA.....   | 126        |
| Objectifs de la thèse .....  | 128        |
| <b>Résultats .....</b>   | <b>130</b> |
| Article 1.....   | 131        |
| Article 2.....   | 166        |
| <b>Discussion et perspectives .....</b>  | <b>179</b> |
| Discussion .....   | 180        |
| I. PCNA un nouveau régulateur de l'inflammasome NLRP3.....                       | 180        |
| 1) Effet sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique .....                | 180        |
| 2) Co-sécrétion de PCNA avec les composants inflammatoires ? .....               | 183        |
| 3) Régulation de l'inflammasome non canonique.....                               | 183        |
| 4) Régulation de l'inflammasome canonique dans les macrophages murins.....       | 184        |
| 5) Régulation de l'inflammasome NLRP3 dans les neutrophiles ? .....              | 185        |
| II. Mécanistique de la régulation de l'inflammasome NLRP3 canonique par PCNA ... | 188        |
| 1) Interaction de PCNA avec NLRP3 et NEK7 .....                                  | 188        |
| 2) Régulation par modification post-traductionnelle ? .....                      | 192        |
| Perspectives.....  | 195        |
| <b>Annexe .....</b>  | <b>197</b> |
| Abstract Congrès Phagocyte Workshop .....  | 198        |
| <b>Bibliographie .....</b>   | <b>199</b> |

## Liste des figures

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1: La réponse inflammatoire .....  | 22  |
| Figure 2: Les Pattern Recognition Receptors .....   | 36  |
| Figure 3: Structure et signaux d'activation des différents inflammasomes, et exemple de l'assemblage et de l'activation de l'inflammasome NLRP3 .....               | 46  |
| Figure 4: Modèle d'activation de NLRP3 .....  | 60  |
| Figure 5: Amorçage/Priming de l'inflammasome NLRP3 .....  | 63  |
| Figure 6: Activation de l'inflammasome NLRP3 canonique .....  | 75  |
| Figure 7: Activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique .....  | 78  |
| Figure 8: Activation de l'inflammasome NLRP3 alternatif .....   | 80  |
| Figure 9: Sécrétion d'Il-1 $\beta$ /IL-18 et pyroptose .....  | 82  |
| Figure 10: Régulation de l'inflammasome NLRP3 par localisation subcellulaire, régulateurs et MPTs .....   | 94  |
| Figure 11: Structure tridimensionnelle de PCNA .....  | 106 |
| Figure 12: Fonctions de la protéine PCNA nucléaire .....  | 113 |
| Figure 13: Relocalisation cytoplasmique de PCNA et fonctions de la protéine PCNA cytoplasmique .....  | 115 |
| Figure 14: Régulation de la protéine PCNA par modifications post-traductionnelles (MPTs) .....  | 124 |
| Figure 15: Structure tridimensionnelle de PCNA en interaction avec le peptide p21 ou le T2AA .....  | 126 |
| Figure 16: Modèle de régulation de l'inflammasome NLRP3 canonique par la protéine PCNA cytoplasmique dans les macrophages .....                                     | 191 |
| Figure 17: Modèle hypothétique de la régulation de l'inflammasome NLRP3 par la protéine PCNA cytoplasmique par contrôle de l'acétylation de la protéine NLRP3 ..... | 193 |

## Liste des abréviations

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>AA</b> : Acide arachidonique   | <b>BRCC3</b> : BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3  | <b>CINCA</b> : Chronic infantile neurological cutanéus, articular                            |
| <b>ADN</b> : Acide deoxyribonucleique   | <b>BTK</b> : Bruton's Tyrosine Kinase  | <b>CLIC</b> : Chloride intracellular channel   |
| <b>ADNdb</b> : ADN double brin  | <b>CIITA</b> : MHC class II transcription activator  | <b>CLR</b> : C-type lectin receptor  |
| <b>ADNmt</b> : ADN mitochondrial  | <b>Ca<sup>2+</sup></b> : Calcium   | <b>COP</b> : CARD-only protein   |
| <b>AIM2</b> : Absent In Melanoma 2  | <b>CaSR</b> : Calcium sensing receptor   | <b>COVID-19</b> : Coronavirus disease 2019   |
| <b>ALR</b> : AIM-2 like receptor  | <b>CAPS</b> : Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes  | <b>CPPD</b> : Calcium pyrophosphate dihydrate  |
| <b>ALS</b> : Amyotrophic lateral sclerosis                                    | <b>CARD</b> : Caspase Activation and Recruitment Domain  | <b>CRL4Cdt2</b> : Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 4  |
| <b>AP-1</b> : Activator Protein-1   | <b>CARD9</b> : CARD-containing protein 9   | <b>CRM1</b> : Chromosome region maintenance 1  |
| <b>ApoC3</b> : Apolipoprotein C-III   | <b>CBP</b> : CREB-binding protein  | <b>CTB</b> : Cholera toxin B   |
| <b>ARIH2</b> : Ariadne RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase 2                      | <b>CDK</b> : Cyclin dependent kinase   | <b>CTLD</b> : C-Type Like Domain   |
| <b>ARN</b> : Acide ribonucléique  | <b>CDS</b> : Cytosolic DNA sensor  | <b>Cyclin-S</b> : Cycline dépendante de la phase S   |
| <b>ARNsb</b> : ARN simple brin  | <b>cGAMP</b> : cyclic GMP-AMP  | <b>CYLD</b> : Cylindromatosis (turban tumor syndrome)  |
| <b>ARNdb</b> : ARN double brin  | <b>cGAS</b> : Cyclic GMP-AMP Synthase  | <b>DAG</b> : Diacylglycerol  |
| <b>ASC</b> : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain | <b>CHC</b> : Carcinome hépatocellulaire  | <b>DAI/ZNBP1</b> : DNA-dependent activator of IFN regulatory factors/Z-DNA binding protein 1 |
| <b>ASK</b> : Apoptosis Signal regulating Kinases                              | <b>CINCA/NOMID</b> : Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular Syndrome/Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease | <b>DAMP</b> : Damaged-associated molecular pattern   |
| <b>ATP</b> : Adénosine Triphosphate   | <b>Cl</b> : Chlorure   | <b>DAPK</b> : Tumor suppressor death-associated protein kinase                               |
| <b>BCL-2</b> : B-Cell Lymphoma 2  | <b>cIAP2</b> : cellular Inhibitor of Apoptosis 2   | <b>DCIR</b> : Dendritic Cell Immunoreceptor  |
| <b>BCL-xl</b> : B-cell Lymphoma-extra large                                   |  | <b>DC-SIGN</b> : Dendritic Cell-Specific Intercellular                                       |
| <b>BER</b> : Base excision repair   |  |  |
| <b>BIR</b> : Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat                |  |  |
| <b>BMDM</b> : Bone marrow derived-macrophages                                 |  |  |
| <b>BPCO</b> : Bronchopneumopathie chronique obstructive                       |  |  |

adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

**DDX3X:** DEAD-Box Helicase 3 X-Linked

**DSS:** Dextran Sulfate Sodium

**EGFR:** Epithelial Growth Factor Receptor

**EH2Z:** Enhancer of zeste homolog 2

**ERK1:** Extracellular signal-Regulated Kinase 1

**ESCRT:** Endosomal sorting complexes required for transport

**FIIND:** F-InteractinNg Domain

**FADD:** Fas-Associated protein with Death Domain

**FCAS:** Familial cold autoinflammatory syndrome

**FEN1:** Flap structure-specific endonuclease 1

**FMF:** Familial Mediterranean fever

**FPI:** Fibrose pulmonaire idiopathique

**GADD45:** Protein 45 inducing growth arrest and DNA damage

**GBP:** Guanylate-binding protein

**G-CSF:** Granulocyte-Colony-Stimulating Factor

**GM-CSF:** Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

**GPA:** Granulomatosis with polyangiitis

**GPCR:** G-protein coupled receptor

**GPRC6A:** G-protein coupled receptor family C group 6 member A

**GSDMA-B-C-D-E:** Gasdermine A-B-C-D-E

**GSDMD-C:** Gasdermine D fragment C-terminal

**GSDMD-N:** Gasdermine D fragment N-terminal

**HBL:** Hemolysin BL

**HET-E:** Incompatibility locus protein from *Podospira anserina*

**HIN-200:** Hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with 200–amino acid repeat

**HLTF:** Helicase-like transcription factor

**HMGB1:** High mobility group box 1

**HNP:** Human Neutrophil ( $\alpha$ -defensin) peptide

hNLRP: human NLRP

**HOIL-1L:** Heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1L

**HSP:** Heat shock proteins

**HSV1:** Herpes Simplex Virus 1

**IAPP:** Islet amyloid polypeptide

**IAV:** Influenza A virus

**IDCL:** Interdomain connecting loop

**IFI16:** Interferon Gamma Inducible Protein 16

**IFN-I:** Interferon de type I

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gamma

**IKK $\alpha$ :** I kappaB kinase alpha

**IL-1:** Interleukine-1

**IL-1 $\alpha$ :** Interleukine-1 $\alpha$

**IL-1 $\beta$ :** Interleukine-1 $\beta$

**IL-1R:** IL-1 Receptor

**IL-6:** Interleukine-6

**IL-8:** Interleukine-8

**IL-18:** Interleukine-18

**IL-33:** Interleukine-33

**ING1b:** Growth inhibitor 1b

**IP3R:** inositol 1,4,5-triphosphate receptor

**IRAK1/4:** IL-1 Receptor-Associated Kinases  $\frac{1}{4}$

**IRF:** Interferon-Regulatory Factor

**IRG:** Immunity-related GTPases

**IRGM:** Immunity-related GTPase family M protein

**JIA:** Juvenile Idiopathic Arthritis

**JNK1:** c-Jun N-terminal Kinase 1

**K<sup>+</sup>:** Potassium

**KAT5:** Lysine acétyltransférase 5

**KSHV:** Kaposi sarcoma associated herpes virus

**LF:** Letal factor

**LGP2:** Laboratory of Genetics and Physiology 2

**LLPS:** Liquid–liquid phase separation

**LPS:** Lipopolysaccharide

**LRR:** Leucine rich repeats

**LTA:** Lipotéichoic acid

**LUBAC:** Linear ubiquitin chain assembly complex

**MAM:** Mitochondria-associated membrane

**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase

**MAPL:** Mitochondrial-anchored protein ligase

**MARCH7:** Membrane associated RING-CH protein 7

**MARK4:** Microtubule affinity regulating kinase 4

**MAVS:** Mitochondrial antiviral-signaling protein

**MDA5:** Melanoma Differentiation-Associated protein 5

**MGL:** Macrophage Galactose-type lectin

**MICI:** Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

**MIF:** Macrophage migration inhibitory factor

**MINCLE:** Macrophage Inducible C-type lectin

**MMR:** Mismatch repair

**MNDA:** Myeloid cell Nuclear Differentiation Antigen

**mNLRP:** mouse NLRP

**MPO:** Myéloperoxydase

**MPTs:** Modifications post-traductionnelles

**MSU:** Monosodium urate

**MyD118:** Myeloid Differentiation Primary Response Protein 118

**MyD88:** Myeloid Differentiation Primary Response 88

**MR:** Mannose receptor

**MTOC:** Microtubule organizing center

**Na<sup>+</sup>:** Sodium

**NACHT:** NAIP, CIITA, HET-E and TP1 domain

**NADPH:** Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate

**NAFLD:** Nonalcoholic fatty liver disease

**NAIP:** NLR family apoptosis inhibitory proteins

**NAMPT:** Nicotinamide phosphoribosyltransferase

**NASH:** Non-alcoholic Steatohepatitis

**NEK7:** NIMA (Never in mitosis A)-related kinase 7

**NER:** Nucleotide excision repair

**NES:** Nuclear Export Signal

**NET:** Neutrophil extracellular traps

**NF-AT:** Nuclear Factor of Activated T-cells

**NF-κB:** Nuclear Factor κB

**NINJ1:** Nerve Injury-Induced Protein 1

**NK:** Natural Killer

**NLR:** NOD Like Receptor

**NLRB:** NLR family BIR domain-containing proteins

**NLRC:** NLR family CARD domain-containing proteins

**NLRP:** NLR family pyrin domain-containing proteins

**NLRP1-3-6-7-9-12:** NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3-12

**NLRX:** NLR family X domain-containing proteins

**NLS:** Nuclear Localization Signal

**NOD:** Nucleotide-binding oligomerization domain

**NOX2:** NADPH oxydase 2

**OA:** Osteoarthritis

**OMV:** Outer Membrane Vesicles

**PAMP:** Pathogen-Associated Molecular Pattern

**PARI:** PCNA-associated recombination inhibitor

**PCNA:** Proliferating Cell Nuclear Antigen

**PI3K/Akt:** Phosphoinositide 3-Kinase/Akt

**PI4P:** Phosphatidylinositol-4-phosphate

**PIP-box:** PCNA interacting protein-box

**PIP2:** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

**PKA:** Protein kinase A

**PKB:** Protein kinase B

**PKD:** Protein kinase D

**PKM:** Pyruvate kinase, Muscle

**PKR:** Protein Kinase R

**PLC:** Phospholipase C

**PLK4:** Polo-like kinase 4

**PMA:** Phorbol 12-myristate 13-acetate

**POP:** PYD-only protein

**PP2A:** Protein phosphatase 2A

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

**PR:** Polyarthrite rhumatoïde

**PRR:** Pattern Recognition Receptors

**PS:** Phosphatidylserine

**PTPN22:** Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22

**PYD:** Pyrin Domain

**PYHIN:** PYrin and HIN200 domain containing proteins

**RBD:** RNA binding domain

**RCH:** Rectocolite hémorragique

**RE:** Reticulum Endoplasmique

**Rho-GTPases:** Guanosine triphosphatases Rho

**RIG-I:** Retinoic acid-inducible gene-I

**RIPK 1:** Receptor Interacting serine/threonine Protein Kinase 1

**RLR:** RIG-I-like receptor

**RMN:** Résonance magnétique nucléaire

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**ROSmt:** ROS mitochondrial

**RNS:** Reactive Nitrogen Species

**S1P:** Sphingosine 1-phosphate

**S1PR:** Sphingosine 1-phosphate receptor

**SAP130:** Sin3-Associated Polypeptide p130

**SARS-CoV-2:** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

**SCAP:** SREBP cleavage-activating protein

**SCF FBXL2:** Skp-cullin-F box L2

**SCF FBXO3:** Skp-cullin-F box O3

**SCIMP:** SLP adapter and CSK-interacting membrane protein

**SENP:** Sentrin-specific protease

**SFAF:** Syndrome familial auto-inflammatoire au froid

**SHPRH:** SNF2, histone linker, PHD-finger, RING-finger hélicase

**SIRT:** Sirtuin ou Silent information regulator

**SLE:** Systemic Lupus Erythematosus

**SLPI:** Secretory leukocyte protease inhibitor

**SOCE:** Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry

**SPA:** Spondyloarthritis

**SPM:** Specialized Pro-Resolving Mediators

**SQSTM1:** Sequestosome1

**SREBP2:** Sterol regulatory element-binding protein 2

**STAT:** Signal transducer and activator of transcription

**STG1:** SM22/transgelin-like actin-modulating protein 1

**STING:** Stimulator of Interferon Genes

**SYK:** Spleen tyrosine kinase

**T2AA:** T2 Amino Alcohol

**T3:** 3,3',5-triiodothyronine

**T3SS:** Appareil de sécrétion de type III

**T4SS:** Système de sécrétion de type IV

**TAK1:** Transforming growth factor beta-activated kinase 1

**TGF- $\beta$ :** Tumor Growth Factor  $\beta$

**TGN:** Trans-Golgi network

**TIR:** Toll/interleukin-1 receptor

**TLR:** Toll-like receptor

**TLR1-TLR10:** Toll Like Receptor 1 - Toll Like Receptor 10

**TLS:** Translational synthesis

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TNF-R1/TNF-R2**: TNF-Receptor 1/2

**TP1**: Telomerase-associated protein

**TRAF3**: TNF receptor-associated factor 3

**TRIF**: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

**TRIM31**: Tripartite Motif Containing 31

**TRP**: Transient Receptor Potential

**TRPM7**: Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7

**TRX**: Thioredoxin

**USP**: Ubiquitin-specific peptidases

**UV**: Urticarial vasculitis

**VRAC**: Volume-regulated anion channel

# Introduction



# Partie 1: L'inflammation

## I. La réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est un processus biologique complexe qui se produit dans l'organisme en réponse à une lésion tissulaire ou à une infection. Il s'agit d'une réponse protectrice caractérisée par une série de changements physiologiques et biochimiques visant à éliminer la cause de l'inflammation, limiter les dommages tissulaires, détruire les agents pathogènes et favoriser la guérison des tissus endommagés.

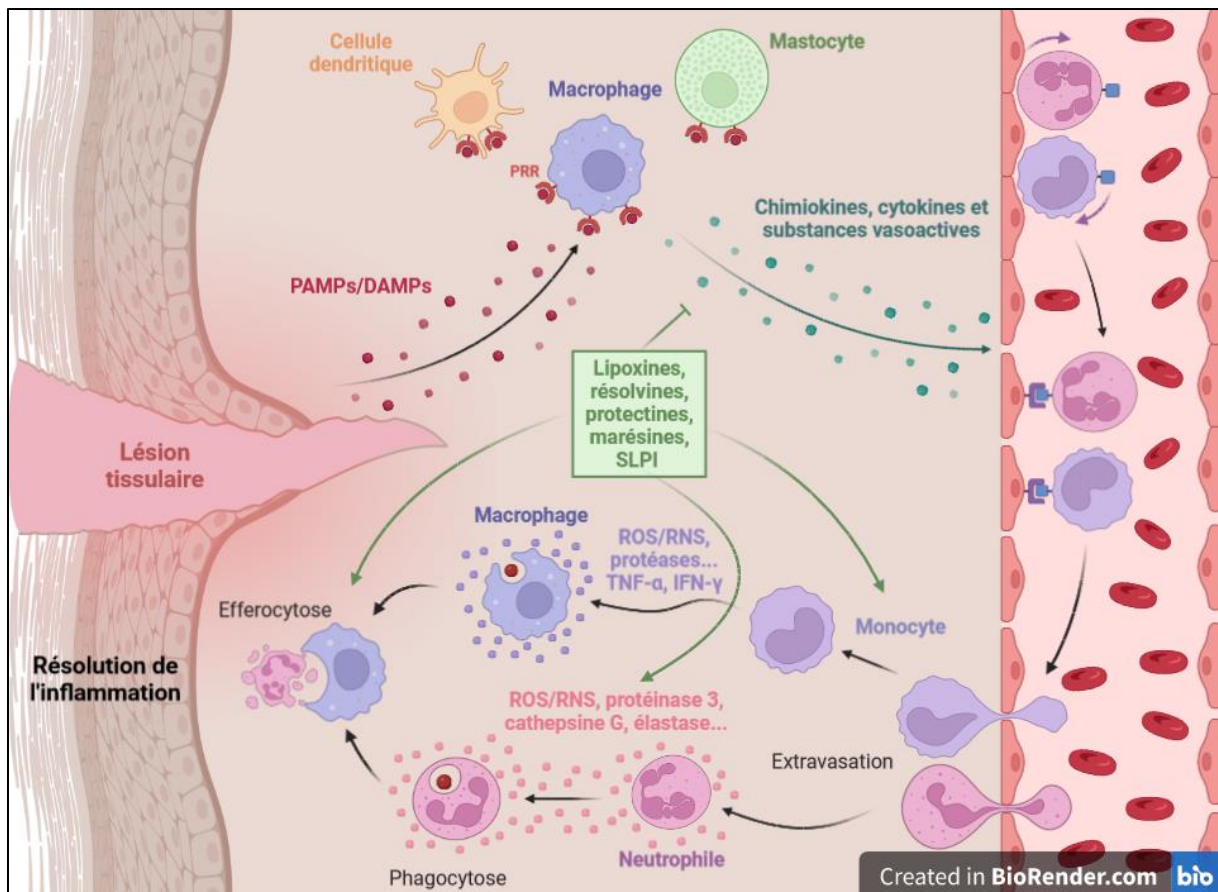
La découverte de la réponse inflammatoire remonte à l'Antiquité, mais grâce aux avancées scientifiques et médicales, sa compréhension a largement évolué au fil du temps. En 1600 avant J-C, les Égyptiens ont montré qu'une plaie entraînait l'apparition d'une rougeur. Deux millénaires plus tard, des médecins grecs et romains ont décrit les symptômes caractéristiques de l'inflammation. En particulier, le romain Aulus Cornelius Celsus a décrit les symptômes tels que la douleur, la rougeur, la chaleur et le gonflement. Le grec Claude Galien a quant à lui décrit la perte de fonctionnalité des organes. Il faudra attendre le 19<sup>ème</sup> siècle pour que les mécanismes sous-jacents à la réponse inflammatoire soient mieux compris. Le pathologiste allemand Rudolf Virchow suggère que l'inflammation est une réponse des tissus et décrit la présence de cellules immunitaires dans les tissus inflammatoires, jetant ainsi les bases des futures études immunologiques sur l'inflammation. Au cours des décennies suivantes, les chercheurs ont continué à explorer les mécanismes de la réponse inflammatoire, en identifiant des molécules clés telles que les cytokines et les médiateurs inflammatoires. En 1984, Charles A. Dinarello découvre la première cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine-1 (IL-1), ouvrant ainsi la voie à la découverte d'autres molécules impliquées dans la réponse inflammatoire (C. A. Dinarello 1984). De nos jours, la recherche continue de faire progresser notre compréhension de ces processus, en particulier leurs rôles dans des maladies présentant une réponse inflammatoire excessive ou chronique telles que l'arthrite, la maladie de Crohn, l'asthme ou encore de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Nathan 2002; Medzhitov 2008).

La première réponse contre les agents infectieux fait appel à différents mécanismes. Les barrières physiques, comme la peau et les muqueuses, sont des éléments essentiels de la défense de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes. En cas de détérioration de ces barrières, les pathogènes peuvent facilement pénétrer dans l'organisme, se développer et

provoquer une infection. Le système immunitaire met alors en place une défense en trois étapes : l'immunité innée immédiate, la réaction inflammatoire et l'immunité adaptative activée par l'inflammation. L'immunité innée immédiate va entraîner le recrutement de cellules immunitaires clés comme les neutrophiles et les macrophages qui induisent une réponse inflammatoire. Cette immunité dite innée est la première ligne de défense contre l'infection. D'un point de vue physiologique, l'inflammation est un processus conduit par ces cellules inflammatoires répondant à des signaux d'infection ou de danger. L'immunité adaptative, également connue sous le nom d'immunité acquise (ou encore immunité spécifique), est quant à elle une réponse immunitaire spécifiquement adaptée à une menace particulière. Elle est caractérisée par la reconnaissance de l'antigène par des cellules immunitaires spécialisées, telles que les lymphocytes T et B, qui sont activées pour éliminer la menace. Les cellules de l'immunité adaptative se distinguent des cellules de l'immunité innée par leur capacité à reconnaître des antigènes spécifiques, à se reproduire de manière clonale et à conserver une mémoire immune (Barton 2008). Malgré un rôle essentiel des lymphocytes, les cellules de l'immunité innée sont celles qui vont déclencher et résoudre la réaction inflammatoire.

Les cellules de l'immunité innée résidentes déjà présentes dans les tissus vont déclencher l'inflammation après la détection d'un signal via les récepteurs PRR, pour Pattern Recognition Receptors. Ces récepteurs peuvent être activés par deux types de signaux : les PAMPs, pour Pathogen-Associated Molecular Patterns, qui vont signaler la présence de motifs moléculaires présents sur des agents pathogènes extérieurs tels que les bactéries, les virus, les champignons ou encore les parasites, et les DAMPs, pour Danger/Damage-Associated Molecular Pattern, qui sont des molécules libérées en réponse à des stimuli non infectieux comme par exemple des blessures physiques, des brûlures ou l'exposition à des toxines (**Figure 1**)(Polly Matzinger 2002; Barton 2008; Medzhitov 2008).

La réponse inflammatoire est divisée en quatre phases : la première phase est la phase d'initiation durant laquelle le signal va être détecté ; la deuxième phase est la phase de recrutement des cellules immunitaires au niveau du site de l'inflammation ; la troisième phase va permettre l'élimination du signal déclencheur ; et enfin la dernière phase est celle de la résolution de l'inflammation (**Figure 1**) (Barton 2008).



**Figure 1: La réponse inflammatoire**

Après une lésion tissulaire suivie d'une contamination par des pathogènes, des signaux de danger et de stress tels que les PAMPs et les DAMPs sont libérés. Ces signaux activent les leucocytes résidents du tissu (mastocytes, cellules dendritiques et macrophages) via leur détection par des PRR présents à la surface ou dans le cytoplasme des cellules. En réponse, ces cellules sécrètent des molécules pro-inflammatoires et vasoactives telles que des cytokines, des chimiokines et des leucotriènes. Cela entraîne le recrutement de neutrophiles circulants, suivis de monocytes circulants qui se différencient en macrophages. Les macrophages et les neutrophiles phagocytent les pathogènes et sécrètent des molécules telles que des protéases et des ROS (Reactive Oxygen Species) ou des RNS (Reactive Nitrogen Species) qui créent un environnement inhospitalier pour les pathogènes. Une fois la source de l'inflammation éliminée, la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire sont déclenchées grâce aux lipoxines, résolvines, protectines, marésins et aux SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor) sécrétés par les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales. Les neutrophiles, après avoir été activés, vont rapidement mourir par apoptose. Par la suite, les macrophages vont éliminer les neutrophiles apoptotiques par efferocytose, processus anti-inflammatoire contribuant à la résolution de l'inflammation. Created with BioRender.com

L'inflammation aiguë est un processus rapide qui est résolu en quelques heures. Si l'inflammation n'est pas abolie, il y a alors développement d'une inflammation dite chronique. Cette inflammation chronique, si elle est due à une infection, peut entraîner un risque de septicémie, la défaillance de plusieurs organes et le décès.

Cette inflammation chronique est aussi impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires non infectieuses telles que la polyarthrite rhumatoïde, la goutte ou encore les

vascularites dont je vous parlerai dans une prochaine partie (Firestein 2003; A. K. So et Martinon 2017; Aymonnier et al. 2023). Toutes ces maladies chroniques impliquent des anomalies du système immunitaire inné, en particulier dans la production et la régulation des cytokines. Ces cytokines dérégulées entraînent des épisodes d'inflammation pouvant affecter divers organes et tissus du corps. Ces affections sont souvent multifactorielles avec possiblement une composante génétique. Dans les maladies auto-immunes, le système immunitaire attaque les propres tissus de l'organisme, déclenchant une inflammation stérile. D'autres de ces pathologies, comme la goutte, sont dues au processus d'auto-inflammation, une dysrégulation du système immunitaire qui entraîne des épisodes récurrents d'inflammation en l'absence d'infection ou d'auto-immunité.

Au cours de l'inflammation stérile, le système immunitaire réagit de manière similaire à une infection, en déclenchant une cascade de réactions inflammatoires pour éliminer les débris cellulaires, réparer les tissus endommagés et restaurer l'homéostasie (G. Y. Chen et Nuñez 2010). Cependant, en l'absence d'un agent pathogène réel, cette réponse inflammatoire peut devenir excessive, prolongée ou inappropriée, ce qui peut entraîner des dommages tissulaires supplémentaires et des symptômes indésirables. Les traumatismes tels que les fractures osseuses, les brûlures, les coupures profondes ou les contusions peuvent également déclencher une inflammation stérile. Les allergies, telles que l'asthme, l'urticaire ou la rhinite allergique, peuvent-elles aussi entraîner une inflammation stérile en réponse à des allergènes tels que le pollen, les acariens, les moisissures ou certains aliments. Enfin, lorsqu'un corps étranger non infectieux, tel qu'une écharde, une prothèse ou un implant, est introduit dans le corps, il peut lui aussi provoquer une réaction inflammatoire stérile (G. Y. Chen et Nuñez 2010).

### **1) L'initiation de la réponse inflammatoire : la phase vasculaire**

La réponse inflammatoire va être initiée par une infection ou une lésion des tissus, ce qui va entraîner l'émission de deux types de signaux inducteurs : des signaux endogènes, les DAMPs, et/ou des signaux exogènes, les PAMPs. Les DAMPs sont libérés dans le milieu extracellulaire par les cellules endommagées ou stressées, tandis que les PAMPs, qui sont des motifs moléculaires conservés portés par différents micro-organismes, sont libérés lors d'une infection. Les cellules immunitaires de l'hôte ont développé un ensemble de récepteurs permettant de détecter la présence des DAMPs et des PAMPs : les PRR tels que les récepteurs

de type Toll (TLR, Toll-like receptor) et les récepteurs de type NOD (NLR, nucleotide-binding oligomerization-domain protein (NOD)-like receptor) qui seront abordés plus en détails dans la prochaine partie. La détection des signaux inducteurs est réalisée par les cellules résidentes des tissus telles que les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques ainsi que les cellules tissu-spécifiques comme par exemple les neurones. Ces cellules vont alors permettre la production d'une grande variété de médiateurs pro-inflammatoires tels que des chimiokines et cytokines (TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor  $\beta$ ), IL-1 $\beta$  (Interleukine-1 $\beta$ ), IL-18 (Interleukine-18) ...), mais également la libération de substances vasoactives telles que l'histamine, la prostaglandine ou encore la sérotonine qui vont provoquer une vasodilatation. Certains médiateurs comme l'histamine sont produits et stockés dans les granules des mastocytes, des polynucléaires basophiles et des plaquettes, d'autres circulent sous forme de précurseurs inactifs dans les vaisseaux sanguins, tandis que d'autres sont produits directement en réponse à une stimulation appropriée par des inducteurs de l'inflammation. Le flux sanguin vers la zone touchée, alors augmenté, permet ainsi aux cellules immunitaires de se rapprocher de la zone de l'infection/lésion. Les capillaires deviennent perméables, ce qui permet aux leucocytes circulants, en particulier aux polynucléaires neutrophiles qui sont normalement limités aux vaisseaux sanguins, de les quitter et de migrer vers le site de l'inflammation. Les leucocytes vont pouvoir quitter les vaisseaux sanguins grâce aux intégrines présentes à leur surface. L'ensemble des médiateurs pro-inflammatoires permet aux cellules endothéliales présentes à la surface des vaisseaux sanguins d'exprimer diverses sélectines permettant ainsi l'extravasation sélective des leucocytes tout en empêchant la sortie des érythrocytes. Une fois les leucocytes présents dans le milieu extravasculaire, ils sont recrutés au niveau du site de l'inflammation (Barton 2008; Medzhitov 2008)(**Figure 1**).

## **2) Amplification de la réponse inflammatoire : la phase cellulaire**

Dans la deuxième phase dite « phase cellulaire », les leucocytes recrutés au site de l'inflammation, soit par contact direct avec les agents pathogènes, soit par des cytokines sécrétées par les cellules résidentes telles que l'IL-8 (Interleukine-8) sécrétée par les macrophages résidents, commencent à combattre l'infection ou à éliminer les débris cellulaires provenant des tissus endommagés.

### **a. Les neutrophiles**

En arrivant seulement quelques heures après l'infection/lésion, les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur le site inflammatoire. Ils disposent de nombreux mécanismes pour éradiquer les agents infectieux comme la phagocytose des pathogènes, la libération du contenu toxique de leurs granules, l'activation de leur NADPH (Nicotinamide-Adénine Dinucleotide Phosphate) oxydase produisant des ROS ou encore la libération de protéines antimicrobiennes telles que la protéinase 3, la cathepsine G ou encore l'élastase (**Figure 1**).

Une fois au site de l'inflammation, les neutrophiles vont phagocyter les éléments endommagés ou les microbes et vont diriger leurs granules vers les phagosomes pour permettre le relargage de leur contenu toxique. Les protéases vont dégrader le matériel phagocyté et les ROS et les RNS vont dénaturer les protéines, perturber les lipides et endommager l'ADN. Si les neutrophiles ne rencontrent pas directement les pathogènes après être arrivés au niveau du site inflammatoire, des cytokines telles que le TNF- $\alpha$  vont induire la libération du contenu des granules directement dans le compartiment cytosolique, créant ainsi un environnement hostile pour les pathogènes proches. Cependant, les effecteurs très puissants contenus dans les granules des neutrophiles ne font pas de distinction entre les cibles microbiennes et celles de l'hôte, de sorte que les dommages collatéraux aux tissus de l'hôte sont inévitables. La protéinase 3, la cathepsine G et l'élastase vont par exemple entraîner la décomposition de la matrice extracellulaire conduisant à l'élimination des cellules de l'hôte (Segal 2005; Barton 2008; Medzhitov 2008)(**Figure 1**).

Les neutrophiles sont également capables de promouvoir l'inflammation par le biais de la sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  (Tacnet-Delorme et al. 2018).

### **b. Les autres cellules recrutées : macrophages, mastocytes, cellules dendritiques**

Les neutrophiles ne sont pas les seules cellules effectrices lors de cette phase. En plus des cytokines produites lors de la première phase et présentes au site de l'inflammation, la dégranulation des neutrophiles va permettre le recrutement des monocytes circulants (Soehnlein et al. 2017). Les macrophages vont également jouer un rôle dans la destruction des pathogènes en phagocytant et en libérant des protéases, peptides antimicrobiens, des ROS et des RNS, tout comme le neutrophile (Barton 2008). Outre la libération de médiateurs de

l'inflammation, les mastocytes sont également responsables de la sécrétion d'interleukines et d'autres cytokines. Ces substances régulent l'intensité et la durée de la réponse immunitaire en favorisant l'expression de molécules d'adhésion et en recrutant des cellules inflammatoires, telles que les polynucléaires, vers le site de la réaction inflammatoire. Les mastocytes vont également produire des leucotriènes qui vont induire le recrutement de cellules dendritiques. Les macrophages et les cellules dendritiques vont sécréter des cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , renforçant ainsi l'inflammation.

### **c. La réponse immune adaptative : les lymphocytes**

Si la réponse inflammatoire innée ne parvient pas à éliminer le pathogène, l'inflammation persiste dans la zone lésée et le système immunitaire adaptatif est activé par l'intermédiaire du recrutement de lymphocytes T. Les macrophages et les cellules dendritiques sont capables de présenter un antigène aux lymphocytes T naïfs. Ce processus entraîne la prolifération et la différenciation des lymphocytes T en cellules T effectrices qui contribuent à éliminer l'agent pathogène responsable de l'infection (Galli, Borregaard, et Wynn 2011).

### **3) Résolution de la réponse inflammatoire**

Lorsque l'élément pathogène est éliminé, débute la phase de résolution de l'inflammation et de réparation des tissus.

Les macrophages, qu'ils soient résidents ou recrutés, jouent un rôle crucial dans cette dernière phase de la réponse inflammatoire. Le mécanisme exact de cette phase est encore en cours d'étude, mais il est évident que les lipoxines, des dérivés de l'acide arachidonique (AA) générés par les lipoxigénases, jouent un rôle crucial dans la transition de l'inflammation vers la résolution. Les lipoxines inhibent le recrutement des neutrophiles et favorisent leur absorption par les macrophages, c'est-à-dire le processus d'efferocytose, ainsi que le recrutement des monocytes, qui éliminent les cellules mortes et initient le remodelage des tissus (Medzhitov 2008; Barton 2008).

Serhan a identifié et décrit trois autres familles de médiateurs - les "résolvines", les "protectines" et les "marésines" - qui forment une superfamille appelée "médiateurs pro-résolutifs spécialisés" (SPM, Specialized Pro-Resolving Mediators) (Serhan et Levy 2018). Les SPM ont des fonctions biologiques spécifiques au type de cellule et à l'organe et possèdent des actions pro-résolutives et anti-inflammatoires puissantes avec des rôles particuliers

durant la phase de résolution. Ces SPM permettent l'arrêt des signaux de recrutement des neutrophiles, stoppant ainsi leur infiltration et les lésions tissulaires concomitantes. Comme les lipoxines, les SPM permettent le renforcement de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques et des débris cellulaires par les macrophages, et une augmentation de la destruction des bactéries par les cellules phagocytaires. Les SPM activent également des programmes de résolution endogènes, ce qui raccourcit le délai de résolution. Les marésines en particulier jouent un rôle important dans la réduction de la douleur, la régénération des tissus et la résolution de l'inflammation.

Les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales produisent également un inhibiteur de protéase leucocytaire sécrétoire (SLPI, Secretory leukocyte protease inhibitor), qui inactive les protéases libérées par les granules des neutrophiles et pousse la réponse inflammatoire vers la résolution.

Ainsi, la clairance cellulaire est l'étape suivante, car les neutrophiles, s'ils ne sont pas régulés, peuvent causer des dommages considérables au niveau du site déjà inflammé. Ils doivent donc être éliminés de manière contrôlée et efficace. Cela implique leur mort locale par apoptose suivie de leur phagocytose par les macrophages dérivés des monocytes recrutés. Le PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), comme nous le verrons plus tard, est un élément clé dans le contrôle de la survie des neutrophiles (Witko-Sarsat et al. 2010). Pour les macrophages, le processus d'efferocytose entraîne un changement vers un phénotype anti-inflammatoire avec la sécrétion de diverses cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- $\beta$  ou encore l'IL-10 (Interleukine-10). Une fois la phagocytose terminée, les macrophages quittent le site inflammé par drainage lymphatique, et les cellules parenchymateuses/stromales reviennent à un phénotype non inflammatoire pour atteindre l'homéostasie tissulaire.

Ainsi, si les conditions de stress cellulaire sont temporaires, une réponse inflammatoire aiguë réussie permet au système de revenir à son état homéostatique de base. En revanche, si les conditions anormales sont prolongées, l'infiltration de neutrophiles est remplacée par des macrophages, et en cas d'une infection, par des lymphocytes T. Si l'effet combiné de l'immunité innée et adaptative reste insuffisant, un état inflammatoire continu s'installe, aboutissant à une inflammation chronique (Medzhitov 2008; Barton 2008).



#### 4) L'inflammation chronique

Une mauvaise résolution de l'inflammation et une réaction inflammatoire non contrôlée dans les tissus peuvent conduire à l'apparition d'une inflammation chronique. C'est le cas par exemple lorsque la neutralisation et l'élimination des stimuli nocifs sont insuffisantes, ou si l'apoptose des cellules immunitaires ou la clairance des cellules inflammatoires apoptotiques du tissu inflammé échouent. Outre la présence d'agents pathogènes persistants, l'inflammation chronique peut résulter d'autres causes. Par exemple, la présence de corps étrangers non dégradables peut également déclencher et maintenir une réaction inflammatoire prolongée. De même, des réponses auto-immunes peuvent se produire lorsque des antigènes du soi persistent dans l'organisme, provoquant une inflammation chronique. D'autres facteurs peuvent déclencher l'inflammation chronique, tels que le stress oxydatif, la consommation excessive d'alcool, le tabagisme, l'obésité, le vieillissement et le manque d'activité physique. Ces facteurs activent les cellules immunitaires résidentes dans les tissus, comme les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques, ce qui entraîne la libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. En conséquence, des cellules inflammatoires infiltrantes, telles que les lymphocytes T et B, les neutrophiles et les cellules natural killer (NK), sont attirées vers les tissus touchés. Cette infiltration prolongée de cellules inflammatoires peut endommager les tissus, entraîner une dysfonction des organes et altérer les réponses immunitaires (Medzhitov 2008; Serhan et Levy 2018).

Alors que les réponses inflammatoires aiguës sont principalement dues à l'afflux de neutrophiles, les monocytes et les macrophages jouent un rôle plus important dans les sites d'inflammation chronique. Lorsque les macrophages ne parviennent pas à phagocyter et détruire les agents pathogènes ou les corps étrangers, cela peut entraîner la formation de granulomes, où les intrus sont entourés de couches de macrophages, dans une tentative ultime de protéger l'hôte (Medzhitov 2008). Les alarmines produites par les neutrophiles, telles que les HNP (Human Neutrophil ( $\alpha$ -defensin) peptide), S100A8, S100A9 et la boîte de groupe 1 à haute mobilité (HMGB1), stimulent le recrutement des cellules myéloïdes et favorisent l'activation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire (Soehnlein et al. 2017). Lors d'une exposition répétée, comme à des lipides modifiés, les macrophages sécrètent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires. Certaines de ces cytokines contribuent à prolonger la durée de vie des neutrophiles sur les sites d'inflammation. Par exemple, l'IL-1 $\beta$ , le G-CSF (Granulocyte-Colony-Stimulating Factor), le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) et le TNF- $\alpha$ , libérés par les macrophages, peuvent retarder l'apoptose des neutrophiles. Ce processus est crucial car la mort des neutrophiles marque le tournant entre l'inflammation en cours et sa résolution (Soehnlein et al. 2017).

Chez l'homme, les troubles inflammatoires chroniques sont souvent associés à une incapacité à éliminer les cellules mortes. En effet, lors d'une inflammation chronique, l'efferocytose est altérée car

les neutrophiles produisent des ROS qui activent la GTPase RHOA, régulant négativement le processus d'efferocytose dans les cellules phagocytaires voisines. De plus, il existe un processus d'excrétion des récepteurs d'englobement exposés à la surface des efferocytes, réduisant drastiquement la capacité des macrophages à phagocyter les cellules apoptotiques et entraînant également la libération d'inhibiteurs de l'efferocytose sur les cellules phagocytaires voisines (Richens et al. 2009 ; Kim et al. 2017).

Pour finir, la clairance des cellules apoptotiques est affectée par la compétition entre les ligands et les récepteurs au niveau des sites inflammatoires. Par exemple, HMGB1 réduit la phagocytose en se liant aux phosphatidylsérines (PS) exposées à la surface des neutrophiles apoptotiques et en les masquant. Il se lie également aux intégrines présentes sur les macrophages (Friggeri et al. 2010 ; Soehnlein et al. 2017). D'autres études ont également démontré que la protéinase 3 exposée à la surface des neutrophiles apoptotiques peut inhiber le processus d'efferocytose (Tacnet-Delorme et al. 2018).

En toute logique, des études ont révélé que l'inflammation chronique joue un rôle dans l'émergence et le développement de diverses maladies chroniques, notamment les maladies auto-immunes, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'obésité et le cancer. Par exemple, dans le cas du cancer, l'inflammation chronique favorise la croissance cellulaire excessive et la résistance à la mort cellulaire programmée des cellules tumorales. De même, l'inflammation chronique contribue à la résistance à l'insuline conduisant au diabète, mais aussi aux troubles lipidiques et aux problèmes vasculaires associés aux maladies cardiovasculaires.

Une grande partie de ces maladies est liée à une inflammation chronique de faible intensité appelée "para-inflammation" (Medzhitov 2008). Plusieurs facteurs peuvent déclencher et entretenir cette réponse inflammatoire de faible intensité. Parmi eux, on trouve le processus de vieillissement, un régime alimentaire déséquilibré, de faibles niveaux d'hormones sexuelles et le tabagisme.

L'inflammation chronique liée au vieillissement est connue sous le nom d'"inflammaging" et représente un facteur de risque majeur de morbidité et de mortalité chez les personnes âgées. Elle est également associée à un large éventail de maladies liées à l'âge telles que l'hypertension, le diabète, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et le cancer (Sanada et al. 2018). Un exemple de facteur pouvant favoriser l'inflammation chronique chez les personnes âgées est la dysfonction des neutrophiles (Soehnlein et al. 2017). En effet, les neutrophiles chez les sujets âgés (humains et murins) rencontrent des difficultés accrues à être recrutés sur le site inflammatoire en raison de défauts de chimiotactisme. De plus, ils sont moins efficaces dans leurs fonctions antimicrobiennes et dans leur capacité à phagocyter les

agents pathogènes, ce qui contribue à une prolongation de la réaction inflammatoire. Également, contrairement aux jeunes individus, les personnes âgées présentent des niveaux élevés de cytokines inflammatoires, notamment l'interleukine-6 (IL-6) et le TNF- $\alpha$ .

Chez les personnes obèses, le tissu adipeux viscéral produit également de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , ce qui perturbe le métabolisme global. L'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux viscéral est proportionnelle à l'indice de masse corporelle et constitue une source majeure d'inflammation persistante et de résistance à l'insuline (Sanada et al. 2018). Le stress oxydatif qui accompagne une alimentation déséquilibrée, en particulier une consommation excessive de graisses ou d'autres macronutriments sans apport suffisant d'antioxydants, peut également contribuer à l'inflammation associée à l'obésité (Monteiro et Azevedo 2010).

Le tabagisme chronique expose les individus à de multiples inducteurs d'inflammation, notamment les espèces réactives de l'oxygène. Il a été démontré que le tabagisme chronique augmente la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . D'autres facteurs tels que le stress mental et les maladies parodontales (Eltay et Van Dyke 2023) peuvent également jouer un rôle stimulant dans l'inflammation chronique.

## **II. Activation de l'inflammation par des signaux de danger**

### **1) Les signaux de danger : DAMPs/PAMPs**

Dans le contexte de l'inflammation, les signaux de danger font référence aux molécules ou aux motifs moléculaires libérés lors d'une réponse inflammatoire, qui alertent le système immunitaire de la présence de cellules ou tissus endommagés ou d'agents pathogènes. Ces signaux jouent un rôle essentiel dans l'activation du système immunitaire et la mise en place d'une réponse inflammatoire. Ces signaux de danger peuvent être divisés en deux catégories : les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs).

#### **a. La découverte des PAMPs et des DAMPs**

La découverte des DAMPs et des PAMPs a été un élément clé dans la compréhension du système immunitaire inné et de son rôle dans la détection et la réponse aux dangers. Cette découverte remonte à plusieurs décennies et est le fruit de nombreuses recherches dans le domaine de l'immunologie et de la biologie moléculaire. Avant la découverte des DAMPs et PAMPs, l'inflammation était principalement considérée comme une réponse immunitaire à

des agents pathogènes, tels que les bactéries, les virus et les champignons. Cette théorie, appelée "théorie microbienne de l'inflammation", a été proposée par l'immunologiste allemand Paul Ehrlich à la fin du XIXe siècle et a été largement acceptée pendant de nombreuses années. Cependant, il était clair que l'inflammation pouvait également être déclenchée par des stimuli non infectieux, tels que des traumatismes, des brûlures et des réactions allergiques. Au fil du temps, il est devenu évident que l'inflammation n'était pas simplement une réponse à des agents pathogènes étrangers, mais qu'elle était également déclenchée par des signaux endogènes produits par l'organisme lui-même.

Après cela, un modèle couramment utilisé pour décrire la réponse immunitaire était le modèle du soi/non-soi, également connu sous le nom de « modèle de la discrimination du soi » décrit par Burnet en 1959 (Burnet 1959). Ce modèle postule que le système immunitaire est capable de distinguer les composants du soi (les molécules présentes dans l'organisme) des composants du non-soi (les molécules étrangères) et d'y répondre de manière sélective pour éliminer les éléments étrangers tout en préservant les tissus sains. Le modèle du soi/non-soi a jeté les bases de la compréhension initiale de la spécificité de la réponse immunitaire et de la tolérance immunitaire (Burnet 1961).

Cependant, il a été enrichi et élargi en 1989 par le modèle du non-soi infectieux de Janeway (Janeway 1989). Ce nouveau modèle suggère que le système immunitaire fait la distinction entre les molécules étrangères associées aux agents pathogènes et les molécules du soi, c'est-à-dire les molécules présentes dans le corps de l'organisme hôte (Janeway 1992). Cette distinction est essentielle pour éviter une réponse immunitaire excessive contre les propres tissus de l'organisme. Selon le modèle du non-soi infectieux, le système immunitaire possède des récepteurs innés appelés PRR. Ceux-ci sont capables de reconnaître des motifs moléculaires conservés appelés PAMPs présents sur les agents pathogènes tels que les bactéries, les virus, les champignons, etc. Le modèle du non-soi infectieux de Janeway met l'accent sur le rôle des récepteurs innés dans la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes et la réponse immunitaire initiée par cette reconnaissance. Il a contribué à une meilleure compréhension de la reconnaissance des infections par le système immunitaire et a posé les bases de la recherche sur les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes.

C'est en 1994 seulement que l'existence des signaux de danger endogènes (provenant du soi) a été proposée pour la première fois, dans le cadre d'un modèle d'immunité qui suggère que

le système immunitaire réagit aux substances provenant de dommages cellulaires, plutôt qu'à celles qui sont uniquement étrangères (non-soi) (P Matzinger 1994). Selon ce modèle, l'inflammation peut être déclenchée par des stimuli non infectieux qui représentent une menace pour l'organisme. Contrairement au modèle précédent centré sur les agents pathogènes, ce modèle met l'accent sur la reconnaissance de signaux de danger associés à des dommages « les DAMPs », tels que des blessures, des brûlures ou des réactions allergiques. Cette étude de Matzinger a contribué à élargir notre compréhension de l'inflammation en reconnaissant que la réponse inflammatoire ne se limite pas uniquement aux infections, mais peut également être déclenchée par des signaux de danger provenant de sources non infectieuses (du soi non infectieux). Cela a ouvert de nouvelles perspectives dans la recherche sur les maladies inflammatoires et a conduit au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les récepteurs de DAMPs pour moduler l'inflammation excessive ou inappropriée (P Matzinger 1994; Gallucci et Matzinger 2001; Polly Matzinger 2002).

#### **b. Description des PAMPs et des DAMPs**

De manière générale, il existe deux principaux types de signaux moléculaires qui jouent un rôle prédominant dans la réponse inflammatoire : les PAMPs, qui sont des motifs moléculaires étrangers associés à des agents infectieux, et les DAMPs, qui sont des molécules intracellulaires exposées ou libérées par les cellules stressées ou endommagées.

Les PAMPs sont des motifs moléculaires conservés présents sur des composants des micro-organismes pathogènes tels que les bactéries (lipopolysaccharide (LPS), flagelline...), les virus (ADN double brin (db), ARN simple brin (sb), ARNdb...), les champignons (zymosan...), etc (Akira, Uematsu, et Takeuchi 2006 ; Mogensen 2009). Les PAMPs sont principalement des composants structuraux des agents pathogènes ou des produits dérivés de ces agents. Ils comprennent des éléments tels que les LPS spécifiques de la paroi des bactéries Gram négatif, des motifs d'acides nucléiques spécifiques des virus, des motifs de parois cellulaires fongiques, et bien d'autres. Ces motifs moléculaires sont relativement conservés et se retrouvent fréquemment sur différents types d'agents pathogènes. Les PAMPs jouent un rôle crucial dans l'activation de la réponse immunitaire innée de l'organisme. Ils sont reconnus par les PRR exprimés par les cellules immunitaires et déclenchent une réponse inflammatoire pour éliminer l'agent pathogène. La reconnaissance des PAMPs permet au système immunitaire

d'identifier et de réagir rapidement aux agents pathogènes en ciblant spécifiquement les motifs moléculaires associés à ces agents.

Les DAMPs, quant à eux, sont des molécules produites par les cellules endommagées ou stressées qui jouent un rôle physiologique à l'intérieur des cellules, mais qui acquièrent des fonctions supplémentaires lorsqu'elles sont exposées à l'environnement extracellulaire. Leur libération dans le milieu extracellulaire alerte l'organisme d'un danger potentiel, ce qui déclenche une réponse inflammatoire (Vénéreau, Ceriotti, et Bianchi 2015). Différentes formes de mort cellulaire régulée ou non régulée peuvent entraîner la libération de DAMPs. Parmi ces formes de mort cellulaire, on retrouve notamment la nécrose (non régulé), la nécroptose, la pyroptose (une forme de mort inflammatoire qui sera détaillée dans la partie sur l'inflammasome NLRP3), la ferroptose et la mort lytique des neutrophiles accompagnée de la formation de pièges extracellulaires (NET, Neutrophil extracellular traps) (Kaczmarek, Vandenabeele, et Krysko 2013; LaRock et Cookson 2013; Murao et al. 2021). En effet, lorsque les cellules subissent une mort nécrotique, elles libèrent des DAMPs provenant de leurs composants intracellulaires, tels que l'ADN mitochondrial, les protéines cytoplasmiques et les enzymes, qui peuvent déclencher une réponse inflammatoire. Lors de l'extrusion de NET, les polynucléaires neutrophiles vont quant à eux libérer des DAMPs nucléaires (histones, ADNcf...) mais également des enzymes antimicrobiennes telles que l'élastase et la myéloperoxydase (MPO) pouvant causer des lésions tissulaires. En plus des divers types de mort cellulaire, il est important de noter que les DAMPs peuvent être libérés par les lysosomes sécrétoires et par les exosomes qui sont sécrétés par exocytose. Bien que l'exocytose soit un processus régulier, même à l'état basal, une libération accrue de DAMPs a été observée par ce mécanisme en réponse à des conditions de stress. Cette libération accrue de DAMPs peut contribuer à l'initiation ou à l'amplification de la réponse inflammatoire (Murao et al. 2021).

Parmi les DAMPs les plus connus, on retrouve l'ADN et l'ARN qui peuvent être libérés dans l'environnement extracellulaire sous forme de fragments, ainsi que des protéines intracellulaires telles que les histones et la HMGB1 qui peuvent également être libérées dans le milieu extracellulaire lors de dommages cellulaires. L'ATP (adénosine triphosphate) peut fonctionner comme un DAMP en agissant comme un médiateur de la réponse inflammatoire et en activant les récepteurs purinergiques P2X7 présents sur les cellules immunitaires. L'acide hyaluronique est une molécule de la matrice extracellulaire qui peut être libérée lors de dommages tissulaires. Sa présence dans l'environnement extracellulaire peut contribuer à

l'inflammation et à la réponse immunitaire. Enfin, Les protéines de choc thermique, également connues sous le nom de heat shock proteins (HSP), telles que HSP60 et HSP70, peuvent être libérées lors de lésions cellulaires. Ces protéines agissent comme des signaux de stress et peuvent induire une réponse inflammatoire (Kono et Rock 2008). Certains médiateurs inflammatoires, tels que l'interleukine-1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) et l'interleukine-33 (IL-33), peuvent être libérés lors de lésions tissulaires et agir comme DAMPs en activant les cellules immunitaires et en favorisant l'inflammation (Oppenheim et Yang 2005). Il convient de noter que cette liste n'est pas exhaustive, et d'autres molécules peuvent également agir comme DAMPs dans des contextes spécifiques.

En effet, il existe tellement de types de molécules différentes pouvant jouer le rôle de DAMPs que la nomenclature dans la littérature n'est pas très précise. Une classification des DAMPs en deux groupes a été proposée pour mieux comprendre leur rôle dans l'inflammation (Kaczmarek, Vandenabeele, et Krysko 2013). Le premier groupe comprend des molécules qui, dans des conditions physiologiques normales, n'ont pas de rôle inflammatoire, mais qui vont acquérir des propriétés inflammatoires lorsqu'elles vont être sécrétées, modifiées ou exprimées à la surface cellulaire (voir ci-dessus : ATP, HMGB1, HSP...) (Kono et Rock 2008). Le deuxième groupe comporte des molécules qui sont qualifiées d'alarmines. Il comprend des molécules stockées dans les cellules qui sont libérées lors de la lyse cellulaire et qui contribuent ainsi à la réponse inflammatoire, comme par exemple les cytokines IL-1 $\alpha$  et IL-33 (Oppenheim et Yang 2005). Il est important de noter que cette classification des DAMPs en deux groupes est une approche conceptuelle qui peut aider à comprendre les différents mécanismes impliqués dans l'inflammation. Cependant, il existe une certaine diversité et complexité dans les DAMPs, et certaines molécules peuvent avoir des rôles à la fois inflammatoires et non inflammatoires selon le contexte (Oppenheim et Yang 2005; Kono et Rock 2008; Kaczmarek, Vandenabeele, et Krysko 2013). De plus, de nombreux PAMPs ont la capacité de stimuler l'expression des DAMPs appartenant à la famille des cytokines IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-33...), ce qui permet une interaction synergique entre ces deux classes distinctes de déclencheurs inflammatoires. Des études récentes suggèrent que les cytokines de la famille IL-1 jouent un rôle essentiel en tant qu'initiateurs majeurs de l'inflammation stérile induite par la nécrose, mais aussi qu'en tant qu'amplificateurs de l'inflammation en réponse aux lésions tissulaires associées à une infection (Martin 2016).

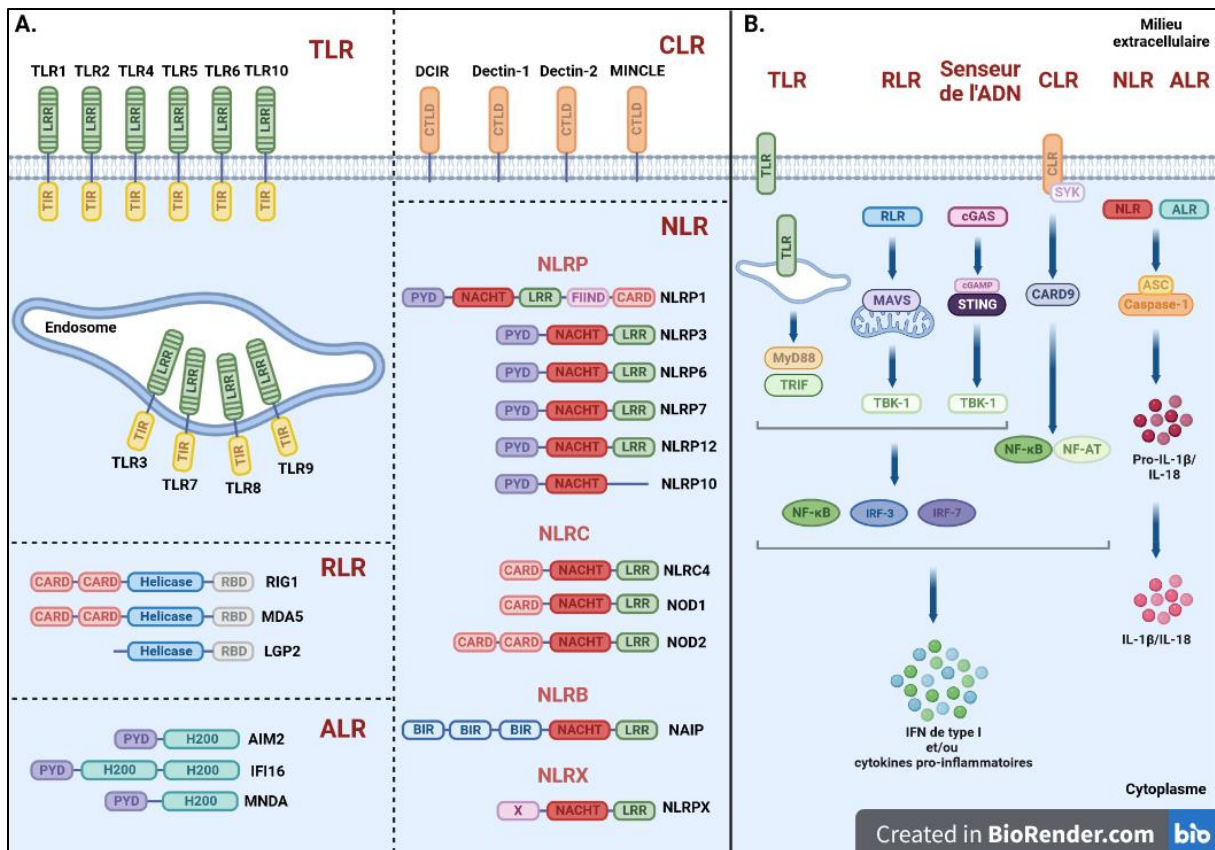
Outre leur implication dans l'inflammation, il convient de souligner que les DAMPs jouent également un rôle important dans le processus de régénération tissulaire en activant des mécanismes de réparation et de cicatrisation. Certains DAMPs, tels que l'acide hyaluronique, l'ATP et HMGB1, peuvent favoriser la régénération tissulaire en activant des voies de signalisation spécifiques et en favorisant la prolifération cellulaire, la synthèse de la matrice extracellulaire et la formation de nouveaux tissus (Vénéreau, Ceriotti, et Bianchi 2015).

## **2) Les Pattern Recognition Receptors (PRR)**

Les PRR sont une classe de récepteurs qui jouent un rôle essentiel dans le système immunitaire inné. Ils sont responsables de la détection des DAMPs et des PAMPs. En reconnaissant ces motifs, les PRR déclenchent la réponse immunitaire, ce qui conduit à l'élimination des agents pathogènes envahissants. Ils sont essentiels pour la détection précoce des infections et le déclenchement d'une réponse immunitaire adéquate visant à protéger l'organisme hôte (Akira, Uematsu, et Takeuchi 2006). Les PRR sont notamment présents dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Ces récepteurs à reconnaissance de motifs peuvent être localisés soit à la surface de ces cellules immunitaires, soit à l'intérieur, dans le cytoplasme ou dans des compartiments intracellulaires spécifiques (Mogensen 2009). Il est important de noter que la localisation exacte des PRR peut varier selon le type cellulaire, l'état de différenciation cellulaire et le contexte tissulaire. De plus, certains récepteurs peuvent subir une redistribution lors de l'activation immunitaire ou en réponse à des stimuli spécifiques.

Les PRR sont classés en différentes familles en fonction de leur structure et de leur localisation cellulaire. Les principales familles de PRR sont : les Toll-like receptors (TLR), les NOD-like receptors (NLR), les RIG-I-like receptors (RLR), les C-type lectin receptors (CLR) et les récepteurs senseur de l'ADN (de type cytosolic DNA sensor (CDS) et AIM-2 like receptor (ALR)) (**Figure 2**) (Caneparo et al. 2018). Il existe également d'autres familles de PRR moins connues que je ne vous présenterai pas ici, telles que les récepteurs de type NKB1/NKp46 (NK cell activating receptor) exprimés sur les cellules tueuses naturelles (Natural Killer, NK), et les récepteurs « scavenger » qui reconnaissent divers ligands, notamment les lipides oxydés. Chaque famille de récepteurs reconnaît des motifs spécifiques et active des voies de signalisation distinctes pour déclencher une réponse immunitaire adaptée.





**Figure 2: Les Pattern Recognition Receptors**

**A. Structure et localisation.** Les TLR sont des récepteurs membranaires localisés soit à la membrane plasmique, soit à la membrane des endosomes. Ils contiennent un domaine LRR (Leucine-Rich Repeat) et un domaine TIR (Toll/ IL1-R). Les RLR sont des récepteurs cytosoliques qui contiennent deux domaines CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) (sauf LGP2), un domaine hélicase et un domaine de liaison à l'ARN (RNA Binding Domain, RBD). Les ALR sont des senseurs cytosoliques de l'ADN qui contiennent un domaine PYD (PYrin Domain) et un ou deux domaine(s) H200. Les CLR sont des récepteurs membranaires présents à la membrane plasmique ; ils contiennent un domaine CTLD (C-Type Like Domain). Les NLR sont des senseurs cytosoliques qui contiennent tous un domaine NACHT (NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) and TP1 (telomerase-associated protein), ou encore appelé domaine NOD (Nucleotide-binding and oligomerization)) et un LRR. Ils peuvent également contenir un domaine PYD, un ou deux domaine(s) CARD, trois domaines BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat), un domaine FIIND (F-InteractiING Domain) et/ou un domaine X. **B. Les voies de signalisation induites par les différents types de PRR.** Les TLRs utilisent les adaptateurs MyD88 ou TRIF pour déclencher la production d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires via la stimulation des facteurs de transcription IRF (Interferon-Regulatory Factor) et NF-κB, respectivement. Les RLR ont besoin de l'adaptateur mitochondrial MAVS (Mitochondrial AntiViral-Signaling protein) pour induire la production d'interférons de type I. Les senseurs de l'ADN tels que cGAS (Cyclic GMP-AMP Synthase) utilisent STING (Stimulator of Interferon Genes) pour stimuler la production d'interférons de type I. Les CLR peuvent activer les facteurs de transcription NF-κB et NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells) via la kinase SYK (Spleen tyrosine (Y) Kinase) et CARD9, entraînant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, certains récepteurs de type NLR et de type ALR peuvent former un complexe inflammasome en association avec la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain, aussi appelée PYCARD, CARD5, TMS1, Q9ULZ3) et la Caspase-1. L'inflammasome formé va favoriser la maturation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18. Created with BioRender.com

### a. Les Toll-like receptors: TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires présentes à la surface des cellules immunitaires. Certains TLR peuvent également être trouvés à l'intérieur des cellules, principalement dans des compartiments endosomaux. On connaît actuellement 10 types de TLR chez les humains (TLR1 à TLR10). Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10 sont exprimés à la surface des cellules, où ils peuvent détecter directement les pathogènes extracellulaires. En revanche, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont principalement localisés dans des compartiments intracellulaires, tels que les endosomes (**Figure 2A**). Les TLR sont capables de reconnaître divers signaux de danger, mais ils ne sont pas tous activés par les mêmes ligands. Leur capacité à reconnaître des motifs bactériens et viraux (PAMPs) ainsi que des signaux de danger associés aux dommages (DAMPs) est variée. Certains TLR vont reconnaître des motifs bactériens tels que TLR1, TLR2 et TLR6 qui vont reconnaître des lipoprotéines bactériennes, TLR4 qui reconnaît le LPS des bactéries Gram-négatif et TLR5 qui reconnaît la flagelline bactérienne. D'autres TLR vont reconnaître des motifs viraux tels que TLR3 qui reconnaît les ARN bicaténaires viraux, TLR7 et TLR8 qui reconnaissent les ligands à base d'ARN simple brin comme les acides nucléiques viraux, et TLR9 qui reconnaît les motifs CpG présents dans les acides nucléiques bactériens et viraux non méthylés (Akira, Uematsu, et Takeuchi 2006; Broz et Monack 2013; Takeuchi et Akira 2010). Certains TLR sont également capables de reconnaître des DAMPs. Par exemple, le TLR2 peut reconnaître la protéine HMGB1 qui est libérée lors de lésions ou de mort cellulaires (Curtin et al. 2009). TLR2 et TLR4, sont impliqués dans la reconnaissance des cristaux de monosodium d'urate (MSU), qui sont associés à des maladies inflammatoires telles que la goutte (Liu-Bryan et al. 2005). Le TLR10 est le dernier TLR à avoir été découvert. C'est un TLR unique qui présente des propriétés anti-inflammatoires (Fore et al. 2020) et dont les ligands et les fonctions ne sont pas encore pleinement compris. En effet, les ligands qui se lient à TLR2 sont également reconnus comme ligands de TLR10. De plus, les lipopeptides diacylés sont également identifiés comme des activateurs de TLR10. Enfin, TLR10 n'est pas exclusivement présent dans les cellules immunitaires, et peut également être trouvé dans des cellules non immunitaires comme les trophoblastes.

Les TLR sont composés de trois domaines principaux (**Figure 2A**) : un domaine extracellulaire responsable de la reconnaissance des ligands, constitué de répétitions en tandem appelées leucine-rich repeats (LRR) ; un domaine transmembranaire hydrophobe qui traverse la

membrane cellulaire et ancre le récepteur à la surface de la cellule/endosome ; et un domaine intracellulaire impliqué dans la signalisation et l'activation des voies immunitaires. Le domaine intracellulaire des TLR est également responsable de l'interaction avec les protéines adaptatrices et les facteurs de transcription. Ce domaine est principalement composé de deux régions : le domaine TIR (Toll/interleukin-1 receptor) conservé et présent dans de nombreux récepteurs de type Toll et certains récepteurs de l'interleukine-1 (IL-1), essentiel pour la transduction du signal et l'activation des voies de signalisation intracellulaires, et le domaine de liaison aux protéines adaptatrices. En effet, certains TLR possèdent des domaines supplémentaires qui leur permettent d'interagir avec des protéines adaptatrices spécifiques, telles que MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88) ou TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta), pour initier des cascades de signalisation distinctes (**Figure 2B**) (Broz et Monack 2013; Takeuchi et Akira 2010; Fore et al. 2020). Ainsi, la stimulation des cellules par un ligand des TLR induit le recrutement de protéines adaptatrices, contenant elles aussi un domaine TIR via des interactions homotypiques entre leurs domaines TIR. Il en résulte le déclenchement de cascades de signalisation en aval, notamment l'induction de la voie des MAP kinases (MAPK, Mitogen-activated protein kinase) ainsi que l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, conduisant in fine à la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. MyD88 est essentiel pour la signalisation de tous les TLR, à l'exception du TLR3 qui va interagir avec TRIF et induire la production d'IFN de type I (**Figure 2B**). Le TLR4 peut également recruter TRIF (Broz et Monack 2013).

#### **b. Les NOD-like receptors: NLR**

Les NLR (Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Repeat containing receptors) sont des récepteurs cytosoliques situés principalement dans le cytoplasme (**Figure 2A**). Ils sont impliqués dans l'activation des réponses inflammatoires et la formation de complexes multiprotéiques tels que les inflammasomes ou les signalosomes NOD. En effet, certains NLR sont capables de former des inflammasomes qui activent la Caspase-1, une enzyme clé dans le processus de maturation des cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 et dans l'induction de la mort par pyroptose, tandis que d'autres vont induire la formation de signalosomes NOD permettant ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B (**Figure 2B**) (Martinon, Mayor, et Tschopp 2009).

Chaque membre des NLR a une structure et des fonctions spécifiques, leur permettant de détecter et de répondre à divers signaux de danger et d'infection. Les NLR se composent de

trois domaines principaux (**Figure 2A**) : 1) un domaine NACHT (NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) and TP1 (telomerase-associated protein)) également appelé NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) essentiel dans la formation d'oligomères et dans la régulation de l'activité des NLR, et impliqué dans la liaison à l'ATP essentiel pour l'activation des NLR ; 2) un domaine LRR permettant la liaison aux ligands ; et 3) un domaine N-terminal permettant la formation d'oligomères et l'activation de la signalisation inflammatoire. Ce dernier domaine peut être un domaine PYD (PYrin Domain), CARD ou BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis proteine Repeat) permettant l'interaction avec d'autres protéines, notamment les protéines adaptatrices et les effecteurs de signalisation contenant également l'un de ces domaines respectifs (Martinon et Tschopp 2005; Ting et al. 2008).

Les NLR sont divisés en plusieurs sous-familles en fonction de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. Les principales sous-familles de NLR sont (**Figure 2A**) (Wilmanski, Petnicki-Ocwieja, et Kobayashi 2008; Ting et al. 2008 ; Davis, Wen, et Ting 2011):

- NLRP (NLR family pyrin domain-containing proteins) : Cette sous-famille comprend les NLR contenant un domaine PYD dans leur structure. À ce jour, 22 NLRP ont été caractérisés chez l'homme et 34 chez la souris. Les membres de la sous-famille NLRP, tels que NLRP1, NLRP3, NLRP6, sont associés à la formation d'inflammasomes. Il convient de noter que certaines protéines murines comme NLRP1 et NLRP5 ne possèdent pas de domaine PYD, tandis que NLRP1 humaine et murine possèdent en supplément un domaine CARD.
- NLRC (NLR family CARD domain-containing proteins) : Les membres de cette sous-famille possèdent un domaine CARD en plus du domaine NACHT. NLRC4 est un exemple connu de cette sous-famille et est impliqué dans la formation de l'inflammasome NLRC4. Les NOD (NOD1 et NOD2) permettent, après détection de PAMPs d'origine bactérienne, de former des signalosomes.
- NLRB (NLR family BIR domain-containing proteins) : Les NLR de cette sous-famille contiennent des domaines BIR supplémentaires. Un exemple de cette sous-famille est NAIP (NLR family apoptosis inhibitory proteins) qui joue un rôle dans la détection des bactéries intracellulaires. Les NAIP sont également capables de former des inflammasomes.

- NLRX (NLR family X domain-containing proteins) : Les membres de cette sous-famille possèdent un domaine X supplémentaire et sont impliqués dans la régulation de la signalisation antivirale.

Les différents inflammasome seront détaillés plus amplement dans la prochaine partie.

### c. Les RIG-I-like receptors: RLR

Les RLR sont une famille de récepteurs cytoplasmiques qui jouent un rôle crucial dans la détection des infections virales en détectant l'ARN viral. Les RLR reconnaissent les signatures moléculaires des virus, notamment les ARN viraux double brin (ARNdb) ou les structures d'ARN intermédiaires formées lors de la réplication virale. Lorsque les RLR détectent la présence d'ARN viral, ils activent une cascade de signalisation intracellulaire qui conduit à l'induction de réponses antivirales. Cette activation implique généralement l'interaction avec des adaptateurs tels que le facteur mitochondrial antiviral MAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling protein). Ces interactions permettent l'activation de IRF1, IRF3, IRF7 et NF- $\kappa$ B, ainsi que la production d'interférons de type I (interféron-alpha et interféron-beta) et d'autres cytokines antivirales, ainsi que l'activation de gènes antiviraux (**Figure 2B**). Les membres de cette famille comprennent RIG-I lui-même (Retinoic Acid-Inducible Gene I), MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) et LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) (**Figure 2A**) (Yoneyama et Fujita 2009; Kumagai et Akira 2010; Takeuchi et Akira 2010).

Les RLR sont composés de deux domaines CARD essentiels pour l'activation des voies de signalisation, d'un domaine hélicase essentiel pour la reconnaissance de l'ARN viral permettant notamment la détection et le déroulement des structures d'ARN double brin, et d'un domaine C-terminal riche en acides aminés basiques impliqué dans l'interaction avec les molécules d'ARN viral (**Figure 2A**). Bien que LGP2 ne possède pas de domaine de signalisation CARD comme RIG-I et MDA5, il joue un rôle régulateur dans la signalisation des RLR. LGP2 peut moduler l'activité de RIG-I et MDA5 en s'y associant pour amplifier la réponse antivirale.

Les RLR et les TLR jouent tous deux un rôle dans la lutte contre les infections virales, mais ils présentent des différences significatives dans leurs localisations, leurs ligands et leurs voies de signalisation, permettant ainsi aux RLR de fournir une alternative aux TLR dans la réponse antivirale. De plus, les RLR et les TLR peuvent interagir et coopérer pour renforcer la réponse immunitaire lors d'infections complexes.

#### d. Les C-type lectin receptors: CLR

Les CLR sont un groupe diversifié de récepteurs qui reconnaissent les structures glucidiques à la surface des agents pathogènes. Les CLR sont impliqués dans la reconnaissance de divers agents pathogènes, y compris les champignons, les bactéries et les parasites.

Les CLR sont caractérisés par la présence d'un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone appelé domaine CTLD (C-type lectin domain) permettant la liaison aux glucides présents sur les pathogènes tels que les mannanes, les glucanes et les fucanes (**Figure 2A**). Les CLR peuvent être divisés en plusieurs sous-familles (17) en fonction de leur structure et de leurs fonctions (Geijtenbeek et Gringhuis 2009; Hoving, Wilson, et Brown 2014). Certaines sous-familles bien connues comprennent :

- Les CLR de type I : Ils comprennent les mannose receptor (MR), DCIR (Dendritic Cell Immunoreceptor), Langerin et plusieurs autres récepteurs. Ils sont impliqués dans la reconnaissance des antigènes glycosylés et participent à la présentation des antigènes aux cellules immunitaires, la phagocytose des pathogènes et la modulation de la réponse immunitaire.
- Les CLR de type II : Ils comprennent les DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), Dectin-1, Dectin-2 et MGL (Macrophage Galactose-type lectin). Ils sont exprimés principalement sur les cellules dendritiques et les macrophages, et jouent un rôle crucial dans la reconnaissance et la capture des pathogènes, tels que les bactéries, les champignons et les virus.
- Les CLR de type III : Ils comprennent les Dectin-3 (CLEC4D), Dectin-3-like lectin (CLEC4E), CLEC4G, MINCLE (Macrophage Inducible C-type lectin) et plusieurs autres récepteurs. Ils sont impliqués dans la reconnaissance des pathogènes fongiques et bactériens et contribuent à l'activation des cellules immunitaires et à la production de cytokines inflammatoires.

Outre ces quelques exemples de sous-familles de CLR, il existe d'autres membres qui ont des fonctions spécifiques dans la reconnaissance des pathogènes et la modulation de la réponse immunitaire.

Lorsque certains CLR reconnaissent des motifs spécifiques présents sur les pathogènes, ils recrutent et activent la kinase SYK (spleen tyrosine kinase). SYK agit alors comme un médiateur clé en transmettant le signal intracellulaire via la voie de signalisation CARD9 (CARD-containing protein 9). La protéine CARD9 est recrutée et forme un complexe avec SYK qui

active ensuite la voie des MAPK qui va à son tour entraîner l'activation des facteurs de transcription tels que NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et NF- $\kappa$ B (**Figure 2B**). De plus, les CLR tels que de nombreux récepteurs de type Dectin peuvent également reconnaître des ligands endogènes (DAMPs), notamment des glucides et des ribonucléoprotéines comme SAP130 (Sin3-Associated Polypeptide p130) présents sur des cellules endommagées ou des produits de dégradation cellulaire. Ces interactions participent à la reconnaissance des tissus endommagés et à la régulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation associée. Il existe une collaboration entre les CLR et les autres PRR. Par exemple, certains CLR peuvent former des complexes avec les TLR à la surface des cellules immunitaires, ce qui permet une coopération étroite dans la reconnaissance des pathogènes. Cette interaction peut faciliter la liaison et l'internalisation des pathogènes, ainsi que l'activation des voies de signalisation intracellulaires. De plus, la collaboration entre les CLR et d'autres PRR peut conduire à une amplification des réponses immunitaires. En effet, l'activation simultanée des CLR et des TLR ou des NLR peut induire une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, favorisant ainsi une réponse immunitaire robuste contre les infections. Par exemple, les DC-SIGN peuvent collaborer avec les TLR3, TLR4 et TLR5. Dectin-1 peut participer à l'activation de NLRP3, et donc à l'activation de la Caspase-1 et à la sécrétion de cytokines de la famille de l'IL-1 (Geijtenbeek et Gringhuis 2009; Hoving, Wilson, et Brown 2014).

#### **e. Les récepteurs senseurs de l'ADN: CDS (Cytosolic DNA Sensor) et ALR (AIM-2 Like Receptor)**

Les récepteurs de type CDS sont une famille de récepteurs présents dans le cytosol des cellules et qui sont responsables de la détection de l'ADN pathogène provenant de bactéries, de virus ou d'autres sources. Leur activation déclenche la production d'interférons de type I et d'autres médiateurs inflammatoires, contribuant ainsi à la défense de l'organisme contre les infections virales et bactériennes (Z. Ma et Damania 2016; Caneparo et al. 2018).

Parmi les CDS, on retrouve les récepteurs de la famille PYHIN (PYrin and HIN200 domain containing proteins) tels que le récepteur AIM2 (Absent In Melanoma 2) (Lugrin et Martinon 2018), IFI16 (Interferon Gamma Inducible Protein 16) (Jakobsen et Paludan 2014) et MNDA (Myeloid cell Nuclear Differentiation Antigen) (Goubau, Rehwinkel, et Reis e Sousa 2010) (**Figure 2A**). En 2018, AIM2 et IFI16 ont été regroupés dans une famille appelée ALR (AIM2-like receptors) (Caneparo et al. 2018). Lorsque les récepteurs ALR détectent l'ADN

cytoplasmique, par exemple celui provenant de bactéries ou de virus, ils s'assemblent en oligomères fonctionnels et recrutent des adaptateurs de signalisation, tels que ASC, pour initier des cascades de signalisation inflammatoire en permettant la formation d'inflammasome, comme les NLR. IFI16, quant-à-lui, peut reconnaître de l'ADN viral dans le cytoplasme activant ainsi la production d'IFN de type I via STING (Stimulator of Interferon Genes) (Unterholzner et al. 2010), mais également dans le noyau où il pourrait former un inflammasome avec la protéine adaptatrice ASC (Kerur et al. 2011 ; Xiao 2015) (**Figure 2B**). Les ALR partagent une structure similaire, avec des domaines fonctionnels distincts : un domaine PYD et un domaine HIN-200 (Hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with 200–amino acid repeat ; répétitions de 200 acides aminés riches en histidine) caractéristique des récepteurs ALR et impliqué dans la liaison à l'ADN cytoplasmique, permettant aux ALR de reconnaître et de lier spécifiquement les séquences d'ADN bactérien et viral. Certains ALR, comme AIM2, possèdent également un domaine LRR (**Figure 2A**).

Les CDS comprennent également des protéines telles que cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) (Z. Ma et Damania 2016) et DAI/ZNBP1 (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors/Z-DNA binding protein 1) (Takaoka et al. 2007 ; Kuriakose et Kanneganti 2018) (**Figure 2A**). cGAS détecte l'ADN cytoplasmique double brin et catalyse la synthèse d'un second messager appelé cGAMP (cyclic GMP-AMP). Le cGAMP activé se lie ensuite à la protéine STING, entraînant la production d'interférons de type I et d'autres cytokines antivirales via TBK-1 et IRF3 (**Figure 2B**) (Z. Ma et Damania 2016). DAI active également les facteurs de transcription TBK-1, IRF3 et IRF7, qui induisent la production d'interférons de type I et d'autres molécules antivirales (Takaoka et al. 2007).

### **III. Les inflammasomes : acteur majeur de l'immunité innée**

Les inflammasomes sont des complexes protéiques multimériques impliqués dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire. Ils sont composés d'un PRR (comme certains NLR, ALR), d'une protéine adaptatrice souvent la protéine ASC, et de la pro-Caspase-1 (**Figure 3**).

Lorsque des signaux d'activation, tels que des DAMPs ou des PAMPs, sont détectés par un PRR, celui-ci s'assemble avec ASC via une interaction entre leur domaine PYD. Cette formation recrute ensuite la pro-Caspase-1 via son interaction avec ASC par leur domaine CARD respectif, permettant alors l'autoclivage catalytique et l'activation de la pro-Caspase-1 au sein du



complexe appelé inflammasome. La Caspase-1 activée permet le clivage protéolytique des pro-formes des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 en leur formes mature et active, ainsi leur relargages (**Figure 3**). Les cytokines matures sont en effet ensuite libérées dans l'environnement extracellulaire, où elles exercent des effets pro-inflammatoires importants en induisant le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires (Martinon, Mayor, et Tschopp 2009; de Zoete et al. 2014; Sharma et Kanneganti 2016).

L'IL-1 $\beta$  joue un rôle central dans la médiation de l'inflammation en stimulant les réponses immunitaires, en favorisant le recrutement des cellules inflammatoires, en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires et en activant les cellules endothéliales. Précisément, l'IL-1 $\beta$  stimule l'activation et la prolifération des lymphocytes T, B et des cellules NK. Elle favorise également la maturation et l'activation des cellules dendritiques, qui sont essentielles pour l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. L'IL-1 $\beta$  induit l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, facilitant ainsi le recrutement des leucocytes vers le site d'inflammation. L'IL-1 $\beta$  stimule la production de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , qui amplifient la réponse inflammatoire. Enfin, L'IL-1 $\beta$  stimule les cellules endothéliales à produire des molécules d'adhésion et des facteurs pro-coagulants, contribuant ainsi à la réponse inflammatoire et à la coagulation (Charles A. Dinarello 2013; 2018).

La libération de l'IL-18 lors de l'activation de l'inflammasome contribue quant-à-elle à l'amplification de l'inflammation, à l'activation des cellules immunitaires et à la régulation de l'immunité, renforçant ainsi la réponse immunitaire contre les agents pathogènes ou les lésions tissulaires. En effet, l'IL-18 favorise la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , et participe à l'amplification de la réponse inflammatoire. Cela peut entraîner une activation accrue des cellules immunitaires et la persistance de l'inflammation. L'IL-18 stimule également la production d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) par les lymphocytes T et favorise leur activation. Cela contribue à renforcer la réponse immunitaire cellulaire et l'inflammation (C. Dinarello et al. 2013).

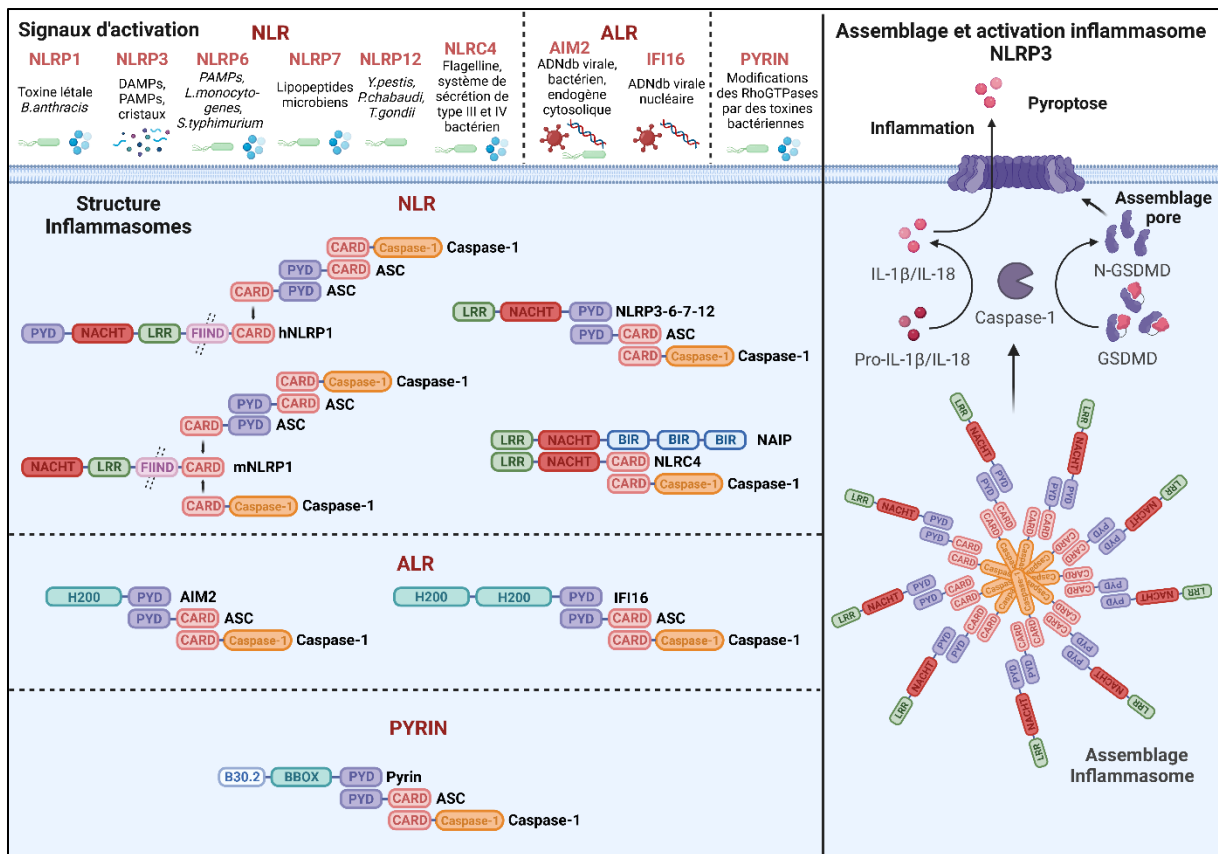
La Caspase-1 activée permet également le clivage de la gasdermin D (GSDMD) présente sous forme de précurseur inactif, libérant ainsi un fragment N-terminal actif appelé GSDMD-N. Les fragments GSDMD-N s'assemblent ensuite pour former des pores dans la membrane cellulaire. La formation de ces pores membranaires par le GSDMD-N permet la libération de molécules cytoplasmiques pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18. De plus, les pores

peuvent induire une rupture cellulaire explosive caractéristique d'une mort inflammatoire par pyroptose, entraînant une inflammation locale et la libération de signaux d'alarme pour activer le système immunitaire et pour stimuler d'autres voies de signalisation inflammatoires (**Figure 3**) (Shi et al. 2015 ; He et al. 2015)

Les inflammasomes jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et dans la régulation de l'inflammation. Ils contribuent à la défense contre les infections, la reconnaissance des lésions tissulaires, la coordination des réponses inflammatoires et la résolution des infections et des inflammations. Cependant, une activation excessive ou dérégulée des inflammasomes peut être associée à des maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes. Certaines maladies inflammatoires associées à une activation excessive de l'inflammasome NLRP3 seront présentées dans une prochaine partie.

Il existe différents types d'inflammasome, chacun étant activé par des signaux spécifiques. Les inflammasomes portent le nom du PRR qui régule leur activité et détermine en amont la nature des stimuli d'activation (Lamkanfi et Dixit 2012). Les PRR les mieux étudiés pouvant induire la formation d'un inflammasome sont : NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 et pyrin (**Figure 3**). Toutefois, plusieurs autres récepteurs NLR peuvent former des inflammasomes tels que NLRP6, NLRP7, NLRP9, NLRP12, NLRC3, NLRC5, mais également des récepteurs non NLR tels que IFI16 (**Figure 3**).

Ainsi, à ce jour, on estime qu'il existe une dizaine d'inflammasomes différents qui ont été identifiés et caractérisés dans la littérature scientifique. Chacun de ces inflammasomes est impliqué dans la reconnaissance de différents motifs moléculaires et pathogènes, et joue un rôle spécifique dans la régulation de l'inflammation.



**Figure 3: Structure et signaux d'activation des différents inflammasomes, et exemple de l'assemblage et de l'activation de l'inflammasome NLRP3**

Les inflammasomes sont activés en réponse à divers stimuli associés à des pathogènes (PAMPs) ou à des cellules endommagées (DAMPs). Les inflammasomes sont constitués d'un PRR, qui contient soit un domaine PYD, soit un domaine CARD, qui peut interagir physiquement avec le domaine PYD ou CARD de ASC et de la Caspase-1, respectivement. NLRP1 et NLRC4 contiennent tous deux un domaine CARD qui peut interagir directement avec la Caspase-1, indépendamment de ASC ; cependant, l'ajout de ASC dans l'assemblage de l'inflammasome peut renforcer son activité dans le cas de NLRP1. L'oligomérisation de ASC et du PRR aboutit à la formation d'un complexe capable de cliver la pro-Caspase-1 en sa forme active, ce qui entraîne le clivage des pro-formes d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 en leur forme mature active. L'activation de la Caspase-1 conduit également au clivage de la gasdermine D (GSDMD). Les fragments N-terminaux des GSDMD clivées s'assemblent ensuite pour former des pores dans la membrane cellulaire, permettant le relargage d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 et conduisant à la mort cellulaire par pyroptose. Created with BioRender.com

### 1) L'inflammasome NLRP1

L'inflammasome NLRP1 humain a été le premier complexe inflammasome à avoir été identifié (Martinon, Burns, et Tschopp 2002). L'inflammasome NLRP1 est activé en réponse à divers signaux, tels que les infections microbiennes, les lésions tissulaires et le stress cellulaire. Son activation joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections, en favorisant l'inflammation locale pour éliminer les agents pathogènes. Il est composé comme la plupart des inflammasomes de type NLR, du récepteur senseur NLRP1 lui-même, de l'adaptateur ASC et de la Caspase-1. En revanche, NLRP1 se distingue des autres membres de

cette famille, en possédant deux domaines supplémentaires à son extrémité C-terminal : un FIIND et un CARD. La structure de la protéine NLRP1 diffère d'une espèce à l'autre, contrairement à la plupart des autres protéines NLR. Par exemple, chez la souris, le gène *Nlrp1* ne code pas pour un domaine PYD N-terminal (Hsu et al. 2008). De plus, chez la souris, il existe plusieurs paralogues de *Nlrp1* (NLRP1a, NLRP1b et NLRP1c) induisant l'existence de trois isoformes de l'inflammasome NLRP1 présentant des différences dans leur réponse à la toxine létale de l'anthrax. L'activité de l'inflammasome NLRP1 dépend exclusivement du clivage autolytique du domaine FIIND (Finger et al. 2012). Ce clivage conduit à l'ubiquitination et à la dégradation fonctionnelle de l'extrémité N-terminale de NLRP1, libérant le fragment C-terminal pour médier la formation de l'inflammasome (Sandstrom et al. 2019; Chui et al. 2019). Après l'activation de FIIND et la libération de son fragment C-terminal, les inflammasomes NLRP1 humain (hNLRP1) et NLRP1 murin (mNLRP1) utilisent leur domaine CARD C-terminal pour activer la signalisation de l'inflammasome. L'adaptateur ASC est essentiel pour l'activation de l'inflammasome hNLRP1. Deux molécules ASC vont venir former un complexe pour recruter la caspase 1 par des interactions CARD-CARD avec l'inflammasome NLRP1 (**Figure 3**) (Finger et al. 2012). En revanche, mNLRP1B peut engager directement la Caspase-1 ou utiliser également ASC pour amplifier l'activation de l'inflammasome (**Figure 3**) (Bauernfried et Hornung 2021). En effet, Sandstrom et al. ont montré que le domaine CARD présent dans le fragment C-terminal de mNLRP1 est suffisant pour s'auto-assembler, recruter la Caspase-1 et former un inflammasome fonctionnel (Sandstrom et al. 2019).

Chez la souris, mNLRP1b détecte l'activité enzymatique du facteur létal (LF), une toxine protéase produite par la bactérie *Bacillus anthracis*, mais détecte également le parasite *Toxoplasma gondii* (Sharma et Kanneganti 2016). L'inflammasome mNLRP1b est induit par un mécanisme appelé dégradation fonctionnelle dépendante du protéasome (Sandstrom et al. 2019). La protéase LF permet une dégradation spécifique des domaines N-terminaux de mNLRP1b, tandis que le domaine C-terminal libéré permet la formation de l'inflammasome NLRP1. Ce modèle a permis de mettre en évidence que toute protéine qui induit un clivage protéolytique N-terminal de NLRP1 peut également induire l'activation de l'inflammasome NLRP1, telles que IpaH7.8, une E3 ubiquitine ligase sécrétée par l'agent pathogène *Shigella flexneri* (Sandstrom et al. 2019).

Chez l'homme, l'inflammasome hNLRP1 est activé en présence d'un fragment du peptidoglycane muramyl dipeptide, un composant de la paroi bactérienne (Bruey et al. 2007

; Faustin et al. 2007). En 2020, deux activateurs physiologiques de hNLRP1 ont été décrits : des protéases 3C virales et l'ARN double brin (Robinson et al. 2020; Bauernfried et al. 2021; Bauernfried et Hornung 2021). Un nouvel activateur a été identifié en 2023 dans les kératinocytes humains, le poly(dA:dT) qui est un mimétique synthétique de l'ADNdb (J. Y. Zhou et al. 2023). Les mécanismes d'activation de NLRP1 ne sont pas encore clairement établis, mais, comme pour NLRP3, l'efflux de potassium semble être essentiel (Fink, Bergsbaken, et Cookson 2008; Wickliffe, Leppla, et Moayeri 2008).

L'inflammasome NLRP1 est l'inflammasome le plus présent et important dans les kératinocytes de la peau. Il est donc associé à de nombreuses pathologies cutanées telles que le vitiligo, le psoriasis, la dermatite atopique ou encore le cancer de la peau (Y. Jin et al. 2007 ; Burian, Schmidt, et Yazdi 2023). Des mutations dans le gène NLRP1 ont également été associées à d'autres maladies auto-inflammatoires et auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn (Finger et al. 2012 ; Sharma et Kanneganti 2016). Ces mutations entraînent une activation constitutive de l'inflammasome NLRP1 et une production excessive de cytokines inflammatoires.

Des études ont également examiné les interactions de l'inflammasome NLRP1 avec d'autres protéines régulatrices et adaptatrices. Par exemple, il a été montré que BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) et BCL-xl (B-cell Lymphoma-extra large), qui sont deux protéines anti-apoptotiques, peuvent interagir avec NLRP1 et inhiber son activation (Bruey et al. 2007 ; Bauernfeind et al. 2011). Ils suppriment l'activation de la Caspase-1 dépendante de NLRP1 ainsi que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en inhibant la liaison de l'ATP au domaine NACHT, une étape nécessaire à l'oligomérisation du domaine NACHT (Faustin et al. 2007).

## 2) L'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 également connu sous les noms NALP3 et cryopyrin, est le plus largement étudié et caractérisé dans la littérature. Il est composé du récepteur NLRP3, de l'adaptateur ASC et de la Caspase-1 (**Figure 3**). L'activation de l'inflammasome NLRP3 peut être déclenchée par de nombreux stimuli, chimiquement et structurellement très différents. Les signaux d'activation ainsi que les voies de signalisation et les mécanismes d'actions de cet inflammasome seront détaillés dans la prochaine partie.

### 3) L'inflammasome NLRP6

L'inflammasome NLRP6 est composé du récepteur NLRP6 lui-même, de l'adaptateur ASC et de la Caspase-1 (**Figure 3**). L'activation de l'inflammasome NLRP6 est généralement déclenchée par des signaux de stress cellulaire, tels que les infections bactériennes, les lésions tissulaires ou les déséquilibres de la flore intestinale. En raison de son expression élevée dans les cellules épithéliales gastro-intestinales, en particulier dans le côlon, l'une des fonctions principales de l'inflammasome NLRP6 est de réguler l'homéostasie intestinale et de maintenir l'équilibre entre la tolérance immunitaire et la réponse inflammatoire dans le tube digestif. Des études suggèrent que NLRP6 contribue à la modulation de la composition de la flore intestinale, à la régulation de l'intégrité de la barrière intestinale et à la production de peptides antimicrobiens (Chen et al. 2011 ; Elinav et al. 2011 ; Wlodarska et al. 2014). En effet, la taurine, un métabolite microbien produite par les bactéries commensales de l'intestin, active l'inflammasome NLRP6, entraînant l'activation et la sécrétion d'IL-18 qui favorise alors la production de peptides antimicrobiens nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale (Levy et al. 2015). Toutefois, des altérations dans l'expression ou l'activation de NLRP6 peuvent perturber l'équilibre immunitaire dans l'intestin, conduisant à une inflammation chronique et à des dommages tissulaires. Ainsi, l'inflammasome NLRP6 a été associé à des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, mais également les cancers du côlon.

Le rôle de NLRP6 dans l'immunité antibactérienne est sujet à débat et est rapporté de manière très contradictoire dans la littérature scientifique. Certaines études suggèrent que les souris déficientes en NLRP6, en ASC ou en Caspase-1, après traitement par sulfate de dextran sodique (DSS) induisant une colite expérimentale, présentent des altérations de la flore microbienne intestinale et une susceptibilité accrue aux colites (Elinav et al. 2011 ; Normand et al. 2011 ; Levy et al. 2015).

Cependant, d'autres études, avec un même modèle d'induction des colites par le DSS, ont rapporté des résultats contradictoires. Par exemple, certaines études ont montré que les souris déficientes en NLRP6 et en ASC ne présentaient aucune altération dans la régulation du microbiote intestinal ni une susceptibilité accrue aux colites (Mamantopoulos et al. 2017; Lemire et al. 2017; Volk et al. 2019). De plus, des souris déficientes en NLRP6 semblaient être résistantes aux infections par des bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* (Anand et al. 2012 ; Hara et al. 2018). Une autre

étude a montré que NLRP6 pourrait aggraver la maladie gastro-intestinale du greffon contre l'hôte à médiation immunitaire allogénique, indépendamment des changements dans la composition du microbiome intestinal (Toubai et al. 2019).

En résumé, les résultats contradictoires dans la littérature ébranlent les effets protecteurs supposés de l'activation de l'inflammasome NLRP6 dans les MICI. Des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle précis de NLRP6 dans l'immunité antibactérienne et son impact sur la régulation du microbiote intestinal et des réponses inflammatoires associées aux MICI.

Les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP6 varient également d'une étude à l'autre et selon les ligands d'activation utilisés. En effet, une des premières études sur NLRP6 a révélé que cet inflammasome agissait comme un régulateur négatif de la voie MAPK et de l'activation de NF- $\kappa$ B dans les macrophages infectés par des bactéries telles que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* (Anand et al. 2012). Dans le contexte des infections bactériennes à Gram positif, il a été constaté que la liaison de l'acide lipotéichoïque (LTA), un composant de la paroi des bactéries, à NLRP6 joue un rôle dans la formation de l'inflammasome (Hara et al. 2018 ; Shen et al. 2021). D'autre part, lors d'infections par des virus à ARN, NLRP6 détecte l'ARN viral en interagissant avec une hélicase à ARN appelée DHX15. Cette interaction favorise la mise en place des réponses de type interféron (IFN) (P. Wang et al. 2015 ; Shen et al. 2021). Une étude récente a proposé que NLRP6 pourrait accomplir ces deux fonctions (activation de l'inflammasome et des réponses IFN) grâce à un processus appelé séparation de phase liquide-liquide (LLPS). Selon cette étude, NLRP6 peut directement se lier à l'ARNdb ou au LTA pour favoriser la LLPS et former des condensats liquides avec ASC ou DHX15. Ces condensats liquides peuvent ensuite jouer des rôles distincts : ceux formés avec ASC conduisent à la formation de l'inflammasome, tandis que ceux formés avec DHX15 favorisent les réponses IFN (Shen et al. 2021).

#### **4) L'inflammasome NLRP7**

Les connaissances sur l'inflammasome NLRP7 sont relativement limitées par rapport à d'autres inflammasomes tels que NLRP1 ou NLRP3, et il y a moins d'études spécifiques sur son rôle et ses mécanismes d'action. Cependant, comme pour l'inflammasome NLRP6, l'inflammasome NLRP7 est composé du récepteur senseur NLRP7, de l'adapteur ASC et de la Caspase-1 effectrice (**Figure 3**). NLRP7 est exprimé dans divers tissus, y compris le système

reproducteur, le système immunitaire et le système nerveux (Radian et al. 2013). NLRP7 est activé par des lipopeptides acylés microbiens provenant d'espèces de *Mycoplasma*, ce qui induit un assemblage de l'inflammasome dépendant de ASC (Khare et al. 2012). Il a été suggéré que l'activation de NLRP7 dépend de l'ATP (Radian et al. 2013). Il semblerait que l'inflammasome NLRP7 joue un rôle anti-inflammatoire en régulant négativement le niveau intracellulaire d'IL-1 $\beta$  mature (Kinoshita et al. 2005 ; Messaed et al. 2011). Cependant, NLRP7 est nécessaire à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  puisqu'il a été montré que son inactivation diminue de manière significative la sécrétion d'IL-1  $\beta$  (Khare et al. 2012).

Des mutations dans le gène NLRP7 ont été associées à des maladies génétiques rares, telles que les môles hydatiformes qui sont des maladies trophoblastiques gestationnelles caractérisées par des anomalies du développement embryonnaire (villosités placentaires dégénérées) et des complications obstétriques (ovule fécondé non viable) (Murdoch et al. 2006 ; Slim et Wallace 2013).

En résumé, l'inflammasome NLRP7 est un membre de la famille des inflammasomes, mais ses fonctions et ses mécanismes d'action sont moins bien compris que ceux d'autres inflammasomes plus étudiés. Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour approfondir notre compréhension de son rôle dans la réponse inflammatoire et son implication dans les maladies associées.

## 5) L'inflammasome NLRP12

L'inflammasome NLRP12 est constitué du récepteur senseur NLRP12 lui-même, de l'adaptateur ASC et de la Caspase-1 (**Figure 3**). Les connaissances sur l'inflammasome NLRP12 sont encore en évolution, mais des études préliminaires suggèrent qu'il joue un rôle dans la modulation de l'inflammation et dans la régulation des réponses immunitaires. En effet, il a été observé que NLRP12 peut jouer un rôle à la fois anti-inflammatoire et pro-inflammatoire. D'un côté, des travaux de recherche ont montré que NLRP12 peut avoir des effets pro-inflammatoires dans certains contextes, en favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires. Notamment, il a été montré dans des modèles murins que l'inflammasome NLRP12 est activé par l'infection par la bactérie *Yersinia pestis* (Vladimer et al. 2012), par le parasite *Plasmodium chabaudi* (Ataide et al. 2014) et plus récemment, par le parasite *Toxoplasma gondii* (Rajabi et al. 2022), conduisant à la libération des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18. D'un autre côté, la protéine NLRP12 agit comme un régulateur négatif des voies de



signalisation NFκB et MAPK suite à une infection par les bactéries *Salmonella Typhimurium* (Zaki et al. 2014) ou encore *Klebsiella pneumoniae* ou *Mycobacterium tuberculosis* (Allen et al. 2013). De plus, NLRP12 peut jouer un rôle dans la migration des cellules dendritiques, qui sont des acteurs clés du système immunitaire, et dans la formation d'une réponse immunitaire adaptative appropriée (Arthur et al. 2010). Cela souligne le potentiel de NLRP12 pour moduler la réponse immunitaire en fonction du contexte et des stimuli spécifiques.

NLRP12 joue également un rôle crucial dans la régulation du microbiote intestinal en contrôlant la production excessive de cytokines inflammatoires et en favorisant la diversité et la croissance des bactéries commensales du microbiote afin de limiter l'inflammation intestinale (L. Chen et al., 2017). Ceci a été confirmé par une autre étude qui montre que les souris déficientes en NLRP12 présentent une inflammation accrue du côlon et une dysbiose du microbiome, provoquant une obésité chez ces souris (Truax et al. 2018).

De plus, il a été montré que NLRP12 peut avoir un impact sur la localisation et le recrutement des cellules immunitaires en particulier des neutrophiles. En effet, des études ont montré que lors d'une infection par le virus de la grippe A (IAV, Influenza A virus) ou par les bactéries *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, NLRP12 régulait positivement la chimioattraction des neutrophiles (Hornick et al. 2018 ; Ulland et al. 2016). En revanche, lors d'une infection par le parasite *Leishmania major*, NLRP12 régulait négativement la migration et le recrutement des neutrophiles vers le site d'infection (Zamoshnikova et al. 2016). Ceci souligne encore une fois la dualité des effets de NLRP12, en fonction des stimuli appliqués.

Chez l'homme, les mutations dans le gène NLRP12 sont associées à des maladies auto-inflammatoires, telles que le syndrome familial auto-inflammatoire au froid (SFAF). En dehors de ces maladies génétiques spécifiques, NLRP12 a également été étudié dans le contexte de diverses autres maladies inflammatoires, notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (L. Chen et al. 2017; Lau et Dombrowski 2018), les maladies cardiovasculaires (Flister et al. 2015) et différents types de cancer (Karan, Tawfik, et Dubey 2017; Udden et al. 2019).

Cependant, NLRP12 semble avoir été bien plus étudié en tant que protéine seule que pour sa participation dans un complexe inflammasome. En effet, il existe peu d'études qui ont élucidé le rôle de NLRP12 en tant que composant de l'inflammasome (Vladimer et al. 2012; Ataide et al. 2014; Rajabi et al. 2022). De plus, il a été montré qu'une infection par la bactérie *Brucella*

*abortus* entraîne une augmentation de la circulation de l'IL-1 $\beta$  chez les souris déficientes en NLRP12 (Silveira et al. 2017), obscurcissant le rôle potentiel de NLRP12 en tant que composant de l'inflammasome.

Des recherches supplémentaires seront donc nécessaires pour confirmer et approfondir notre compréhension de l'implication de NLRP12 dans la formation d'un inflammasome fonctionnel et ses conséquences sur la régulation de l'inflammation. Ces études permettront de mieux éclairer le rôle et les mécanismes d'action de NLRP12 dans le contexte de l'immunité et des maladies inflammatoires.

## 6) L'inflammasome NLRC4

L'inflammasome NLRC4 ne contient pas de domaine PYD N-terminal comme les autres NLR, mais contient un domaine CARD N-terminal, qui peut recruter directement la pro-Caspase-1 via des interactions CARD-CARD permettant la formation de l'inflammasome en absence de ASC (**Figure 3**) (Mariathasan et al. 2004 ; Sharma et Kanneganti 2016). Cependant, ASC va améliorer la réponse de l'inflammasome puisqu'une déficience en ASC entraîne un clivage inefficace de la pro-Caspase-1 et une diminution de la libération d'IL-1 $\beta$  (Case et Roy 2011; Broz et al. 2010). L'activation d'un inflammasome NLRC4 fonctionnel nécessite la reconnaissance de ligands bactériens par les NAIPs (**Figure 3**), car lui-même ne peut pas reconnaître directement ces signaux. Il n'existe qu'un seul NAIP chez l'homme tandis que chez la souris, il y en a sept. Le NAIP humain reconnaît la flagelline et les composants des appareils de sécrétion de type III (T3SS), tandis que les NAIPs 1 et 2 murins reconnaissent des éléments du T3SS et les NAIPs 5 et 6 murins se lient directement à la flagelline (Kortmann, Brubaker, et Monack 2015; Reyes Ruiz et al. 2017). Cette reconnaissance est suivie du recrutement de NLRC4 et de son oligomérisation permettant l'assemblage d'un complexe inflammasome NAIP-NLRC4 fonctionnel (Zhao et al. 2011 ; Qu et al. 2012). Certaines études ont montré que l'activation de l'inflammasome NLRC4 nécessitait la phosphorylation de NLRC4 sur la sérine 533 (Qu et al. 2012 ; Liu et al. 2017) bien que la structure du NLRC4 inactif et auto-inhibé contienne également cette modification post-traductionnelle (Hu et al. 2013). En accord avec cette dernière observation, d'autres n'ont pas observé que l'activation de l'inflammasome NLRC4 nécessitait cette phosphorylation (S. Suzuki et al. 2014 ; Tenthorey et al. 2020).

L'inflammasome NLRC4 est principalement connu pour sa réponse aux infections bactériennes (Lamkanfi et Dixit 2012), notamment *Salmonella typhimurium* (Franchi et al. 2006), *Legionella*

*pneumophila* (Amer et al. 2006; Coers et al. 2007; Jamilloux et al. 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Franchi, Stoolman, et al. 2007; Miao et al. 2008; Sutterwala et al. 2007), *Shigella flexneri* (T. Suzuki et al. 2007), *Staphylococcus aureus* (Paudel et al. 2019) et *Listeria monocytogenes* (Wu, Fernandes-Alnemri, et Alnemri 2010 ; Sauer et al. 2011). L'activation de l'inflammasome NLRC4 dépend de la présence d'un système de sécrétion spécifique. Pour les bactéries *S. typhimurium*, *S. flexneri* et *P. aeruginosa*, un système T3SS intact est nécessaire. Quant à *L. pneumophila*, elle nécessite un système de sécrétion de type IV (T4SS) pour activer l'inflammasome NLRC4. Lorsque des macrophages sont infectés par *Salmonella typhimurium*, l'inflammasome NLRC4 favorise la polymérisation de filaments d'actine augmentant la rigidité cellulaire, ce qui empêche la phagocytose de bactéries supplémentaires et limite les mouvements cellulaires afin de limiter la propagation de l'infection. De plus, il stimule la production de ROS dans les cellules infectées, contribuant ainsi à la mort intracellulaire des bactéries et à leur incapacité à se disséminer (Man et al. 2014). En réponse à la présence de flagelline, l'inflammasome NLRC4 induit la production de prostaglandines et de leucotriènes qui participent à la réponse inflammatoire en recrutant d'autres cellules immunitaires et en amplifiant la réaction inflammatoire locale (von Moltke et al. 2012). Ces découvertes mettent en évidence les multiples rôles de l'inflammasome NLRC4 dans la défense de l'organisme contre les infections bactériennes.

## 7) L'inflammasome AIM2

L'inflammasome AIM2 est constitué du récepteur AIM2, de l'adaptateur ASC et de la Caspase-1 (**Figure 3**). Il se distingue des autres inflammasomes par sa capacité à détecter l'ADN à partir de son domaine HIN-200 qui va venir s'oligomériser le long de l'ADNdb (Morrone et al. 2015 ; Ru et al. 2013). Cela va permettre la libération du domaine PYD qui va se lier à ASC pour former l'inflammasome (Lu et al. 2014 ; 2015). L'inflammasome AIM2 est particulièrement important dans la réponse aux infections virales et bactériennes qui entraînent la libération d'ADN dans le cytoplasme. En effet, il reconnaît spécifiquement l'ADN cytoplasmique bicaténaire qu'il soit d'origine microbienne, lors d'infection par exemple par les bactéries intracellulaires *Francisella tularensis* et *Listeria monocytogenes*, le cytomégalovirus et le virus de la vaccine, ou provienne de cellules endommagées (Alnemri 2010 ; Rathinam et al. 2010). La taille optimale des séquences d'ADN reconnues par AIM2 est entre 70 et 80 paires de bases (T. Jin et al. 2012 ; Morrone et al. 2015). Des études plus récentes ont également montré que AIM2 permettrait

également de détecter l'ARN (H. Zhang et al. 2017). Les protéines POPs (PYD-only proteins) régulent l'activation et l'assemblage de l'inflammasome AIM2 (Khare et al. 2014). Par exemple, POP1 et POP2 se lient au domaine PYD de ASC, tandis que POP3 se lie directement au domaine PYD de AIM2. La liaison de POP3 à AIM2 va venir bloquer les interactions PYD-PYD avec ASC, empêchant ainsi l'activation subséquente de la pro-Caspase-1 et la libération des cytokines inflammatoires. D'autres protéines peuvent également réguler l'activation et l'assemblage de l'inflammasome AIM2 telles que les protéines COPs (CARD-only proteins) et les protéines leurres appartenant à la famille des ALR (B. Wang et al. 2020). AIM2 est également lié à une autre voie de détection de l'ADN, la voie cGAS-STING qui va initier une réponse IFN de type I en réponse à l'ADNdb cytosolique (L. Sun et al. 2013). Cette voie de signalisation peut favoriser l'amorçage de l'inflammasome AIM2 (F. Liu et al. 2017), tandis qu'à l'inverse, l'inflammasome AIM2 inhibe la signalisation cGAS-STING (Banerjee et al. 2018 ; Y. Wang et al. 2017 ; Corrales et al. 2016 ; Fukuda et al. 2021). En effet, cGAS est clivé, et donc inactivé, par la Caspase-1 (Yutao Wang et al. 2017) et l'activité de cGAS est inhibée par la perturbation des niveaux de K<sup>+</sup> intracellulaires causée par la formation de pores GSDMD (I. Banerjee et al. 2018). Plusieurs études ont montré une coordination des inflammasomes AIM2 et NLRP3 dans de nombreux contextes, y compris l'infection bactérienne (S. Kim et al. 2010 ; Wu, Fernandes-Alnemri, et Alnemri 2010; Cunha et al. 2017), l'infection fongique (Karki et al. 2015), l'infection à Plasmodium (Kalantari et al. 2014) et la stimulation de l'agoniste STING (Swanson et al. 2017). Enfin, AIM2 est également impliqué dans la PANoptose, une voie de mort cellulaire caractérisée par une activation simultanée de la pyroptose, de l'apoptose et de la nécroptose (Pandian et Kanneganti 2022).

### **8) L'inflammasome IFI16**

Comme AIM2, IFI16 est un membre de la famille des protéines PYHIN (PYrine et domaine HIN) caractérisée par la présence d'un domaine pyrine N-terminal mais également d'un domaine HIN-200 de liaison à l'ADN. Contrairement à AIM2, IFI16 contient deux domaines HIN-200 et n'est pas présent chez la souris (**Figure 3**) (Ludlow, Johnstone, et Clarke 2005). Autre différence entre IFI16 et AIM2, IFI16 est intranucléaire dans les cellules au repos. IFI16 va donc reconnaître les virus qui pénètrent dans le noyau des cellules tels que le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV, Kaposi sarcoma associated herpesvirus) dont la réplication s'effectue à l'intérieur du noyau (Kerur et al. 2011). D'autres virus pénètrent

également dans le noyau des cellules tels que le virus de l'herpès simplex 1 (HSV1, Herpes Simplex Virus 1) qui pourrait donc vraisemblablement activer l'inflammasome IFI16. Lors de son activation par de l'ADN étranger, IFI16 va déclencher l'assemblage d'un inflammasome à la fois dans le noyau mais aussi le cytoplasme. En plus de former un inflammasome, IFI16 est nécessaire à la réponse immunitaire de l'hôte à une infection virale puisqu'il régule également la production d'interférons de type I lors d'une infection virale ou en réponse à l'ADN synthétique (Unterholzner et al. 2010).

### 9) L'inflammasome PYRIN

L'inflammasome Pyrin est le plus récemment identifié. Il est composé du récepteur senseur Pyrin, de l'adaptateur ASC et de la Caspase-1 (**Figure 3**). La pyrine humaine contient trois domaines fonctionnels (**Figure 3**) : un domaine PYD, un domaine B-box à doigt de zinc impliqué dans l'oligomérisation de la pyrine et l'organisation du cytosquelette, et le domaine C-terminal B30.2 également appelé SPRY responsable des interactions directes avec la Caspase-1 et avec les composants d'autres inflammasomes comme NLRP1 et NLRP3, permettant leur modulation (Schnappauf et al. 2019 ; Papin et al. 2007). Son activation dépend de l'inactivation des petites GTPases de la famille des guanosine triphosphatases Rho (Rho-GTPases ; RhoA) via des toxines bactériennes modificatrices de Rho telles que par exemple TcdB (*Clostridium difficile*), VopS (*Vibrio parahemolyticus*), IbpA (*Histophilus somni*) ou C3 (*Clostridium botulinum*), qui inhibent l'action des sérine-thréonine kinases PKN1 et PKN2 pour déphosphoryler la pyrine et favoriser son activation. L'inactivation de RhoA se produit sur différents résidus qui peuvent être détectés par la pyrine, ce qui indique que la pyrine répond à la perturbation de l'homéostasie cytoplasmique plutôt qu'à la reconnaissance directe de PAMP/DAMP (Xu et al. 2014 ; Jamilloux et al. 2018 ; Heilig et Broz 2018). Cependant, certains agents pathogènes peuvent au contraire empêcher l'activation de l'inflammasome Pyrin. Par exemple, lors d'une infection par *Yersinia pestis*, son effecteur YopM peut empêcher l'activation normalement induite par les inhibiteurs de RhoA-GTPases YopE et YopT, et ainsi bloquer la production d'IL-1 $\beta$ /IL-18 dépendante de la Caspase-1 et la mort par pyroptose (Ratner et al. 2016 ; Chung et al. 2016).

La relation entre la pyrine et RhoA suggère que la pyrine peut être impliquée dans la surveillance et la signalisation des changements du cytosquelette d'actine, qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions cellulaires telles que la migration cellulaire, la division cellulaire

et la morphogénèse. En effet, l'inflammasome Pyrin peut être activé par la détection de dysfonctionnements du cytosquelette, tels que la dépolymérisation des microtubules ou l'instabilité des filaments d'actine (Mansfield et al. 2001 ; Papin et al. 2007). Ces perturbations du cytosquelette peuvent être détectées par le domaine B30.2 de la protéine Pyrin (Papin et al. 2007).

L'inflammasome Pyrin est associé à des maladies auto-inflammatoires telles que le syndrome de la fièvre méditerranéenne familiale (FMF, Familial Mediterranean fever) (Papin et al. 2007 ; Manukyan et Aminov 2016) caractérisé par des épisodes récurrents de fièvre et d'inflammation. Les mutations dans le gène MEFV, qui code pour la protéine Pyrin, conduisent à une activation anormale de l'inflammasome Pyrin et à une production excessive d'IL-1 $\beta$ , contribuant aux symptômes cliniques de la maladie.

#### **IV. L'inflammasome NLRP3**

En 2002, Martinon décrivait le premier inflammasome, l'inflammasome NLRP1 (Martinon, Burns, et Tschopp 2002). Cependant, l'inflammasome NLRP3 est celui qui a été le plus étudié et donc le mieux décrit, et dont on connaît le mieux les signaux d'activation et les mécanismes d'action.

##### **1) Description et structure**

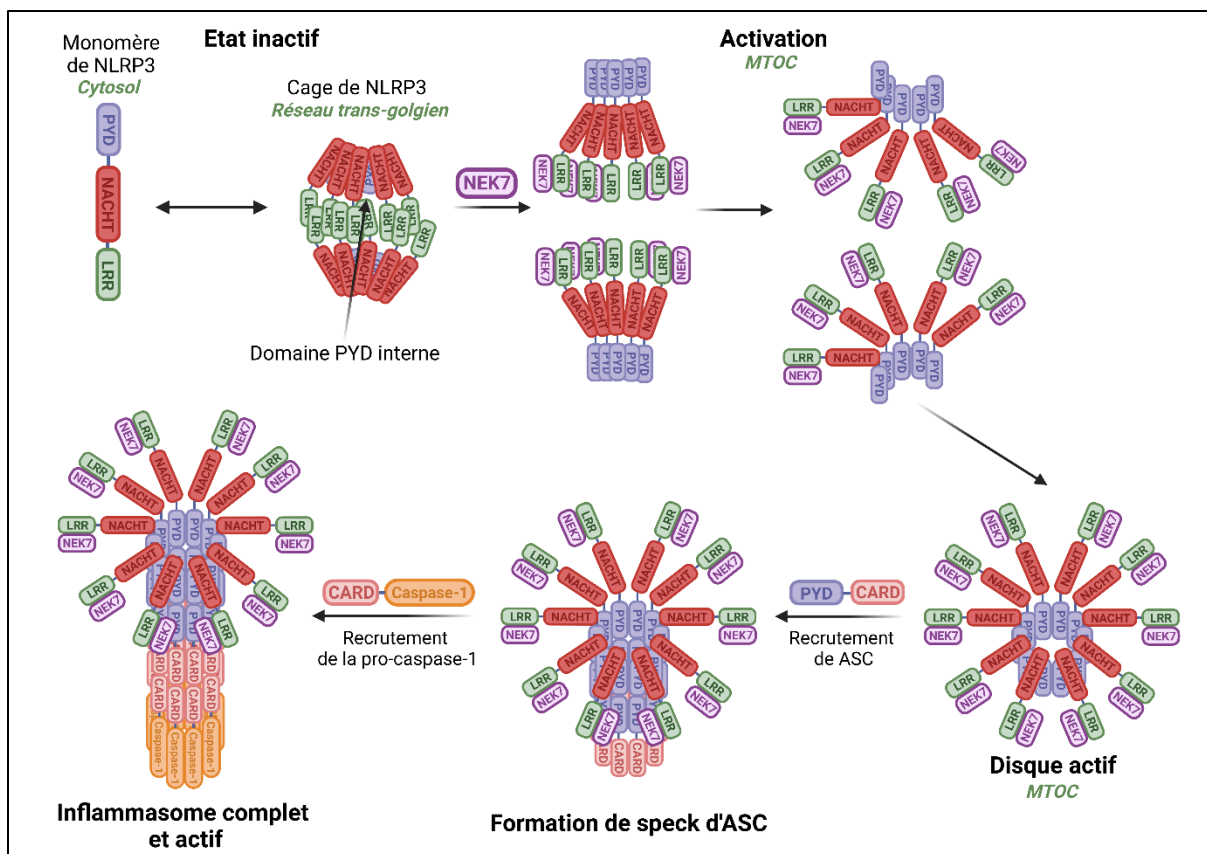
Les premières étapes de la découverte de l'inflammasome NLRP3 ont commencé avec l'identification du gène NLRP3, également connu sous le nom de cryopyrine, en 2001. En effet une étude a montré que des mutations dans ce gène étaient associées à des maladies auto-inflammatoires rares, telles que le syndrome de Muckle-Wells et le syndrome de la cryopyrine associée aux syndromes périodiques (Hoffman et al. 2001). Le gène NLRP3 est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme. Des mutations du gène NLRP3 ont été décrites comme impliquées dans de nombreuses autres maladies inflammatoires héréditaires, notamment le syndrome familial auto-inflammatoire au froid (SFAF), la FMF ou le syndrome neurologique cutané et articulaire infantile chronique (CINCA) (Martinon, Mayor, et Tschopp 2009). En 2002, une étude a révélé que la protéine NLRP3 était capable d'induire la production d'IL-1 $\beta$ , suggérant que NLRP3 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire (Aksentijevich et al. 2002). C'est en 2004 que l'on parle pour la première fois d'inflammasome NLRP3 (Agostini et al. 2004). Au fil des années, des chercheurs ont exploré les mécanismes de

signalisation de NLRP3 et ont identifié les signaux de danger qui peuvent activer cet inflammasome. Des travaux ont montré que des stimuli très divers, tels que les cristaux d'urate, les dépôts d'amyloïde, les infections bactériennes, les toxines et les dommages cellulaires, pouvaient déclencher l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ces déclencheurs seront décrits plus en détails, selon les voies qu'ils activent, dans les prochaines sous-parties.

La compréhension de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 a également été un sujet de recherche important. Des études ont montré que lorsque l'inflammasome NLRP3 est activé, il va s'assembler en un complexe multiprotéique qui comprend la protéine NLRP3 en tant que récepteur détecteur des signaux de danger, la protéine ASC en tant que protéine adaptatrice et la Caspase-1 en tant que composant effecteur. Cela conduit à l'activation de la Caspase-1 qui clive les pro-formes de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 en leur forme active (**Figure 3, partie droite**). Comme pour les inflammasomes NLRP1, NLRP6, NLRP7 et NLRP12 décrits dans la partie précédente, NLRP3 lie ASC par des interactions PYD-PYD et ce dernier lie la pro-Caspase-1 par des interactions CARD-CARD (Y. He, Hara, et Núñez 2016) (**Figure 3**). Au départ, avant activation, la protéine NLRP3 est sous forme inactive avec son domaine LRR replié dans une conformation fermée. Certaines protéines vont aider à maintenir cet état inactif telles que la protéine STG1 (SM22/transgeline-like actin-modulating *protein* 1) et la chaperonne HSP90 (heat shock protein 90) (Mayor et al. 2007). Lorsque le domaine LRR reconnaît un signal d'activation, il y aurait alors un changement de conformation qui exposerait les domaines PYD de la protéine NLRP3 et permettrait ainsi la formation du complexe inflammasome. En réponse à de nombreux stimuli qui seront décrits plus en détails dans la prochaine sous-partie, NLRP3 va ensuite recruter ASC et induire son agrégation qui va entraîner la formation de « speck/agrégat » de ASC (Lu, 2014). Par la suite, ASC va recruter la pro-Caspase-1 pour former le complexe macromoléculaire connu sous le nom d'inflammasome NLRP3 (Martinon, 2002). Des études récentes ont étudié la structure de NLRP3 par microscopie électronique cryogénique (cryo-EM) et ont montré la présence de formes inactive et active de NLRP3 (Andreeva et al. 2021 ; Hochheiser et al. 2022 ; Xiao, Magupalli, et Wu 2023) (**Figure 4**). Ces études ont montré que NLRP3 sous forme inactive se présente sous la forme d'une cage multimérique (Andreeva et al. 2021 ; Hochheiser et al. 2022) (**Figure 4**). Chez la souris, cette cage est un dodécamère qui protège le domaine PYD de NLRP3 pour empêcher une activation prématurée de NLRP3 (Andreeva et al. 2021). Chez l'homme, NLRP3 inactif se présente sous

la forme d'une cage décamerique (Hochheiser et al. 2022). Dans son état inactif, NLRP3 est lié à l'ADP et est principalement localisé au niveau des membranes du réseau trans-golgien (TGN, Trans-Golgi network) (**Figure 4**). C'est son association avec les membranes du TGN qui va promouvoir l'assemblage de la structure en forme de cage. La dispersion du TGN en vésicules, observée de façon précoce suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 par divers stimuli, nécessite la formation de la cage inactive de NLRP3 (Andreeva et al. 2021). De plus, à la suite des stimuli d'activation, NLRP3 serait transportée sur/dans les vésicules du TGN dispersé vers le centrosome qui constitue le centre organisateur des microtubules (MTOC, microtubule-organizing center), centre d'activation de l'inflammasome (Li et al. 2017 ; Magupalli et al. 2020 ; Andreeva et al. 2021) (**Figure 4**). Lors de l'activation de l'inflammasome, la structure de NLRP3 va changer de forme pour devenir un disque libérant ainsi les domaines PYD pour pouvoir interagir avec ASC et former les inflammasomes complets (Xiao, Magupalli, et Wu 2023) (**Figure 4**). Dans son étude, Xiao propose qu'au niveau du MTOC, l'interaction de la protéine kinase NEK7 (NIMA (Never In Mitosis A) -related Kinase 7), localisée dans le centrosome, avec les domaines riches en leucine de NLRP3 (LRR), aille induire une perturbation de la cage inactive de NLRP3 et la formation du disque actif (**Figure 4**). La cage va alors se séparer en deux moitiés reliées par de courts filaments PYD (Andreeva et al. 2021 ; Hochheiser et al. 2022) et former un disque actif de NLRP3. Malgré l'absence de preuve concrète, Xiao émet l'hypothèse que les deux demi-cages obtenues après la liaison de NEK7 seraient constituées chez l'homme de cinq sous-unités chacune pour se réorganiser en un seul disque actif (**Figure 4**). Les études à venir sur le sujet viseront à comprendre comment divers stimuli provoquent ces modifications de la structure entre états actif et inactif, ouvrant ainsi la possibilité de découvrir de nouvelles cibles pour des traitements thérapeutiques. En effet, cette organisation permet aux différentes protéines de l'inflammasome NLRP3 d'interagir étroitement et de collaborer pour déclencher l'activation de la Caspase-1 et la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18. Ainsi, une fois le disque formé, NLRP3 oligomérisée va recruter ASC via des interactions homotypiques de domaines PYD – PYD et induire l'agrégation de ASC en foyer macromoléculaire, connu sous le nom de « speck » d'ASC (A. Lu, Magupalli, et al. 2014) (**Figure 4**). Une fois ASC assemblée avec NLRP3, il y a recrutement de la pro-Caspase-1 via des interactions homotypiques des domaines CARD – CARD pour former l'inflammasome NLRP3 complet et actif (Martinon, Burns, et Tschopp 2002) (**Figure 4**).





**Figure 4: Modèle d'activation de NLRP3**

À l'état inactif ou après amorçage, NLRP3 est présent à la fois sous forme monomérique dans le cytosol et sous forme de cage à double anneau sur le réseau trans-golgien. Lors de l'activation, le réseau trans-golgien se disperse en vésicules qui transportent NLRP3 vers le MTOC (microtubule-organizing center) via les microtubules. Au MTOC, la cage est perturbée par NEK7 qui va interagir avec NLRP3, ce qui entraîne une séparation en deux de la cage et un réarrangement spatial de NLRP3 sous forme de disque actif. Il y a ensuite recrutement de ASC puis de la proCaspase-1. Created with BioRender.com

L'inflammasome NLRP3 est présent dans différents types de cellules, principalement les cellules immunitaires telles que les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles (Guarda, 2011) mais aussi dans d'autres types de cellules tels que par exemple les cellules épithéliales, notamment les cellules épithéliales pulmonaires et les cellules épithéliales intestinales, et les cellules endothéliales qui tapissent les parois des vaisseaux sanguins (Zito et al. 2020). Seront décrits ci-dessous les mécanismes d'activation, de régulation ainsi que les pathologies associées à l'inflammasome NLRP3 exprimé dans les macrophages.

Dans les monocytes/macrophages humains, l'inflammasome NLRP3 peut être activé par trois voies différentes (Mangan et al. 2018) : une voie canonique activée par une multitude de stimuli, une voie non canonique induite par le LPS intracellulaire après phagocytose de

bactéries Gram-négatif, et une voie alternative induite par le LPS extracellulaire (Tourneur et Witko-Sarsat 2019).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite généralement un double signal appelé "priming" (amorçage) et "activation". Le priming correspond à la première étape durant laquelle les cellules immunitaires sont préparées pour la future activation de l'inflammasome NLRP3. Une fois que les cellules ont été "primées" par l'expression des composants de l'inflammasome NLRP3, la deuxième étape consiste en l'activation proprement dite de l'inflammasome. Cela se produit en réponse à des signaux de danger (DAMPs) ou de stress (PAMPs) spécifiques selon les voies activées. Il est important de noter que le processus de priming et d'activation de l'inflammasome NLRP3 peut varier en fonction des stimuli et du type cellulaire considéré. De plus, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement les mécanismes moléculaires sous-jacents au priming et à l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans différents contextes physiologiques et pathologiques.

## **2) Amorçage/Priming de l'inflammasome NLRP3**

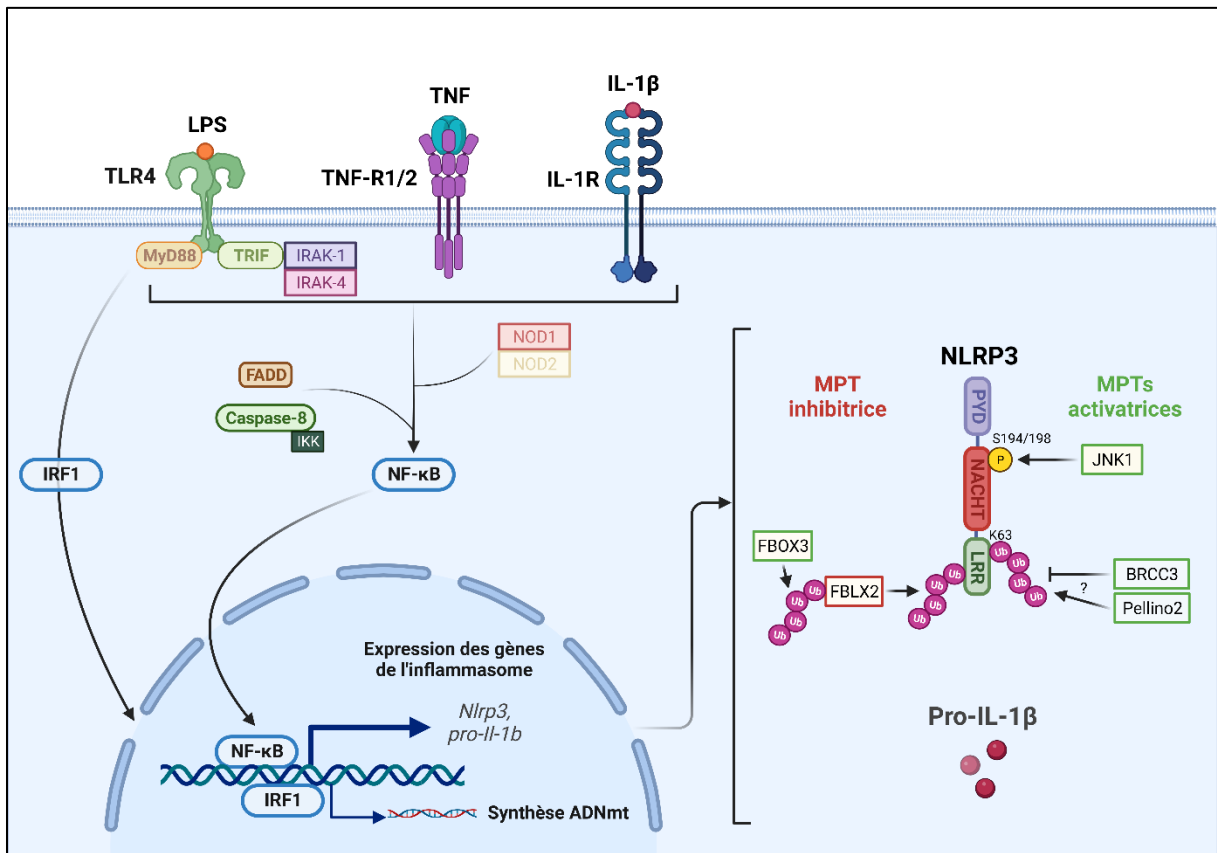
Cette première étape du processus implique l'induction de l'expression des composants de l'inflammasome NLRP3, notamment la protéine NLRP3 elle-même puisque à l'état basal les quantités de NLRP3 sont insuffisantes pour activer l'inflammasome, ainsi que la pro-interleukine-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) (**Figure 5**). Cela se produit généralement en réponse à des signaux inflammatoires et prépare ainsi les cellules pour une activation ultérieure.

Il existe des signaux variés de priming, dont seuls les plus couramment étudiés seront présentés ici. Tout d'abord, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et le facteur de nécrose tumorale (TNF) peuvent agir comme des signaux de priming de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 5**), via leur fixation respective sur l'IL-1R (IL-1 Receptor) et le TNF-R1 et/ ou TNF-R2 (TNF-Receptor 1 or 2) (Bauernfeind et al., 2009 ; Franchi et al., 2009) (**Figure 5**). L'exposition des cellules à ces cytokines induit l'expression des composants de l'inflammasome NLRP3. L'activation des TLR ou d'autres récepteurs qui utilisent les protéines adaptatrices MyD88 ou TRIF (**Figure 5**) va également déclencher une cascade de signalisation qui conduit à la transcription des gènes codant pour les composants de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, certains ligands des récepteurs TLR présents dans l'environnement cellulaire lors d'une infection bactérienne, tels que le LPS ou les lipopeptides, peuvent induire le priming de l'inflammasome NLRP3. En particulier, l'engagement du TLR4 par le LPS, composant structurel de la paroi

externe de toutes les bactéries Gram-négatif, est un signal d'amorçage de l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui est généralement utilisé *in vitro* (Hornung et Latz 2010; Y. He, Hara, et Núñez 2016). Des NLR tels que NOD1 et NOD2 peuvent également induire l'amorçage de l'inflammasome NLRP3. D'autres part, la signalisation de la sphingosine 1-phosphate (S1P) via son récepteur S1P (S1PR) intervient dans l'amorçage de NLRP3 en augmentant l'expression génique des composants de l'inflammasome NLRP3 (Hou et al. 2020). Ainsi, les signaux de priming peuvent varier en fonction du contexte cellulaire et des stimuli spécifiques. Ils préparent tous les cellules en induisant une cascade de signalisation conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et, *in fine*, à une augmentation de la transcription des composants nécessaires pour l'activation ultérieure de l'inflammasome NLRP3, en particulier NLRP3 et la pro-IL-1 $\beta$  (F. G. Bauernfeind et al. 2009 ; Franchi, Eigenbrod, et Núñez 2009) (**Figure 5**). En revanche, l'amorçage ne semble pas affecter les niveaux d'expression de ASC, de la pro-Caspase-1 et de la pro-IL-18 (F. G. Bauernfeind et al. 2009). Des études ont montré que les protéines FADD (Fas-associated death domain) et Caspase-8 étaient nécessaires lors de l'étape de d'amorçage de l'inflammasome NLRP3, indépendamment de leur fonction pro-apoptotique (Gurung et al. 2014 ; Allam et al. 2014 ; X. Zhang et al. 2016) (**Figure 5**). Il a été précédemment montré que la Caspase-8 pouvait interagir avec le complexe IKK essentiel dans l'activation de NF- $\kappa$ B pour permettre la translocation de ce dernier dans le noyau et l'induction de la transcription (Lemmers et al. 2007) (**Figure 5**). Cependant, en 2018, une étude a montré que des signaux d'amorçage en aval de TLR4 pouvaient également activer le facteur de transcription IRF1, conduisant à la synthèse d'ADN mitochondrial (ADNmt), l'un des signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3 (Zhong et al. 2018) (**Figure 5**).

Le type cellulaire joue également un rôle important dans l'étape d'amorçage. En effet, la biodisponibilité des composants de l'inflammasome, en fonction du type cellulaire, va faire que le priming sera plus ou moins indispensable à l'activation de l'inflammasome. Dans certains types cellulaires comme les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM, Bone marrow derived-macrophages) ou encore certaines cellules myéloïdes, l'étape d'amorçage est nécessaire pour activer l'inflammasome NLRP3. De plus, dans d'autres types cellulaires comme par exemple les monocytes humains, le LPS n'induit pas l'amorçage de l'inflammasome canonique, mais une autre voie d'activation appelée inflammasome alternatif qui sera détaillée ultérieurement (Gaidt et al. 2016). Au cours de l'amorçage, différentes

modifications post-traductionnelles de NLRP3 ont également lieu (**Figure 5**). Elles seront détaillées dans la partie 7 « Régulation de l'inflammasome »).



**Figure 5: Amorçage/Priming de l'inflammasome NLRP3**

Pendant la phase d'amorçage, les ligands des TLR (LPS/TLR4) et des récepteurs de cytokines (TNF-R et IL-1R) stimulent l'expression de NLRP3 et de la pro-IL-1 $\beta$  par le biais de la voie de signalisation MyD88/TRIF-NF- $\kappa$ B. La régulation de la voie NF- $\kappa$ B au cours de cette étape implique la Caspase-8 et la protéine adaptatrice FADD. De plus, des modifications post-traductionnelles (MPT) sont apportées à NLRP3 pendant cette phase telles que l'ubiquitination, la désubiquitination et la phosphorylation, permettant ainsi sa future activation. Created with BioRender.com

En conclusion, l'amorçage permet de réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 de manière dépendante et indépendante de la transcription. Cependant, il est important de noter que le priming seul n'est généralement pas suffisant pour déclencher l'activation de l'inflammasome NLRP3. Des signaux de danger supplémentaires sont nécessaires pour une activation complète de l'inflammasome.

### 3) Inflammasome NLRP3 canonique

#### a. Signaux d'activation de l'inflammasome canonique

Les signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique sont généralement associés à des stimuli de danger spécifiques divers et variés qui conduisent à l'assemblage et à l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Voici quelques exemples de signaux d'activation bien décrits dans la littérature :

- DAMPs :
  - Cristaux (**Figure 6**) : Certains cristaux insolubles, tels que les cristaux d'acide urique (MSU, monosodium urate) (Martinon et al. 2006) ou de pyro-phosphate de calcium (CPPD, calcium pyrophosphate dihydrate) (Ea et Lioté 2009) qui peuvent se former dans les articulations et les tissus respectivement lors de la goutte ou de la pseudo-goutte (maladie auto-inflammatoires qui seront plus détaillées dans la partie V « Inflammasome NLRP3 et pathologies »), les cristaux d'oxalate de calcium associés aux calculs rénaux, les cristaux de silice et d'amiante (Hornung et al. 2008 ; Dostert et al. 2008) ou encore les cristaux d'hémozoïne associés au paludisme (Dostert et al. 2009), peuvent activer l'inflammasome NLRP3. En effet, l'internalisation de ces cristaux par les cellules peut provoquer une perturbation ionique intracellulaire et une augmentation du niveau de potassium (qui sera détaillée dans la prochaine sous-partie « mécanismes d'activation de l'inflammasome canonique »), ce qui contribue à l'activation de l'inflammasome.
  - ATP extracellulaire (**Figure 6**) : L'ATP extracellulaire peut également activer l'inflammasome NLRP3 (Mariathasan, 2006). Lorsque les cellules subissent des dommages, l'ATP est libérée dans l'environnement extracellulaire. L'ATP se lie alors au récepteur purinergique P2X7 qui est un canal ionique exprimé entre autres sur les cellules immunitaires. Cette fixation déclenche son ouverture et le recrutement ultérieur du canal pannexine-1, entraînant la libération de potassium intracellulaire et l'activation de l'inflammasome NLRP3.
  - Dépôts d'amyloïde (**Figure 6**) : Certains dépôts d'amyloïde, tels que les plaques amyloïdes observées dans la maladie d'Alzheimer, peuvent également activer l'inflammasome NLRP3 (Halle et al. 2008). L'interaction des dépôts amyloïdes

avec l'inflammasome NLRP3 induit son activation et la production de cytokines inflammatoires.

- Stress cellulaire : Des conditions de stress cellulaire, tels que les dommages cellulaires, le stress oxydatif ou l'autophagie dysfonctionnelle, peuvent conduire à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à l'inflammation associée. Le stress oxydatif, qui résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres réactifs de l'oxygène et les mécanismes de défense antioxydants, résulte en un excès de ROS qui peuvent stimuler l'activation de l'inflammasome en induisant des modifications cellulaires (Harijith, Ebenezer, et Natarajan 2014).

- PAMPs :

- Toxines microbiennes (**Figure 6**) : Certaines toxines bactériennes, telles que la toxine de certaines souches d'*Escherichia coli* et la toxine de l'anthrax produite par *Bacillus anthracis*, peuvent stimuler l'activation de l'inflammasome NLRP3. Des toxines microbiennes telles que la nigéricine produite par *Streptomyces higroscopicus*, la maïtotoxine produite par la microalgue *Gambierdiscus toxicus*, la candidalysine produite par le champignon microscopique *Candida Albicans* ou encore l'Hémolysine BL (HBL) produite par *Bacillus cereus* peuvent également induire la formation de l'inflammasome NLRP3 (Mariathasan et al. 2006 ; Kasper et al. 2018 ; Mathur et al. 2019).
- Agents infectieux (**Figure 6**) : Certaines infections virales, bactériennes et fongiques peuvent conduire à une activation de l'inflammasome. Les agents infectieux responsables peuvent directement activer l'inflammasome NLRP3, comme par exemple, des virus tels que le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV1, Herpes Simplex Virus 1) ou le virus de la grippe A, des bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, et des champignons tels que *Candida albicans* (Franchi, Muñoz-Planillo, et Núñez 2012).
- Acides nucléiques : L'inflammasome NLRP3 peut être activé par des acides nucléiques, notamment l'ARN et l'ADN, lorsqu'ils sont présents dans le cytoplasme des cellules. L'ADN bactérien provenant de bactéries envahissantes ou l'ADN mitochondrial oxydé libéré lors de dommages cellulaires peuvent pénétrer dans le cytoplasme et entraîner l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les virus contiennent souvent de l'ARN, et certains virus libèrent leur

ARN dans le cytoplasme des cellules infectées induisant l'activation de l'inflammasome (Swanson, Deng, et Ting 2019; Shimada et al. 2012 ; Zhong et al. 2018).

Ces exemples représentent certains des signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique. Cependant, il est important de noter que cette liste n'est pas exhaustive, et que la compréhension des mécanismes précis d'activation de l'inflammasome NLRP3 est un domaine de recherche actif, et de nouveaux signaux d'activation sont continuellement découverts. Ces signaux d'activation peuvent varier en fonction du contexte cellulaire, de la maladie sous-jacente et des stimuli spécifiques. Cependant, nous pouvons dire que NLRP3 ne se lie pas de manière directe à ces stimuli, puisque l'inflammasome est activé par une gamme de stimuli très différents autant structurellement que chimiquement (Lamkanfi et Kanneganti 2010). Il est donc admis que NLRP3 détecte plus un événement cellulaire commun induit par ces stimuli.

#### **b. Mécanismes d'activation de l'inflammasome canonique**

Les mécanismes moléculaires et cellulaires exacts par lesquels les stimuli cités dans la partie précédente activent l'inflammasome NLRP3 ne sont pas encore entièrement compris, mais plusieurs hypothèses ont été proposées. Bien qu'il ne semble pas y avoir de signalisation standard, plusieurs activateurs semblent initier plusieurs voies de stress cellulaire qui ne s'excluent pas mutuellement. On retrouve notamment régulièrement l'efflux de potassium (Pétrilli et al. 2007), la signalisation du calcium, les ROS, le dysfonctionnement mitochondrial et la rupture lysosomale avec libération de cathepsine B (Y. He, Hara, et Núñez 2016).

##### **i. Les flux ioniques**

Certains stimuli peuvent perturber l'équilibre ionique intracellulaire (T. Gong et al. 2018). En effet, l'activation de l'inflammasome NLRP3 est associée à des perturbations ioniques spécifiques dans la cellule, en particulier une diminution du niveau de potassium ( $K^+$ ) intracellulaire, également connue sous le nom d'efflux de potassium et une fuite d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) provenant des réserves intracellulaires comme celles contenues dans le réticulum endoplasmique (RE).

De nombreuses études ont montré que l'efflux de potassium était un mécanisme important dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Perregaux et Gabel 1994; Piccini et al. 2008 ;

Muñoz-Planillo et al. 2013). En effet, il a été montré qu'une concentration élevée de  $K^+$  extracellulaire bloque l'activation de l'inflammasome NLRP3, tandis qu'une diminution de la concentration de  $K^+$  cytosolique est suffisante pour l'activer (Pétrilli et al. 2007 ; Franchi, Kanneganti, et al. 2007). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'efflux de potassium. Des canaux ioniques spécifiques, tels que le canal  $K^+$  purinergique P2X7, peuvent être impliqués dans cette diminution (**Figure 6**). D'autres mécanismes potentiels incluent l'ouverture de canaux potassiques, tels que le canal  $K^+$  ouvert par le froid TRPM7 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7), ou la modulation de la perméabilité membranaire au potassium. En conséquence, de nombreux stimuli peuvent induire l'efflux de potassium, notamment l'ATP qui se fixe sur le récepteur P2X7 et les toxines qui forment des pores dans la membrane telles que la nigéricine (Muñoz-Planillo et al. 2013) (**Figure 6**). Cet efflux de potassium induit l'activation de la phospholipase A2 indépendante du  $Ca^{2+}$  qui va favoriser la maturation de l'IL-1 $\beta$  (Walev et al. 2000).

Tout comme l'efflux de potassium, la fuite d'ions  $Ca^{2+}$  est nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3 comme le démontrent plusieurs études (Lee et al. 2012 ; Murakami et al. 2012 ; Rossol et al. 2012 ; Gong et al. 2018). De nombreux stimuli induisent la mobilisation du calcium dans la cellule et l'activation subséquente de l'inflammasome, tels que l'ATP et la nigéricine (Murakami et al. 2012). La fuite d'ions  $Ca^{2+}$  peut être causée par plusieurs mécanismes. Certains stimuli peuvent activer les canaux calciques dépendants du récepteur d'inositol triphosphate (IP3R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) présent sur le réticulum endoplasmique, induisant ainsi la libération de calcium (Murakami et al. 2012). C'est l'IP3, un produit du clivage du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) médié par la phospholipase C (PLC), qui permet l'activation de l'IP3R (**Figure 6**). En revanche, l'activation de la PLC par les différents stimuli n'est pas encore bien comprise. Cependant, une étude a montré que le récepteur de détection du calcium extracellulaire (CaSR, calcium sensing receptor) et le GPRC6A (G-protein coupled receptor family C group 6 member A), des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), vont agir en amont de la PLC pour déclencher la mobilisation du  $Ca^{2+}$  et l'activation du NLRP3 (G.-S. Lee et al. 2012; Murakami et al. 2012) (**Figure 6**). Mais, l'étude menée par Rossol a montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'ATP ne nécessitait pas le CaSR/GPCR (Rossol et al. 2012). D'autres mécanismes potentiels incluent l'activation des canaux calciques dépendants du calcium extracellulaire TRP (transient receptor potentiel) (**Figure 6**), tels que les canaux P2X7, TRPM2, TRPM7 et TRPV2 (Murakami



et al. 2012; Compan et al. 2012; Zhong et al. 2013). Le canal SOCE (Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry) présent sur la membrane plasmique est également impliqué dans la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'activation de l'inflammasome (Murakami et al. 2012). Le lysosome, également, peut être considéré comme une source de calcium pouvant contribuer à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Weber et Schilling 2014). Comme pour l'efflux de  $\text{K}^+$ , son inhibition bloque l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lee et al. 2012 ; Murakami et al. 2012) (**Figure 6**). Le réticulum endoplasmique (RE) étant le principal réservoir intracellulaire de calcium, il a donc un rôle essentiel dans la fuite de calcium. En effet, l'inhibition pharmacologique du canal calcique IP3R sur le RE diminue fortement la mobilisation du calcium et l'activation de l'inflammasome NLRP3, démontrant ainsi le rôle crucial de celui-ci dans cette mobilisation (G.-S. Lee et al. 2012). Des études ont montrés que l'augmentation du calcium cytosolique favorise le recrutement direct de l'ASC par NLRP3 (G.-S. Lee et al. 2012). Une autre étude montre que la fuite d'ions calcium dans le cytosol provoque une surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries conduisant au dysfonctionnement mitochondrial à l'origine de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Murakami et al. 2012). De plus, le calcium intracellulaire peut également agir comme un cofacteur pour certaines enzymes, telles que les phospholipases et les kinases, qui sont impliquées dans la régulation de la signalisation de l'inflammasome NLRP3. Le rôle de la mobilisation du calcium dans l'activation de l'inflammasome est cependant controversé puisqu'une étude de 2015 a montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 est indépendante de la signalisation du  $\text{Ca}^{2+}$  (Katsnelson et al. 2015).

Un efflux de  $\text{Cl}^-$  peut également jouer sur l'activation de l'inflammasome NLRP3. Une étude a montré qu'une diminution de la concentration d'ion chlorure améliore à la fois la maturation et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par l'ATP (Verhoef et al. 2005). L'efflux de  $\text{Cl}^-$  peut avoir lieu lors de l'activation du récepteur purinergique P2X7 par l'ATP, ou par des particules cristallines par exemple. L'efflux de  $\text{Cl}^-$  est particulièrement important car il perturbe l'équilibre ionique intracellulaire, ce qui peut affecter la fonction mitochondriale et d'autres processus cellulaires. Les canaux chlorure, qui comprennent les canaux anioniques régulés en volume (VRAC, Volume-regulated anion channel) et les canaux intracellulaires chlorure (CLIC, Chloride intracellular channel) tels que CLIC1 et CLIC4, sont impliqués à la fois lors de l'amorçage, en favorisant la transcription d'IL-1 $\beta$ , et lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3, en favorisant la formation des speck de ASC et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  mature (Compan et al. 2012 ; T. Tang et al. 2017 ; Domingo-Fernández et al. 2017). L'étude de Tang a montré que l'activation

de NLRP3 par divers stimuli entraîne d'abord une sortie de  $K^+$ , provoquant ainsi des altérations mitochondriales et la production de ROS (**Figure 6**). Ces ROS mitochondriaux conduisent ensuite à la migration des CLIC vers la membrane plasmique, ce qui induit un efflux de  $Cl^-$ , favorisant ainsi l'interaction entre NEK7 et NLRP3 (T. Tang et al. 2017) (**Figure 6**). Ainsi, l'efflux de chlorure, qui dépend des CLIC, est un événement crucial et préalable à l'activation de NLRP3, mais ne conduira pas à celle-ci sans l'efflux de  $K^+$  (Green et al. 2018).

L'inflammasome NLRP3 est également influencé par les changements dans la concentration intracellulaire de sodium ( $Na^+$ ) (Schorn et al. 2011). Des études ont montré que l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Na^+$  peut contribuer à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Muñoz-Planillo et al. 2013 ; Schorn et al. 2011). Cela peut se produire en réponse à différents stimuli inflammatoires, tels que les cristaux d'urate de sodium ou des changements dans la pression osmotique cellulaire. Les cristaux de MSU délivrés aux lysosomes provoquent une augmentation de  $Na^+$  intracellulaire entraînant un afflux d'eau et un gonflement de la cellule conduisant à une baisse de la concentration intracellulaire de  $K^+$  (Muñoz-Planillo et al. 2013) (**Figure 6**). L'afflux de sodium seul n'active pas l'inflammasome NLRP3 mais semble jouer un rôle régulateur dans l'activation en modulant l'efflux de  $K^+$  (Muñoz-Planillo et al. 2013).

En résumé, les modifications des flux ioniques sont perçues comme des signaux de danger et conduisent à des changements dans l'environnement intracellulaire qui favorisent l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les flux ioniques, tels que l'efflux de  $K^+$ , l'efflux de  $Cl^-$  et l'entrée de  $Ca^{2+}$ , sont des éléments clés dans le mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3, jouant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée et dans le déclenchement de l'inflammation.

## ii. **Dysfonctionnement des organites**

De nombreux stimuli provoquent un dysfonctionnement de divers organites cellulaires. En effet, les stimuli qui activent NLRP3 semblent déclencher, en tout ou en partie, les phénomènes suivants : la rupture des lysosomes, la production de radicaux oxygénés dans les mitochondries (ROS mitochondriaux), la libération d'ADN mitochondrial, la formation de contacts entre la membrane du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (MAM, mitochondria-associated membrane), le stress du réticulum endoplasmique (RE) et la dispersion du TGN. De plus, il a été signalé que les stimuli activant NLRP3 provoquent le

déplacement de NLRP3 vers les MAM, les mitochondries, le TGN et les endosomes. En résumé, il semble que les organites jouent un rôle à la fois de détecteur et de plate-forme pour l'activation de NLRP3.

#### ❖ Les lysosomes

Certains stimuli peuvent provoquer une rupture ou une lésion des lysosomes, entraînant la libération de leur contenu dans le cytoplasme, tel que les enzymes lysosomales, notamment des cathepsines qui peuvent alors agir comme des activateurs de l'inflammasome NLRP3 (Seoane et al. 2020) (**Figure 6**). La rupture des lysosomes peut se produire en raison d'une augmentation de la pression osmotique interne des lysosomes ou de perturbations de l'intégrité membranaire. Les stimuli particuliers phagocytés tels que le MSU, l'alun, la silice ou encore l'amyloïde- $\beta$  vont endommager les lysosomes (Hornung et al. 2008) (**Figure 6**). Les cathepsines libérées sont des protéases actives qui jouent un rôle dans la dégradation des composants cellulaires et qui peuvent agir comme des activateurs de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 6**). Elles peuvent directement ou indirectement stimuler l'assemblage de l'inflammasome, en favorisant le recrutement de la protéine NLRP3, de ASC et de la Caspase-1. Cependant, de nombreux articles se contredisent sur le rôle des cathepsines dans l'activation de l'inflammasome (Hornung et al. 2008 ; Dostert et al. 2009 ; Orłowski et al. 2015 ; Campden et Zhang 2019). Une étude a montré que la libération de la cathepsine B est nécessaire pour la libération d'IL-1 $\beta$  mais pas pour la production de pro-IL-1 $\beta$  (Weber et Schilling 2014). En plus de la cathepsine B, d'autres membres de la famille des cathepsines induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 notamment les cathepsines L, C, S et X. La cathepsine X joue un rôle important dans la mort cellulaire induite par la nigéricine (Orłowski et al. 2015).

La rupture de la membrane des lysosomes entraîne également un efflux de potassium de la cellule (événement déclencheur décrit dans l'onglet précédent) (Muñoz-Planillo et al. 2013) (**Figure 6**). En effet, lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3, il y a une acidification du lysosome, ce qui va entraîner une libération massive de Na<sup>+</sup> augmentant l'osmolarité cellulaire, l'afflux d'eau et ainsi permettant l'efflux de K<sup>+</sup> (Hornung et al. 2008; Schorn et al. 2011) (**Figure 6**).

## ❖ Les mitochondries

Certains stimuli ont été associés à des signaux mitochondriaux, faisant référence aux altérations de la fonction mitochondriale (Seoane et al. 2020). Tout d'abord, l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut être associée à une production accrue de ROS dans les mitochondries, qui peuvent agir comme des signaux activateurs de l'inflammasome NLRP3 (R. Zhou et al. 2011) (**Figure 6**). En effet, Munoz-Planillo a même montré dans son étude que le dysfonctionnement mitochondrial et la production de ROS mitochondriaux (ROSmt) étaient indispensables à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Muñoz-Planillo et al. 2013). Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à la production de ROSmt lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3, notamment la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'activation des oxydases mitochondriales ou l'oxydation des composants de la membrane mitochondriale. L'activation de l'inflammasome avec du LPS et de l'ATP induit une production de ROS par les mitochondries dysfonctionnelles (Nakahira et al. 2011). Les ROSmt peuvent oxyder des protéines cellulaires, y compris la protéine NLRP3 elle-même, ce qui favorise son assemblage et l'activation de l'inflammasome.

Lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3, des altérations de la fonction mitochondriale peuvent également entraîner la libération d'ADN mitochondrial (ADNmt) oxydé dans le cytoplasme (**Figure 6**). L'ADNmt ainsi libéré peut agir comme un signal activateur de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 6**). En effet, Shimada a montré que l'ATP induisait des dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à la libération d'ADNmt oxydé activant l'inflammasome NLRP3 (Shimada et al. 2012). Les mécanismes précis par lesquels l'ADNmt est libéré ne sont pas complètement compris, mais certains processus tels que la rupture de la membrane mitochondriale externe ou la formation de pores peuvent être impliqués. Certains facteurs, tels que la production excessive de ROS ou l'activation de protéines pro-apoptotiques, peuvent contribuer à la libération d'ADNmt (**Figure 6**). En effet, l'étude de Nakahira a montré que la libération d'ADN mitochondrial dans le cytosol était dépendante de NLRP3 et des ROSmt (Nakahira et al. 2011). L'ADNmt libéré peut se lier à des protéines cytoplasmiques, notamment NLRP3 et ASC, facilitant ainsi l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Cependant l'oxydation de l'ADNmt, synthétisé suite à la signalisation TLR, est requise pour activer l'inflammasome NLRP3 (Shimada et al. 2012 ; Zhong et al. 2018). Cette liaison entre l'ADN mitochondrial et ASC peut renforcer l'activation de la Caspase-1 et l'amplification de la réponse inflammatoire.

La perturbation de la fonction mitochondriale lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut également entraîner la libération d'ATP mitochondriale dans le cytoplasme (**Figure 6**). Les mécanismes régulant la libération d'ATP mitochondriale peuvent impliquer des altérations de la perméabilité de la membrane mitochondriale ou des canaux ioniques spécifiques. Certains composants du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale, tels que le complexe V (ATP synthase), peuvent également être impliqués dans la libération d'ATP. L'ATP libérée par les mitochondries va sortir de la cellule via le canal Pannexine-1 et peut se lier aux récepteurs P2X7 sur les cellules, déclenchant ainsi des événements de signalisation qui contribuent à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cette activation du récepteur P2X7 peut provoquer, comme précédemment décrit, une augmentation du niveau de potassium intracellulaire et d'autres perturbations ioniques qui favorisent l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 6**).

Enfin, plusieurs molécules mitochondriales interagissent avec l'inflammasome, en particulier avec NLRP3, en réponse aux stimuli d'activation, telles que la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS, Mitochondrial antiviral-signaling protein) et la cardiolipine (**Figure 6**). La protéine MAVS, en interagissant directement avec NLRP3, est nécessaire pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à des stimuli solubles tels que l'ATP et la nigéricine, mais pas à des stimuli particuliers tels que la silice, l'alun et le MSU (Park et al. 2013; Subramanian et al. 2013) (**Figure 6**). D'autres études en revanche indiquent que la protéine MAVS est nécessaire pour l'activation de l'inflammasome seulement par des infections virales, et non par des stimuli non viraux (Park et al. 2013 ; Ermler et al. 2014 ; Franchi et al. 2014). La protéine TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3) recruté par les MAVS au niveau de ASC va l'ubiquitiner pour favoriser son oligomérisation (Guan et al. 2015). L'exposition de la cardiolipine sur la membrane externe de la mitochondrie peut également être un signal d'activation (**Figure 6**). Elle va se lier directement à NLRP3 par son domaine LRR (Iyer et al. 2013). En 2019, une étude a montré qu'un amorçage par les agonistes des TLR1/2, TLR3 et TLR4 induit une association à la fois de NLRP3 et de la Caspase-1 aux cardiolipines exposées sur la membrane externe de mitochondrie (Elliott et al. 2018).

Ces différents signaux mitochondriaux lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 reflètent les altérations de la fonction mitochondriale qui se produisent et contribuent au processus d'assemblage et d'activation de cet inflammasome. Cependant, il est important de noter que les mécanismes précis et la contribution exacte des signaux mitochondriaux à l'activation de

l'inflammasome NLRP3 peuvent varier en fonction du stimulus spécifique et du contexte cellulaire.

#### ❖ Le réticulum endoplasmique

A l'état inactif, le senseur NLRP3 cytosolique s'associe au RE dans la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 (R. Zhou et al. 2011). Lors de l'activation de l'inflammasome par des stimuli particuliers ou la nigéricine, NLRP3 et ASC vont s'associer aux membranes mitochondriales (MAM) (R. Zhou et al. 2011 ; Subramanian et al. 2013) (**Figure 10**).

Le RE exerce diverses fonctions au sein de la cellule, y compris le processus de repliement et de modification des protéines, la synthèse des lipides, ainsi que la régulation de l'équilibre du calcium ( $Ca^{2+}$ ). Le RE pourrait donc également jouer un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Zhirong Zhang et al. 2023 ; B. Lee et al. 2023). Plus précisément, le stress du RE causé par l'accumulation de protéines incorrectement repliées va induire une réponse appelée « réponse du réticulum endoplasmique au stress » (ou ER stress response, en anglais) visant à restaurer l'homéostasie du RE, ce qui pourrait induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lerner et al. 2012) (**Figure 6**). Cependant des études contradictoires ont montré que l'activation de NLRP3 induite par le stress du RE était indépendante de la réponse aux protéines mal repliées (Menu et al. 2012). En 2015, Bronner a montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 par du LPS et de l'ATP n'induisait pas de stress du RE tandis qu'une infection par *Brucella abortus*, elle, induisait l'activation de l'inflammasome dépendante du stress du RE (Bronner et al. 2015). Ce stress peut induire la libération de molécules, telles que les ions calcium, l'ATP ou encore les ROS, qui sont des activateurs potentiels de l'inflammasome NLRP3.

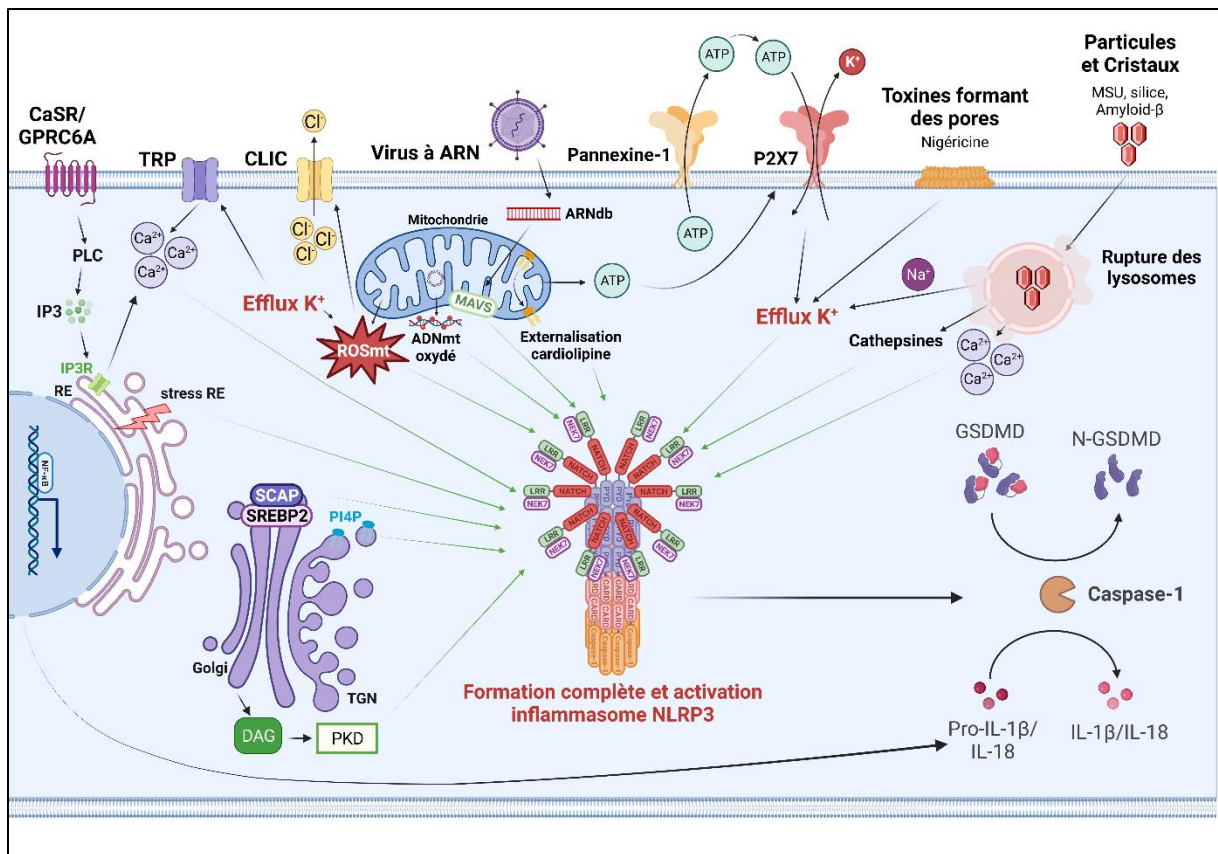
De plus, divers stimuli activant l'inflammasome NLRP3 ont entraîné des dérèglements du trafic endosomal. Il y a une déstabilisation des sites de contact membranaire entre le RE et l'endosome, ce qui entraîne une accumulation de phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) endosomal, une altération du trafic entre l'endosome et le réseau trans-golgien puis le recrutement de NLRP3 endosomal (Zhirong Zhang et al. 2023; B. Lee et al. 2023).

Ainsi, l'activation de NLRP3 par le RE peut contribuer à la réponse immunitaire en cas de stress cellulaire sévère.

### ❖ L'appareil de golgi

Différents stimuli activant l'inflammasome NLRP3 conduisent également au désassemblage du TGN (Jueqi Chen et Chen 2018) (**Figure 6**). Le TGN dispersé sert d'échafaudage à l'activation de l'inflammasome NLRP3, tandis que le NLRP3 associé aux mitochondries ne parvient pas à activer l'inflammasome (**Figure 6**). Sur les vésicules dispersées du TGN, est présent du phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) qui va favoriser l'agrégation de NLRP3 essentielle pour son oligomérisation avec ASC (Jueqi Chen et Chen 2018) (**Figure 6/Figure 10**). L'efflux de  $K^+$  n'est pas nécessaire pour la formation du TGN dispersé, suggérant que l'activation de NLRP3 dépendante de l'efflux de  $K^+$  et l'activation dépendante des mitochondries seraient des voies distinctes qui convergent vers le désassemblage du Golgi. Une autre étude montre l'implication évidente du TGN dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en montrant que la protéine kinase D (PKD) phosphoryle NLRP3 au niveau du golgi pour permettre sa libération des MAM et *in fine* l'assemblage de l'inflammasome dans le cytosol (Zhirong Zhang et al. 2017). Cette étude montre que les niveaux de diacylglycerol (DAG) dans le golgi influencent l'activation de l'inflammasome NLRP3 puisque la stimulation de NLRP3 induit la production de DAG au niveau de la membrane du golgi entraînant l'activation de son agoniste la PKD (Zhirong Zhang et al. 2017) (**Figure 6**). En 2018, Guo a également montré que lors de son activation, NLRP3 est transporté vers le golgi dans un complexe avec la protéine 2 de liaison aux éléments régulateurs des stéroïdes (SREBP2, sterol regulatory element-binding protein-2) et la protéine activant le clivage SREBP (SCAP, SREBP cleavage-activating protein) et que ce complexe est requis pour l'activation de NLRP3 (Chuansheng Guo et al. 2018) (**Figure 10**).

Il est important de noter que ces mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique sont simplifiés, et que de nombreux détails moléculaires et mécanistiques restent à élucider. Cependant, dans l'ensemble, ces données indiquent que la proximité spatiale entre le RE, les mitochondries et l'appareil de golgi est fortement liée à l'activation de l'inflammasome NLRP3.



**Figure 6: Activation de l'inflammasome NLRP3 canonique**

Lors du processus d'activation, une diversité de PAMPs ou de DAMPs, tels que l'ATP, des toxines formant des pores, des virus à ARN, et des particules, induisent l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 en déclenchant une série d'événements moléculaires et cellulaires. Ces événements comprennent des changements dans les flux ioniques, le dysfonctionnement mitochondrial, la production de ROS, la génération d'ADN mitochondrial, ainsi que des perturbations au niveau des lysosomes. Une fois que l'inflammasome NLRP3 est formé et activé, il initie l'auto-clivage et l'activation de la pro-Caspase-1, ce qui aboutit à la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18. De plus, la Caspase-1 activée clive également la protéine GSDMD, libérant ainsi son domaine N-terminal et déclenchant un type de mort cellulaire inflammatoire connu sous le nom de pyroptose.

Plus spécifiquement, le récepteur P2X7 est essentiel à l'activation de l'inflammasome NLRP3, car il agit comme un canal d'efflux de K<sup>+</sup> en réponse à l'ATP extracellulaire. Divers DAMPs/PAMPs induisent l'efflux de K<sup>+</sup> en libérant de l'ATP par le récepteur pannexine-1 permettant l'activation du récepteur P2X7. Les particules et les cristaux endommagent les lysosomes, entraînant la libération de cathepsines. Les lysosomes endommagés induisent également un efflux de K<sup>+</sup>, ce qui provoque un efflux de Cl<sup>-</sup> via les canaux CLIC. Le Ca<sup>2+</sup> extracellulaire peut activer l'inflammasome NLRP3 via les récepteurs CaSR/GPRC6A en déclenchant la voie de signalisation PLC/IP3/IP3R, entraînant la libération intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> à partir du RE. L'inflammasome peut également être activé par le flux de Ca<sup>2+</sup> induit par les récepteurs TRP en réponse aux ROS. Les mitochondries contribuent également à l'activation de l'inflammasome NLRP3 de différentes manières, notamment en libérant des ROS en réponse à l'efflux de K<sup>+</sup> ou d'ADN mitochondrial oxydé. De plus, elles recrutent NLRP3 grâce à des protéines telles que les MAVS (pour les infections virales à ARN) ou les cardiolipines externalisées. L'activation de l'inflammasome NLRP3 peut également être favorisée par le recrutement de NLRP3 au niveau de l'appareil de Golgi, médié par les protéines SREBP, SCAP, la PKD, ou le PI4P présent sur le TGN. En outre, la PKD peut phosphoryler NLRP3 et déclencher son activation. Created with BioRender.com

Malgré le fait que la plupart de ces mécanismes déclenchent l'efflux potassique pour activer l'inflammasome NLRP3, il ne semble pas y avoir d'événement unificateur unique, car certains de ces événements ne se manifestent pas en réponse à tous les activateurs de NLRP3, sont



partagés par plusieurs inflammasomes, ou leur occurrence suscite des débats et des controverses. Les recherches continuent d'explorer ces mécanismes et de fournir une compréhension toujours plus précise des voies d'activation spécifiques de l'inflammasome NLRP3.

### c. Les protéines extérieures

Bien que NLRP3, ASC et pro-Caspase-1 soient les protéines qui forment le corps de l'inflammasome, des études ont montré que plusieurs autres protéines peuvent participer à ce complexe et être nécessaires à son activation telles que NEK 7 (Y. He, Hara, et Núñez 2016; H. Shi et al. 2016 ; Schmid-Burgk et al. 2016).

Suite à l'efflux de potassium, la protéine NEK7 est recruté sur le complexe inflammasome. L'activité kinase de NEK7 n'est pas requise, mais son domaine catalytique va lui permettre de se lier directement à la protéine NLRP3 au niveau des domaines LRR et NOD pour contrôler son oligomérisation et celle de ASC (Y. He et al. 2016 ; H. Shi et al. 2016).

Des études ont montré que les protéines FADD et Caspase-8 sont nécessaires à la fois pour le priming et l'activation de l'inflammasome canonique NLRP3 chez la souris (Gurung et al. 2014). En outre, dans certaines conditions, en cas d'absence de Caspase-1, la Caspase-8 peut entrer en jeu et cliver la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  (Antonopoulos et al. 2015).

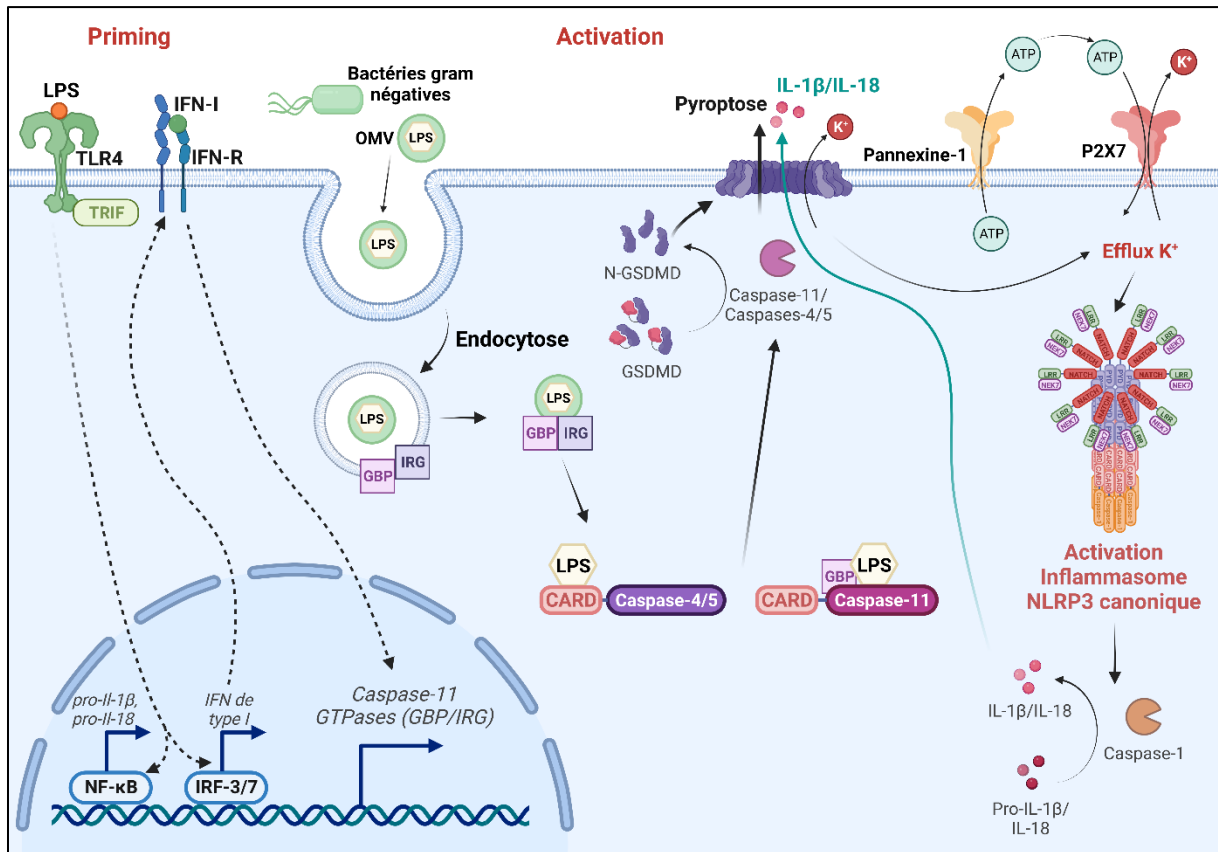
### 4) Inflammasome NLRP3 non canonique

L'activation de l'inflammasome NLRP3 peut également se produire via un mécanisme distinct du mécanisme canonique décrit précédemment. En effet, Kayagaki a mis en évidence que l'infection de macrophages de souris par certaines bactéries telles que *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* ou *Vibrio cholerae*, mais également par la toxine CTB (Cholera toxin B), entraînait l'activation de la Caspase-1 et la production d'IL-1 $\beta$  dépendante de la Caspase-11 (Caspase-4/5 chez l'homme) faisant ainsi ressortir une nouvelle voie d'activation de l'inflammasome NLRP3 : la voie non canonique (Kayagaki et al. 2011). L'inflammasome NLRP3 non canonique est activé par le LPS intracellulaire des bactéries Gram-négatif phagocytées (Kayagaki et al. 2013; Hagar et al. 2013; Casson et al. 2015) (**Figure 7**). Ainsi, l'inflammasome non canonique NLRP3 joue un rôle important dans la défense contre les bactéries intracellulaires à Gram-négatif parmi lesquelles des bactéries entéropathogènes. L'amorçage de la voie non canonique de l'inflammasome NLRP3 n'induit pas la transcription

de la Caspase-1 mais celle de la Caspase-11 chez la souris et des Caspases-4/5 chez l'homme (**Figure 7**). En effet, chez la souris, l'amorçage de l'inflammasome non canonique est essentiel. L'amorçage induit l'activation de NF- $\kappa$ B par la voie du TLR4, conduisant à la transcription de pro-IL-1 $\beta$  et de pro-IL-18, mais également l'activation d'IRF-3 et IRF-7 (Gurung et al. 2012) (**Figure 7**). Ces IRF vont alors induire l'expression d'IFN de type I conduisant à l'activation des récepteurs à l'IFN et de la voie JAK/STAT et, *in fine*, à la transcription de la Caspase-11 (Schauvliege et al. 2002). En revanche, ce deuxième signal d'amorçage n'est pas nécessaire pour l'activation de l'inflammasome non canonique chez l'homme dont les cellules expriment la Caspase-4 de manière constitutive (J. Shi et al. 2014).

Des études ont montré que l'activation de la Caspase-11 suite à une infection par des bactéries Gram-négatif nécessite la production d'IFN de type I stimulant alors des GTPases telles que les protéines de liaison au guanylate (GBP, Guanylate-binding protein) et les GTPases régulées par l'interféron (IRG, Immunity-related GTPases) (Meunier et al. 2014 ; Pilla et al. 2014 ; Man et al. 2016) (**Figure 7**). Ces GTPases détruisent alors les vésicules produites et relarguées par les bactéries, libérant ainsi le LPS dans les cellules et entraînant ainsi l'activation des caspases (**Figure 7**). En effet, une étude a montré que le LPS cytosolique proviendrait des vésicules de la membrane externe des bactéries (OMV, Outer Membrane Vesicles) qui sont internalisées par endocytose et qui libèrent ainsi le LPS dans le cytosol (Vanaja et al. 2016) (**Figure 7**). L'activation de la Caspase-11 induite par les vésicules libérées par les bactéries nécessite la signalisation TLR4-TRIF suivie de la production d'IFN de type 1 (Santos et al. 2018) (**Figure 7**). Cette étude a également montré que les GBP vont faciliter l'interaction du LPS avec la Caspase-11 (**Figure 7**). Chez l'homme, les Caspases-4/5 vont reconnaître directement le LPS intracellulaire de la bactérie grâce à leur domaine CARD, de manière indépendante du TLR4 (J. Shi et al. 2014) (**Figure 7**). Ces caspases vont alors s'oligomériser et s'autoprotéolyser pour s'activer. L'activation des Caspases-4/5, mais également de la Caspase-11, induit la mort cellulaire pyroptotique par clivage direct de la GSDMD (**Figure 7**). L'activation des caspases ne permet pas la libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, cette sécrétion nécessitant absolument l'activation de l'inflammasome canonique et de la Caspase-1 (Kayagaki et al. 2011). C'est l'efflux de potassium consécutif à la formation des pores de GSDMD qui va induire l'activation de l'inflammasome canonique NLPR3, conduisant ainsi à la maturation et à la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 (Kayagaki et al. 2015 ; Rühl et Broz 2015 ; Broz, Pelegrín, et Shao 2020) (**Figure 7**). Une étude menée chez la souris a montré que la Caspase-11 induit le clivage du canal

pannexine-1, entraînant une libération d'ATP permettant l'activation du récepteur purinergique P2X7. L'activation de ce récepteur déclenche un efflux de potassium et *in fine* l'activation de l'inflammasome canonique (Pelegriin et Surprenant 2006 ; Kayagaki et al. 2015 ; D. Yang et al. 2015) (**Figure 7**).



**Figure 7: Activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique**

L'activation non canonique de l'inflammasome NLRP3 est initiée par la détection du LPS intracellulaire par un mécanisme qui dépend du TLR4, de la protéine adaptatrice TRIF, des IFN de type I, ainsi que des GTPases. L'amorçage initial se produit lorsque le LPS extracellulaire active TLR4, ce qui à son tour active la voie de signalisation NF-κB et induit la production d'IFN de type I. Ces IFN stimulent la transcription des gènes codant la pro-Caspase-11 et des GTPases. L'inflammasome non canonique est ensuite activé lorsque des OMV provenant de bactéries Gram-négatif sont internalisées par endocytose. Les GTPases facilitent l'extraction du LPS des OMV, le libérant ainsi dans le cytosol. La présence du LPS libre dans le cytosol active alors la Caspase-11 chez les souris ou les Caspases-4/5 chez l'homme, par des interactions directes, ce qui entraîne leur auto-protéolyse et activation. En conséquence, les Caspases-11/4/5 activées clivent la protéine GSDMD, provoquant la formation de pores dans la membrane cellulaire et induisant un efflux de K<sup>+</sup>, qui conduit à une activation canonique de l'inflammasome NLRP3 et à la maturation de l'IL-1β et l'IL-18. Les pores de GSDMD permettent alors la libération des cytokines IL-1β et IL-18 mature. En parallèle, l'activation de la Caspase-11 ouvre également le canal pannexine-1, provoquant aussi un efflux d'ions K<sup>+</sup>. Cette double activation de l'inflammasome et la pyroptose finalement engendrée contribuent à l'amplification de la réponse inflammatoire. Created with BioRender.com

Comme cela a été démontré pour l'inflammasome NLRP3 canonique, une perte d'expression de FADD ou de la Caspase-8 interfère avec le priming transcriptionnelle et l'activation post-

traductionnelle de l'inflammasome NLRP3 non canonique également (Gurung et al. 2014). La perte d'expression de la Caspase-8 entraîne l'inhibition de l'activation de la pro-Caspase-1 et de la pro-Caspase-11 pendant la stimulation de l'inflammasome NLRP3. La perte d'expression de la protéine FADD a empêché la maturation de la pro-Caspase-8, positionnant ainsi FADD en amont de la Caspase-8 dans la voie de signalisation (Gurung et al. 2014).

Il existe également une voie non canonique mais non conventionnelle réalisée, dans les monocytes humains, en une étape en réponse au LPS seul, entraînant l'activation de l'inflammasome et une sécrétion d'IL-1 $\beta$  robuste. Le LPS seul est internalisé grâce aux récepteurs CD14/TLR4. Cette internalisation du LPS induit le clivage de la Caspase-5 mais pas de la Caspase-4. Cependant, la Caspase-4 participe à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et à celle d'autres cytokines et chimiokines, dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B. L'activation de la Caspase-5 est induite par un flux de Ca<sup>2+</sup> médié par Syk via le récepteur PLC $\gamma$ /IP3. Enfin, le LPS seul n'induit pas la mort cellulaire des monocytes (Viganò et al. 2015).

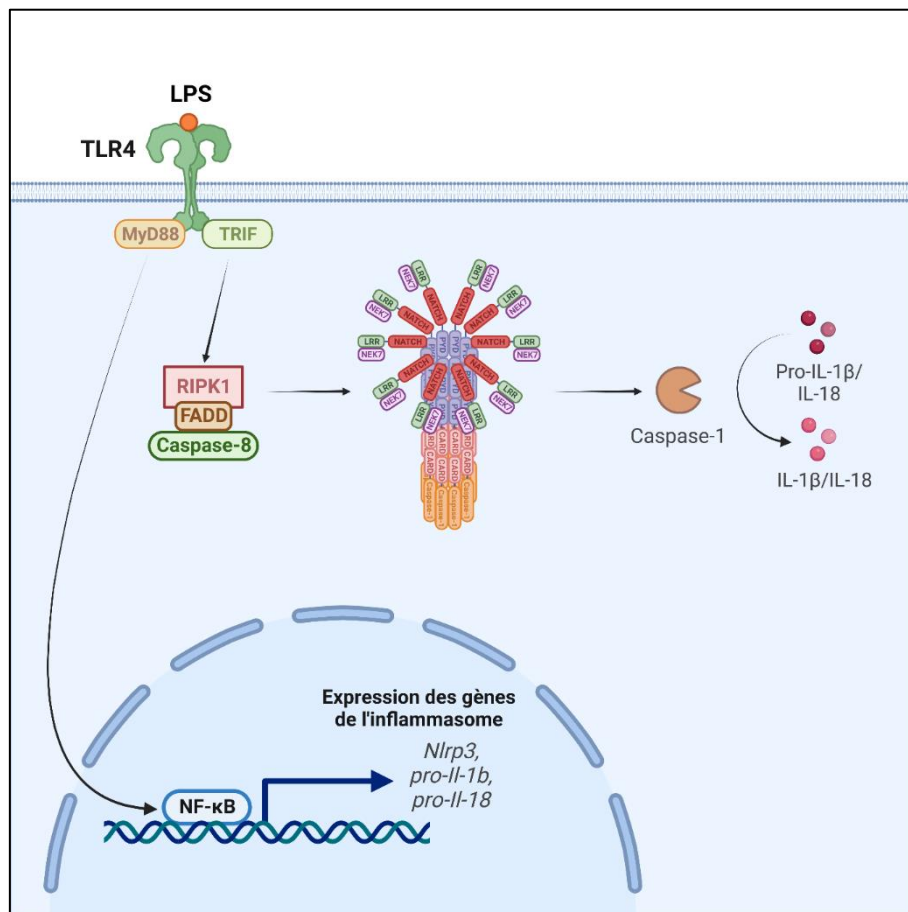
La voie non canonique est également présente dans les neutrophiles. Il a été démontré qu'à la suite d'une infection par *Aspergillus fumigatus*, la Caspase-11 des neutrophiles était requise pour l'activation de la Caspase-1 et la maturation et sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Y. Sun et al. 2018).

### 5) Inflammasome NLRP3 alternatif

La capacité des monocytes humains à sécréter de l'IL-1 $\beta$  en réponse au LPS est un phénomène bien établi depuis de nombreuses années (Hazuda, Lee, et Young 1988; Lonnemann et al. 1989 ; Danis et al. 1990 ; Schumann et al. 1998). En 2016, une étude a montré l'existence d'une voie d'activation alternative qui est distincte du mécanisme canonique et non canonique (Gaidt et al. 2016). Le LPS extracellulaire déclenche une voie alternative de l'inflammasome NLRP3 dans les monocytes primaires humains et porcins, mais pas dans les monocytes murins (Gaidt et al. 2016) (**Figure 8**). Contrairement aux autres voies, la voie alternative ne nécessite qu'un seul signal servant à la fois d'amorçage et d'activation. La stimulation du TLR4 par le LPS extracellulaire va induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 alternatif via les protéines RIPK 1 (Receptor Interacting serine/threonine Protein Kinase 1), TRIF, FADD et pro-Caspase-8 (Figure 8). L'activité catalytique de la Caspase-8 est nécessaire mais, ne clivant ni NLRP3 ni directement l'IL-1 $\beta$ , elle cliverait une protéine pour l'instant inconnue faisant l'intermédiaire pour l'activation de l'inflammasome alternatif. Finalement, la signalisation TLR4-TRIF-RIPK1-FADD-Caspase-8 va induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$  suite à la maturation de la pro-Caspase-1 en

Caspase-1 dépendante de NLRP3/ASC/Caspase-1. Contrairement à l'inflammasome NLRP3 classique, cette voie n'induit ni efflux de  $K^+$ , ni pyroptose, et permet donc le relargage d'IL-1 $\beta$  par des cellules vivantes (Gaidt et al. 2016 ; Gaidt et Hornung 2017) (**Figure 8**).

Enfin, il n'a pas été décrit d'inflammasome NLRP3 alternatif dans les neutrophiles (Tourneur et Witko-Sarsat 2019).



**Figure 8: Activation de l'inflammasome NLRP3 alternatif**

L'activation alternative de l'inflammasome NLRP3 ne requiert qu'un seul signal. La fixation du LPS sur le TLR4 est suffisante pour activer l'inflammasome NLRP3 dans les monocytes primaires humains et porcins grâce à la voie de signalisation impliquant TLR4, TRIF, RIPK1, FADD et Caspase-8. Plus précisément, la stimulation du TLR4 par le LPS extracellulaire déclenche simultanément deux voies de signalisation : la voie conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B via l'adaptateur MyD88, et la voie conduisant à l'activation de l'inflammasome NLRP3 via TRIF, RIPK1, FADD et la Caspase-8. Cette voie alternative de l'inflammasome ne conduit ni à une sortie d'ions potassium ( $K^+$ ) ni à la pyroptose de la cellule. Created with BioRender.com

Des nouvelles études de 2020, ont montré que l'apolipoprotéine C3 (ApoC3) pouvait également activer, dans les monocytes humains, un inflammasome NLRP3 alternatif nécessitant la dimérisation des TLR2 et 4, l'activation de la Caspase-8, et la protéine adaptatrice SCIMP (SLP adapter and CSK-interacting membrane protein) (Zewinger et al. 2020;

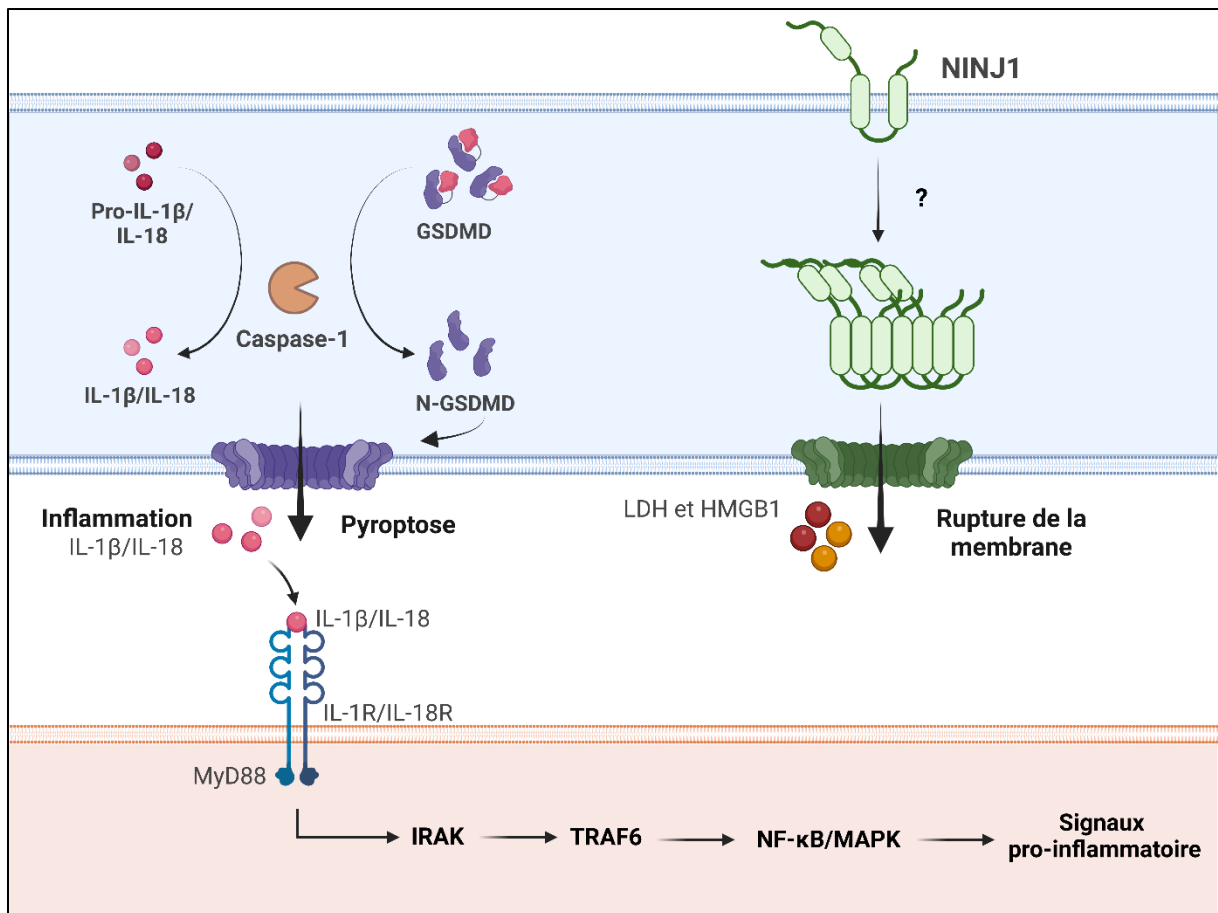
T. Gong et Zhou 2020). Ces résultats suggèrent qu'il n'existerait pas un, mais potentiellement plusieurs inflammasomes NLRP3 alternatifs.

## 6) Sécrétion d'IL-1 $\beta$ /IL-18 et pyroptose

### a. Sécrétion d'IL-1 $\beta$ /IL-18

Une fois les composants de l'inflammasome NLRP3 (NLRP3, ASC, pro-Caspase-1) assemblés en un complexe multiprotéique, il y a activation de la Caspase-1, qui va alors cliver les pro-formes des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 en leur forme active (**Figure 9**). Les cytokines actives sont ensuite sécrétées à l'extérieur de la cellule, déclenchant une réponse inflammatoire (**Figure 9**) (Charles A. Dinarello 2009; 2013). Une fois sécrétées, ces cytokines diffusent dans le tissu environnant et se lient à leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules cibles. L'IL-1 $\beta$  se lie au récepteur IL-1R, tandis que l'IL-18 se lie au récepteur IL-18R (**Figure 9**) (Charles A. Dinarello 2009; 2013). La liaison de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 à leur récepteur déclenche une cascade de signalisation intracellulaire (**Figure 9**). Il y a recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 sur le récepteur permettant l'activation de la protéine kinase IRAK4. IRAK4 phosphoryle IRAK1 qui est alors libérée du complexe et peut former un complexe avec TRAF6. Cela entraîne l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et MAPK (**Figure 9**) (Charles A. Dinarello 2009; 2013). Ces voies de signalisation déclenchent la transcription de gènes pro-inflammatoires, y compris ceux qui codent pour d'autres cytokines inflammatoires (**Figure 9**) (Charles A. Dinarello 2009; 2013). Les cytokines produites peuvent amplifier la réponse inflammatoire en recrutant d'autres cellules immunitaires, en augmentant la perméabilité vasculaire, en activant des cellules immunitaires, etc.

L'IL-1 $\beta$  mature est un puissant médiateur pro-inflammatoire au cours des réponses immunitaires, induisant le recrutement de cellules immunitaires innées au site de l'infection et la modulation des cellules immunitaires adaptatives (Chan et Schroder 2020). En effet, l'IL-1 $\beta$  stimule l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la fièvre, de la sensibilité à la douleur, de la vasodilatation et de l'hypotension. Lorsqu'elle se fixe sur son récepteur à la surface des cellules, elle déclenche une réponse des cellules endothéliales qui favorise l'infiltration de cellules immunitaires dans les tissus infectés ou lésés (Charles A. Dinarello 2009). L'IL-18 mature est importante pour l'induction de la réponse Th1 via l'activation des cellules NK et T, ainsi que pour la production et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Charles A. Dinarello 2009; Chan et Schroder 2020).



**Figure 9: Sécrétion d'IL-1 $\beta$ /IL-18 et pyroptose**

La gasdermine D (GSDMD) possède un domaine N-terminal (en violet) relié à un domaine C-terminal (en rose). Ce dernier possède une activité auto-inhibitrice qui induit le blocage de la libération des fragments N-terminaux. Lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3, la Caspase-1 clive la GSDMD, libérant ainsi son domaine N-terminal qui s'oligomérisent et forme alors des pores dans la membrane plasmique. Ces pores permettent la libération de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 activées. L'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 vont alors se lier à leurs récepteurs respectifs à la surface de cellules cibles, entraînant le recrutement de MyD88, IRAK4 et TRAF6, qui aboutit à l'activation de NF- $\kappa$ B et MAPK et ainsi à la promotion de la transcription de plusieurs gènes inflammatoires. Lors de la mort cellulaire régulée, notamment lors de la pyroptose, la ninjurine-1 (NINJ1) activée subit également une oligomérisation, ce qui conduit à la rupture de la membrane plasmique aux stades avancés de la pyroptose. Cette rupture membranaire entraîne la libération de protéines cytosoliques de plus grande taille, telles que la LDH et HMGB1. Created with BioRender.com

### **b. Mort inflammatoire pyroptotique**

La Caspase-1 activée conduit également au clivage de la GSDMD au niveau de l'Asp276, libérant les fragments N-terminaux (GSDMD-N) des domaines C-terminaux (**Figure 9**). Le fragment GSDMD-N induit la mort par pyroptose tandis que le domaine C-terminal possède une activité auto-inhibitrice qui induit le blocage de la libération des fragments N-terminaux et supprime la mort par pyroptose (J. Ding et al. 2016). Les domaines N-terminaux libérés vont s'oligomériser et former des pores dans la membrane plasmique des cellules (**Figure 9**) en se liant aux cardiolipines, aux phosphatidylinositol phosphates et aux phosphatidylsérines (X. Liu

et al. 2016a ; J. Ding et al. 2016). Ces pores participent à la sécrétion d'IL-1 $\beta$ /IL-18 et conduisent à l'initiation d'une forme de mort inflammatoire appelée pyroptose (J. Shi et al. 2015 ; W. He et al. 2015 ; X. Liu et al. 2016) (**Figure 9**). Ainsi, la GSDMD est nécessaire pour la pyroptose et la libération de l'IL-1 $\beta$ , mais pas pour la maturation de l'IL-1 $\beta$ , dans les voies canonique et non canonique de l'inflammasome NLRP3 (J. Shi et al. 2015 ; W. He et al. 2015).

Le terme de mort par pyroptose a été proposé par Cookson et Boise en 2001 pour décrire une nouvelle forme de mort pro-inflammatoire dépendante de la Caspase-1 (Cookson et Brennan 2001; Boise et Collins 2001). Plus tard, il a été proposé par différentes études que la pyroptose pouvait être induite par d'autres caspases inflammatoires telles que la Caspase-11 murine et ses homologues humaines -4 et -5 ainsi que les Caspases-3,-6,-7 et -8 (J. Shi et al. 2015 ; Aglietti et al. 2016 ; Sarhan et al. 2018). Ces différentes études ont montré que la pyroptose dépend de la GSDMD, mais pas de la caspase, et sera donc redéfinie comme une « mort cellulaire médiée par la gasdermine ». En 2016, les pores formés par la GSDMD ont été décrits comme étant d'un diamètre de 10 à 14nm et constitués de 16 protomères symétriques (J. Ding et al. 2016), permettant ainsi la libération de molécules de petite taille telles que l'IL-1 $\beta$  d'environ 4,5nm et l'IL-18 d'environ 5nm, avant la lyse cellulaire (X. Liu et al. 2016b, 20216).

La pyroptose est un type de mort cellulaire inflammatoire qui diffère des autres formes de mort cellulaire, telles que l'apoptose et la nécrose, par son mécanisme et ses conséquences. La pyroptose est une forme de mort cellulaire régulée déclenchée en réponse à des infections intracellulaires, à des agents pathogènes ou à d'autres signaux de danger. Elle est caractérisée par une libération rapide et incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs inflammatoires (DAMPs, alarmines...), conduisant à une inflammation intense. Lors de la pyroptose, il va y avoir une condensation de la chromatine, une augmentation de la pression osmotique et un gonflement de la cellule, suivis d'une rupture de la membrane plasmique et pour finir de la libération de composants pro-inflammatoires intracellulaires (Bergsbaken, Fink, et Cookson 2009). Cette libération massive de médiateurs inflammatoires contribue à l'activation du système immunitaire et à l'aggravation de l'inflammation locale. La pyroptose joue donc un rôle essentiel dans la défense de l'organisme contre les infections, en particulier les infections bactériennes et virales intracellulaires (W. He et al. 2015; Miao et al. 2010). Cependant, une pyroptose excessive ou dérégulée peut conduire à une inflammation chronique et à des lésions tissulaires, contribuant ainsi au développement de maladies



inflammatoires chroniques et auto-immunes. La régulation fine de l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la pyroptose est donc essentielle pour maintenir l'homéostasie et éviter une inflammation excessive et nuisible.

Enfin, de nombreuses preuves indiquent que d'autres membres de la famille des gasdermines peuvent également induire une pyroptose tels que la GSDMA, la GSDMB, la GSDMC et la GSDME (J. Shi et al. 2015 ; Yupeng Wang et al. 2017 ; Q. Wang et al. 2020 ; Zhibin Zhang et al. 2020 ; Z. Zhou et al. 2020, 202).

La dernière étape de la mort par pyroptose est la rupture de la membrane plasmique permettant la libération des médiateurs inflammatoires qui vont propager la réponse inflammatoire. Les lésions membranaires provoquées par les pores formés par la GSDMD-N ne conduisant pas toujours à la mort cellulaire. En effet, les lésions membranaires peuvent être réparées grâce à l'intervention des complexes de tri endosomal nécessaires au transport, connus sous le nom d'ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) (Rühl et al. 2018). L'activation de l'ESCRT est déclenchée par une augmentation du niveau de calcium à travers les pores de GSDMD, ce qui entraîne la formation de bourgeons membranaires et la libération de la membrane endommagée, contribuant ainsi à la prévention de la mort cellulaire. La protéine d'adhésion NINJ1 (Nerve Injury-Induced Protein 1), également connue sous le nom de Ninjurin-1, a été identifiée comme un élément indispensable lors de la rupture de la membrane plasmique (Kayagaki et al. 2021) (**Figure 9**). La protéine NINJ1 est une protéine présente à la membrane plasmique, avec deux domaines transmembranaires (**Figure 9**). À la suite de stimuli de mort cellulaire, NINJ1 va s'accumuler à la membrane plasmique puis s'oligomériser grâce à son hélice  $\alpha$  N-terminale, et former des pores dans la membrane entraînant la rupture de celle-ci (Kayagaki et al. 2021) (**Figure 9**). Une nouvelle étude a montré plus précisément que pendant la phase de mort lytique, les hélices  $\alpha$  situées à l'extérieur de NINJ1 vont s'incorporer dans la membrane plasmique, favorisant ainsi l'assemblage des monomères de NINJ1 en filaments amphipathiques qui ont la capacité de perforer et de rompre la membrane plasmique (Degen et al. 2023). Cet événement se produit en aval de la formation de pores de GSDMD. Les pores de GSDMD permettent une augmentation de la pression osmotique et un gonflement de la cellule, mais ne permettent pas la rupture de la membrane plasmique. Ainsi, dans les macrophages déficients en NINJ1, la libération des cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  est maintenue, tandis que la libération de molécules cytosoliques

plus grandes telles que la LDH, la HMGB1 ou d'autres grosses molécules pouvant agir comme des DAMPs potentiels, est inhibée. Ainsi, la libération des cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  est induite par les pores formés par la GSDMD, tandis que NINJ1 permet la libération de molécules plus grosses (Kayagaki et al. 2021) (**Figure 9**). Les études futures vont chercher à déterminer quel signal déclenche l'activation de NINJ1. Il est envisageable que l'activation de NINJ1 soit déclenchée par un ou plusieurs substrats activés par des caspases inflammatoires, ou par des flux ioniques médiés par la GSDMD ou d'autres pores de la membrane plasmique.

## **7) La régulation de l'inflammasome NLRP3 canonique**

L'inflammasome NLRP3 est régulé de manière complexe pour assurer l'homéostasie cellulaire. Plusieurs mécanismes de régulation contrôlant l'activité de l'inflammasome NLRP3 ont été identifiés.

### **a. Disponibilité des composants et localisation subcellulaire**

Le premier mécanisme de régulation de l'inflammasome NLRP3 repose sur la disponibilité de ses composants. En effet, les éléments qui constituent l'inflammasome ne sont pas systématiquement présents dans la cellule à l'état basal. Par conséquent, l'inflammasome requiert un signal d'amorçage pour déclencher leur transcription. Bien que les protéines ASC et pro-Caspase-1 soient présentes en permanence dans la cellule au repos, la protéine NLRP3, quant à elle, est généralement exprimée à des niveaux très bas qui ne sont pas suffisants pour activer l'inflammasome (F. G. Bauernfeind et al. 2009). La pro-IL-1 $\beta$  est également exprimée à des niveaux très faibles. La quantité de ces protéines peut être régulée par le contrôle de leur expression génique. Des signaux inflammatoires peuvent induire l'amorçage induisant la transcription de ces protéines pour favoriser l'assemblage de l'inflammasome. Il est important de noter que certaines cellules du système immunitaire maintiennent une activation de l'inflammasome à un niveau de base. Par exemple, les monocytes primaires présentent une légère activation de la Caspase-1, même en l'absence de stimulation externe (Netea et al. 2009). Enfin, une forte expression constitutive de NLRP3 et de la pro-IL-1 $\beta$  est associée au développement de maladies inflammatoires (Anderson et al. 2008; F. G. Bauernfeind et al. 2009; Netea et al. 2009).

L'inflammasome NLRP3 est constitué de trois protéines différentes qui sont colocalisées au moins momentanément, au cours du processus d'activation. Une autre voie de régulation de l'inflammasome réside donc dans le contrôle de la localisation subcellulaire de ces différentes molécules (Hamilton et Anand 2019). En effet, la protéine NLRP3 se localise au repos dans le cytosol et dans le RE, mais va se relocaliser dans les mitochondries et dans l'appareil de Golgi après activation (Moretti et Blander 2021) (**Figure 10A**). Comme décrit précédemment, à l'état inactif, la protéine NLRP3 est sous forme de cage avec ses domaines PYD protégés à l'intérieur de la cage, permettant ainsi une régulation et empêchant une activation prématurée de l'inflammasome (Andreeva et al. 2021 ; Hochheiser et al. 2022 ; Xiao, Magupalli, et Wu 2023). Pour permettre le transport et l'assemblage de NLRP3, des signaux provenant de différents organites sont nécessaires comme précédemment vu, notamment des signaux mitochondriaux pour l'amorçage, du RE, du TGN, des infrastructures du cytosquelette dont les microtubules, et enfin du MTOC (Pandey et al. 2021). Le NLRP3 des MAM et du MTOC est localisé au départ à la fois dans le cytosol et dans le RE. Lors de l'activation par divers stimuli, le NLRP3 du RE va se lier au ASC cytosolique au niveau des mitochondries adjacentes au MAM (**Figure 10A**). Une étude a montré que la kinase MARK4 (Microtubule affinity regulating kinase 4) interagit directement avec NLRP3 pour aider à son déplacement vers le MTOC et contribue ainsi à la formation de l'inflammasome (Li et al. 2017) (**Figure 10A**). Par conséquent, la localisation subcellulaire de NLRP3 s'est révélée être un facteur critique pour la régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3. La participation de différents sites subcellulaires peut varier en fonction du stimulus qui active NLRP3. L'emplacement de l'adaptateur ASC peut également être d'une importance significative. ASC est généralement située dans le cytosol, mais elle peut également se trouver dans le noyau des cellules au repos, et elle peut être associée au RE (Bryan et al. 2009) (**Figure 10A**). Lors de l'activation de l'inflammasome, la protéine ASC est observée dans des agrégats cytosoliques caractéristiques, « les speck de ASC », qui correspondent aux inflammasomes oligomérisés et assemblés (Stutz et al. 2013).

#### **b. Régulation lors du priming**

Au cours de l'amorçage, il y a une augmentation de la transcription de NLRP3, mais des données ont également montré que l'amorçage régule également l'activation de NLRP3 à des niveaux post-transcriptionnels. En effet, un amorçage de courte durée (10 min) par du LPS dans des macrophages de souris ne permet pas l'induction de l'expression de NLRP3, mais

augmente pourtant de manière significative l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Y. He, Hara, et Núñez 2016).

#### **i. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelles**

La phase d'amorçage fait intervenir différents régulateurs. Comme indiqué dans les sections précédentes, les protéines NEK7, FADD et Caspase-8 sont impliquées dans l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 canonique et non canonique (pour FADD et Caspase-8) via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Gurung et al. 2014 ; Y. He, Hara, et Núñez 2016). En 2018, Place a montré que les kinases ASK 1 et ASK2 (Apoptosis Signal regulating Kinases) étaient impliquées dans l'induction transcriptionnelle de NLRP3 dans les macrophages murins en réponse à un priming au LPS (Place et al. 2018). D'autres régulateurs sont les adaptateurs MyD88 et TRIF (F. G. Bauernfeind et al. 2009) dont l'implication va dépendre à la fois du type de récepteur TLR engagé et du signal d'amorçage (Fernandes-Alnemri et al. 2013). Par exemple, dans les macrophages de souris, l'amorçage par le LPS se fixant sur le récepteur TLR4 implique à la fois MyD88 et TRIF, tandis que l'amorçage avec le Pam3CSK4 se fixant sur le récepteur TLR2 implique uniquement MyD88. La signalisation IRAK-1 et 4 (IL-1 receptor associated kinases 1 et 4), en aval de MyD88 ou TRIF, est essentielle pour la phase d'initiation de l'inflammasome NLRP3 via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ainsi, MyD88, IRAK-1 et 4 jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle, tandis que TRIF et IRAK-1 sont impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle. En effet, la costimulation de TLR4 par le LPS et de l'inflammasome NLRP3 par l'ATP dans les macrophages de souris conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP3 via le recrutement d'IRAK-1 qui interagirait directement avec NLRP3 et ASC, sans induire de synthèse de nouvelles protéines (Lin et al. 2014). En conséquence, dans les macrophages IRAK-1 KO, il n'y a pas d'oligomérisation de ASC et une très faible activation de la Caspase-1 (Fernandes-Alnemri et al. 2013 ; Humphries et al. 2018). La ligase TRAF6 est également nécessaire à l'amorçage non transcriptionnel de l'inflammasome NLRP3 (Xing et al. 2017). En effet TRAF6 favorise l'oligomérisation de NLRP3 ainsi que son interaction avec ASC.

#### **ii. Régulation par modifications post-traductionnelles**

Des modifications post-traductionnelles (MPTs) telles que la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation, etc., sont importantes pour la régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3 et peuvent influencer la stabilité ou l'activité des protéines impliquées dans

l'inflammasome NLRP3. Par exemple, la phosphorylation de la protéine NLRP3 peut influencer son oligomérisation et son activation, tandis que l'ubiquitination peut cibler les composants de l'inflammasome NLRP3 pour la dégradation ou pour l'assemblage et l'activation. Certaines de ces modifications vont être plutôt activatrices et d'autres inhibitrices, d'autres encore font débat.

Dans les lignées cellulaires monocytaires humaines U937 et THP-1, l'amorçage transcriptionnel de l'inflammasome NLRP3 par le LPS induit une augmentation de l'expression de l'ubiquitine ligase E3 SCF FBXO3 (Skp-cullin-F box O3). Cette E3 ligase réprime l'expression de la E3 ubiquitine ligase SCF FBXL2 (Skp-cullin-F box L2) en induisant sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. SCF FBXL2 ne peut alors plus poly-ubiquitiner NLRP3 et provoquer sa dégradation par le protéasome. Ceci permet une augmentation de la quantité de protéine NLRP3 (Han et al. 2015).

Dans les macrophages de souris, la stimulation de TLR4 conduit à la désubiquitination de NLRP3 par une désubiquitinase non identifiée, indépendamment de la transcription, mais en fonction des ROS (Juliana et al. 2012). L'inhibition pharmacologique de la désubiquitination de NLRP3 empêche l'activation de l'inflammasome NLRP3, suggérant que l'ubiquitination de NLRP3 permet le maintien de la protéine dans un état inactif (Juliana et al. 2012). Ces résultats sont confirmés en 2013 par Lopez-Castejon qui montre que l'activation de l'inflammasome NLRP3 est bloqué par un inhibiteur de désubiquitinase, b-AP15 (Lopez-Castejon et al. 2013). De même Py a démontré en 2013 que la protéine BRCC3 (BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3) murine ou BRCC36 humaine était l'enzyme responsable de la désubiquitination de NLRP3 (Py et al. 2013). La métalloprotéase BRCC3 permet la désubiquitination de la chaîne de polyubiquitine liée à la lysine K63 de NLRP3, conduisant à l'assemblage de l'inflammasome. Si BRCC3 est inhibé, l'ubiquitination de NLRP3 empêche l'activation de l'inflammasome, mais ne conduit pas à sa dégradation par le protéasome. Ainsi, la désubiquitinase BRCC3 est une protéine clé de l'étape d'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (Y. He, Hara, et Núñez 2016). Le récepteur de la vitamine D bloque la désubiquitination de NLRP3 par BRCC3 en se liant directement à NLRP3, permettant ainsi une régulation négative de l'oligomérisation et de l'activation de l'inflammasome (Rao et al. 2019).

Une étude a montré, au contraire, que l'ubiquitination de la lysine K63 de NLRP3 par l'ubiquitine ligase Pellino2, pendant la phase d'amorçage des macrophages de souris, joue un rôle clé dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Humphries et al. 2018). Les

désubiquitines USP7 (USP, ubiquitin-specific peptidases) et USP47 vont permettre l'oligomérisation de ASC, la formation de speck et la régulation de l'ubiquitination de NLRP3 (Palazón-Riquelme et al. 2018). Ainsi, le rôle précis de l'ubiquitination/désubiquitination de NLRP3 pendant l'amorçage doit encore être étudié pour expliquer ces divergences. L'ubiquitination de NLRP3 peut exercer une influence soit positive soit négative sur l'activation de l'inflammasome NLRP3, en fonction de l'ubiquitine ligase impliquée et du type spécifique d'ubiquitination.

Concernant la phosphorylation, la kinase JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1) permet l'amorçage transcriptionnel et non-transcriptionnel des macrophages. Elle permet la phosphorylation de NLRP3 sur la sérine S194 et S198 chez la souris et l'homme, respectivement. Chez la souris, cette phosphorylation induit une désubiquitination de NLRP3 qui semble favoriser l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3 (N. Song et al. 2017). La kinase ERK1 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1) a également été associée au processus d'amorçage de l'inflammasome NLRP3. Toutefois, il subsiste une incertitude quant à sa capacité à phosphoryler NLRP3, comme le suggère l'étude de Ghonime en 2014 (Ghonime et al. 2014).

L'importance de toutes ces modifications post-traductionnelles pendant la phase d'amorçage demeure cruciale pour faciliter l'activation et l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3.

### c. Régulation lors de l'activation

#### i. Les régulateurs

De nombreuses protéines vont intervenir comme régulateur dans l'activation. Beaucoup de ces régulateurs sont communs à l'étape d'amorçage et d'activation, notamment la kinase NEK 7 (Y. He, Hara, et Núñez 2016; H. Shi et al. 2016; Schmid-Burgk et al. 2016), FADD et la Caspase-8 (Gurung et al. 2014) (**Figure 10B**). Certaines kinases favorisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 sans que leur activité kinase soit nécessaire, comme c'est le cas pour NEK 7 ou DAPK (tumor suppressor death-associated protein kinase). La DAPK s'associe à NLRP3 et contribue à l'assemblage de l'inflammasome (**Figure 10B**). L'inactivation totale de la DAPK entraîne donc une réduction de l'activation de la Caspase-1 (J. Yang, Liu, et Xiao 2017). Une étude de 2019 a également identifié l'hélicase 3 de la protéine granulaire de stress DEAD-box (DDX3X, DEAD-Box Helicase 3 X-Linked) comme un régulateur contribuant à l'activation

de l'inflammasome NLRP3 en interagissant directement avec NLRP3 (Samir et al. 2019) (**Figure 10B**).

La protéine de choc thermique 90 (Hsp90, heat shock protein 90) permet la protection de NLRP3 contre la dégradation par le protéasome et par autophagie (Mayor et al. 2007 ; Piippo et al. 2018). HSP90 va recruter son co-chaperon SGT1 au niveau de NLRP3 pour former un complexe maintenant NLRP3 dans un état inactif (Mayor et al. 2007) (**Figure 10B**).

Une étude de 2010 a montré que l'oxydation de la thiorédoxine (TRX) par les ROS, induite par des stimuli de NLRP3 tels que le MSU, l'alun ou la silice, ainsi que l'ATP, induit une dissociation de TRX avec son capteur oxydatif TXNIP. Cette dissociation entraîne l'association de TXNIP avec NLRP3 conduisant in fine à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (R. Zhou et al. 2010) (**Figure 10B**). Cependant une autre étude sortie la même année a montré que TXNIP n'était pas nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par l'ATP, le MSU et l'amyline (ou IAPP (islet amyloid polypeptide) (Masters et al. 2010). Ces conclusions différentes pourraient être dues aux types de stimuli de départ ou encore aux cellules utilisées dans ces études. La protéine kinase activée par l'ARN double brin (PKR, Protein kinase RNA-activated) a été identifiée comme régulant l'activation de plusieurs inflammasomes dont l'inflammasome NLRP3 (B. Lu et al. 2012) (**Figure 10B**). En effet, son inhibition conduit à la réduction de l'activation de la Caspase-1 dépendante de l'inflammasome NLRP3 ainsi que de la maturation de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. En 2017, c'est dans les ostéoblastes que la PKR a été identifiée comme un régulateur indirect de l'activation de l'inflammasome, en régulant la voie NF- $\kappa$ B (Yoshida et al. 2017). La kinase 4 régulant l'affinité des microtubules (MARK4) se lie directement à NLRP3 pour le conduire vers le MTOC (Li et al. 2017) (**Figure 10B**).

Le facteur inhibiteur de migration (MIF, Macrophage migration inhibitory factor), quant à lui, interagit aussi directement avec NLRP3, mais pour permettre son interaction avec la vimentine, protéine de filament intermédiaire essentiel lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lang et al. 2018) (**Figure 10B**).

## ii. Régulation par modifications post-traductionnelles

Tout d'abord la phosphorylation semble être une protection contre une activation précoce ou accidentelle de l'inflammasome NLRP3, comme démontré par l'étude de Stutz (Stutz et al. 2017). Une déphosphorylation de NLRP3 semble donc requise pour son activation et nécessite l'intervention de diverses phosphatases. La protéine PTPN22 (protein tyrosine phosphatase

non-receptor type 22) est impliquée dans la déphosphorylation de la tyrosine Y861 de la protéine NLRP3, permettant une activation efficace de NLRP3 et la libération subséquente d'IL-1 $\beta$  (**Figure 10C**). Son recrutement nécessite l'adaptateur ASC. Il semble être une conséquence de l'association préalable de NLRP3 et ASC et donc probablement de la désubiquitination de NLRP3 par la désubiquitinase BRCC3 (Spalinger et al. 2016). La phosphatase 2A (PP2A) favorise également l'activation de l'inflammasome en déphosphorylant NLRP3 sur son domaine PYD (Ser5) permettant ainsi à NLRP3 de s'auto-oligomériser et de recruter ASC par des interactions PYD-PYD (Stutz et al. 2017) (**Figure 10C**). Il a été suggéré que de nombreuses kinases phosphorylant NLRP3 sont également impliquées dans la régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3, telles que les kinases TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1), ERK1, la protéine kinase A (PKA) et la PKD. Les kinases TAK1 et ERK1 favorisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 puisque leur inhibition bloque l'activation de l'inflammasome (Ninomiya-Tsuji et al. 2003 ; Y.-N. Gong et al. 2010 ; Manna et al. 2018). En revanche la PKA entraîne la phosphorylation de NLRP3 humaine sur la sérine 295 (ou Ser291 pour la protéine NLRP3 murine) inhibant l'activation de l'inflammasome (Mortimer et al. 2016 ; Hughes et O'Neill 2018) (**Figure 10C**). Cette phosphorylation de NLRP3 favorise sa polyubiquitination sur les lysines K48 et K63 et *in fine* sa dégradation (Chuansheng Guo et al. 2016). La PKD, quant à elle, joue un rôle activateur de l'inflammasome NLRP3 en phosphorylant également la sérine 295, libérant NLRP3 des MAM et permettant ainsi l'assemblage de l'inflammasome (Zhirong Zhang et al. 2017) (**Figure 10C**). Cette dernière étude a montré que divers stimuli de NLRP3 induisent sa translocation des MAM vers le golgi où l'accumulation de diacylglycérol qui s'y produit active la PKD. La question que l'on se pose est pourquoi la phosphorylation de NLRP3 sur un même site par différentes kinases induit une régulation opposée de l'activation de l'inflammasome NLRP3 ? La phosphorylation de NLRP3 par AKT, également appelée protéine kinase B (PKB), au niveau de la sérine 5, restreint l'activation de l'inflammasome NLRP3 en inhibant l'oligomérisation de NLRP3 et le recrutement de ASC (W. Zhao et al. 2020).

La protéine ASC peut également être phosphorylée sur le domaine CARD par les kinases JNK et SYK, permettant son oligomérisation dans les macrophages (**Figure 10C**).

La BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) a également été impliquée dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 via son interaction avec ASC et NLRP3, et la phosphorylation de ASC (J. Yang, Liu, et Xiao 2017) (**Figure 10C**). Néanmoins, la phosphorylation de ASC ne favorise pas



toujours l'activation de l'inflammasome NLRP3. En effet, la phosphorylation de ASC par IKK $\alpha$  (IkappaB kinase alpha) sur les résidus Ser16 et Ser193 est importante pour la localisation de ASC dans le noyau, et empêche sa localisation cytosolique et donc son association avec NLRP3 (**Figure 10C**). L'activation de l'inflammasome NLRP3 permet l'inhibition de l'activité kinase de IKK $\alpha$  (**Figure 10C**), ce qui permettrait la translocation des protéines ASC dans le cytosol et leur association avec NLRP3 (J. Yang, Liu, et Xiao 2017).

Au niveau de l'ubiquitination lors de l'étape d'activation, des désubiquitinases visant NLRP3 peuvent agir comme des régulateurs négatifs de l'activation de l'inflammasome, notamment CYLD (cylindromatosis (turban tumor syndrome)) qui empêche l'interaction de NEK7 et de NLRP3 au centrosome en désubiquitinant PLK4 (Polo-like kinase 4), qui va alors phosphoryler NEK7 sur la sérine 204, atténuant ainsi son interaction avec NLRP3. ARIH2 (Ariadne RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase 2) polyubiquitine sur la lysine K68 le domaine NATCH de NLRP3 pour inhiber l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Kawashima et al. 2017) (**Figure 10C**).

STING va faciliter l'activation de NLRP3 et favoriser sa localisation au niveau du RE via la désubiquitination de NLRP3 et une formation augmentée des specks de ASC lors d'une infection par le VHS-1 ou lors de la transfection d'ADN (W. Wang et al. 2020).

Au contraire, ASC peut être polyubiquitinée par LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex), un processus permettant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 10C**). Le rôle de cette modification n'est pas encore vraiment clair, mais des souris déficientes en HOIL-1L (Hemeoxidized IRP2 ubiquitin ligase 1L), une protéine composant le complexe LUBAC, montrent une sécrétion réduite d'IL-1 $\beta$  en réponse à la stimulation du NLRP3 *in vivo* (J. Yang, Liu, et Xiao 2017).

La ligase E3 TRAF3 peut également polyubiquitiner ASC sur la lysine K63, favorisant la formation des speck de ASC et l'activation de l'inflammasome (Guan et al. 2015) (**Figure 10C**). De même, cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis 2) peut induire une poly-ubiquitination non dégradante de la Caspase-1, favorisant ainsi l'activation de NLRP3 (**Figure 10C**).

La pro-IL-1 $\beta$  est désubiquitiné sur la lysine K133 par A20 et POH1, entraînant une baisse du clivage de la pro-IL-1 $\beta$  par la Caspase-1 résultant en une diminution de la quantité d'IL-1 $\beta$  mature produite (Duong et al. 2015; L. Zhang et al. 2018). Par conséquent, l'ubiquitination de la pro-IL-1 $\beta$  favorise l'assemblage et l'activité de l'inflammasome NLRP3, tandis que sa désubiquitination prévient une activation excessive de l'inflammasome. Il est à noter que l'IL-

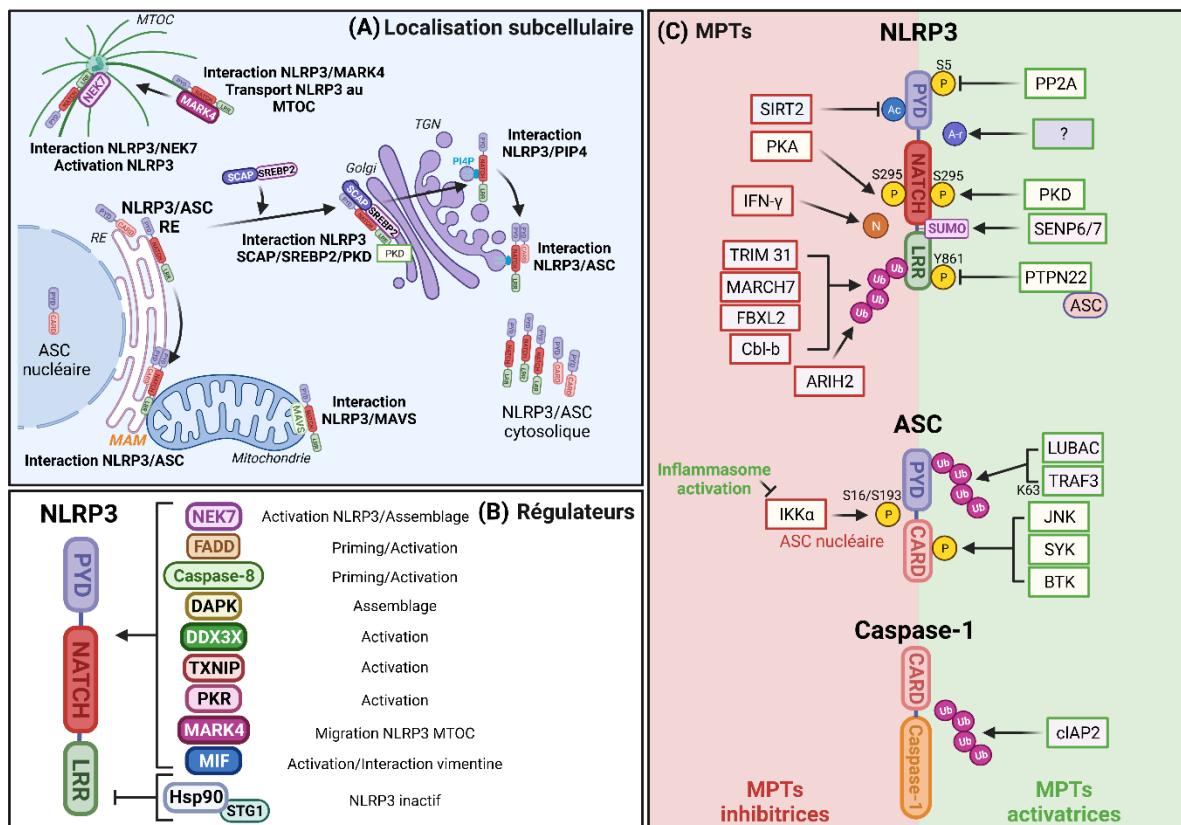
1 $\beta$  mature ne présente pas d'ubiquitination, ce qui suggère la nécessité d'une étape supplémentaire de désubiquitination lors du traitement de la pro-IL-1 $\beta$  par l'inflammasome. Enfin, la désensibilisation de NLRP3 repose également sur ce type de modification. La poly-ubiquitination sur la lysine K48 de NLRP3 permet de signaler sa dégradation au niveau du protéasome ou via l'autophagie, permettant ainsi d'éviter une activation excessive de l'inflammasome NLRP3. Les ubiquitine ligases responsables sont la ligase E3 TRIM31 (tripartite motif containing 31) (H. Song et al. 2016), la ligase E3 MARCH7 (Membrane associated RING-CH protein 7) (Yan et al. 2015), la protéine FBXL2 (Han et al. 2015) et la Cbl-b (J. Tang et al. 2020) (**Figure 10C**).

MARCH7 permet également d'inhiber l'activation de l'inflammasome via la signalisation du récepteur dopaminergique D1 en induisant une poly-ubiquitination de NLRP3 sur la lysine K48 suite à la liaison de l'AMPc sur NLRP3 phosphorylé par PKA (Yan et al. 2015) (**Figure 10C**).

D'autres modifications post-traductionnelles influencent l'activation de l'inflammasome NLRP3 telles que la sumoylation, l'acétylation et la nitrosylation.

La sumoylation semble réguler l'activation de NLRP3 de manière négative. En effet, une étude a montré que NLRP3 est SUMOylée par la SUMO E3-ligase MAPL (mitochondrial-anchored protein ligase). En revanche, la désumoylation de NLRP3 par les protéases SUMO-spécifiques SENP6 (Sentrin-specific protease) et SENP7 favorise l'activation de NLRP3 (Barry et al. 2018) (**Figure 10C**).

L'acétylation peut également moduler l'expression de l'inflammasome NLRP3 puisque l'inhibition de l'acétylation des histones H3 et H4 sur le promoteur NLRP3 induit une inhibition de l'expression de NLRP3 (Zhu et al. 2021). L'acétylation de NLRP3 peut moduler son activation et son oligomérisation dans l'inflammasome. En effet, La lysine acétyltransférase 5 (KAT5) acétyle NLRP3 au niveau de la lysine 24, facilitant son interaction avec NEK7 et son oligomérisation (K. Zhao et al. 2019). La désacétylase Sirtuine 2 (SIRT2, Silent information regulator two 2) désacétyle NLRP3 entraînant l'inactivation de l'inflammasome NLRP3 (M. He et al. 2020) (**Figure 10C**).



**Figure 10: Régulation de l'inflammasome NLRP3 par localisation subcellulaire, régulateurs et MPTs**

(A). La localisation subcellulaire de NLRP3 peut jouer un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Plusieurs localisations possibles de NLRP3 sont envisageables, notamment dans le cytosol ou le RE en l'absence d'activation. NLRP3 se lie à la kinase MARK4 et est transporté vers le MTOC. Une fois au MTOC, la kinase NEK7 interagit avec NLRP3, favorisant ainsi son activation par des changements conformationnels. Une fois activée, NLRP3 peut subir diverses relocalisations, comme la translocation vers les mitochondries, où elle interagit fonctionnellement avec la protéine MAVS. Dans le RE, NLRP3 se trouve à proximité immédiate de la protéine ASC lorsque l'inflammasome est induit par différents stimuli. NLRP3 et ASC forment des complexes dans les MAM. En outre, NLRP3 est recrutée dans le TGN par le biais de l'interaction avec le PIP4, déclenchée par divers stimuli. La translocation du complexe SCAP/SREBP2 du RE vers le Golgi est également cruciale pour l'activation de NLRP3, où NLRP3 interagit physiquement avec SREBP2 et SCAP. La kinase PKD, recrutée dans le Golgi, joue également un rôle dans l'assemblage et l'activation de NLRP3. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels ces localisations influencent l'activation de l'inflammasome NLRP3 demeurent encore mal compris. (B) Les partenaires régulateurs qui interagissent avec NLRP3 sont répertoriés. (C) NLRP3 subit diverses modifications post-traductionnelles (MPTs), notamment la phosphorylation (P), l'ubiquitination (Ub), la SUMOylation (SUMO) et la s-nitrosylation (N). Les MPTs qui affectent positivement l'activation de NLRP3 sont répertoriées à droite et celles qui agissent négativement sur NLRP3 pour inhiber son activation sont répertoriées à gauche. Created with BioRender.com

De plus, l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline va faciliter le déplacement de NLRP3 des mitochondries le long des microtubules vers la région périnucléaire, où elle permet un rapprochement spatial entre les protéines ASC des mitochondries et NLRP3 du RE (Misawa et al. 2013). Dans cette étude, a également été découvert que SIRT2 agit comme un régulateur potentiel de

l'activation de l'inflammasome NLRP3 en modulant l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline, ce qui va diminuer le transport par les microtubules des mitochondries vers la région périnucléaire (Misawa et al. 2013). Cette proximité favorise ensuite l'activation de l'inflammasome. Les activateurs de l'inflammasome NLRP3 provoquent une diminution du taux de NAD (+) entraînant la désactivation de la Sirtuine 2, ce qui conduit à une augmentation de l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline et de NLRP3.

La nitrosylation module négativement l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Hernandez-Cuellar et al. 2012 ; Mao et al. 2013 ; Mishra et al. 2013) (**Figure 10C**). En effet, la S-nitrosylation de NLRP3 induite par l'IFN- $\gamma$  inhibe l'assemblage de l'inflammasome (Mishra et al. 2013). L'ADP-ribosylation de NLRP3 favorise l'activation de l'inflammasome NLRP3 lors de la stimulation par des toxines (Bose et al. 2014) (**Figure 10C**).

En conclusion, il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité de NLRP3 qui ont été documentées, ce qui suggère une régulation précise de l'activation de l'inflammasome NLRP3 au niveau cellulaire. Cependant, certaines questions demeurent largement méconnues : quand et où ces événements de signalisation ont-ils lieu et également si différents types de MPTs sont activés de manière liée, superposée ou indépendante.

#### **d. Contrôle autophagique**

L'autophagie est un processus cellulaire de recyclage et de dégradation des composants cellulaires, qui peut influencer l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Cao et al. 2019). Certains signaux de danger, tels que des agrégats protéiques et des mitochondries endommagées, ou encore des dommages de l'ADN ou du stress oxydatif, peuvent activer l'inflammasome NLRP3. Une autophagie fonctionnelle peut éliminer ces signaux qui pourraient activer l'inflammasome NLRP3 limitant ainsi l'activation de l'inflammasome et contribuant à maintenir l'homéostasie cellulaire. Par exemple, une étude a montré que la rapamycine inhibait la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 en éliminant par autophagie les ROSmt (Ko et al. 2017). En revanche, une défaillance de l'autophagie peut favoriser l'accumulation de stimuli activateurs de l'inflammasome NLRP3. Des protéines autophagiques, telles que la protéine M de la famille GTPase, p62/SQSTM1 (Sequestosome1) et LC3, ont été impliquées

dans la régulation de l'activité de l'inflammasome NLRP3. Deux études récentes de Mehto ont révélé que l'IRGM (Immunity-related GTPase family M protein) interagit avec NLRP3 et ASC et bloque leurs polymérisation, ce qui entraîne leur dégradation par autophagie à travers la voie dépendante du p62/SQSTM1 (Mehto, Jena, et al. 2019 ; Mehto, Chauhan, et al. 2019). En 2020, une étude a montré dans des macrophages activés par LPS-ATP que l'autophagie orchestrée par SQSTM1 entraîne la dégradation de la pyruvate kinase musculaire (PKM), ce qui inhibe la production d'IL-1 $\beta$  mature et contribue à l'amélioration de l'inflammation synoviale.

L'inflammasome NLRP3 lui-même peut être dégradé par l'autophagie pour éviter une réponse inflammatoire excessive (C.-S. Shi et al. 2012 ; Cao et al. 2019). En effet, lorsque l'inflammasome NLRP3 est activé en réponse à des signaux de danger, il contribue à la production d'IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Cependant, une activation prolongée et excessive de l'inflammasome peut conduire à une inflammation chronique indésirable. L'autophagie peut dégrader l'inflammasome NLRP3 activé, limitant ainsi sa fonction et la production de cytokines pro-inflammatoires. Cela permet de réguler finement la réponse inflammatoire et d'éviter une surinflammation nuisible. La déficience en PTPN22 provoque une augmentation de la phosphorylation de NLRP3, ce qui entraîne sa présence accrue dans les autophagosomes, réduisant ainsi l'activation de l'inflammasome NLRP3. La phosphorylation de NLRP3 induit son inactivation en favorisant son entrée précoce dans le processus d'autophagie, ce qui conduit à l'inhibition de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Nurmi et al. 2017 ; Spalinger et al. 2017 ; Cao et al. 2019).

Ainsi, la régulation de l'inflammasome NLRP3 par l'autophagie joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse inflammatoire au sein des cellules. L'autophagie agit comme un mécanisme de contrôle visant à atténuer l'activation de l'inflammasome NLRP3 en ciblant ses composants clés vers la dégradation, notamment NLRP3 lui-même. Cette interaction entre l'autophagie et l'inflammasome NLRP3 contribue à maintenir l'homéostasie cellulaire en limitant la production excessive de cytokines inflammatoires et en prévenant les réponses inflammatoires inappropriées. Comprendre cette régulation est essentiel pour éclairer les mécanismes sous-jacents des maladies inflammatoires et peut ouvrir la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques visant à moduler l'inflammasome NLRP3 par le biais de la régulation autophagique.

En conclusion, les mécanismes de régulation contribuent à maintenir un contrôle étroit de l'activation de l'inflammasome NLRP3 afin d'éviter une inflammation excessive et non contrôlée. Cependant, il est important de noter que la régulation de l'inflammasome NLRP3 est un domaine de recherche actif, et de nombreux autres facteurs et mécanismes peuvent être impliqués dans cette régulation.

## **V. Inflammasome NLRP3 et pathologies**

L'hyperactivation ou la dysfonction de l'inflammasome NLRP3 ont été impliquées dans la pathogenèse de diverses maladies inflammatoires et peuvent contribuer au développement de maladies auto-inflammatoires et auto-immunes (Lamkanfi, 2012 ; Strowing, 2012). La compréhension des mécanismes d'activation et de régulation de l'inflammasome NLRP3 est un domaine de recherche actif, car il offre des perspectives pour développer des stratégies thérapeutiques afin de moduler l'inflammation excessive et traiter les maladies associées.

Quelques pathologies connues pour être associées à une dysrégulation de l'inflammasome NLRP3 sont présentées dans cette partie.

### **1) Syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS)**

Les cryopyrinopathies, également connues sous le nom de syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS, Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes) ou encore maladies auto-inflammatoires liées au NLRP3, sont un groupe de maladies rares et héréditaires caractérisées par des épisodes récurrents de fièvre et d'inflammation systémique. Ces maladies sont causées par des mutations dans le gène NLRP3, qui est responsable de la synthèse de la protéine NLRP3 (Booshehri et Hoffman 2019). Ces mutations entraînent une activation excessive de l'inflammasome NLRP3, conduisant à une surproduction et une libération accrue d'IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Les cryopyrinopathies comprennent plusieurs maladies distinctes comme le syndrome de Muckle-Wells, le syndrome de la FMF et le syndrome auto-inflammatoire familial au froid (FCAS, Familial cold autoinflammatory syndrome). Ces maladies sont caractérisées par des épisodes récurrents de fièvre, d'éruptions cutanées, de douleurs articulaires (notamment d'arthrite) et de symptômes inflammatoires systémiques. Le syndrome de CINCA/NOMID (Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular Syndrome/Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease) est une forme plus sévère de cryopyrinopathie qui se manifeste dès la naissance avec des signes neurologiques,

cutanés, articulaires et oculaires graves. Il existe également des formes moins sévères de cryopyrinopathie qui se manifestent généralement chez l'adulte et qui présentent des symptômes similaires aux autres formes, mais de manière plus modérée.

Le traitement des cryopyrinopathies vise généralement à atténuer l'inflammation et les symptômes associés. Les médicaments ciblant l'IL-1, tels que l'anakinra (un inhibiteur de l'IL-1) et le canakinumab (un anticorps monoclonal anti-IL-1 $\beta$ ), ont été utilisés avec succès pour contrôler l'inflammation et améliorer la qualité de vie des patients atteints de ces maladies (Kubota et Koike 2010; Mitroulis, Skendros, et Ritis 2010). La recherche sur les cryopyrinopathies a permis de mieux comprendre le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la pathogenèse des maladies auto-inflammatoires et a ouvert la voie au développement de nouvelles thérapies ciblées pour ces affections rares mais graves.

## **2) Inflammasome NLRP3 et maladies articulaires**

L'inflammasome NLRP3 a été impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies articulaires telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Guo et al. 2018 ; Yin et al. 2022), la goutte (Ea et Lioté 2009; A. K. So et Martinon 2017; Dalbeth et al. 2021), la spondylarthrite ankylosante (SPA) (S.-K. Kim, Cho, et Choe 2018; Tian, Yao, et Chen 2020; M.-H. Ding et al. 2023), l'arthrite juvénile idiopathique (JIA, Juvenile Idiopathic Arthritis) (C.-A. Yang, Huang, et Chiang 2014; Khanna et al. 2023) et l'arthrose (L.-R. Zhao et al. 2018 ; Zu et al. 2019 ; Z. Chen et al. 2019).

L'inflammasome NLRP3 joue un rôle central dans la pathogenèse de la goutte, une forme d'arthrite auto-inflammatoire causée par des dépôts de cristaux d'urate de sodium dans les articulations et les tissus environnants (Martinon et al. 2006). Les cristaux d'urate de sodium, qui se forment lorsque les niveaux d'acide urique dans le sang sont élevés, peuvent activer l'inflammasome NLRP3 dans les cellules immunitaires, en particulier les macrophages. Une fois activé, l'inflammasome NLRP3 entraîne la production d'IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires provoquant ainsi une réponse inflammatoire aiguë intense, ce qui va entraîner une douleur articulaire sévère, un gonflement et une rougeur autour des articulations touchées et une détérioration articulaire. Le mécanisme exact de la formation des cristaux d'urate dans la goutte n'est pas complètement compris, mais il est maintenant établi que l'inflammasome NLRP3 joue un rôle clé dans l'activation de la réponse inflammatoire en présence de ces cristaux. Dans les cas de goutte chronique non traitée, les cristaux d'urate peuvent s'accumuler dans les tissus sous la peau, formant des nodules durs appelés tophus

(Ahmad et al. 2021). L'activation de l'inflammasome NLRP3 peut également contribuer à l'inflammation et à la formation de tophus (Dalbeth et al. 2010 ; Ahmad et al. 2021).

Des études ont montré que le blocage de l'inflammasome NLRP3 ou de l'IL-1 $\beta$  peut atténuer l'inflammation et soulager les symptômes de la goutte. Les inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$ , tels que l'anakinra et le canakinumab, ont été utilisés avec succès pour traiter les crises de goutte aiguës chez certains patients (Charles A. Dinarello et van der Meer 2013; A. So et al. 2007 ; Gratton, Scalapino, et Fye 2009 ; A. So et al. 2010 ; Schlesinger et al. 2011 ; 2012). En résumé, l'inflammasome NLRP3 joue un rôle crucial dans la réponse inflammatoire induite par les cristaux d'urate dans la goutte. Comprendre les mécanismes moléculaires de cette réponse inflammatoire a permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'inflammasome NLRP3 et l'IL-1 $\beta$  pour le traitement de la goutte (A. So et al. 2013).

La PR est une maladie auto-immune inflammatoire chronique qui affecte principalement les articulations, provoquant une inflammation, une douleur et une raideur articulaire. Bien que la cause exacte de la PR ne soit pas entièrement comprise, on sait qu'elle implique une réponse immunitaire anormale où le système immunitaire attaque les tissus sains, en particulier les synoviales (membranes qui tapissent les articulations). L'inflammasome NLRP3 a été identifié comme un facteur clé contribuant à l'inflammation et aux lésions articulaires dans cette maladie (Guo et al. 2018 ; Yin et al. 2022). Plusieurs études ont montré que l'expression de NLRP3 est augmentée dans les cellules synoviales des patients atteints de PR, ce qui suggère un rôle potentiellement important de cet inflammasome dans la maladie. L'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules synoviales conduit à la production accrue d'IL-1 $\beta$ , contribuant à l'amplification de la réponse inflammatoire, à la destruction des tissus articulaires, à l'activation des cellules immunitaires et à l'attraction de nouvelles cellules immunitaires vers les articulations, exacerbant ainsi l'inflammation et les dommages articulaires (Schett, Dayer, et Manger 2016). Des études précliniques sur des modèles animaux de PR (Vande Walle et al. 2014; Snouwaert et al. 2016) ont montré que l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 ou de l'IL-1 $\beta$  peut réduire l'inflammation articulaire et atténuer les dommages causés aux articulations. Ces résultats suggèrent que le ciblage de l'inflammasome NLRP3 et de l'IL-1 $\beta$  pourrait être une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement de la PR (Vande Walle et al. 2014). Il est important de noter que la PR est une maladie complexe et multifactorielle, et que l'inflammasome NLRP3 est l'un des nombreux



mécanismes impliqués dans sa pathogenèse. Les traitements actuels pour la PR visent à supprimer l'inflammation et à ralentir la progression de la maladie, et les inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$  font partie des options thérapeutiques pour certains patients. La recherche continue sur le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la PR et pourrait fournir de nouvelles pistes pour le développement de thérapies ciblées additionnelles plus efficaces dans l'avenir (A. So et al. 2013).

### **3) Inflammasome NLRP3 et vascularites**

Les vascularites sont un groupe de maladies inflammatoires caractérisées par une inflammation des vaisseaux sanguins, ce qui peut entraîner des dommages aux parois des vaisseaux. L'inflammasome, en particulier l'inflammasome NLRP3, a été étudié dans le contexte des vascularites en raison de son rôle potentiel dans l'inflammation vasculaire (Hamzaoui et Hamzaoui 2023). Des études ont suggéré que l'inflammasome NLRP3 pourrait être activé dans les cellules immunitaires et les cellules endothéliales (qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins) lors de certaines formes de vascularites. Cette activation de l'inflammasome peut contribuer à la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , et à l'inflammation vasculaire. L'activation de l'inflammasome NLRP3 peut également être associée à la formation de thrombi ou caillots sanguins dans les vaisseaux affectés par la vascularite. Les thrombi peuvent obstruer le flux sanguin et aggraver les dommages vasculaires. L'inflammasome NLRP3 a été étudié dans le contexte de diverses formes de vascularites, notamment la maladie de Kawasaki (une vascularite pédiatrique) (Shahi et al. 2023 ; Jia et al. 2019) et la vascularite urticarienne (UV, urticarial vasculitis). (Marzano et al. 2015). Son rôle précis varie en fonction de la forme spécifique de vascularite. Notamment, dans la maladie de Kawasaki, des études ont suggéré que l'inflammasome NLRP3 pourrait jouer un rôle dans l'inflammation associée puisqu'il a été observé que des cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , étaient produites en quantités importantes dans cette maladie (Maury, Salo, et Pelkonen 1988). L'IL-1 $\beta$  étant une cytokine dont la production est régulée par l'inflammasome NLRP3, certains chercheurs se sont intéressés à l'implication potentielle de l'inflammasome NLRP3 et ont exploré l'utilisation de médicaments qui ciblent cet inflammasome, tels que les inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$  (Cohen et al. 2012; Shafferman, Birmingham, et Cron 2014). Ces deux études ont décrit l'efficacité du traitement par l'anakinra, bloquant les récepteurs de l'IL-1, dans la maladie de Kawasaki.

La granulomatose avec polyangéite (GPA, anciennement appelée granulomatose de Wegener) est une forme de vascularite caractérisée par une inflammation des petits et moyens vaisseaux sanguins. Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude ayant montré que l'inflammasome NLRP3 pourrait être activé dans le contexte de cette maladie.

Cependant, il est important de noter que la recherche sur le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans les vascularites n'en est qu'à son balbutiement, et les mécanismes exacts de son implication doivent être davantage élucidés.

#### **4) Inflammasome NLRP3 et autres pathologies**

En plus des différentes pathologies citées précédemment, l'inflammasome NLRP3 est impliqué dans la formation de maladies diverses et multiples. En voici une liste non exhaustive :

- Maladie cardiaque : Une surexpression de l'inflammasome NLRP3 a été observée dans des pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (Duewell et al. 2010) et l'insuffisance cardiaque (Sano et al. 2018 ; Al-Qazazi et al. 2022). L'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules vasculaires ou cardiaques contribue à l'inflammation chronique, à la formation de plaques d'athérosclérose et aux dommages cardiaques.
- Maladie métabolique : L'activation excessive de l'inflammasome NLRP3 a été associée à des maladies métaboliques telles que l'obésité (Vandanmagsar et al. 2011 ; Henao-Mejia et al. 2012), le diabète de type 2 (Masters et al. 2010 ; Wen et al. 2011) et la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD, Nonalcoholic fatty liver disease) (Henao-Mejia et al. 2012). L'inflammasome NLRP3 est activé en réponse au stress métabolique, y compris les acides gras saturés et les lipides dérivés. L'activation de l'inflammasome NLRP3 conduit à une production accrue d'IL-1 $\beta$ , ce qui contribue à l'inflammation systémique et à la résistance à l'insuline.
- Maladies neurodégénératives (Singh, Habean, et Panicker 2023) : Une dysrégulation de l'inflammasome NLRP3 a été impliquée dans le développement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Halle et al. 2008 ; Heneka et al. 2013 ; Heneka, McManus, et Latz 2018), la maladie de Parkinson (Codolo et al. 2013 ; Y. Zhou et al. 2016 ; Fan et al. 2016) et la sclérose latérale amyotrophique (ALS, Amyotrophic lateral sclerosis) (Gugliandolo et al. 2018 ; Deora et al. 2020 ; P. Banerjee

et al. 2022). L'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le système nerveux central peut contribuer à la neuro-inflammation, à la mort neuronale et à la progression de ces maladies.

- Maladies pulmonaires : L'inflammasome NLRP3 est également impliqué dans diverses maladies pulmonaires, notamment les maladies pulmonaires inflammatoires, les infections respiratoires et les maladies obstructives. Dans les maladies pulmonaires inflammatoires, on retrouve des maladies telles que l'asthme (R. Y. Kim et al. 2017 ; M. Ma et al. 2021), la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (H. Wang et al. 2018) et la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) (Jäger et al. 2021). Une surexpression de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules pulmonaires peut provoquer une inflammation chronique des voies respiratoires, une obstruction bronchique et une fibrose progressive. L'inflammasome NLRP3 peut également être activé en réponse à certaines infections virales respiratoires, telles que la grippe (H. Liu et al. 2020) ou encore la COVID-19 (Coronavirus disease 2019) (Freeman et Swartz 2020; Sefik et al. 2022; Aymonnier et al. 2022) entraînant une réponse inflammatoire excessive dans les poumons et des complications respiratoires graves.
- Maladies rénales : Des études ont suggéré une implication de l'inflammasome NLRP3 dans diverses maladies rénales, notamment la néphropathie diabétique (T. Ding et al. 2018), la glomérulonéphrite (Anton-Pampols et al. 2022) et l'insuffisance rénale aiguë. Une surexpression de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules rénales peut contribuer à l'inflammation rénale, à la fibrose, aux dommages des vaisseaux sanguins des reins et à la dysfonction rénale.
- Maladies intestinales : De nombreuses études impliquent l'inflammasome, en particulier l'inflammasome NLRP3, dans le contexte de différentes maladies du système digestif en raison de son rôle potentiel dans l'inflammation intestinale et la régulation de l'homéostasie intestinale. En effet, des études ont montré que l'inflammasome NLRP3 pourrait jouer un rôle dans l'inflammation intestinale observée dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Zhen et Zhang 2019) telles que la maladie de Crohn (G. Zhang et al. 2021), la colite ulcéreuse et la rectocolite hémorragique (RCH). Son activation peut contribuer à la production de cytokines pro-inflammatoires et à la détérioration de la muqueuse intestinale.

- Maladies hépatiques : Des études ont montré que l'inflammasome NLRP3 pourrait être activé dans le foie, contribuant à l'inflammation et à la progression de maladies hépatiques (de Carvalho Ribeiro et Szabo 2022) telles que la stéatose hépatique non alcoolique (NASH, Non-alcoholic Steatohepatitis) ou encore le carcinome hépatocellulaire (CHC), un type de cancer du foie.
- Maladies dentaires : L'inflammasome NLRP3 a été étudié pour son rôle potentiel dans certaines maladies dentaires et des problèmes bucco-dentaires. Des études ont montré que l'inflammasome NLRP3 pourrait être activé dans le cadre de la réponse inflammatoire associée à la parodontite (Y. Chen et al. 2021 ; Ying Zhao et al. 2022 ; Cheat et al. 2022) et pourrait jouer un rôle dans la réponse immunitaire de l'organisme aux infections buccales. L'activation de NLRP3 peut déclencher la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 $\beta$ , qui contribuent à l'inflammation, à la destruction des tissus parodontaux et à la douleur associées aux caries (Y. Song et al. 2018 ; Al Natour et al. 2023). Des études ont également montré que l'inflammasome NLRP3 peut être activé en réponse à des irritants présents dans la plaque dentaire, contribuant ainsi à l'inflammation gingivale (K. Yang et al. 2021).

Il convient de noter que la surexpression ou la dysrégulation de l'inflammasome NLRP3 peut être complexe et que les mécanismes exacts et la contribution de l'inflammasome à chaque maladie spécifique peuvent varier. Cependant, ces exemples mettent en lumière le rôle critique de l'inflammasome NLRP3 dans la promotion de l'inflammation et de la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires.

## Partie 2: Proliferating Cell Nuclear Antigen

### « PCNA »

#### I. PCNA: une protéine d'échafaudage

La protéine PCNA, abréviation de Proliferating Cell Nuclear Antigen, est également appelée cycline dépendante de la phase S (cyclin-S). C'est une protéine nucléaire qui appartient à la famille des protéines à pince coulissante et qui joue un rôle essentiel dans des processus liés à l'ADN, tels que la réplication et la réparation de l'ADN (Moldovan, Pfander, et Jentsch 2007). Il est important de noter que la protéine PCNA est hautement conservée au cours de l'évolution, étant présente chez les archéobactéries et toutes les espèces d'eucaryotes (Stoimenov et Helleday 2009).

Il convient de souligner que PCNA ne présente aucune activité enzymatique connue. Cependant, elle peut interagir avec un large éventail de protéines impliquées dans diverses voies cellulaires, régulant ainsi leur activité. En somme, PCNA agit comme une protéine d'échafaudage, facilitant les interactions entre différentes protéines pour coordonner efficacement les processus liés à l'ADN.

#### 1) Découverte de la protéine PCNA

La protéine PCNA a été identifiée au cours des années 1970. Plus précisément, en 1978, Miyachi et al. ont découvert la présence d'auto-anticorps dans le sérum de patients atteints de lupus érythémateux systémique (SLE) (Miyachi, Fritzler, et Tan 1978). Ces auto-anticorps étaient dirigés contre un ou plusieurs antigènes nucléaires présents dans les cellules en phase de prolifération. C'est cette observation qui a conduit à l'appellation de la protéine « PCNA » (Proliferating Cell Nuclear Antigen : antigène nucléaire des cellules prolifératives).

Deux ans plus tard, en 1980, Bravos et Celis ont identifié une protéine de 36 kDa dont la synthèse augmentait pendant la phase S du cycle cellulaire, au moment de la réplication de l'ADN (Bravo et Celis 1980). Ils ont initialement nommé cette protéine "cycline" en raison de sa variation cyclique d'expression tout au long du cycle cellulaire (Celis et al. 1984). Cependant, une étude réalisée en 1984 par Mathews a révélé que PCNA et la protéine cycline étaient en réalité une seule et même protéine (Mathews et al. 1984).

## 2) Description et structure

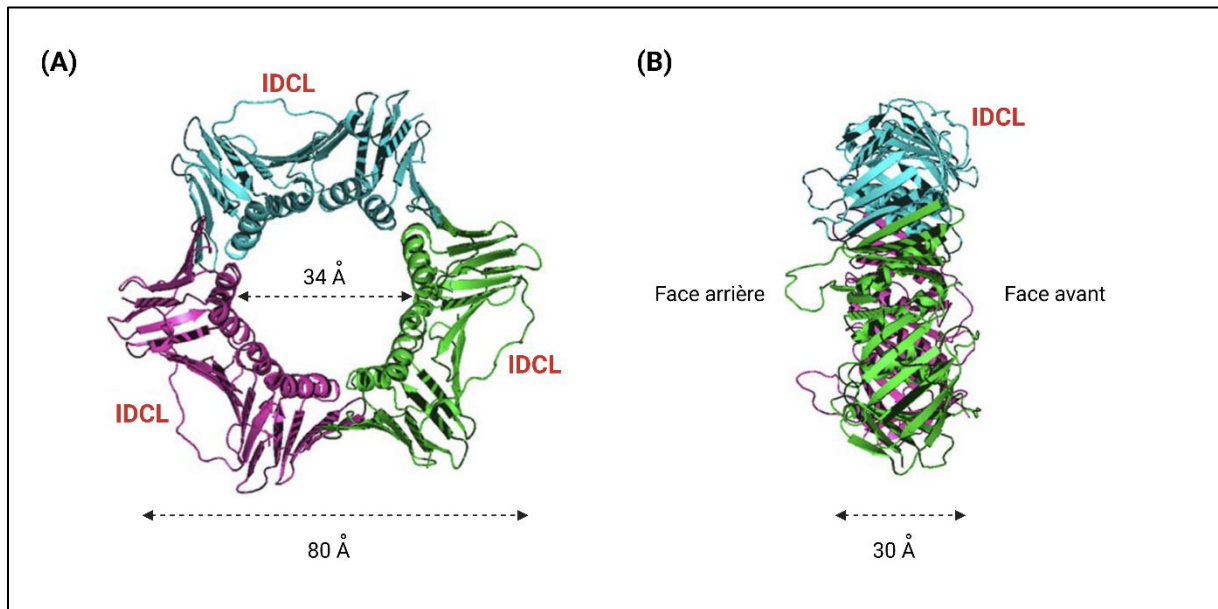
Le gène humain codant pour la protéine PCNA se trouve sur la région du bras court du chromosome 20, à la position 20p12. La protéine résultante de ce gène est composée de 261 acides aminés (Stoimenov et Helleday 2009).

La protéine PCNA est munie d'un signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal ou NLS) qui la guide vers le noyau cellulaire. Ce signal NLS permet à PCNA de se positionner dans le noyau, où elle peut interagir avec d'autres protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN. Toutefois, il est important de noter que PCNA présente également plusieurs signaux d'export nucléaire (Nuclear Export Signal ou NES) qui la dirigent vers le cytoplasme, suggérant ainsi la possibilité qu'elle puisse avoir d'autres fonctions en dehors de son activité nucléaire (B. J. Kim et Lee 2008). Il convient de souligner que la localisation subcellulaire de PCNA, qu'elle soit nucléaire ou cytoplasmique, peut varier en fonction des conditions cellulaires et des besoins fonctionnels de la cellule. En effet, bien que PCNA soit principalement présente dans le noyau des cellules eucaryotes, où se déroulent de nombreux processus de réplication et de réparation de l'ADN, des études ont montré que dans des cellules privées de sérum, PCNA semble se localiser dans le cytoplasme (Vriz et al. 1992).

La protéine PCNA est un trimère constitué de trois monomères, chacun composé de 261 acides aminés. Ces monomères sont reliés les uns aux autres par un arrangement tête-bêche pour former un homotrimère (**Figure 11A**). Une étude de 2017 a montré que la structure quaternaire de PCNA était la même dans le noyau et dans le cytoplasme (Belyakova et al. 2017). De plus, il a été observé que la protéine PCNA peut exister sous forme monomérique, se trouvant exclusivement dans le cytoplasme des cellules (De Chiara et al. 2013).

La structure de PCNA a été examinée en détail grâce à des techniques telles que la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN). La protéine PCNA présente une structure toroïdale avec un trou central d'environ 34 Å de diamètre, permettant ainsi d'encercler l'ADN lors des processus de réplication ou de réparation de l'ADN. Cette structure toroïdale affiche un diamètre extérieur d'environ 80 Å et une épaisseur d'environ 30 Å (S. N. Naryzhny 2008). La surface interne de l'anneau de PCNA est formée de douze hélices  $\alpha$  orientées perpendiculairement à l'ADN, tandis que la surface externe est constituée de six feuilletts  $\beta$ . Chaque sous-unité de PCNA est composée de deux domaines principaux : le domaine N-terminal et le domaine C-terminal, maintenus ensemble par des feuilletts  $\beta$  et

connectés par un domaine intermédiaire long et flexible appelé "interdomain connecting loop" (IDCL) (Krishna et al. 1994) (**Figure 11A**). L'IDCL se caractérise par sa grande flexibilité, ce qui se révèle crucial pour les interactions et les fonctions de PCNA.



**Figure 11: Structure tridimensionnelle de PCNA**

Le complexe trimérique de PCNA est illustré sous deux angles : vue de face (A) et vue de côté (B). Les trois monomères de PCNA sont colorés en bleu, rose et vert. La structure secondaire est exposée sous forme de ruban, mettant en évidence douze hélices  $\alpha$  (quatre dans chaque monomère) entourant la cavité interne, tandis que le périmètre extérieur présente une couche continue de structure en feuillet  $\beta$ . La région IDCL (Interdomain connecting loop), où la plupart des protéines partenaires se fixent, est également indiquée. Le diamètre intérieur de l'anneau mesure environ 34 Å, le diamètre extérieur mesure environ 80 Å et l'épaisseur mesure environ 30 Å. D'après (Witko-Sarsat et Ohayon 2016). Created with BioRender.com

La protéine PCNA est une protéine acide, présentant une distribution asymétrique de charges électrostatiques. Les charges positives sont situées sur la surface interne de l'anneau, facilitant ainsi l'interaction avec l'ADN chargé négativement, tandis que les charges négatives sur la surface externe préviennent les interactions non spécifiques avec l'ADN, favorisant ainsi le positionnement précis de l'ADN à l'intérieur de l'anneau (Krishna et al. 1994). Plus précisément, la surface interne de l'anneau de PCNA comporte neuf résidus de lysine et d'arginine, globalement positifs, qui permettent l'interaction avec l'ADN (Krishna et al. 1994 ; Gulbis et al. 1996). Cette caractéristique permet à PCNA de se lier à l'ADN en cours de réplication, renforçant et stabilisant ainsi l'interaction entre l'ADN et l'ADN polymérase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'ADN nouvellement formé.

Enfin, il est important de noter que la protéine PCNA présente une face avant et une face arrière distinctes (**Figure 11B**). La face avant comprend l'IDCL et les domaines N- et C-terminaux, tandis que la face arrière comporte des boucles marquées reliant des brins  $\beta$  anti-parallèles qui s'étendent dans le milieu environnant et ne favorisent pas l'interaction avec d'autres protéines (Krishna et al. 1994) (**Figure 11B**). La face arrière est la cible de modifications post-traductionnelles qui altèrent les propriétés de la pince à ADN.

Ainsi, la structure en anneau de PCNA est essentielle pour ses fonctions, car elle permet l'interaction avec diverses protéines partenaires et la formation de complexes moléculaires nécessaires à la réplication et à la réparation de l'ADN. Elle facilite également le déplacement de PCNA le long de l'ADN pendant les processus en cours, ce qui est crucial pour une synthèse et une réparation précises de l'ADN.

### 3) Motifs de liaison

En 1998, Warbrick a identifié la "PIP-box" (PCNA-interacting protein-box), un motif consensus présent dans de nombreuses protéines interagissant avec PCNA (Warbrick et al. 1998). La PIP-box est généralement représentée par le motif consensus QXX(h)XX(a)(a), où "Q" représente une glutamine conservée, "X" peut être n'importe quel acide aminé, "h" indique un résidu avec une chaîne latérale hydrophobe tel que la leucine, l'isoleucine ou la méthionine, et "(a)" désigne un résidu avec une chaîne latérale aromatique très hydrophobe, comme la phénylalanine ou la tyrosine (De Biasio et Blanco 2013). Les protéines interagissant avec PCNA via leur PIP-box, elles se fixent généralement au niveau de l'IDCL (Gulbis et al. 1996). En 2004, une étude a révélé que la PIP-box de nombreux partenaires de PCNA, notamment les protéines p21 et Fen1, se trouvait dans la région C-terminale de ces protéines (Bruning et Shamo 2004). De nombreuses études ont par la suite démontré qu'un grand nombre de protéines se liant à PCNA au même site possédait des séquences de plus en plus divergentes (Gilljam et al. 2009 ; Boehm, Gildenberg, et Washington 2016). La nécessité de la première place du résidu glutamine dans la séquence consensus de la boîte PIP a été remise en question, en partie en raison de la prévalence de boîtes PIP non canoniques (Boehm, Gildenberg, et Washington 2016). De plus, il est important de noter que toutes les protéines qui interagissent avec PCNA ne possèdent pas de PIP-box, telles que la cycline D et la polymérase  $\epsilon$  (Tsurimoto 1999). Par conséquent, d'autres motifs de liaison doivent exister pour expliquer la diversité des partenaires protéiques de PCNA.



Au début des années 2000, un nouveau motif d'interaction avec PCNA, appelé le "motif KA-box", a été découvert (Tsurimoto 1999; Heng Xu et al. 2001). Ce motif a pour séquence : [KA(A/L/I)(A/L/Q)XX(L/V)]. Plus tard, une étude menée par Gilljam a permis d'identifier un autre motif d'interaction avec PCNA, le "motif APIM" (ALKBH2 PCNA interacting motif), dont la séquence est [KR]-[FYW]-[LIVA]-[LIVA]-[KR] (Gilljam et al. 2009). Ce motif a été initialement identifié dans la protéine ALKBH2 (Human AlkB homolog 2), impliquée dans la réparation par excision de bases de l'ADN et interagissant directement avec PCNA. Il a depuis été identifié dans la séquence de plus de 200 partenaires de PCNA, principalement impliqués dans la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire en réponse à un stress génotoxique (Fu et al. 2015; Sebesta et al. 2017). Cependant, il convient de noter que ce motif semble également présent dans plusieurs protéines cytosoliques. La structure cristalline de PCNA liée au peptide APIM a révélé que, malgré une séquence très différente, cette interaction était similaire à celle du motif PIP, soulignant ainsi l'importance cruciale de ces motifs de liaison pour la régulation des processus cellulaires impliquant PCNA. Ils permettent aux protéines partenaires de s'associer étroitement à PCNA, coordonnant ainsi leurs activités au sein de la cellule.

Les données structurales disponibles concernant PCNA en complexe avec divers partenaires révèlent que trois ligands distincts sont capables de se lier simultanément aux trois protomères identiques de PCNA (Dionne et al. 2003). Ces ligands entrent en compétition pour se lier à PCNA en fonction de leurs affinité respective, qui peut être régulée par des modifications post-traductionnelles (modifications qui seront présentées ultérieurement) (De Biasio et Blanco 2013). Cependant, les mécanismes exacts par lesquels ces nombreux partenaires différents entrent en compétition pour la liaison à PCNA et exercent leurs fonctions enzymatiques et régulatrices demeurent encore inconnus.

## **II. Fonctions de la protéine PCNA nucléaire**

Dans le noyau cellulaire, la fonction principale de la protéine PCNA consiste à établir des interactions avec l'ADN polymérase pendant le processus de réplication de l'ADN (**Figure 12A**). En effet, PCNA est une protéine essentielle impliquée dans la réplication de l'ADN et dans le maintien de la stabilité du génome. Son rôle est crucial dans la régulation de la synthèse de l'ADN et dans la coordination des processus cellulaires liés à la division cellulaire. Grâce à sa structure homotrimerique, PCNA a la capacité de former un anneau autour des brins d'ADN

et de se déplacer le long de l'hélice d'ADN, ce qui lui vaut le surnom de " pince coulissante " (sliding clamp) (Indiani et O'Donnell 2006) (**Figure 12A**). Lors de la réplication de l'ADN, PCNA agit comme un facteur de chargement pour l'ADN polymérase, formant un complexe avec cette enzyme pour faciliter sa liaison à l'ADN. Cette interaction PCNA-ADN polymérase est essentielle pour la synthèse de nouveaux brins d'ADN pendant la duplication cellulaire (**Figure 12A**). Le PCNA crée une plate-forme moléculaire qui favorise les interactions entre molécules, qu'elles soient protéine-protéine ou protéine-ADN, au niveau de la fourche de réplication (Moldovan, Pfander, et Jentsch 2007). Cela permet de prévenir la dissociation de l'ADN polymérase du brin matrice d'ADN, assurant ainsi une réplication continue et précise de l'ADN. Au cours de la réplication de l'ADN, ainsi que lors des processus de réparation de l'ADN, PCNA interagit avec de nombreuses autres protéines, notamment des hélicases, des exonucléases, des ligases, des régulateurs du cycle cellulaire, des acétyltransférases, des remodeleurs de la chromatine et des protéines chaperonnes des histones (Moldovan, Pfander, et Jentsch 2007; Choe et Moldovan 2017). PCNA a notamment été identifié comme un facteur de processivité pour l'ADN polymérase  $\delta$  dès la fin des années 80 (Tan et al. 1986 ; Prelich et al. 1987 ; Bravo et al. 1987). PCNA interagit avec les ADN polymérases  $\delta$  et  $\epsilon$ , augmentant ainsi leur capacité à rester liées à l'ADN pendant la réplication (Boehm, Gildenberg, et Washington 2016) (**Figure 12A**). Dans le processus de synthèse de l'ADN, les ADN polymérases  $\delta$  et  $\epsilon$  réalisent une synthèse continue sur le brin matrice, tandis que sur le brin discontinu, l'amorce d'ARN initiale doit être retirée pour permettre la poursuite de la synthèse.

PCNA intervient alors en interagissant avec l'hélicase H1, l'exonucléase FEN1 (Flap structure-specific endonuclease 1) pour stimuler son activité exonucléase, et l'ADN ligase 1 pour joindre les fragments d'Okazaki (Mailand, Gibbs-Seymour, et Bekker-Jensen 2013; Boehm, Gildenberg, et Washington 2016; Slade 2018) (**Figure 12A**). Lorsque la réplication du brin discontinu est terminée, la polymérase doit se désengager de PCNA après avoir achevé la synthèse d'un fragment d'Okazaki, laissant ainsi le PCNA sur ce fragment terminé. En conséquence, la polymérase devient disponible pour s'associer à une autre protéine PCNA chargée sur un nouveau site d'amorçage, tandis que la protéine PCNA laissée derrière a la capacité de se lier à d'autres partenaires pour des étapes ultérieures dans le traitement du fragment d'Okazaki (Kochaniak et al. 2009) (**Figure 12A**).

La protéine PCNA joue également un rôle de premier plan dans les processus de réparation de l'ADN, tels que la recombinaison homologue, la réparation des mésappariements (MMR), la réparation par excision de bases (BER) et la réparation par excision de nucléotides (NER) (Slade 2018) (**Figure 12B**). Son interaction avec diverses protéines impliquées dans ces mécanismes de réparation contribue à la détection et à la correction des erreurs de l'ADN. Dans le contexte de la recombinaison homologue, un mécanisme de réparation qui utilise une copie intacte de l'ADN comme matrice pour réparer des brins d'ADN cassés ou endommagés, PCNA facilite l'appariement de l'ADN endommagé avec le brin intact, favorisant ainsi le processus de réparation. En particulier, PCNA interagit avec les polymérases Pol  $\delta$  et Pol  $\kappa$  lors de la synthèse de réparation de l'ADN (Sebesta et al. 2013) (**Figure 12B**). La protéine PCNA intervient également dans la réparation des mésappariements de paires de bases qui peuvent survenir lors de la réplication de l'ADN. Elle recrute des enzymes spécialisées pour corriger ces erreurs et maintenir l'intégrité de la séquence d'ADN. Lorsque des lésions se produisent pendant la synthèse de l'ADN, ce qui entraîne un arrêt de la réplication, PCNA recrute des ADN polymérases spécialisées, telles que Pol  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  et  $\lambda$ , pour initier la synthèse translésionnelle (TLS). PCNA permet également le recrutement des protéines impliquées dans la TLS. Dans ce processus de réparation, le PCNA joue un rôle clé en interagissant avec le complexe MutS $\alpha$  pour détecter le mésappariement (**Figure 12B**). Ensuite, il active l'activité endonucléase de MutL $\alpha$ , permettant ainsi l'excision du mésappariement, et recrute finalement la polymérase  $\delta$  pour la synthèse de réparation de l'ADN (Boehm, Gildenberg, et Washington 2016) (**Figure 12B**). Cette série d'interactions coordonnées est cruciale pour la correction des erreurs de paires de bases lors de la réplication de l'ADN, et permet de continuer la synthèse de l'ADN malgré la présence d'une lésion sur le brin d'ADN (Burgers, 1998 ; Burgers et al., 2001; Prakash et al., 2005). Dans le cadre de la réparation par excision de base (BER), PCNA recrute les polymérases  $\beta$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$  pour éliminer la base endommagée, contribuant ainsi à la restauration de l'intégrité de la séquence d'ADN (Krokan et Bjørås 2013) (**Figure 12B**). Lors de la réparation par excision de nucléotides (NER), PCNA interagit avec la protéine d'échafaudage XPA (groupe de complémentation de Xeroderma pigmentosum A) pour initier le processus. Ensuite, PCNA active l'endonucléase XPF (groupe de complémentation de Xeroderma pigmentosum F) et cible XPG (groupe de complémentation de Xeroderma pigmentosum G) pour dégrader la région endommagée de l'ADN (**Figure 12B**). Enfin, PCNA recrute la polymérase  $\delta$  pour synthétiser l'ADN manquant résultant de la dégradation du brin endommagé (Choe et

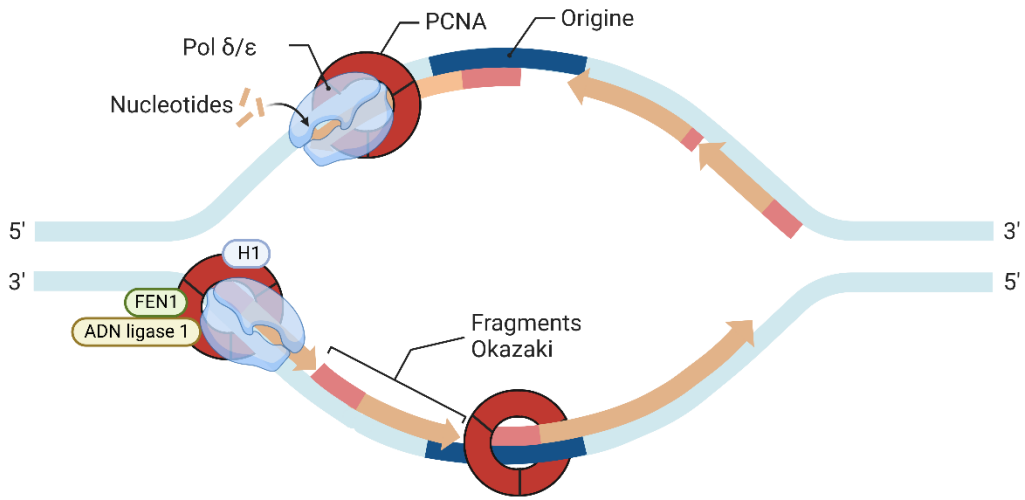
Moldovan 2017). Ces interactions complexes assurent la réparation précise des dommages de l'ADN et contribuent à maintenir la stabilité génomique de la cellule.

Outre ses fonctions cruciales dans la réplication et la réparation de l'ADN, la protéine PCNA exerce un rôle de régulateur de l'activité de diverses protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, ce qui impacte une multitude de processus cellulaires, notamment la prolifération cellulaire et l'apoptose. PCNA intervient dans la régulation de la progression du cycle cellulaire en interagissant avec de nombreuses protéines de contrôle du cycle cellulaire, y compris différents complexes cycline-CDK (Cyclin-dependent kinase) (Xiong, Zhang, et Beach 1992; Gulbis et al. 1996) (**Figure 12C**). En conséquence, PCNA est un indicateur de la prolifération cellulaire, car il est principalement présent et même accru dans les cellules en phase active de division, en particulier pendant la phase S du cycle cellulaire (Madsen, Ogata, et Celis 1987). Son expression est étroitement régulée tout au long du cycle cellulaire, et sa surexpression peut être associée à une croissance cellulaire non régulée, comme dans le cas de cancers. À noter qu'en cas de dommages de l'ADN, PCNA peut interagir avec l'inhibiteur de CDK p21/waf1, ce qui entraîne une inhibition de la réplication de l'ADN sans entraver la réparation par excision de nucléotides dépendante de PCNA (Witko-Sarsat et Ohayon 2016) (**Figure 12C**).

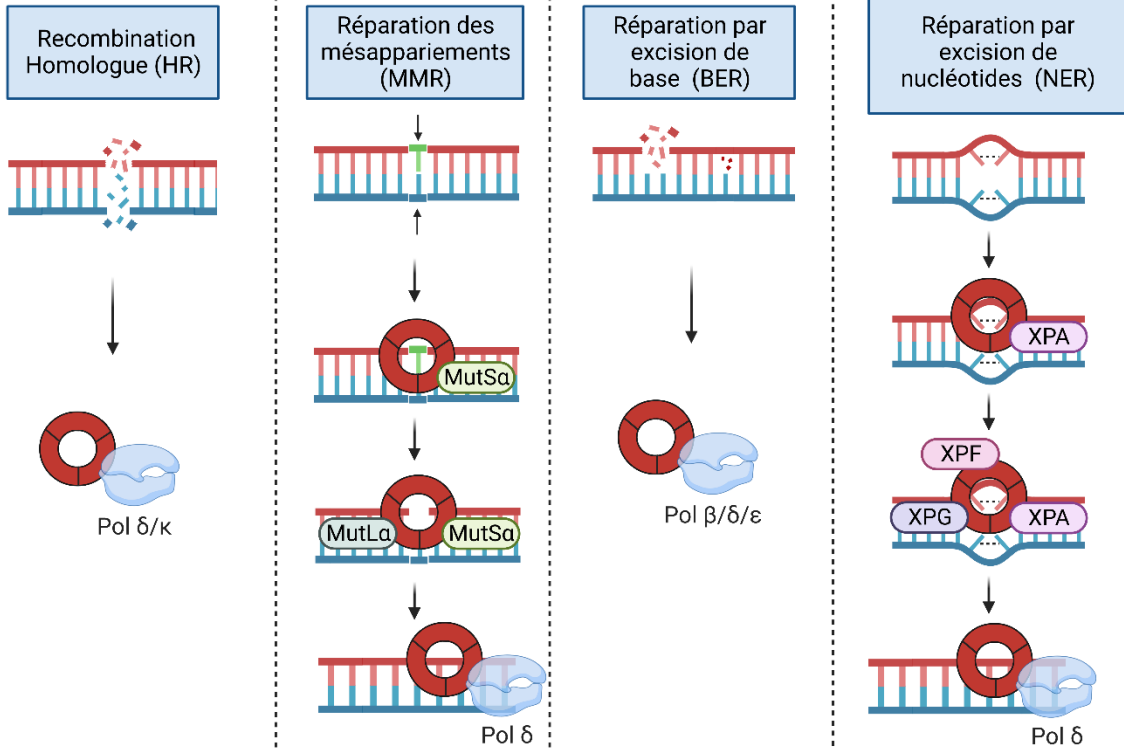
Enfin, PCNA est capable d'induire l'apoptose en interagissant avec certaines protéines inhibant la croissance, telles que l'ING1b (Inhibitor of Growth 1b), ou en inhibant des protéines anti-apoptotiques telles que GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45), MyD118 (Myeloid Differentiation Factor 118) et CR6 (également appelés GADD45alpha, bêta et gamma) (Vairapandi et al. 2000 ; Witko-Sarsat et Ohayon 2016) (**Figure 12C**).

En résumé, le rôle nucléaire de la protéine PCNA est principalement axé sur la régulation de la réplication et de la réparation de l'ADN, la signalisation cellulaire et la stabilité du génome, jouant un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires fondamentaux. En occupant le noyau cellulaire, PCNA orchestre les processus moléculaires essentiels qui permettent à la cellule de dupliquer son ADN de manière précise et de répondre aux dommages potentiels pour assurer la santé et la fonctionnalité de la cellule.

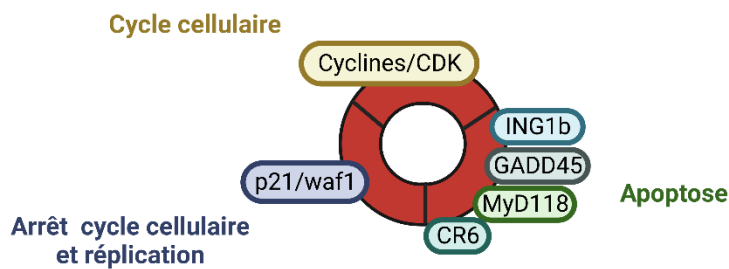
### A. Réplication de l'ADN



### B. Réparation de l'ADN



### C.



## Figure 12: Fonctions de la protéine PCNA nucléaire

La protéine PCNA est une protéine essentielle pour de nombreux processus cellulaires, principalement liés à la réplication et à la réparation de l'ADN. **A.** PCNA forme un complexe avec les ADN polymérase  $\delta$  ou  $\epsilon$  et les aide à rester associées à l'ADN, ce qui permet une synthèse d'ADN plus efficace. **B.** PCNA est impliquée dans plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN, notamment la recombinaison homologue, la réparation des mésappariements (MMR, Mismatch repair), la réparation par excision de base (BER, Base excision repair) et la réparation par excision de nucléotides (NER, nucleotide excision repair). Elle recrute et coordonne l'action de diverses protéines impliquées dans ces processus de réparation. **C.** En plus de son rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN, PCNA peut réguler l'activité de différentes protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Elle influence ainsi divers processus cellulaires, notamment la prolifération cellulaire et l'apoptose. Created with BioRender.com

### III. Relocalisation cytoplasmique et fonctions de la protéine PCNA cytoplasmique

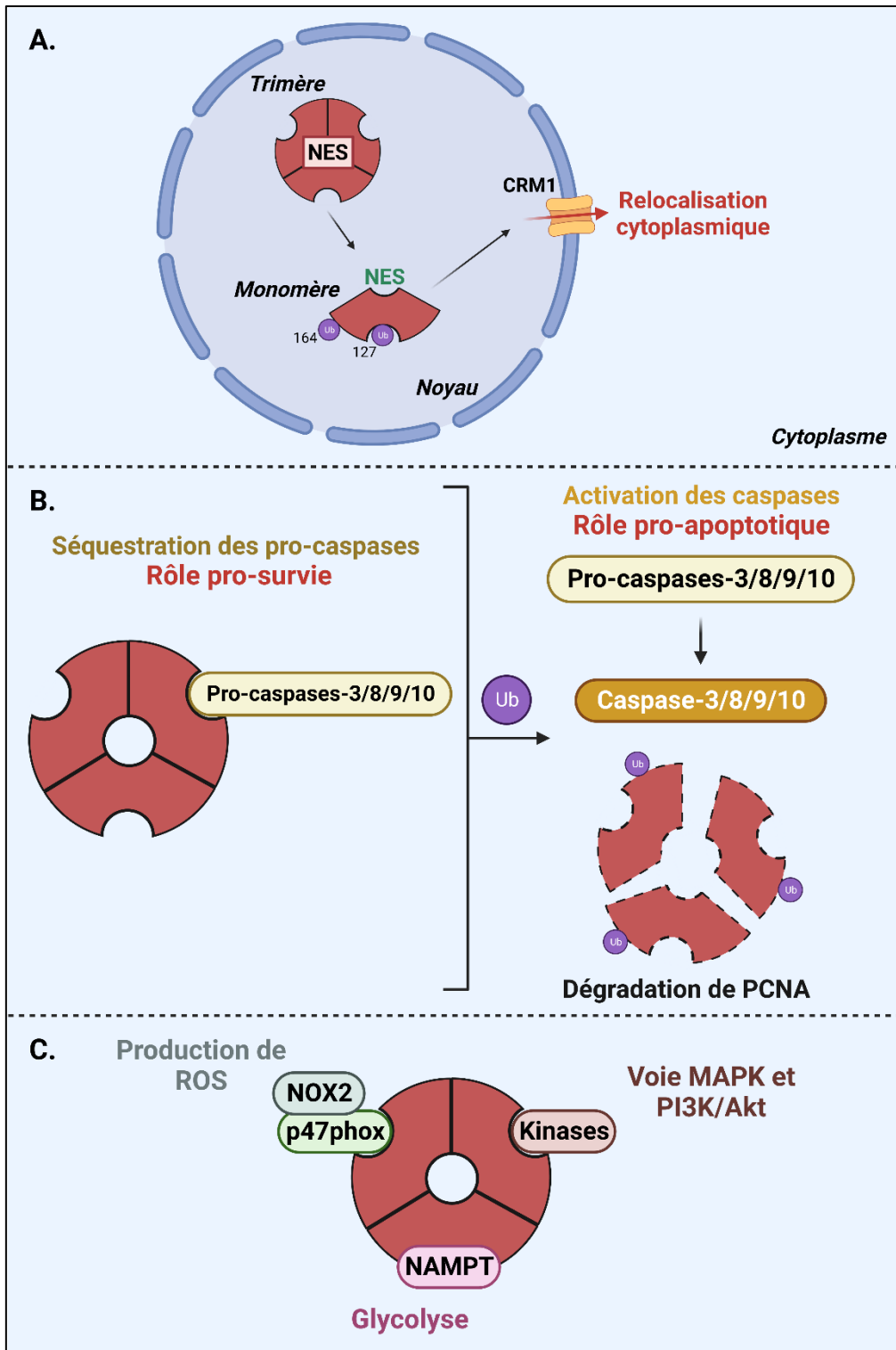
#### 1) Relocalisation cytoplasmique

À l'origine, la protéine PCNA a été décrite comme principalement localisée et exerçant ses fonctions dans le compartiment nucléaire, grâce à la présence dans sa séquence d'une NLS. Cependant, il a été découvert qu'une NES était présente entre les résidus isoleucine 11 et isoleucine 23, suggérant que la protéine PCNA pouvait également jouer un rôle essentiel en dehors du noyau cellulaire (Bouayad et al. 2012). Il est important de noter que cette NES se trouve sur la surface interne du trimère de PCNA, ce qui ne permet pas au PCNA sous sa forme trimérique de quitter le noyau (**Figure 13A**). En revanche, lorsque le PCNA est présent sous forme monomérique, la NES devient accessible, ce qui permet au PCNA de se déplacer vers le cytoplasme (**Figure 13A**) (Bouayad et al. 2012). Les mécanismes qui régissent la transition entre la forme trimérique et monomérique de PCNA ne sont pas encore entièrement compris. Le neutrophile mature est une cellule qui a atteint la dernière étape de sa différenciation et qui a cessé de se diviser. Pendant le processus de différenciation des précurseurs myéloïdes, la protéine PCNA monomérique subit une relocalisation dépendante de l'exportine CRM1 (chromosome region maintenance 1) (Bouayad et al. 2012) (**Figure 13A**). En conséquence, dans les neutrophiles, la protéine PCNA se trouve exclusivement dans le cytoplasme, où elle établit des interactions avec de nombreuses protéines partenaires pour réguler leurs fonctions. Ainsi, tout comme dans le noyau, la protéine PCNA cytoplasmique conserve son rôle de protéine d'échafaudage. De plus, la localisation exclusivement cytoplasmique du PCNA dans les neutrophiles est cohérente avec leur absence de prolifération. Il est donc raisonnable de supposer que d'autres types de cellules hautement différenciées et non proliférantes pourraient également présenter une localisation cytoplasmique de la protéine PCNA qui pourrait exercer différentes fonctions.

## 2) Fonctions de la protéine PCNA cytoplasmique

Dans les neutrophiles, la protéine PCNA cytoplasmique joue un rôle anti-apoptotique (Witko-Sarsat et al. 2010). En effet, la protéine PCNA cytoplasmique peut interagir avec différents partenaires, notamment les pro-caspases -3, -8, -9 et -10. Cette interaction a pour effet de séquestrer ces pro-caspases, les empêchant ainsi d'être activées, ce qui favorise la survie des neutrophiles (**Figure 13B**) (Witko-Sarsat et Ohayon 2016). Cette fonction est d'une grande importance étant donné que les neutrophiles sont des cellules essentielles du système immunitaire inné, et le maintien d'un équilibre entre la survie et l'apoptose des neutrophiles est crucial pour résoudre efficacement une réponse inflammatoire. Prolonger la durée de vie des neutrophiles est bénéfique pour renforcer l'élimination des agents pathogènes. Cependant, il est également essentiel de réguler la mort par apoptose des neutrophiles et leur élimination par les macrophages afin d'éviter la libération de substances cytotoxiques potentielles par les neutrophiles activés sur le site inflammatoire. Ainsi, le contrôle de l'équilibre entre la survie et la mort des neutrophiles doit être un processus dynamique (Witko-Sarsat et al. 2010 ; Witko-Sarsat et Ohayon 2016).

Lors d'une réponse inflammatoire, les neutrophiles, qui sont des cellules à durée de vie courte, prolongent leur survie, et PCNA intervient dans ce processus en séquestrant les pro-caspases pour bloquer leur mort par apoptose. Cependant, afin de terminer la réponse inflammatoire, la protéine PCNA subit une ubiquitination et est dégradée par le protéasome, ce qui libère les pro-caspases pro-apoptotiques (Witko-Sarsat et al. 2010). En 2013, une étude a révélé que la protéine PCNA sous sa forme monomérique jouait également un rôle anti-apoptotique. Cette découverte suggère que la capacité de PCNA à prévenir l'apoptose n'est pas limitée à sa conformation trimérique (De Chiara et al. 2013). De plus, la protéine PCNA cytoplasmique semble être impliquée dans la survie d'autres types de cellules que le neutrophile, notamment les cellules cancéreuses et les neurones. En effet, l'association entre les pro-caspases et PCNA décrite dans les neutrophiles est confirmée dans d'autres types cellulaires (Müller et al. 2013; L. Yin et al. 2015).



**Figure 13: Relocalisation cytoplasmique de PCNA et fonctions de la protéine PCNA cytoplasmique**

**A.** Lors de la différenciation des précurseurs myéloïdes, il y a une relocalisation cytoplasmique de la protéine PCNA sous forme monomérique dépendante de l'exportine CRM1. Ainsi, dans les neutrophiles (cellules différenciées qui ne prolifèrent pas), PCNA est exclusivement cytoplasmique et exerce de nombreuses fonctions régulatrices via son interaction avec différents partenaires cytosoliques. **B.** En particulier, lors d'une inflammation, la protéine PCNA a un rôle anti-apoptotique en séquestrant les procaspases -3, -8, -9 et -10, ce qui empêche leur activation et permet la survie des neutrophiles. Une fois la réponse inflammatoire terminée, les



neutrophiles entrent en apoptose : les procaspases se dissocient de PCNA et sont activées tandis que la protéine PCNA est ubiquitinée et dégradée par le protéasome. C. En plus de son impact sur la survie des neutrophiles, PCNA a la capacité de moduler l'activité de diverses protéines engagées dans la signalisation cellulaire. Cette influence s'étend à plusieurs processus cellulaires essentiels, parmi lesquels figure la régulation de la production de ROS par la NADPH oxydase 2 (NOX2), la modulation de la glycolyse, et la régulation des voies de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-Kinase/Akt). Created with BioRender.com

En plus de son rôle de séquestration des pro-caspases, la protéine PCNA cytoplasmique interagit avec divers autres partenaires pour réguler leur activité. En particulier, PCNA peut influencer la glycolyse en interagissant avec différentes enzymes glycolytiques, notamment la Nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) (Witko-Sarsat et Ohayon 2016). Cette interaction est particulièrement pertinente dans le contexte de la leucémie aiguë myéloïde, où la localisation de la protéine PCNA varie en fonction de la sensibilité des cellules leucémiques à la chimiothérapie. Plus précisément, dans les cellules sensibles à la chimiothérapie, la protéine PCNA est principalement nucléaire, tandis que dans les cellules résistantes à la chimiothérapie, sa localisation est principalement cytoplasmique. Dans les cellules de leucémie aiguë myéloïde résistantes à la chimiothérapie, la protéine PCNA cytoplasmique favorise la survie en interagissant avec les caspases et stimule la glycolyse en interagissant avec NAMPT (**Figure 13B-C**) (Ohayon et al. 2016). Ainsi, la plateforme moléculaire induite par la protéine PCNA cytoplasmique peut conférer un avantage significatif en termes de survie aux cellules.

En outre, les neutrophiles jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire en combattant les infections, notamment en produisant des ROS par le biais de la NADPH oxydase. Bien que ces ROS soient essentiels pour la défense de l'organisme contre les agents microbiens, et donc pour l'immunité innée, des niveaux excessifs de ROS peuvent entraîner une mort cellulaire excessive et des lésions tissulaires. La protéine PCNA cytoplasmique intervient dans la régulation de la production de ROS par les neutrophiles en interagissant avec une sous-unité appelée p47phox de la NADPH oxydase (Figure 13C) (Ohayon et al. 2019). Une étude de 2015 a également montré un rôle de la protéine PCNA cytoplasmique dans la lignée de kératinocytes humains HaCaT (Olaisen et al. 2015). Dans ces cellules, PCNA forme un complexe avec des protéines impliquées dans les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt (Figure 13C). Il s'avère que de nombreuses kinases possèdent un motif APIM et que l'inhibition de l'interaction de PCNA avec ses partenaires possédant un motif APIM (à l'aide d'un peptide dont la séquence correspond à ce motif) induit une inhibition de la phosphorylation de Akt.

Dans cette même étude, ces résultats ont été confirmés dans des monocytes primaires humains, dans lesquels une inhibition de la sécrétion de cytokines stimulée par l'activation des TLR a également été observée (Olaisen et al. 2015).

La protéine PCNA cytoplasmique interagit également avec le cytosquelette d'actine, ce qui a des implications importantes pour la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. L'actine est une protéine qui forme un réseau dynamique de filaments dans le cytoplasme cellulaire, jouant un rôle clé dans des processus tels que la motilité cellulaire, la division cellulaire et le maintien de la forme de la cellule. En 2020, une étude a identifié une relocalisation cytoplasmique de PCNA induite par RANKL lors de la différenciation de ostéoclastes. La protéine PCNA cytoplasmique a été localisée dans le réseau d'actine permettant ainsi un remodelage du cytosquelette d'actine indispensable à la différenciation ostéoclastique (D. Tang et al. 2020).

Enfin, durant la pandémie de COVID-19, différentes études sur le sujet ont été menées. Dans des cellules infectées par le virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), une relocalisation cytoplasmique de PCNA a été observée ainsi qu'une augmentation de son expression (Zambalde et al. 2022). De plus, la protéine PCNA cytoplasmique interagissait avec la protéine de membrane M du SARS-CoV-2, responsable du maintien de la forme du virion (Zambalde et al. 2022). Dans les neutrophiles de patients infectés par le SARS-Cov-2, la protéine PCNA cytoplasmique interagissait avec la protéine S100A8, en corrélation avec la sévérité de la maladie, suggérant que l'interaction PCNA-S100A8 puisse contribuer à la dérégulation des neutrophiles observés dans la COVID-19 (Formiga et al. 2022).

En résumé, la protéine PCNA cytoplasmique est impliquée dans la régulation de la survie cellulaire, du métabolisme et de la réponse immunitaire innée. Sa présence et ses interactions dans le cytoplasme ajoutent une dimension supplémentaire à ses fonctions, en dehors de son rôle bien connu dans le noyau lors de la réplication et de la réparation de l'ADN.

#### **IV. Régulation de la protéine PCNA**

La régulation de la protéine PCNA revêt une importance capitale pour garantir son bon fonctionnement dans les processus cellulaires. PCNA est soumise à diverses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitination, la SUMOylation et l'acétylation, lesquelles peuvent influencer ses fonctions et son affinité d'interaction avec

d'autres protéines (Ulrich 2009) (**Figure 14**). La régulation post-traductionnelle de PCNA, qui a principalement été décrite dans le noyau cellulaire, constitue un mécanisme essentiel pour adapter la fonction de cette protéine en réponse aux signaux cellulaires spécifiques et aux besoins particuliers de la cellule. Bien que la régulation de la protéine PCNA nucléaire ait fait l'objet de nombreuses études, la protéine PCNA cytoplasmique demeure moins explorée. Les modifications précitées ont donc lieu dans le noyau, mais elles pourraient également jouer un rôle dans le cytoplasme.

Les deux modifications post-traductionnelles les plus courantes de PCNA sont l'ubiquitination et la SUMOylation. Les premiers signalements de l'ubiquitination et de la SUMOylation de PCNA remontent au début des années 2000 (Hoegge et al. 2002 ; Matunis 2002), suscitant un intérêt considérable pour la compréhension du rôle de ces modifications dans les processus cellulaires.

L'ubiquitination de PCNA représente une modification post-traductionnelle essentielle qui exerce un contrôle sur divers processus cellulaires, en particulier ceux liés à la réparation de l'ADN. En réponse à des signaux de stress génétique, tels que des dommages de l'ADN, la protéine PCNA subit une mono-ubiquitination au niveau de la lysine 164 (**Figure 14**). Cette modification joue un rôle crucial en favorisant le recrutement de protéines de réparation de l'ADN, notamment des exonucléases et des polymérases, spécifiquement vers le site de l'ADN endommagé, tout en régulant la transition entre la phase de réplication et la phase de réparation de l'ADN (**Figure 14**). L'ubiquitination de PCNA sur la lysine 164 est réalisée par un complexe d'ubiquitination composé des protéines RAD6 et RAD18 (Hoegge et al. 2002) (**Figure 14**). Initialement, RAD18 recrute RAD6 au niveau de la protéine PCNA liée à l'ADN pour déclencher son ubiquitination. Par la suite, diverses protéines, notamment MMS2-UBC13, HLTF (Helicase-like transcription factor) et SHPRH (SNF2, histone linker, PHD-finger, RING-finger hélicase) sont recrutées, entraînant une polyubiquitination sur la lysine 164 (**Figure 14**). Cette polyubiquitination déclenche un mode de réparation sans erreur (Moldovan, Pfander, et Jentsch 2007) (**Figure 14**). HLTF et SHPRH forment des complexes mutuellement exclusifs qui favorisent le recrutement de polymérases TLS spécifiques en fonction du type de dommage à l'ADN (**Figure 14**). Outre RAD6-RAD18, la mono-ubiquitination de PCNA peut également être régulée par d'autres ubiquitine ligases, telles que RNF8, une ubiquitine ligase centrale dans la signalisation des cassures de l'ADN double brin (S. Zhang et al. 2008), et CRL4Cdt2 (cullin-RING E3 ubiquitin ligase 4), qui mono-ubiquitine la protéine PCNA en

l'absence de dommages externes, avec l'intervention de RAD6-RAD18 (Terai et al. 2010) (**Figure 14**). Il convient de noter que la mono-ubiquitination de PCNA est cruciale pour augmenter l'affinité de PCNA envers les ADN polymérases ( $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  et  $\lambda$ ) nécessaires à la synthèse translésionnelle, favorisant ainsi leur recrutement en remplacement des ADN polymérases répliquatives ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) (**Figure 14**). En plus de son interaction avec PCNA au niveau de l'IDCL, l'ADN polymérase  $\eta$  interagit également au niveau de cette ubiquitine, augmentant ainsi l'efficacité d'interaction entre les deux protéines. Cette ubiquitination va être essentielle dans la fixation de nouveaux partenaires et va permettre un ajustement pour la fixation d'autres protéines (Bomar et al. 2007 ; Hishiki et al. 2009 ; Freudenthal et al. 2010). Une fois la réparation de l'ADN achevée, la protéine PCNA doit subir une désubiquitination pour pouvoir être réutilisée dans d'autres processus cellulaires. Ce processus de désubiquitination de PCNA est lui aussi régulé afin de maintenir un équilibre entre la réparation de l'ADN et d'autres fonctions cellulaires. Il est toutefois important de noter que la mono-ubiquitination est également observée dans les cellules humaines non perturbées, suggérant qu'une certaine fraction de la protéine PCNA est constitutivement ubiquitinée (Kashiwaba et al. 2015). Par ailleurs, en 2015, une étude a révélé que la protéine PCNA subissait une ubiquitination supplémentaire sur la lysine K117, bien que la fonction de cette modification post-traductionnelle n'ait pas encore été déterminée (Elia et al. 2015).

La protéine PCNA peut également être soumise à la SUMOylation, tant sur la lysine K164 que sur la lysine K127 chez la levure (Hoegge et al. 2002) (**Figure 14**). Cette SUMOylation est principalement induite par SUMO1 (Small ubiquitin-related modifier 1) et joue un rôle crucial dans la préservation de l'intégrité des fourches de réplication en cas de cassures double brin de l'ADN (Gali et al. 2012) (**Figure 14**). Dans les cellules de mammifères, la SUMOylation de PCNA est étroitement associée à l'inhibition de la recombinaison homologue pendant la phase S du cycle cellulaire, ainsi qu'à la maintenance de la stabilité du génome, en facilitant le recrutement de la protéine PARI (PCNA-associated recombination inhibitor) interagissant avec PCNA en tant qu'anti-recombinase (Hoegge et al. 2002 ; Pfander et al. 2005 ; Moldovan et al. 2012) (**Figure 14**). Il est intéressant de noter que la régulation par SUMOylation semble synchronisée avec le cycle cellulaire, car une augmentation de la quantité de PCNA SUMOylée est observée avant le début de la phase S. Cependant, cette modification peut également survenir en réponse à des lésions graves de l'ADN. Contrairement à l'ubiquitination de PCNA, l'inactivation de RAD6 n'affecte pas la SUMOylation (Moldovan, Pfander, et Jentsch 2007). En

2012, Gali a également identifié une SUMOylation de PCNA sur la lysine K254, bien que sa fonction spécifique n'ait pas encore été déterminée (Gali et al. 2012). De plus, la SUMOylation de PCNA a également été observée dans le cytoplasme. La SUMOylation de PCNA cytoplasmique sur la lysine K127 (lysine situé sur l'IDCL) conduit à la suppression de la liaison des protéines contenant une boîte PIP à ce domaine (Witko-Sarsat et Ohayon 2016).

Il est crucial de noter que, lorsque l'ubiquitination et la SUMOylation ciblent le même résidu de PCNA, à savoir sur la lysine K164, ces deux modifications doivent s'exclure mutuellement. Il est plausible que les enzymes de conjugaison ubiquitine/SUMO fassent partie d'un système de régulation qui dirige la protéine PCNA vers différentes fonctions en réponse aux besoins cellulaires. Dans les deux cas, qu'il s'agisse de l'ubiquitination ou de la SUMOylation de PCNA, ces modifications post-traductionnelles modifient les surfaces d'interaction de PCNA et influencent ses partenaires, particulièrement lorsque PCNA est liée à l'ADN.

D'autre part, la protéine PCNA nucléaire peut également subir des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'acétylation, qui ont été associées à la régulation de la stabilité de la protéine (Stanislav N. Naryzhny et Lee 2004; Prosperi et al. 1994). Tout d'abord, la phosphorylation de PCNA se produit spécifiquement sur la tyrosine Y211 (Prosperi et al. 1994 ; S.-C. Wang et al. 2006) (**Figure 14**). Cette modification est déclenchée par l'activation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, Epithelial Growth Factor Receptor) (**Figure 14**), qui possède une activité tyrosine kinase jouant un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire. La phosphorylation de PCNA sur la tyrosine Y211 a pour effet d'empêcher l'interaction entre PCNA et son E3 ubiquitine ligase, ce qui prévient la dégradation de PCNA par le protéasome (**Figure 14**). Le récepteur EGFR est connu pour son implication dans les voies de prolifération cellulaire et de survie. Cette phosphorylation se produit principalement sur la fraction de PCNA liée à la chromatine, entraînant ainsi une prolongation de la demi-vie de la protéine PCNA liée à la chromatine et favorisant la prolifération cellulaire (S.-C. Wang et al. 2006). En outre, la phosphorylation de PCNA sur la tyrosine Y211 facilite la réplication de l'ADN sujette aux erreurs en inhibant le mécanisme de réparation des mésappariements (MMR) (**Figure 14**), ce qui contribue au développement et à la progression du cancer (Ortega et al. 2015 ; Peng et al. 2019). En 2014, la kinase c-ABL a été identifiée comme étant impliquée dans la phosphorylation de PCNA (H. Zhao et al. 2014) (**Figure 14**).

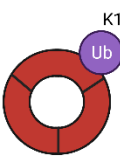
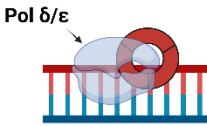
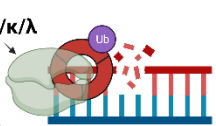
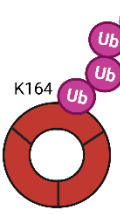
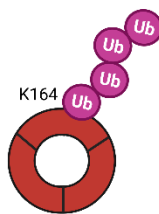


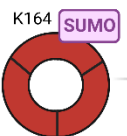

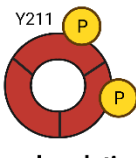
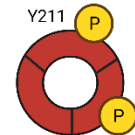
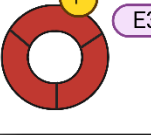
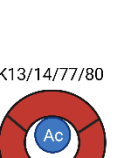

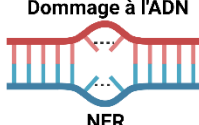

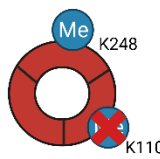
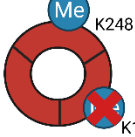


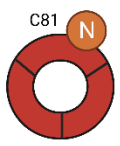



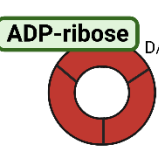

L'acétylation de PCNA revêt une importance particulière dans l'initiation de la réplication de l'ADN et dans l'augmentation de la demi-vie de PCNA (Stanislav N. Naryzhny et Lee 2004; Yu et al. 2009). Cette modification post-traductionnelle se produit généralement sur des résidus lysine. La désacétylation nucléaire de PCNA diminue sa capacité à se lier à l'ADN polymérase (Stanislav N. Naryzhny et Lee 2004). En 2014, des recherches menées par Cazzalini ont révélé que PCNA pouvait être acétylée sur plusieurs résidus de lysine (13, 14, 77 et 80) par la protéine CBP (CREB-binding protein) et, dans une moindre mesure, par p300 (**Figure 14**). Ces acétylations surviennent en réponse à des dommages de l'ADN et favorisent le détachement de PCNA liée à la chromatine, ainsi que sa dégradation par le protéasome au cours du processus de réparation par excision de nucléotides (NER), contribuant ainsi à maintenir la stabilité du génome (Cazzalini et al. 2014) (**Figure 14**). Ces quatre résidus de lysine se trouvent dans les hélices  $\alpha$  qui revêtent la face interne de l'anneau (**Figure 14**). Les acétylations n'entraînent pas nécessairement la dissociation de PCNA de l'ADN polymérase  $\delta$ , mais elles réduisent l'efficacité de cette association en altérant l'interaction de PCNA avec l'ADN (**Figure 14**), ce qui provoque probablement un ralentissement du glissement de la polymérase en raison du désalignement des résidus en contact avec l'ADN. En réalité, l'acétylation des lysines à l'interface PCNA-ADN induit un relâchement du contact PCNA-ADN, provoquant ainsi une modification de l'inclinaison de l'ADN, ce qui altère l'assemblage de l'ADN polymérase  $\delta$  (De March et De Biasio 2017; De March et al. 2017) (**Figure 14**). En 2017, les recherches menées par Billion ont également révélé que l'acétylation de la lysine K20 réduisait la processivité de la polymérase répliquative Pol  $\delta$ , favorisant ainsi la réparation des lésions de l'ADN (Billion et al. 2017). Lorsque l'ADN est endommagé par les rayons UV, il y a acétylation de PCNA sur la lysine K14 présente sur la surface interne de l'anneau, par les enzymes CBP et p300, ce qui entraîne une inhibition de l'interaction entre PCNA et la protéine MTH2, une protéine liée au métabolisme des folates qui est crucial pour la synthèse de l'ADN, et, finalement, une sensibilité accrue de PCNA à la dégradation protéasomale et à la dissociation des sites de dommages de l'ADN (Yu et al. 2009 ; Slade 2018). Cependant, il est crucial de noter que l'élimination du PCNA de la chromatine à la fin du processus de réparation par excision de nucléotides est nécessaire pour prévenir l'instabilité génomique.

Bien que moins fréquentes, d'autres modifications post-traductionnelles de la protéine PCNA ont commencé à être révélées au fil du temps. Par exemple, en 2006, des chercheurs ont décrit la méthyl estérification de PCNA au niveau des acides glutamique et aspartique (Hoelz

et al. 2006). En 2012, Takawa a identifié la méthylation de PCNA sur la lysine K248, une modification qui a pour effet de stabiliser les niveaux protéiques de PCNA et d'améliorer son interaction avec la protéine FEN1 (Takawa et al. 2012) (**Figure 14**). Une étude plus récente a révélé que PCNA était également sujette à une diméthylation sur la lysine K110 grâce à l'enzyme EH2Z (Enhancer of zeste homolog 2), ce qui permet de stabiliser PCNA sous sa forme trimérique (A et al. 2018) (**Figure 14**).

Une étude datant de 2013 a également montré que la protéine PCNA subissait une forte ADP-ribosylation sur des résidus d'aspartate et de glutamate au niveau de l'IDCL, en réponse au stress oxydatif provoqué par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Y. Zhang et al. 2013) (**Figure 14**). Cependant, les unités d'ADP-ribose peuvent former de longues chaînes, perturbant ainsi la liaison des protéines contenant une boîte PIP ou un motif APIM à l'IDCL de PCNA, en raison de l'augmentation de la charge négative des pyrophosphates (Leung 2014) (**Figure 14**). En 2015, une autre modification post-traductionnelle a été découverte : la S-nitrosylation du PCNA cytoplasmique sur la cystéine 81 (**Figure 14**), un processus qui affecte la voie apoptotique dans les neurones. La S-nitrosylation du PCNA altère son interaction avec la pro-Caspase-9, entraînant ainsi le clivage et l'activation de la Caspase-9, et finalement conduisant à l'apoptose de la cellule (L. Yin et al. 2015) (**Figure 14**). Ces découvertes mettent en lumière la complexité des mécanismes de régulation post-traductionnelle qui interviennent dans les fonctions des protéines PCNA nucléaire et cytoplasmique.

Ces modifications post-traductionnelles de la protéine PCNA sont cruciales pour réguler ses interactions avec différentes protéines, à la fois dans le noyau et le cytoplasme, et donc pour coordonner les processus cellulaires tels que la réplication et la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et la survie des cellules. Elles contribuent à la plasticité fonctionnelle de cette protéine essentielle pour la stabilité du génome et la survie cellulaire. Des dysfonctionnements dans la régulation de PCNA peuvent être associés à des maladies telles que le cancer, où une dérégulation de la réplication de l'ADN peut conduire à une prolifération cellulaire incontrôlée. La compréhension de ces mécanismes de régulation de PCNA est primordiale pour mieux comprendre les processus physiopathologiques et développer des stratégies thérapeutiques potentielles.

| MPTs  | Effecteurs                                     | Effets fonctionnels   |   |
|---|--|---|---|
| <p><b>Mono-ubiquitination</b></p>  | <p><b>RAD6/RAD18</b><br/>RNF8<br/>CRL4Cdt2</p> |    | <p><b>Pol η/ι/κ/λ</b></p> <p>Dommage de l'ADN<br/>Switch polymérase TSL<br/>+ Recrutement protéine sde réparation</p>    |
| <p><b>Polyubiquitination</b></p>   | <p><b>MMS2-UBC13</b><br/>HLTF/SHPRH</p>        |    | <p>Dommage de l'ADN<br/>Recrutement ADN pol TSL</p> <p>Réparation sans erreur</p>    |
| <p><b>SUMOylation</b></p>          | <p>SUMO1</p>                                   |    | <p>Recrutement PARI</p>  <p>RH en phase de réplication</p>  |
| <p><b>Phosphorylation</b></p>     | <p>EGFR<br/>c-ABL</p>                          |   | <p>MMR<br/>Interaction PCNA/E3 ubiquitine ligase</p>  <p>Dégradation PCNA</p> <p>?</p>   |
| <p><b>Acétylation</b></p>        | <p>CBP<br/>p300</p>                            |  | <p>Interaction PCNA/ADN et PCNA/ADN pol</p> <p>Dommage à l'ADN</p>  <p>Detachment PCNA/Chromatine + Dégradation PCNA</p>  |
| <p><b>Méthylation</b></p>        | <p>EH2Z</p>                                    |  | <p>Favorise interaction PCNA/FEN1</p>  <p>Stabilisation forme trimérique</p>   |
| <p><b>S-nitrosylation</b></p>    |  |  | <p>Pro-Caspase-9</p> <p>Interaction PCNA/Pro-Caspase-9</p>  <p>Caspase-9</p> <p>Apoptose</p>  |
| <p><b>ADP-ribosylation</b></p>   | <p>Stress oxydatif<br/>H2O2</p>                |  | <p>Interaction PCNA/Protéine avec motif PIP box ou APIM</p>  <p>PIP</p> <p>APIM</p>   |



## Figure 14: Régulation de la protéine PCNA par modifications post-traductionnelles (MPTs)

La mono-ubiquitination de PCNA sur la lysine K164 en réponse à des dommages de l'ADN induit un changement dans les polymérase, remplaçant ainsi les polymérase répliquatives par les polymérase translésionnelles (TLS), tout en favorisant le recrutement des protéines impliquées dans la réparation. La polyubiquitination de PCNA sur la lysine K164 après des dommages de l'ADN déclenche un mécanisme de réparation sans erreur, en recrutant les polymérase TLS spécifiques des dommages induits. La SUMOylation de PCNA sur la lysine K164 recrute la protéine anti-recombinase interagissant avec PCNA (PARI), inhibant ainsi la recombinaison homologue pendant la répliquative. La phosphorylation de PCNA sur la tyrosine Y211 affaiblit son interaction avec les protéines de réparation des mésappariements et prévient également sa dégradation par le protéasome en inhibant son interaction avec l'E3 ubiquitine ligase. L'acétylation de PCNA sur la lysine K14 altère son interaction avec l'ADN, entraînant une réduction de son efficacité dans la liaison avec les ADN polymérase. Lors de dommages à l'ADN, l'acétylation de PCNA facilite sa dissociation de la chromatine après la réparation de l'ADN par NER, suivie de sa dégradation. La méthylation de PCNA sur la lysine K248 améliore son interaction avec FEN1. La déméthylation de PCNA sur la lysine K110 stabilise PCNA sous sa forme trimérique. La S-nitrosylation de PCNA empêche son interaction avec la pro-Caspase-9, ce qui conduit à l'activation de cette dernière et à l'apoptose subséquente. Enfin, l'ADP-ribosylation de PCNA sur des résidus d'acides aspartique et glutamique inhibe son interaction avec des protéines contenant un motif PIP-box ou APIM, altérant ainsi ces interactions. Created with BioRender.com

### V. Molécules inhibitrices de l'interaction PCNA/partenaires

Le peptide p21 et le T2AA (T2 Amino Alcohol) sont 2 composés qui permettent la dissociation des interactions de PCNA en se liant à celui-ci (**Figure 15**). Ils sont pro-apoptotiques et anti-inflammatoires dans différents modèles cellulaires, faisant du PCNA une cible thérapeutique dans les maladies inflammatoires.

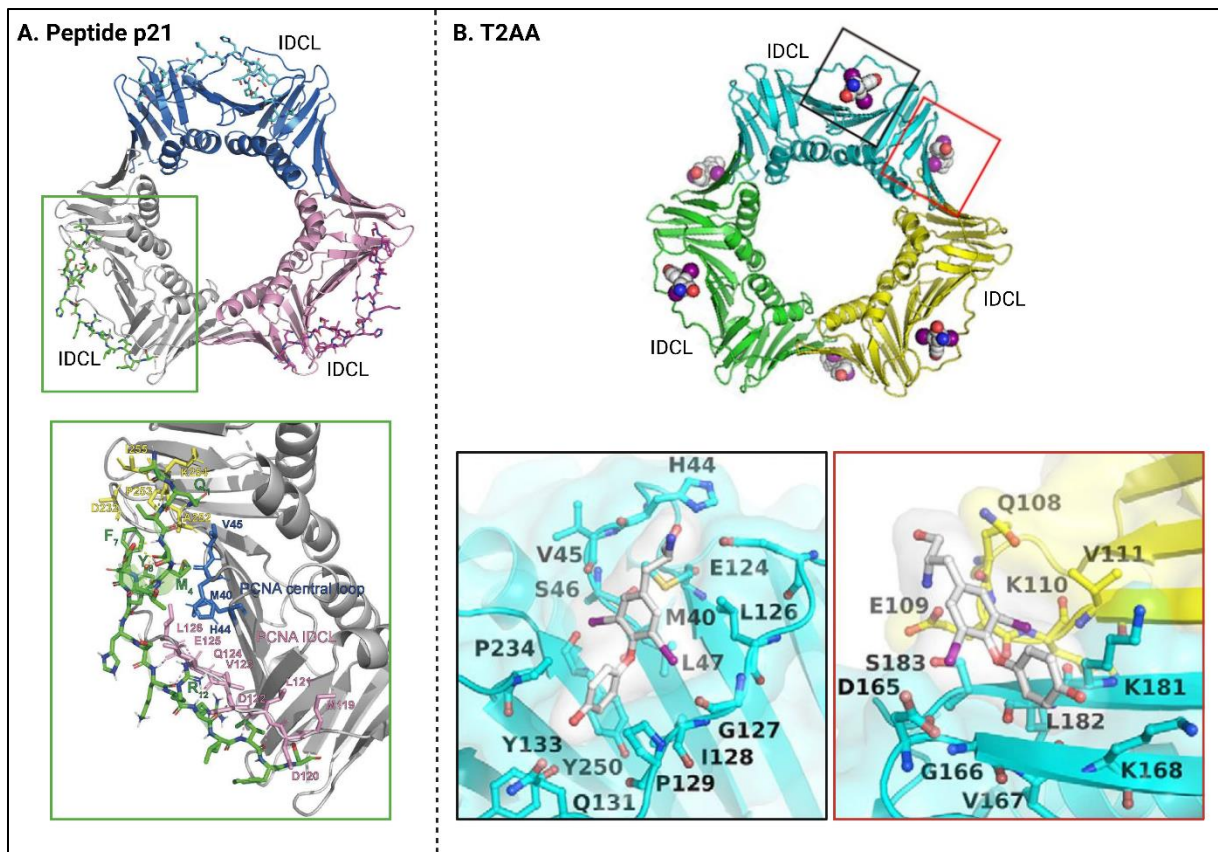
#### 1) Peptide p21

La protéine p21 est le partenaire de PCNA présentant la plus grande affinité de liaison pour celle-ci (Waga et al. 1994 ; Bruning et Shamoo 2004). Ainsi, la protéine p21 fonctionne comme un compétiteur des interactions entre PCNA et d'autres protéines partenaires, entravant les fonctions cellulaires de PCNA. L'activité inhibitrice de p21 est présente dans sa partie C-terminale (J. Chen et al. 1995). Dans cette partie C-terminale est présente la PIP-box entourée par des résidus basiques qui contribuent à sa grande affinité de liaison à PCNA (Warbrick et al. 1998 ; Prestel et al. 2019) (**Figure 15A**). En effet, les résidus C-terminaux de la PIP-box forment une interface de liaison étendue avec les résidus IDCL de PCNA (Sakurai et al. 2005 ; De Biasio et Blanco 2013 ; Kroker et Bruning 2015) (**Figure 15A**). En raison de son affinité de liaison à PCNA beaucoup plus élevée, p21 peut déplacer les ADN polymérase répliquatives (Bruning et Shamoo 2004). De plus, la protéine p21 agit également comme un inhibiteur de certaines enzymes appelées cyclines-dépendantes kinases (CDK) (Harper et al. 1993 ; 1995 ; Xiong et al. 1993). Ces CDK sont responsables de la régulation du cycle cellulaire et jouent un

rôle crucial dans la progression de la cellule d'une phase du cycle cellulaire à une autre. La protéine p21 est donc une protéine suppresseur de tumeur.

Le peptide p21 fait référence à une petite chaîne d'acides aminés correspondant aux résidus 141 à 160 du domaine C-terminal de la protéine p21. La structure entre le peptide p21 et le PCNA humain a été déterminée par cristallographie en 1996 (Gulbis et al. 1996). Celle-ci a permis de mettre en évidence que la PIP-box du peptide p21 interagit avec l'IDCL de PCNA en s'insérant dans une poche hydrophobe. Néanmoins, la liaison de p21 à PCNA n'induit ni une modification de l'oligomérisation de la protéine ni une inhibition de son interaction avec l'ADN au niveau de la partie interne (Gulbis et al. 1996). Ceci suggérait que le peptide p21 serait un peptide synthétique mimant les fonctions de la protéine p21 en rentrant en compétition avec les autres partenaires de PCNA.

Lorsque le peptide p21 couplé à une séquence RYIRS (arginine-tyrosine-isoleucine-arginine-sérine) est ajouté dans le milieu de culture des neutrophiles, il va pénétrer dans le cytoplasme de ceux-ci et modifier la plateforme PCNA. Les peptides p21 entrent en compétition avec les pro-caspases pour se lier au PCNA. Les pro-caspases se dissocient du PCNA, qui est ensuite dégradé par le protéasome. Les pro-caspases libérées sont activées, entraînant l'apoptose des neutrophiles (Witko-Sarsat et al. 2010). Puisque p21 peut neutraliser les effets pro-survie du PCNA dans les neutrophiles, il pourrait être utilisé comme agent de résolution lors de l'inflammation (Witko-Sarsat et Ohayon 2016). Soutenant cette hypothèse, il a été montré que l'inflammation, caractérisée par un recrutement accru de neutrophiles, était beaucoup plus significative chez les souris p21<sup>-/-</sup> infectées par *Pseudomonas aeruginosa* par rapport aux souris de type sauvage (Martin et al. 2016). De plus, le traitement des neutrophiles isolés de patients atteints de mucoviscidose par le peptide p21 a entraîné l'apoptose de ces cellules (Martin et al. 2016). Ces résultats confirmaient un rôle de p21 dans la résolution de l'inflammation.



**Figure 15: Structure tridimensionnelle de PCNA en interaction avec le peptide p21 ou le T2AA**

Le complexe trimérique de PCNA est illustré en interactions avec le peptide p21 (A) et avec le T2AA (B), deux inhibiteurs de l'interaction de PCNA avec ses partenaires. PCNA interagit avec le peptide p21 (A, encadré vert) et avec le T2AA (B, encadré noir) au niveau de l'interdomain connecting loop (IDCL). Le T2AA se lie également à une cavité peu profonde sur l'interface de PCNA adjacente à la Lysine 164 (B, encadré rouge). D'après (Slade 2018; Inoue et al. 2014). Created with BioRender.com

## 2) T2AA

Le T2AA est un inhibiteur non peptidique de PCNA dérivé de l'hormone thyroïdienne T3 (3,3',5-triiodothyronine), mais ne présentant aucune activité hormonale (Punchihewa et al. 2012). Tout comme p21, T2AA peut se fixer au niveau de l'IDCL de PCNA (Figure 15B) (Punchihewa et al. 2012). De plus, T2AA peut également se lier à un autre site de liaison, une cavité moins profonde située à l'interface de l'homotrimère PCNA, à proximité de la lysine 164 (**Figure 15B**). Ce site est impliqué dans la monoubiquitination de PCNA comme nous le verrons dans la section « Régulation de PCNA » (Inoue et al. 2014). Le T2AA possède deux anneaux aromatiques qui lui confèrent la capacité de se fixer dans la cavité adjacente à la lysine 164. En bloquant les interactions du PCNA monoubiquitiné avec ses partenaires, le T2AA perturbe l'interaction du PCNA avec diverses protéines qui ont une préférence pour le PCNA

monoubiquitiné. Cependant, il convient de noter que la molécule T2AA présente une affinité plus faible au niveau de ce deuxième site par rapport à celle observée au niveau de l'IDCL.

Dans le noyau, le T2AA inhibe l'interaction du PCNA avec plusieurs de ces partenaires, entraînant l'inhibition de la synthèse de l'ADN (Inoue et al. 2014). De plus, le T2AA peut également interférer avec l'interaction entre le PCNA cytoplasmique et ses partenaires dans le neutrophile. Dans un contexte inflammatoire, tel que la colite induite pharmacologiquement chez la souris (une inflammation de la muqueuse du gros intestin), le T2AA a démontré des effets bénéfiques, notamment la réduction du stress oxydatif, l'accélération de la réparation de la muqueuse intestinale et la promotion de la résolution de l'inflammation.

Ces effets anti-inflammatoires puissants du T2AA résultent de la déstabilisation de l'échafaudage cytoplasmique du PCNA dans les neutrophiles, ce qui conduit à l'inhibition de la NADPH oxydase (Ohayon et al. 2019).

## Objectifs de la thèse

PCNA est une protéine nucléaire essentielle à la réplication et à la réparation de l'ADN (Moldovan, Pfander, et Jentsch 2007). Dans le neutrophile, cellule mature différenciée qui ne prolifère pas, PCNA est exclusivement cytosolique et agit comme une protéine d'échafaudage qui exerce diverses fonctions régulatrices dépendantes de ses protéines partenaires (Bouayad et al. 2012). En particulier, PCNA exerce un rôle anti-apoptotique en interagissant avec les pro-Caspases-3/8/9/10 qui ne peuvent plus être activées (Witko-Sarsat et al. 2010). Le peptide p21 et le T2AA sont 2 composés dissociant ces interactions en se fixant à PCNA. Ils sont pro-apoptotiques et anti-inflammatoires dans différents modèles (Witko-Sarsat et al. 2010; Martin et al. 2016; Ohayon et al. 2019), faisant de PCNA une cible thérapeutique dans des maladies inflammatoires.

L'inflammasome NLRP3 est un complexe multiprotéique composé des protéines NLRP3, ASC et pro-Caspase-1 (Lamkanfi et Kanneganti 2010). Il est activé en réponse à des signaux de stress et de danger, et conduit à l'activation de la Caspase-1. Dans les macrophages, il induit la sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et une mort inflammatoire par pyroptose. D'autres protéines participent à l'activation de l'inflammasome telles que la kinase NEK7, la protéine adaptatrice FADD et la pro-Caspase-8 (He et al. 2016 ; Gurung et al. 2014). Etant donné que PCNA est capable de former un complexe moléculaire régulant l'activité des caspases, et que les pro-Caspases-1 et 8 font partie de l'inflammasome NLRP3, nous avons émis l'hypothèse que la protéine PCNA pourrait servir de plateforme de régulation de l'inflammasome NLRP3 via son interaction avec des caspases.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été de valider un modèle d'étude. L'activité de l'inflammasome NLRP3 est régulièrement étudiée *in vitro* dans la lignée myélomonocytaire THP1. J'ai donc montré dans un premier temps que, lors de la différenciation des cellules THP-1 en macrophages induite par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), la protéine PCNA était majoritairement relocalisée dans le cytoplasme des cellules. Les THP-1 macrophagiques constituaient donc un modèle pertinent pour étudier la régulation de l'inflammasome NLRP3 par la protéine PCNA cytoplasmique.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse a été d'identifier si la protéine PCNA était impliquée dans la régulation de l'activation des inflammasomes NLRP3 canonique et non

canonique dans les cellules THP-1 différenciées en macrophages. Pour ce faire, l'effet de deux inhibiteurs de l'interaction de PCNA avec ses partenaires, le peptide p21 et le T2AA, sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par divers stimuli (nigéricine, MSU et bactéries entéropathogènes) a été étudié. L'activation de l'inflammasome NLRP3 a été évaluée en mesurant la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par ELISA ainsi que l'activation (clivage des proformes) de la pro-Caspase-1 et de la protéine pyroptotique GSDMD par western blot. Mes résultats ayant montré que la protéine PCNA cytoplasmique était effectivement impliquée dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à des signaux canoniques et non canoniques, et PCNA agissant comme une protéine d'échafaudage, mon troisième objectif a été de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents à la régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par la protéine PCNA cytoplasmique. Pour cela, j'ai voulu identifier les partenaires de la protéine PCNA, en ciblant les composants de l'inflammasome NLRP3, dans des cellules THP-1 macrophagiques au repos ou activées par la nigéricine (voie canonique de l'inflammasome). J'ai utilisé des techniques de microscopie (immunofluorescence et test de liaison de proximité) ainsi que des co-immunoprécipitations pour déterminer si l'un des composants de l'inflammasome NLRP3 interagissait avec PCNA dans des conditions basales ou après activation de l'inflammasome.

Enfin, mon quatrième objectif était de confirmer ces résultats dans un contexte physiopathologique. J'ai donc étendu mon étude aux macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages ou invalidées pour la protéine p21. La sécrétion d'IL-1 $\beta$  par ces macrophages, en conditions basales et après stimulation de l'inflammasome NLRP3, a été mesurée par test ELISA.

# Résultats

# Article 1

## **The cytoplasmic scaffolding protein PCNA as a new regulator of activation of the classical NLRP3 inflammasome**

L'inflammasome NLRP3 est un complexe multiprotéique composé des protéines NLRP3, ASC et pro-Caspase-1 (Lamkanfi et Kanneganti 2010). Il est activé en réponse à des signaux de stress et de danger, et conduit à l'activation de la Caspase-1. Dans les macrophages, il induit la sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et une mort inflammatoire par pyroptose, par clivage de la gasdermine D (GSDMD). D'autres protéines participent à l'activation de l'inflammasome telles que la pro-Caspase-8 et l'adaptateur FADD, deux protéines impliquées dans la mort cellulaire et l'inflammation (Gurung et al. 2014). La protéine NEK7 (Never in mitosis A (NIMA)-related kinase 7) est également l'une de ces protéines (Y. He et al. 2016; H. Shi et al. 2016).

Les inflammasomes sont principalement exprimés dans les cellules myéloïdes, notamment les monocytes/macrophages et les neutrophiles, bien que la signalisation moléculaire puisse différer entre ces cellules.

PCNA est une protéine nucléaire essentielle à la réplication et à la réparation de l'ADN (Moldovan, Pfander, et Jentsch 2007). La protéine PCNA n'a aucune activité enzymatique mais est une protéine d'échafaudage qui se lie à de nombreuses protéines. Dans le neutrophile, cellule différenciée qui ne prolifère pas, PCNA est exclusivement cytoplasmique et contrôle la balance survie/apoptose. PCNA exerce un rôle anti-apoptotique en interagissant avec les pro-Caspases-3/8/9/10 qui ne peuvent plus être activées (Witko-Sarsat et al. 2010; Witko-Sarsat et Ohayon 2016).

Etant donné que la protéine PCNA cytoplasmique, grâce à sa fonction d'échafaudage, est capable de former un complexe moléculaire régulant l'activité des Caspases, et que les pro-Caspases-1/4/5/8 font partie de l'inflammasome NLRP3, nous avons émis l'hypothèse que la protéine PCNA pourrait servir de plateforme de régulation de l'inflammasome NLRP3 via son interaction avec des Caspases. Cela pourrait se produire également via son interaction avec d'autres protéines du complexe inflammasome telles que FADD ou ASC, qui possèdent des domaines d'homologie.



Pour évaluer notre hypothèse selon laquelle la protéine PCNA cytoplasmique pourrait être un régulateur de l'inflammasome, nous avons choisi d'étudier l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages, cellules dans lesquelles les voies de signalisation des inflammasomes NLRP3 classiques ont été clairement définies. J'ai utilisé un modèle d'étude *in vitro* consistant en la culture de la lignée myélomonocytaire humaine THP-1. J'ai montré dans un premier temps que, lors de la différenciation des cellules THP-1 en macrophages par le PMA, il y avait une relocalisation majoritairement cytoplasmique de PCNA, reflétant l'expression de PCNA dans les neutrophiles matures. Les cellules THP-1 macrophagiques constituaient donc un bon modèle d'étude de la régulation de l'inflammasome NLRP3 par la protéine PCNA cytoplasmique.

Le peptide p21 et la molécule T2AA sont 2 composés qui, en se fixant à PCNA, dissocient les interactions entre PCNA et ces partenaires. Ils exercent des activités pro-apoptotique et anti-inflammatoire dans différents modèles murins (Martin et al. 2016; Ohayon et al. 2019), faisant de PCNA une cible thérapeutique en situations inflammatoires. J'ai montré, dans les cellules macrophagiques THP-1, que l'inhibition de l'interaction de la protéine PCNA cytoplasmique avec ses partenaires, par le peptide p21, entraînait une réduction de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par la nigéricine, une toxine bactérienne connue pour activer cet inflammasome. Cependant, cette inhibition n'a pas été observée dans les cellules monocytaires THP-1, dans lesquelles la protéine PCNA est principalement localisée dans le noyau. De plus, j'ai également confirmé cette diminution de l'activation de la voie NLRP3 en montrant une réduction à la fois du clivage de la pro-Caspase-1 et de la GSDMD. Ainsi, le peptide p21 inhibait la sécrétion d'IL-1 $\beta$  inflammatoire ainsi que la mort inflammatoire par pyroptose, deux processus induits par l'inflammasome NLRP3. Par la suite, j'ai constaté que l'activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigéricine entraînait la sécrétion de PCNA dans le milieu de culture. Les protéines appartenant au complexe inflammasome NLRP3, notamment ASC, NLRP3, Caspase-1, Caspase-8 et FADD, sont déjà connues comme étant co-sécrétées avec l'IL-1 $\beta$  après l'activation de l'inflammasome. Ces résultats suggèrent fortement que la protéine PCNA cytoplasmique pourrait faire partie du complexe inflammasome NLRP3 et que sa fonction de protéine d'échafaudage pourrait lui permettre de réguler l'activation de ce complexe. En revanche, dans le même modèle cellulaire, je n'ai pas observé d'effet significatif du T2AA sur l'activation de l'inflammasome. Comme le peptide p21 et le T2AA n'entravent pas les mêmes sites d'interaction sur la protéine

PCNA, cela suggère que l'effet de PCNA sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 pourrait être spécifique du site d'interaction. Pour déterminer si la régulation de l'inflammasome NLRP3 par PCNA était spécifique à l'activation par la nigéricine, j'ai reproduit les mêmes expériences avec un autre activateur de l'inflammasome NLRP3, les cristaux de monosodium urate (MSU), qui sont connus pour activer cet inflammasome dans certaines maladies rhumatologiques telles que la goutte. Dans ce contexte, j'ai observé une tendance à la diminution de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en présence du peptide p21, bien que cela ne soit pas significatif. En revanche, le T2AA a induit une réduction significative de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par les cristaux de MSU. De plus, j'ai constaté une réduction du clivage de la pro-Caspase-1 et de la GSDMD en présence de T2AA, mais pas en présence du peptide p21. Ces résultats indiquent que la protéine PCNA cytoplasmique serait également impliquée dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 dans le contexte de l'activation par les cristaux de MSU. Étant donné que le p21 et le T2AA peuvent empêcher les protéines de se lier à différents sites de PCNA, différents partenaires protéiques pourraient donc être impliqués dans l'induction de l'inflammasome, en fonction des stimuli. J'ai poursuivi mes recherches en étudiant l'implication de la protéine PCNA cytoplasmique dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique, via la stimulation par des bactéries *E. coli* entéropathogènes, dans les cellules THP-1 macrophagiques. J'ai montré que l'inhibition de l'interaction de PCNA avec ses partenaires, à la fois par le peptide p21 et le T2AA, entraînait une réduction de l'activation de l'inflammasome non canonique, mesurée par la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . Cependant, le clivage de la pro-Caspase-4, qui est activée en premier lieu lors de l'activation non canonique, n'était pas inhibé. De façon cohérente, la GSDMD, qui est clivée par la Caspase-4 dans cette voie, n'a pas non plus été impactée. Ces résultats ont confirmé que la protéine PCNA cytoplasmique pourrait réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique, mais n'affecterait pas l'axe Caspase-4/GSDMD.

J'ai ensuite entrepris d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents à la régulation de l'inflammasome NLRP3 par la protéine PCNA. Pour ce faire, j'ai examiné si les protéines du complexe inflammasome pouvaient interagir avec PCNA, que ce soit à l'état basal ou après activation de l'inflammasome par la nigéricine. En utilisant la technique de ligation de proximité par Duolink, qui permet de visualiser les interactions entre protéines *in situ*, j'ai observé une interaction entre PCNA et ASC après activation de l'inflammasome, alors qu'elle n'était pas présente à l'état basal. Pour confirmer ces résultats, j'ai effectué des expériences de co-immunoprécipitation de la protéine PCNA cytoplasmique. Ces expériences ont révélé

une interaction entre PCNA et NLRP3 aussi bien à l'état basal, qu'après activation par la nigéricine, ainsi qu'une interaction entre PCNA cytoplasmique et NEK7 après activation, qui est diminuée par le peptide p21. L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine PCNA cytoplasmique pourrait faire partie du complexe inflammasome NLRP3 et qu'elle serait essentielle pour le recrutement de la kinase NEK7, contribuant ainsi à l'activation complète de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages THP-1.

Enfin, pour confirmer ces découvertes dans un contexte plus physiologique, j'ai utilisé des macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages ou invalidées pour la protéine p21 (KO p21). J'ai ainsi déterminé que les macrophages KO p21 sécrétaient plus d'IL-1 $\beta$  après stimulation par la nigéricine que les macrophages sauvages, suggérant que la protéine p21 puisse agir comme un répresseur naturel de l'activation de l'inflammasome NLRP3, et renforçant l'idée que la protéine PCNA cytoplasmique jouerait un rôle clé dans la régulation de cet inflammasome.

## The cytoplasmic scaffolding protein PCNA as a new regulator of activation of the classical NLRP3 inflammasome

Chloé Lopes<sup>1</sup>, Karen Aymonnier<sup>1</sup>, Nicolas Cagnard<sup>2</sup>, Marcio Do Cruzeiro<sup>1,3</sup>, Véronique Witko-Sarsat<sup>1</sup>, Léa Tourneur<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Cité, INSERM U1016, CNRS 8104, Institut Cochin, Paris, France

<sup>2</sup>Plateforme Bio-informatique, Université Paris Cité, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR 3633, Paris, France

<sup>3</sup>Plate-forme de Recombinaison Homologue, Institut Cochin, INSERM, Paris, France

<sup>4</sup>INSERM UMR\_S942 MASCOT Université Paris Cité, Paris, France

**Keywords:** Inflammasome, NLRP3, PCNA, NEK7, macrophages, scaffold.

### Abstract

**Introduction:** The NLRP3 inflammasome is composed of the NLRP3 sensor, the ASC adaptor and the Caspase-1 effector. However, a large number of proteins are involved in its priming, activation and regulation. Among them, the serine/threonine kinase NEK7, implicated in mitosis, interacts with NLRP3 to manage inflammasome assembly and activation. PCNA is a nuclear scaffolding protein essential for DNA replication whose functions depend on associated proteins. In the neutrophil, a differentiated cell that does not proliferate, the PCNA is exclusively cytoplasmic and regulates neutrophil functions through interactions with different protein partners. That includes pro-Caspases-3/8/9/10 to regulate apoptosis and the p47phox subunit of NADPH oxidase to regulate the production of reactive oxygen species. We therefore hypothesize that cytoplasmic PCNA could serve as a regulatory platform for the NLRP3 inflammasome via its interaction with its components.

**Methods:** We investigated PCNA role in PMA-differentiated THP-1 macrophages, in which PCNA was mainly relocated in the cytoplasm and the signaling pathways of NLRP3 inflammasomes were clearly defined. The p21 peptide binds to PCNA with high affinity and allows the dissociation of the interactions of PCNA with its other partners.

**Results:** We showed that the p21 peptide inhibited nigericin-induced IL-1 $\beta$  secretion, pro-Caspase-1 cleavage and pyroptosis-activating gasdermin D cleavage. By contrast, only the chemical T2AA, which binds to PCNA at different sites than p21 peptide, inhibited NLRP3

inflammasome activation by monosodium urate crystals. However, both p21 peptide and T2AA inhibited IL-1 $\beta$  secretion induced by phagocytosis of *Escherichia coli* bacteria. Moreover, preliminary results suggested that nigericin-stimulation could result in the binding of cytoplasmic PCNA to both NLRP3 and NEK7, and that the p21 peptide could disrupt the PCNA-NEK7 interaction. Finally, using bone marrow-derived macrophages from p21 knockout mice, we suggested that the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 could be a natural repressor of the NLRP3 inflammasome.

**Discussion:** These results suggested that preventing the interaction of PCNA with its partners could inhibit the activation of both the canonical and non-canonical NLRP3 inflammasomes in THP-1 macrophages, suggested that PCNA could be a new regulator of the NLRP3 inflammasome activation in macrophages. Exact molecular mechanism should be deciphered more precisely.

## 1. INTRODUCTION

Inflammasomes are multiprotein complexes activated in response to stress or danger signals (1). They are composed of a pattern recognition receptors (PRR) that senses danger/damage-associated molecular patterns (DAMP) or pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Following the recognition of dangerous particulates, the sensor PRR assembles with an adaptor protein termed ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain) leading to the recruitment and auto-activation of the effector inflammatory pro-Caspase-1. Activated Caspase-1 then mediates both maturation by proteolytic cleavage and unconventional secretion of the proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 (2,3). Caspase-1 also induced gasdermin D (GSDMD) cleavage, liberating its cytotoxic N-terminal fragment that oligomerizes to form large pores into the plasma membrane, leading to pyroptosis, an inflammatory form of cell death (4).

The NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) inflammasome (5), composed of the NLRP3 sensor PRR, is the most extensively studied inflammasome (6). Full NLRP3 inflammasome activation requires two steps. The first one, which is not essential, is the priming mediated by Toll-like receptor (TLR) agonists such as lipopolysaccharide (LPS), allowing transcription of genes encoding components of the inflammasome. The second one is the activation step induced by plenty of infectious and stress-associated signals, the most potent in vitro being the bacterial toxin nigericin (2). Whatever the activation signal, it leads

to a potassium efflux out of the cell, which is the only common mechanism identified for canonical NLRP3 inflammasome activation by all stimuli (7,8). In addition to this canonical pathway, a non-canonical pathway is induced by a unique trigger that is intracellular LPS from phagocytosed Gram-negative bacteria. Non-canonical NLRP3 inflammasome requires Caspase-11 in mice or Caspases-4/5 in humans that recognize intracellular LPS (9,10). Thereafter, Caspases-4/11 cleave the pore-forming protein GSDMD leading to potassium efflux and activation of the NLRP3 inflammasome (6).

Despite the fact the NLRP3 inflammasome itself is composed of NLRP3-ASC-Caspase-1, several other proteins are involved in its priming and activation (11). Among these proteins, FADD adaptor and Caspase-8, two proteins implicated in cell death and inflammation, are necessary for both the priming and activation of the canonical and non-canonical NLRP3 inflammasome (12). NEK7 (never in mitosis A (NIMA)-related kinase 7) is another of these proteins (13). Downstream of the potassium efflux, the catalytic domain of NEK7 interacts with both the leucine-rich repeat (LRR) domain and the NACHT domain of NLRP3 (14). This process does not require the kinase activity of NEK7. The formation of a NEK7-NLRP3 complex allows NLRP3-ASC complex formation, ASC oligomerization, and Caspase-1 activation (15). Since NEK7 is implicated in mitosis, NLRP3 inflammasome activation is restricted to the interphase of the cell cycle (16).

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a nuclear protein essential for DNA replication and repair (17). PCNA has no enzymatic activity but is a scaffolding protein that binds to numerous proteins. In the neutrophil, a differentiated cell which does not proliferate, the PCNA is exclusively cytosolic and exerts various regulatory functions dependent on its partner proteins (18). PCNA plays an anti-apoptotic role by interacting with pro-Caspases-3/8/9/10, which can no longer be activated, allowing the neutrophil to survive (19). PCNA also interacts with the p47phox subunit of NADPH oxidase, regulating the production of reactive oxygen species (ROS) (20). In myeloid leukemic precursors, PCNA controls glycolysis via its interaction with nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), thereby promoting cell survival and chemoresistance (21). The p21 peptide and the chemical T2AA (T2 Amino Alcohol) are 2 compounds that dissociate these interactions by binding to PCNA. They are proapoptotic and anti-inflammatory in different models, making PCNA a therapeutic target in inflammatory diseases.

Inflammasomes are mainly expressed in myeloid cells, including monocytes/macrophages and neutrophils, although the molecular signaling can differ between these cells (22). Since cytoplasmic PCNA can regulate survival and activation of neutrophils through its scaffolding function, we hypothesize that cytoplasmic PCNA could serve as a platform for regulating the NLRP3 inflammasome. This could occur for example via its interaction with pro-Caspases or other proteins such as FADD or ASC, which have homology domains, or via the regulation of ROS production that contributes to inflammasome activation (6). To evaluate our hypothesis, we chose to investigate the NLRP3 inflammasome in macrophages, in which the signaling pathways of classical NLRP3 inflammasomes have been clearly defined (11).

Our study showed that differentiation of monocytes into macrophages induced a predominantly cytoplasmic relocation of PCNA. Moreover, cytoplasmic PCNA could regulate both the canonical and non-canonical NLRP3 inflammasomes through its scaffolding function. Indeed, p21 peptide and/or T2AA were able to inhibit IL-1 $\beta$  secretion by macrophages, depending the stimuli. Our preliminary results suggested that stimulation of the NLRP3 inflammasome could result in the binding of NLRP3 and NEK7 to cytoplasmic PCNA, and that disruption of the NLRP3-NEK7 interaction could impair inflammasome activation. Finally, we suggested that the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 could be a natural repressor of the NLRP3 inflammasome *in vivo*. Thus, our study identified PCNA as a potential new regulator of the NLRP3 inflammasome in macrophages.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Cell culture**

THP1 were grown respectively in RPMI 1640 with GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Biosera), 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin mix (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco) and  $5 \times 10^{-5}$  mol/l 2-mercaptoethanol (Life Technologies) under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

For THP-1 differentiation into macrophages, cells were cultured in 24-well plates for 3 h with 300 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at a density of  $3 \times 10^5$  cells per well and then cultured 3 days in complete RPMI 1640 medium without PMA.

The human L929 cells were cultured in DMEM with GlutaMAX (Gibco), supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Biosera), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin mix (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco) and 1X Minimum essential medium, Non-Essential Amino Acids (NEAA, Gibco). The conditioned L929 medium is obtained after 10 days of growing L929 cells at confluence in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. The medium is then centrifuged at 1500 g for 10 min to remove any detached cells, filtered (0.22 µM) and conserved at -80 °C until use.

## 2.2 Reagents

Nigericin, LPS from *E. coli* strain 0111:B4, and PMA were from Sigma-Aldrich. The MSU crystals were kindly donated by H.K. EA (INSERM UMRS1132, Université Paris-Cité, hôpital Lariboisière, Paris, France). Primary monoclonal rabbit IgG anti-NLRP3 (clone D2P5E), monoclonal rabbit IgG anti-CASPASE-1 (clone D7F10), monoclonal rabbit IgG anti-cleaved CASPASE-1 Asp 297 (clone D57A2), monoclonal rabbit IgG anti-TMS1/ASC (clone E1E3I) and monoclonal rabbit IgG anti-cleaved GSDMD Asp 275 (clone E7H9G), monoclonal rabbit IgG anti-CASPASE-4 (4450S); monoclonal rabbit IgG anti-NEK7 (clone C34C3) antibodies were from Cell Signaling Technology. Polyclonal rabbit IgG anti-GSDMD antibody was from Proteintech. Monoclonal mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) clone PC10 was from Dako. Polyclonal rabbit anti-PCNA clone ab5 was from Calbiochem. PCNA Polyclonal antibody rabbit (PA5-81628) was from Invitrogen. Rabbit (DA1E) mAb IgG XP(R) Isotype control was from Cell Signaling Technology. Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG, F(ab')<sub>2</sub> Fragment Specific (111-035-006), and Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub> Fragment Specific (115-035-006) secondary antibodies used for immunoblot were from Jackson ImmunoResearch. For immunofluorescence studies, we used Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated from Dako (E0432) or Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) from Vector (BA-200) and then Streptavidin Alexa Fluor 555 conjugate from Invitrogen (S32355). Hoechst 33342 solution was from ThermoScientific. We used primary antibody ASC/TMS1/PYCARD (B-3) (sc-514414) from Santa Cruz. For co-immunoprecipitation we used µMACS Protein A Microbeads (130-071-001), MACS Separation µ Columns (130-042-701) and µMACS™ Separator from Miltenyi Biotec.



### 2.3 Mice

p21/Waf1 knockout mice (p21<sup>-/-</sup>) were obtained from The Jackson Laboratory (B6;129S2-Cdkn1atm1Tyj/J; Bar Harbor, ME) and housed with their wild-type (WT) littermate controls. Mice were bred and maintained in pathogen-free animal facilities at Cochin Institute, and were used between 12-15 weeks of age. All animal experiments were conducted in accordance with the European Community Guidelines and were approved by Université Paris Descartes Ethics Committee for Animal Research. The animal facility agreement number is C-75-14-02.

### 2.4 In vitro culture of primary mouse macrophages

The femurs and tibias bone marrow cells were harvested from mice after euthanasia through cervical dislocation. Bone marrow-derived macrophages were obtained by flushing femurs and tibia 3-4 times with DMEM with GlutaMAX (Gibco), supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Biosera), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin mix (Gibco) and 10 mM HEPES (Gibco). The bone marrow-cell suspension was filtered using a 40 µm cell strainer, then cells were pelleted by 5 minutes centrifugation at 1300 rpm. Red blood cells were lysed with ACK buffer for 5 min at RT. Lysis was stopped by adding culture medium and then cells were centrifuged 10 min at 1300 rpm. After cells count was determined, the required cell density was adjusted and the primary mouse bone marrow cells were cultured in IMDM, 25 mM HEPES with GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin mix, and 20% L929 conditioned medium for 7 days. Adherent cells were used as bone marrow derived-macrophages (BMDMs).

### 2.5 Cell stimulation and PCNA inhibition

PMA differentiated THP-1 cells or monocytic THP-1 cells were stimulated in RPMI 1640 with 10% FBS in 24-well plates at a density of  $3 \times 10^5$  cells per well. Monocytic THP-1 cells were primed with LPS at 200 ng/ml during 4 h. If not otherwise indicated, NLRP3 activation of THP-1 monocytes and macrophages was achieved with a final concentration of 20 µM of nigericin for 1 h, 200 ng/ml of MSU for 3 h or with live *E. coli* strain O127: H6 (EPEC, E2348/69, kind gift from Julie Guignot) at a multiplicity of infection of 20 for 2.5 h followed by 16 h incubation following addition of 100 units/ml penicillin/streptomycin to kill living bacteria.

Mouse BMDMs were primed or not with LPS (10 ng/ml) overnight in DMEM with 10% FBS. Then cells were stimulated in 24-well plates at a density of  $1 \times 10^6$  cells per well in a medium without FBS. NLRP3 activation of mouse BMDMs was achieved with a final concentration of 5  $\mu$ M of nigericin for 1 h.

To inhibit the interaction of PCNA with its partners, cells were pre-treated for 1 h with the p21 peptide (p21-IRS peptide: KRRQTSMTDFYHSKRRLIFSRYS, Genecust) or the chemical T2AA (Sigma\_Aldrich, SML0794) at different final concentration (1, 5, 10 or 25  $\mu$ M) before activation of the inflammasome by nigericin or MSU crystals. The mutated homologue p21 peptide (p21m) (p21 mute-IRS peptide: KRRQTGETDFDHAKAALIFSRYS, Genecust), not allowing inhibition, was used as control.

Following infection of THP-1 cells with *E.coli.*, p21, p21m or T2AA were added at the same time as penicillin/streptomycin.

Following cells stimulation, culture supernatants were collected directly and then centrifuged 5 minutes at 2000 rpm. All supernatants were then stored at  $-20$  °C.

For each experiment, each culture condition was performed in triplicate.

## 2.6 ELISA

To detect secreted IL-1 $\beta$ , PBS-Tween 20 (PBS-T) was added to the collected supernatants to obtain a final concentration of 0.05% Tween 20 that were then heated for 5 min at 95 °C. IL-1 $\beta$  levels were measured using human IL-1 beta Uncoated ELISA kit (Invitrogen, 88-7261-88) or Mouse IL-1 beta Uncoated ELISA kit (Invitrogen, 88-7013-88) according to the manufacturer's instructions. Briefly, capture antibodies (1 :250) were coated overnight at 4 °C. ELISA/ELISPOT Diluent Buffer was used for blocking of nonspecific-binding sites and for diluting the Detection Antibody and Enzyme. Samples and recombinant human or mouse IL-1 $\beta$  protein (Invitrogen) that were used to perform standard range (2-150 pg/ml for human and 8-100 pg/ml for mouse) were incubated 2 h at room temperature (RT) or overnight at 4 °C. Detection Antibodies (1:250) were incubated 1 h at RT followed by Avidin-HRP (1:250 for human, 1:100 for mouse) during 30 min at RT. The colorimetric reaction was revealed by adding 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB) during 15 min at RT. Reaction was stopped with 2 N sulfuric acid and the plates were read at 450 nm with a MRX Revelation microplate reader (Dynex Technologies).

## **2.7 Immunofluorescence labeling and microscopy analysis**

To perform cytopins,  $2 \times 10^5$  THP-1 cells or mouse BMDMs were cytocentrifuged on SuperFrost™ Plus adhesion microscope slides (epredia) 3 min at 300 g using Cytospin 3 (Shandon). Then, cells were fixed in PBS containing 4% formaldehyde (Sigma) for 20 min on ice, permeabilized with Triton X-100 (0.25%) for 5 min at RT and blocked with PBS 1% BSA for at least 30 min at RT. Then, cells were incubated at RT with primary antibodies (diluted in PBS 1% BSA) for 1 h followed by biotinylated antibodies (diluted 1:150 in PBS 1% BSA) for 30 min and then by streptavidin-coupled Alexa Fluor 555 (diluted 1:1000 in PBS 1% BSA) for 30 min. Nuclei were stained with Hoechst 33342 solution (diluted 1:6000 in PBS) for 10 min. Slides were mounted using Fluoromount-G™ medium (Invitrogen). Image acquisition were performed at the Cochin Institute Imaging Facility (IMAG'IC, INSERM U1016, Paris, France) using a fluorescence microscope (Widefield Zeiss Observer Z1). Imaging of Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 and Hoechst was obtained using the multitrack mode. Digital pictures were analyzed using Inscoper\_7.2.1 software (Molecular Devices). Quantification was carried out using the ImageJ software, version 1.53e.

## **2.8 Duolink® Proximity Ligation Assay (PLA)**

Duolink II proximity ligation assay kit (PLA-probe anti-rabbit plus, catalog #DUO92004-30RXN; PLA-probe anti-mouse minus, catalog #DUO92006-30RXN; Detection Kit Orange, catalog #DUO92007-100RXN) was used according to the manufacturer's instructions (Merck Sigma-Aldrich). Briefly, the cytopsin slides of THP-1 cells or mouse BMDMs were pretreated the same as indicated above for immunofluorescence staining. After 60 min of blocking in Blocking solution (sigma, DUO82007) at 37 °C in a preheated humidity chamber, cells were co-incubated with anti-PCNA (ab5; 1:200) and anti-ASC (1:200) primary antibodies overnight at 37 °C in a preheated humidity chamber. After washing three times in PBS 1X for 10 min, Duolink II PLA PLUS and MINUS probes, detecting rabbit and mouse antibodies, respectively, were diluted in the Duolink antibody diluent at a concentration of 1:5 and applied to the cells during 1 h in a preheated humidity chamber at 37 °C. Unbound PLA probes were removed by washing three times in buffer A for 5 min. The sections were incubated for 30 min at 37 °C with the ligation solution consisting of Duolink Ligation Buffer (1:5) and Duolink Ligase (1:40) diluted in high purity water. After ligation, the Duolink Amplification Buffer was diluted 1:5 in high purity water with addition of polymerase (1:80), and then applied to the cells for 100 min.

After washing three times with PBS, slides were mounted with the Duolink in situ mounting medium with DAPI (Sigma). Cells were observed with a fluorescence microscope (Widefield Zeiss Observer Z1). The fluorescent signal is generated only if the proteins of interest are located within 40 nm. Digital pictures were analyzed using Inscoper\_7.2.1 software (Molecular Devices). Quantification was carried out using the ImageJ software, version 1.53e.

## **2.9 Co-immunoprecipitation (co-IP)**

Macrophages were lysed by sonication in 50 mM Hepes, 4 mM PMSF, 400  $\mu$ M leupeptin, 400  $\mu$ M pepstatin, 1 mM orthovanadate, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA and 1 mM DTT, during 10 seconds on ice (Soniprep 150 plus, MSE) and then centrifuged 10 min at 14 000 rpm at 4°C to obtain the cytosolic contents on the supernatant. Protein concentration was measured using the BCA kit (Pierce) and 500  $\mu$ g of cytosolic proteins were mixed with 10  $\mu$ l of protein A microbeads ( $\mu$ MACS Protein A Microbeads, 130-071-001, Miltenyi Biotec) and put 1 h at 4 °C under rotation. The lysate was then passed over a  $\mu$  Columns (MACS Separation  $\mu$  Columns, 130-042-701, Miltenyi Biotec) placed in the magnetic field of the  $\mu$ MACS™ Separator (Miltenyi Biotec) to recover a pre-cleared lysate. The lysate was then mixed with 1  $\mu$ g of anti-PCNA pAb (ThermoFisher) or control isotype Ab and incubated for 1 h at 4 °C under rotation. Then 50  $\mu$ l protein A microbeads ( $\mu$ MACS Protein A Microbeads, 130-071-001, Miltenyi Biotec) was added to the mixed and incubated for 1 h at 4 °C under rotation. This mix was loaded onto a column (MACS Separation  $\mu$  Columns, 130-042-701, Miltenyi Biotec) containing Sepharose-coated magnetic beads and washed four times with a stringent washing buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl and 1% NP-40, pH 8), and then five times with a hyposaline buffer (20 mM Tris, pH 7.5). The proteins were eluted from the column by adding 50  $\mu$ l of preheated 5x Laemmli buffer, and analyzed by Western blot.

## **2.10 Western blot analysis**

Total proteins were extracted using lysis buffer (10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl pH 7.8, 1% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich), containing a protease inhibitors cocktail (complete mini EDTA-free, Roche Diagnostics)). Alternatively, cells were washed with PBS and lysed by direct addition of 5x Laemmli buffer, followed by 5 cycles of sonication. Protein concentration was measured using the BCA kit (Pierce). 30  $\mu$ g of extracted protein were fractionated on SDS-PAGE and then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane with a 0.45 mm pore size

(Millipore, Immobilon-P). The membrane was blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature and probed with specific primary antibodies at 4 °C overnight. PCNA was detected using the PC10 mAb.  $\beta$ -actin was used as loading control. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted in TBS containing 5% non-fat dry milk were incubated 1 h at RT and enhanced chemiluminescence (ECL) Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham<sup>TM</sup>, Cytiva) was applied. Images were acquired using a Fusion FX7 system imaging (Vilbert Lourmat).

### 2.11 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R software. Comparisons were made using the non-parametric Mann-Whitney test. For the measurement of IL-1 $\beta$  secretion in the culture medium, several independent experiments were performed. For statistical analysis, concentrations of IL-1 $\beta$  were normalized to the mean value of the positive control in each experiment. For quantification of densitometric analysis (western blot), data were normalized to the positive control in each experiment. Then, comparisons of all the normalized values were made using the non-parametric Mann-Whitney test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTS

### 3.1 Differentiation of THP-1 monocytes into macrophages induces relocation of PCNA from the nucleus to the cytoplasm

In order to assess the role of PCNA in the regulation of the NLRP3 inflammasome in monocytes and/or macrophages, we used the human myelomonocytic cell line THP-1, which is classically used for inflammasome research. PCNA was localized both in the nucleus and cytoplasm of THP-1 monocytes (**Figure 1A and Supplementary Figure S1A, B**). Differentiation of THP-1 monocytes into macrophages by PMA treatment induced cytoplasmic relocation of PCNA, with PCNA becoming predominantly expressed in the cytoplasm (**Figure 1A, B and Supplementary Figure S1A, B**). As previously described, canonical NLRP3 inflammasome activation by nigericin induced IL-1 $\beta$  secretion by both LPS-primed THP-1 monocytes (**Figure 1C**) and PMA-differentiated THP-1 macrophages (**Figure 1D**). These results suggested that, if PCNA was necessary, mainly the cytoplasmic form should be required for the activation of the NLRP3 inflammasome by nigericin. Moreover, treatment of PMA-differentiated THP-1

macrophages with nigericin did not affect the PCNA protein expression (**Figure 1E**) nor the PCNA localization (**Figure 1F**), demonstrating that nigericin did not induce PCNA degradation or relocation during that time.

### **3.2 Preventing the interaction of PCNA with its partners inhibits the activation of the canonical NLRP3 inflammasome in THP-1 macrophagic cell line**

#### **3.2.1 Cytoplasmic PCNA scaffold is required for NLRP3 inflammasome activation by nigericin in THP-1 macrophages**

We next tested whether preventing PCNA scaffold could impair NLRP3 inflammasome activation both in THP-1 monocytic and macrophagic cells. We used both the p21 peptide and the chemical T2AA that are two compounds allowing the dissociation of PCNA interactions by binding to it. Neither p21 peptide nor T2AA was able to inhibit IL-1 $\beta$  secretion induced by LPS priming followed by nigericin treatment in THP-1 monocytes (**Figure 2A**). However, in PMA-differentiated THP-1 macrophages, in which PCNA expression was almost exclusively cytoplasmic, p21 peptide significantly inhibited nigericin-induced IL-1 $\beta$  secretion (**Figure 2B**). By contrast, neither the mutant p21 peptide deprived of PCNA binding sites, nor the non-peptide inhibitor T2AA, inhibited IL-1 $\beta$  secretion by THP-1 macrophages (**Figure 2B**). As expected, in PMA-differentiated THP-1 macrophages, activation of the NLRP3 inflammasome by nigericin induced cleavage of both pro-Caspase-1 into active Caspase-1 (**Figure 2C**) and of GSDMD liberating the GSDMD N-terminal active fragment (**Figure 2C**). Consistent with what we observed with IL-1 $\beta$  secretion, the p21 peptide, but not the mutant p21 peptide, significantly inhibited the cleavage of both pro-Caspase-1 and GSDMD (**Figure 2C**), whereas none of these treatments significantly affected PCNA expression (**Figure 2D and Supplementary Figure S2A**). All these results suggested that binding of proteins to cytoplasmic PCNA was necessary for NLRP3 inflammasome activation in human macrophagic cell line. We therefore hypothesized that cytoplasmic PCNA could be part of the inflammasome complex. Since proteins belonging to the NLRP3 inflammasome complex including ASC (23), NLRP3 (24), CASPASE-1, CASPASE-8 and FADD (25) can be co-secreted with IL-1 $\beta$  following inflammasome activation, we looked for PCNA in the culture supernatant of THP-1 macrophages. Preliminary data suggested that nigericin-treated THP-1 macrophages, but not untreated cells, released PCNA protein into the culture medium, a process completely inhibited by p21 peptide, but also partially inhibited by the mutant p21 peptide and the T2AA

(**Supplementary Figure S2B**). All these results strongly suggested that cytoplasmic PCNA could belong to the NLRP3 inflammasome complex and that its scaffolding function could regulate the activation of this complex.

### **3.2.2 Cytoplasmic PCNA scaffold is required for NLRP3 inflammasome activation by monosodium urate crystals in THP-1 macrophages**

Monosodium urate (MSU) crystals activate NLRP3 inflammasome after phagocytosis by macrophages, a process largely implicated in gout (26). As previously described, PMA-differentiated THP-1 macrophages secreted IL-1 $\beta$  in response to MSU crystals stimulation (**Figure 2E**). Although p21 peptide induced a slight decrease in IL-1 $\beta$  secretion, this was not significant. However, T2AA significantly decreased IL-1 $\beta$  secretion induced by MSU crystals (**Figure 2E**). T2AA inhibition of MSU-induced-IL-1 $\beta$  secretion was accompanied by an inhibition of the cleavage of both pro-Caspase-1 and GSDMD, whereas p21 peptide had no effect on the cleavage of these proteins (**Figure 2F**). All these results suggested that cytoplasmic PCNA could be involved in the activation of the canonical NLRP3 inflammasome. Since p21 and T2AA can prevent proteins from binding to different PCNA sites, different PCNA protein partners may be implicated in inflammasome induction, depending on the stimuli.

### **3.3 Preventing the interaction of PCNA with its partners inhibits the activation of the non-canonical NLRP3 inflammasome in THP-1 macrophagic cell line**

We next investigated whether cytoplasmic PCNA could also regulate the non-canonical NLRP3 inflammasome. PMA-differentiated THP-1 macrophages were cultured with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) that are gram-negative bacteria inducing the non-canonical NLRP3 inflammasome signaling pathway. As expected, EPEC induced a strong IL-1 $\beta$  secretion by THP-1 macrophages. Moreover, this process was significantly inhibited by both p21 peptide and T2AA, but not by the mutant p21 peptide (**Figure 3A**). As previously described (10), upon activation by intracellular LPS from phagocytosed bacteria, Caspase-4 cleaves GSDMD to induce pyroptosis (**Figure 3B**), leading to consequent activation of the Caspase-1-dependent-NLRP3 inflammasome and IL-1 $\beta$  secretion. Whereas IL-1 $\beta$  secretion was decreased in presence of p21 peptide and T2AA (**Figure 3A**), none of these inhibitors diminished the activation of Caspase-4 in THP-1 macrophages (**Figure 3B**). Logically, GSDMD cleavage was not affected either (**Figure 3B**). These results suggested that although cytoplasmic PCNA could

regulate the non-canonical NLRP3 inflammasome, this process did not seem to involve the Caspase-4/GSDMD axis.

### **3.4 The scaffolding protein PCNA could regulate the NLRP3 inflammasome by interacting with NLRP3 and NEK7**

We wanted to elucidate the molecular mechanisms by which the cytoplasmic PCNA could control the NLRP3 inflammasome in THP-1 macrophages. One experiment of proximity ligation assay showed that PCNA and ASC seemed to be little associated in resting THP-1 macrophages, but moved progressively closer together following NLRP3 activation by nigericin (**Figure 4A**). However, PCNA protein co-immunoprecipitation assay performed on cytosolic proteins obtained by sonication suggested that PCNA did not interact with ASC (**Figure 4B**) or Caspase-1 (**Supplementary Figure S3A**) whatever the activation state. In contrary, preliminary results suggested that PCNA could associate with the NLRP3 sensor both at basal state and after nigericin stimulation (**Figure 4C**), and the location of the NLRP3 and PCNA proteins close to the nucleus (**Figure 4D** and **Supplementary Figure S3B**) were concordant with the location of speck formed during inflammasome activation. Preliminary results also suggested that nigericin treatment could led to cytoplasmic PCNA interaction with the kinase NEK7 (**Figure 4E**). One experiment of proximity ligation assay (**Supplementary Figure S3C, D**) showed that PCNA and NEK7 were closed together in 18% of resting THP-1 macrophages. However, at the basal state, the fluorescence concerned exclusively the nuclear compartment, potentially explaining why we could not detect NEK7 in co-immunoprecipitation experiments, which used cytosolic proteins. After stimulation by nigericin, 28% of THP-1 macrophages presented a PCNA-NEK7 interaction, which took place mainly in the cytoplasm of nigericin-treated THP-1 macrophages, in accordance with the cytoplasmic location of the inflammasome complex. Finally, pretreatment of the cells with the p21 peptide seemed to strongly decrease this interaction (**Figure 4F**). Although needed to be confirmed, these preliminary data suggested that cytoplasmic PCNA may belong to the NLRP3 inflammasome complex by interacting with both NLRP3 and NEK7 in THP-1 macrophages.



### 3.5 The cyclin-dependent kinase inhibitor p21/waf1/CIP1 could be a natural repressor of the NLRP3 inflammasome

The p21 peptide inhibitor is derived from the p21/waf1/CIP1 protein. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21/waf1/CIP1 binds to nuclear PCNA to regulate its chromatin-bound protein functions (27). To investigate whether p21/waf1/CIP1 could be a regulator of the NLRP3 inflammasome *in vivo*, we used bone marrow derived-macrophages (BMDM) from p21 knock-out (p21<sup>-/-</sup>) mice. Both wild type (WT) and p21<sup>-/-</sup> BMDM expressed PCNA mainly in the cytoplasm (**Figure 5A**). LPS priming followed by nigericin treatment induced IL-1 $\beta$  secretion by both WT and p21<sup>-/-</sup> BMDM, demonstrating that the NLRP3 inflammasome was activated in both cell types. Although the number of mice tested did not allow us to obtain statistically significant results, p21<sup>-/-</sup> BMDM tended to secrete higher concentration of IL-1 $\beta$  than WT cells following inflammasome activation (**Figure 5B**). These results suggested that p21 could act as a natural repressor of the NLRP3 inflammasome activation *in vivo*.

## 4. DISCUSSION

Tight regulation of the NLRP3 inflammasome is of crucial importance to prevent an involuntary or uncontrolled inflammatory response. Numerous mechanisms have been described as being involved in this regulation (28). Here we have described the cytoplasmic PCNA, and possibly its natural partner p21/waf1/CIP1, as novel regulators of the NLRP3 inflammasome complex activation. Indeed, disruption of the interaction of cytoplasmic PCNA with its partners impaired the NLRP3 inflammasome activation in THP-1 macrophages, as attested by a diminished IL-1  $\beta$  secretion, Caspase-1 activation and GSDMD cleavage. Since the NLRP3 inflammasome assembly takes place in the cytoplasm, the cytoplasmic localization of PCNA may be a prerequisite to assume its inflammasome regulatory function. Indeed, we showed that in THP-1 monocytes, where PCNA was mainly nuclear, neither p21 nor T2AA was able to inhibit IL-1  $\beta$  secretion. Since PCNA is exclusively localized in the cytoplasm of neutrophils, where it was initially described to interact with apoptotic Caspases (19), it will be interesting to evaluate if PCNA could regulate the NLRP3 inflammasome in these cells. More generally, the potential regulatory function of the inflammasome by PCNA should be tested in mature differentiated cells in which cytoplasmic relocation of PCNA has occurred.

In our study, both canonical and non-canonical NLRP3 inflammasomes activation was inhibited by agents that disrupted the interaction of cytoplasmic PCNA with its partners. In

the canonical pathway, p21 and/or T2AA prevented Caspase-1 activation, thus inhibiting GSDMD Cleavage and IL-1 $\beta$  secretion. In the non-canonical pathway, we showed that neither cleavage of pro-Caspase-4 nor the consequent GSDMD cleavage was affected by these two inhibitors, whereas IL-1 $\beta$  secretion was decreased. These results suggested that PCNA did should not interfere with the Caspase-4/GSDMD axis of the non-canonical pathway and that, whatever the way of activation, cytoplasmic PCNA may regulate the inflammasome by acting on the canonical part of the complex (i.e. the Caspase-1 axis). Neither THP-1 cells nor mouse BMDM expressed an alternative NLRP3 inflammasome (29). Consequently, we could not explore the role of the cytoplasmic PCNA in this pathway. Alternative inflammasome is induced in human monocytes/macrophages by extracellular LPS, leading to the formation of a RIPK1-FADD-Caspase-8 signaling complex then inducing the classical NLRP3-ASC-Caspase-1 inflammatory complex (29,30). It will be interesting to test whether cytoplasmic PCNA is able to impair the NLRP3 alternative inflammasome activation. It could do so by inhibiting the Caspase-1 activation. Of note, Caspase-8 has been described to be involved in the canonical, non-canonical and alternative NLRP3 inflammasomes (12,29). Thus, it is possible that cytoplasmic PCNA could also regulate the NLRP3 inflammasome activation regulating the Caspase-8 availability. Indeed, in neutrophils, it was shown that PCNA interacts with apoptotic Caspases, including Caspase-8, promoting cell survival (19). Thus, we can't exclude that Caspase-8 could also be a cytoplasmic PCNA partner in the context of the NLRP3 inflammasome activation.

Notably, depending on the stimulus used to induce the NLRP3 inflammasome, either p21 or T2AA or both were able to inhibit inflammasome activation and consequent IL-1 $\beta$  secretion. p21 peptide is the PCNA partner with the highest known interaction affinity for PCNA (27), thus acting as a competitive inhibitor for proteins interacting with PCNA. Most of the PCNA-interacting partners, including p21, have a characteristic short amino acid sequence called a PIP-box that binds to the interdomain connecting loop (IDCL) of PCNA (31). T2AA is a non-peptide inhibitor derived from T3 (3,3',5-triiodothyronine) but lacking thyroid hormone activity. Like p21, T2AA can bind to the IDCL. T2AA may also bind to another site, a shallow cavity present at the PCNA homotrimer interface adjacent to lysin 164 (32). T2AA inhibits interactions of monoubiquitinated PCNA with its partners. These suggested that, depending on the stimulus, different proteins could intervene to regulate the NLRP3 inflammasome activation. These proteins probably bind different sites on PCNA, explaining why p21 and T2AA

were not always able to inhibit inflammasome activation. Moreover, it is possible that, depending on the stimulus, different forms of PCNA may be implicated (trimeric or monomeric or ubiquitinated...). It should be noted that NLRP3 and NEK7, the two proteins we found interacting with PCNA, don't have a PIP-box, suggesting that they could bind to the IDCL via another motif (33). Alternatively, they could bind to another site of PCNA, or be indirectly linked to PCNA through interaction with other proteins. In our case, we can hypothesize that NEK7 may be indirectly linked to PCNA through at least interaction with NLRP3. Further studies will be required to identify the binding sites of PCNA with NLRP3 and/or NEK7, and to identify potential other proteins implicating in the NLRP3 inflammasome complex activation and interacting with cytoplasmic PCNA.

At the basal state, the NLRP3 inflammasome must be inactivated to prevent unwanted inflammatory response (34). The NLRP3 sensor is inactivated in a double ring cage structure that is associated with membranes of organelles (35–37). Since we found that cytoplasmic PCNA and NLRP3 interacted in resting THP-1 macrophages and considering the ring shape structure of trimeric PCNA (31), we can hypothesize that cytoplasmic PCNA could contribute to the caging of NLRP3. Following inflammasome stimulation, NLRP3 should travel from the membranes to the centrosome, also known as the microtubule-organizing center (MTOC), to interact with NEK7 located there. Previous report had shown that PCNA is able to bind  $\gamma$ -tubulin that expresses a PIP motif, thus allowing the transport of PCNA from the cytosol to the nucleus (38). We can also hypothesize that a PCNA-tubulin interaction may take place in the cell, allowing the transport of PCNA along microtubules and thus allowing transport of the PCNA-NLRP3 complex from the membranes to the MTOC. Once in the MTOC, NLRP3-NEK7 interaction disrupts the NLRP3 cage structure (34–36). We showed that at the basal state, PCNA and NEK7 were mainly colocalized in the nucleus of THP-1 macrophages. However, following NLRP3 inflammasome activation by nigericin, PCNA and NEK7 mainly colocalized in the cytoplasm of these cells. Moreover, we found that after nigericin treatment, PCNA could interact with both NLRP3 and NEK7. These results suggested that PCNA, through its tubulin interaction, could also participate in the transport of NEK7 from the nucleus to the cytoplasm. Only one study has previously described a PCNA-NEK7 interaction, and it was not in the context of inflammasome activation (39). We can make the hypothesis that cytoplasmic PCNA-NEK7 binding at the MTOC could facilitate the NLRP3 cage disruption and the NLRP3-NEK7 interaction, thus allowing the ASC oligomerization. The fact that we observed that ASC and

PCNA came closer together after inflammasome stimulation, without any direct interaction, is in line with our previous hypotheses. Furthermore, since p21 peptide partially disrupted the PCNA-NEK7 interaction and since p21/waf1/CIP1 KO BMDM could secrete higher levels of IL-1 $\beta$  following NLRP3 inflammasome stimulation suggested that p21 protein could be a natural repressor of the inflammasome, preventing PCNA-NEK7 interaction.

In summary, our study highlighted cytoplasmic PCNA as a possible novel component of the NLRP3 inflammasome acting as a regulator of inflammasome assembly, and thus of the subsequent Caspase-1 activation, GSDMD cleavage and IL-1 $\beta$  secretion. Our study will undoubtedly pave the way for numerous studies aimed at elucidating the role of the cytoplasmic PCNA protein in the different types of inflammasomes and at identifying its different partners and their interaction site depending on the activation stimulus.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

LT conceived, designed and supervised the study. LT, CL and KA designed and performed the experiments. LT and KA managed the breeding of mouse colony. MDC genotyped and screened mice. CL, KA and LT analyzed the results. NC performed the statistical analyses. LT and CL wrote the manuscript. VWS financed the project. All authors reviewed and accepted the final version of the manuscript.

#### **FUNDING**

The laboratory of V. Witko-Sarsat was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale FRM (EQU202003010155) and from the Investissements d'Avenir programme ANR-11-IDEX-0005-02, Sorbonne Paris Cité, LabEx INFLAMEX. CL is supported by a scholarship from the French Ministry of Tertiary Education.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank H.K. Ea (INSERM UMRS1132, Université Paris-Cité, hôpital Lariboisière, Paris, France) for providing MSU crystals and J. Guignot (Cochin Institute) for providing EPEC. We

thank A-S. Dangeard (Cochin Institute) for her help with handling in the bacteriology laboratory. We thank D. Judith for discussions on co-immunoprecipitation experimental design. We thank the MOUSET'IC Cochin Institute core facility for his grateful help with mouse genotyping and maintenance of the line. We also thank the IMAG'IC Cochin Institute core facility.

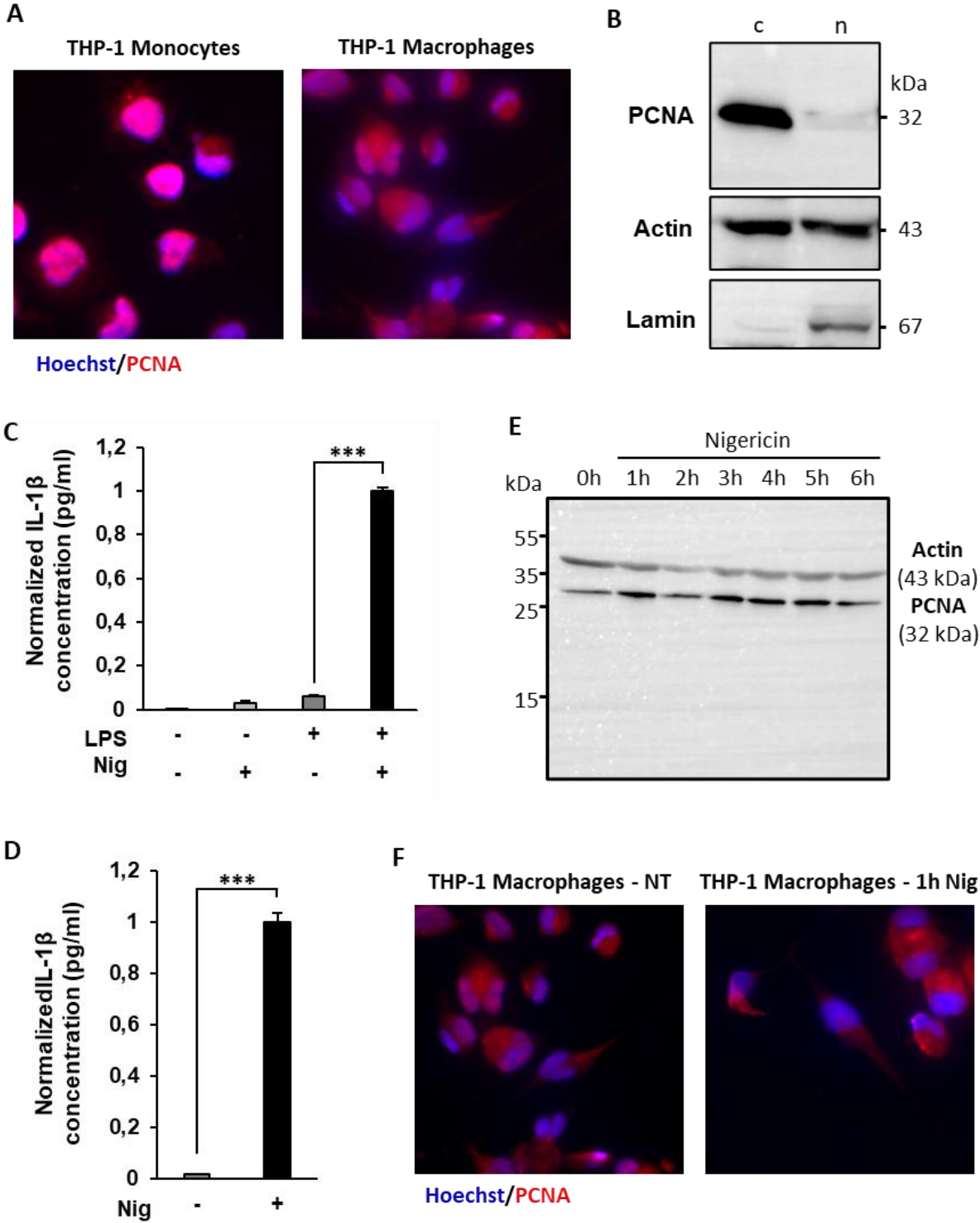
## REFERENCES

1. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* (2002) 10:417–426. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3
2. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* (2010) 140:821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040
3. Place DE, Kanneganti T-D. Recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol* (2018) 50:32–38. doi: 10.1016/j.coi.2017.10.011
4. Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:143–157. doi: 10.1038/s41577-019-0228-2
5. 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) 20:319–325. doi: 10.1016/s1074-7613(04)00046-9
6. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* (2016) 41:1012–1021. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002
7. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* (2007) 14:1583–1589. doi: 10.1038/sj.cdd.4402195
8. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* (2013) 38:1142–1153. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016
9. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* (2011) 479:117–121. doi: 10.1038/nature10558
10. 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) 45:2911–2917. doi: 10.1002/eji.201545523
11. Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res* (2018) 11:359–374. doi: 10.2147/JIR.S141220
12. Gurung P, Anand PK, Malireddi RKS, Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Dillon CP, Weinlich R, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol* (2014) 192:1835–1846. doi: 10.4049/jimmunol.1302839
13. Zhao N, Li C-C, Di B, Xu L-L. Recent advances in the NEK7-licensed NLRP3 inflammasome activation: Mechanisms, role in diseases and related inhibitors. *J Autoimmun* (2020) 113:102515. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102515
14. Sharif H, Wang L, Wang WL, Magupalli VG, Andreeva L, Qiao Q, Hauenstein AV, Wu Z, Núñez G, Mao Y, et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature* (2019) 570:338–343. doi: 10.1038/s41586-019-1295-z
15. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* (2016) 530:354–357. doi: 10.1038/nature16959

16. Shi H, Wang Y, Li X, Zhan X, Tang M, Fina M, Su L, Pratt D, Bu CH, Hildebrand S, et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol* (2016) 17:250–258. doi: 10.1038/ni.3333
17. Moldovan G-L, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* (2007) 129:665–679. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.003
18. Witko-Sarsat V, Ohayon D. Proliferating cell nuclear antigen in neutrophil fate. *Immunol Rev* (2016) 273:344–356. doi: 10.1111/imr.12449
19. Witko-Sarsat V, Mocek J, Bouayad D, Tamassia N, Ribeil J-A, Candalh C, Davezac N, Reuter N, Mouthon L, Hermine O, et al. Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med* (2010) 207:2631–2645. doi: 10.1084/jem.20092241
20. Ohayon D, De Chiara A, Dang PM-C, Thieblemont N, Chatfield S, Marzaioli V, Burgener SS, Mocek J, Candalh C, Pintard C, et al. Cytosolic PCNA interacts with p47phox and controls NADPH oxidase NOX2 activation in neutrophils. *J Exp Med* (2019) 216:2669–2687. doi: 10.1084/jem.20180371
21. Ohayon D, De Chiara A, Chapuis N, Candalh C, Mocek J, Ribeil J-A, Haddaoui L, Ifrah N, Hermine O, Bouillaud F, et al. Cytoplasmic proliferating cell nuclear antigen connects glycolysis and cell survival in acute myeloid leukemia. *Sci Rep* (2016) 6:35561. doi: 10.1038/srep35561
22. Tourneur L, Witko-Sarsat V. Inflammasome activation: Neutrophils go their own way. *J Leukoc Biol* (2019) 105:433–436. doi: 10.1002/JLB.3CE1118-433R
23. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, et al. The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* (2014) 15:727–737. doi: 10.1038/ni.2913
24. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, Barberà-Cremades M, Yagüe J, Ruiz-Ortiz E, Antón J, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* (2014) 15:738–748. doi: 10.1038/ni.2919
25. Mouasni S, Gonzalez V, Schmitt A, Bennana E, Guillonneau F, Mistou S, Avouac J, Ea HK, Devauchelle V, Gottenberg J-E, et al. The classical NLRP3 inflammasome controls FADD unconventional secretion through microvesicle shedding. *Cell Death Dis* (2019) 10:190. doi: 10.1038/s41419-019-1412-9
26. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* (2006) 440:237–241. doi: 10.1038/nature04516
27. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* (1994) 369:574–578. doi: 10.1038/369574a0
28. Xu J, Núñez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation. *Trends Biochem Sci* (2023) 48:331–344. doi: 10.1016/j.tibs.2022.10.002
29. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, Robertson AAB, Cooper MA, Graf T, Hornung V. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* (2016) 44:833–846. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.012
30. Elliott EI, Sutterwala FS. Monocytes Take Their Own Path to IL-1 $\beta$ . *Immunity* (2016) 44:713–715. doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.015
31. Witko-Sarsat V, Ohayon D. Proliferating cell nuclear antigen in neutrophil fate. *Immunol Rev* (2016) 273:344–356. doi: 10.1111/imr.12449
32. Inoue A, Kikuchi S, Hishiki A, Shao Y, Heath R, Evison BJ, Actis M, Canman CE, Hashimoto H, Fujii N. A small molecule inhibitor of monoubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) inhibits repair of interstrand DNA cross-link, enhances DNA double strand break, and sensitizes cancer cells to cisplatin. *J Biol Chem* (2014) 289:7109–7120. doi: 10.1074/jbc.M113.520429
33. Gilljam KM, Feyzi E, Aas PA, Sousa MML, Müller R, Vågbø CB, Catterall TC, Liabakk NB, Slupphaug G, Drabløs F, et al. Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *J Cell Biol* (2009) 186:645–654. doi: 10.1083/jcb.200903138

34. Fu J, Wu H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annu Rev Immunol* (2023) 41:301–316. doi: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207
35. Andreeva L, David L, Rawson S, Shen C, Pasricha T, Pelegrin P, Wu H. NLRP3 cages revealed by full-length mouse NLRP3 structure control pathway activation. *Cell* (2021) 184:6299-6312.e22. doi: 10.1016/j.cell.2021.11.011
36. Schroder K, Coll RC. Caging NLRP3 tames inflammasome activity. *Cell* (2021) 184:6224–6226. doi: 10.1016/j.cell.2021.11.035
37. Hochheiser IV, Pilsel M, Hagelueken G, Moecking J, Marleaux M, Brinkschulte R, Latz E, Engel C, Geyer M. Structure of the NLRP3 decamer bound to the cytokine release inhibitor CRID3. *Nature* (2022) 604:184–189. doi: 10.1038/s41586-022-04467-w
38. Corvaisier M, Zhou J, Malycheva D, Cornella N, Chioureas D, Gustafsson NMS, Rosselló CA, Ayora S, Li T, Ekström-Holka K, et al. The  $\gamma$ -tubulin meshwork assists in the recruitment of PCNA to chromatin in mammalian cells. *Commun Biol* (2021) 4:767. doi: 10.1038/s42003-021-02280-1
39. Buljan M, Ciuffa R, van Drogen A, Vichalkovski A, Mehnert M, Rosenberger G, Lee S, Varjosalo M, Pernas LE, Spegg V, et al. Kinase Interaction Network Expands Functional and Disease Roles of Human Kinases. *Mol Cell* (2020) 79:504-520.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2020.07.001

**FIGURES**

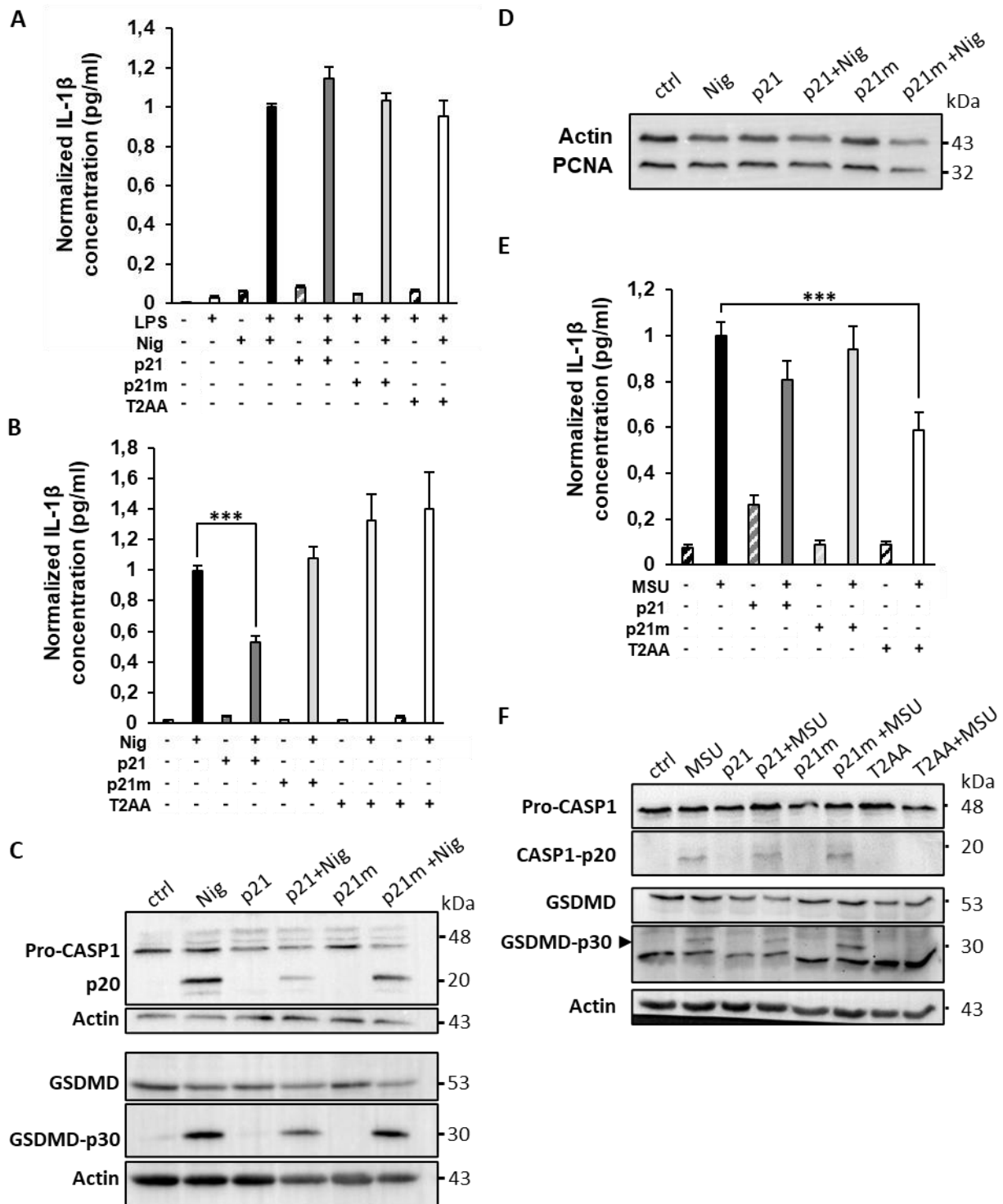


**FIGURE 1**

PCNA expression and canonical NLRP3 inflammasome activation in monocyctic and macrophagic human THP-1 cells. **(A)** Localization of PCNA using PCNA-specific immunofluorescence microscopy analysis performed on monocyctic THP-1 cell line or THP-1



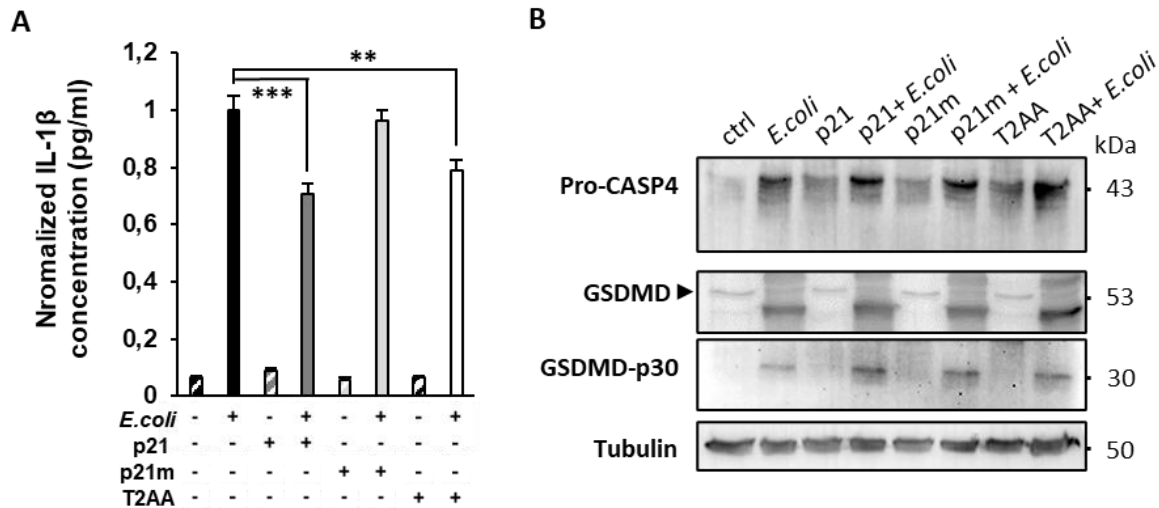
cells differentiated into macrophages by PMA (300 ng/ml for 3 h followed by 3 days of resting). Red, PCNA; blue, Hoechst. 40x magnification. Representative micrographs are shown. **(B)** Western blot analysis of PCNA expressed in nuclear (n) and cytoplasmic (c) protein lysates from PMA-differentiated THP-1 macrophages. 20 and 40 µg nuclear and cytoplasmic proteins were submitted to electrophoresis, respectively. β-actin and lamin serve as total and nuclear loading control, respectively. **(C, D)** ELISA quantification of IL-1β secreted by **(C)** THP-1 monocytes cultured for 4 h with (+) or without (-) 200 ng/ml LPS in absence (-) or presence (+) of 20 µM nigericin (Nig) during the last hour of incubation (n= 12 except for LPS+Nig+ where n=14 in 6 independent experiments) or **(D)** PMA-differentiated THP-1 macrophages cultured for 1 h in absence (-) or presence (+) of 20 µM nigericin (Nig) (n= 36 in 15 independent experiments). **(E)** Western blot analysis of PCNA expressed in protein lysates from PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (0h) or treated by nigericin during the indicated time (h, hours). β-actin serves as a control. Representative of three independent experiments. **(F)** PCNA-specific immunofluorescence microscopy analysis of PMA-differentiated THP-1 macrophages treated (1 h Nig) or not (NT) with 20 µM nigericin during 1 h. Red, PCNA; blue, Hoechst. 100x magnification. Representative micrographs are shown. (C, D) Results are expressed as mean ± sem of normalized data from independent experiments. For each independent experiment, results were normalized to the mean of the positive control (LPS+Nig+ for THP-1 monocytes (ranging from 994,8 to 6551,2 pg/ml) and Nig+ for THP-1 macrophages (ranging from 312,1 to 12177,7 pg/ml)). Non-parametric Mann-Whitney tests were performed, \*\*\*p < 0.001.



**FIGURE 2**

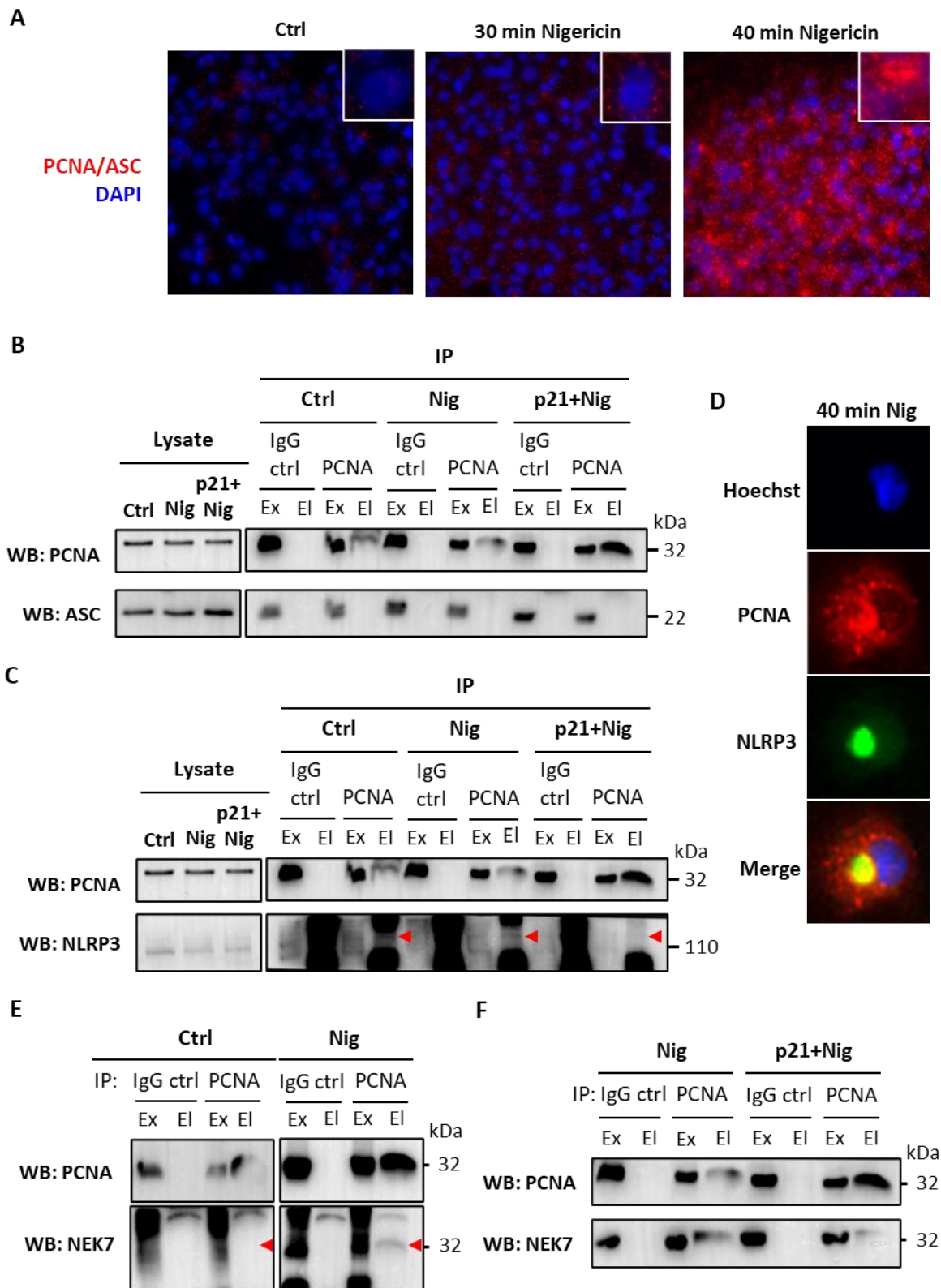
Preventing the interaction of PCNA with its partners by the p21 peptide or the T2AA inhibits nigericin-induced NLRP3 inflammasome activation in THP-1 macrophagic cell line. **(A, B)** ELISA quantification of IL-1 $\beta$  secreted by **(A)** THP-1 monocytes (n= 12 to 14 in 6 independent experiments) cultured for 4 h with (+) or without (-) 200 ng/ml LPS pretreated (+) or not (-)

with 10  $\mu$ M p21 peptide (p21) or mutant p21 peptide (p21m) or 25  $\mu$ M T2AA, and **(B)** PMA-differentiated THP-1 macrophages pretreated (+) or not (-) with 10  $\mu$ M p21 (n= 28 in 13 independent experiments) or p21m (n= 20 in 9 independent experiments), 10  $\mu$ M T2AA (light grey histogram, n= 28 in 11 independent experiments) or 25  $\mu$ M T2AA (white histograms, n=18 in 7 experiments) during 1 h, followed by incubation in absence (-) or presence (+) of 20  $\mu$ M nigericin (Nig) during 1 h. **(C)** Western blot analysis of CASPASE-1 (Pro-CASP1, pro-CASPASE-1; p20, cleaved form of CASPASE-1) and GASDERMIN D (p30, N-terminal cleaved fragment of GSDMD) in PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl) or pretreated 1 h with or without 10  $\mu$ M p21 or 10  $\mu$ M p21m followed by 1 h incubation with or without 20  $\mu$ M nigericin.  $\beta$ -actin serves as a loading control. Representative of three independent experiments. **(D)** Representative western blot analysis of PCNA in PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl) or pretreated 1 h with or without 10  $\mu$ M p21 or 10  $\mu$ M p21m followed by 1 h incubation with or without 20  $\mu$ M nigericin.  $\beta$ -actin serves as a loading control. **(E)** ELISA quantification of IL-1 $\beta$  secreted by PMA-differentiated THP-1 macrophages pretreated 1h in absence (-) or presence (+) of 10  $\mu$ M p21 (n= 14 in 7 independent experiments), 10  $\mu$ M mutated p21 (p21m) (n= 15 in 7 independent experiments) or 25  $\mu$ M T2AA (n= 15 in 7 independent experiments) then cultured for 3 h with (+) or without (-) 200  $\mu$ g/ml monosodium urate (MSU) crystals. **(F)** Western blot analysis of CASPASE-1 (Pro-CASP1, pro-CASPASE-1; p20, cleaved form of CASPASE-1) and GASDERMIN D (p30, N-terminal cleaved fragment of GSDMD) in PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl) or pretreated 1 h with or without 10  $\mu$ M p21, 10  $\mu$ M p21m or 25  $\mu$ M T2AA followed by 1 h incubation with or without 200  $\mu$ g/ml MSU crystals.  $\beta$ -actin serves as a loading control. For GSDMD, representative of three independent experiments. (A, B, E) Results are expressed as mean  $\pm$  sem of normalized data from independent experiments. For each independent experiment, results were normalized to the mean of the positive control (LPS+ Nig+ for THP-1 monocytes (ranging from 994,8 to 6551,2 pg/ml); Nig+ for THP-1 macrophages (ranging from 312,1 to 12177,7 pg/ml); MSU+ for THP-1 macrophages (ranging from 312,6 to 2044,5 pg/ml)). Non-parametric Mann-Whitney tests were performed, \*\*\*p < 0.001.



**FIGURE 3**

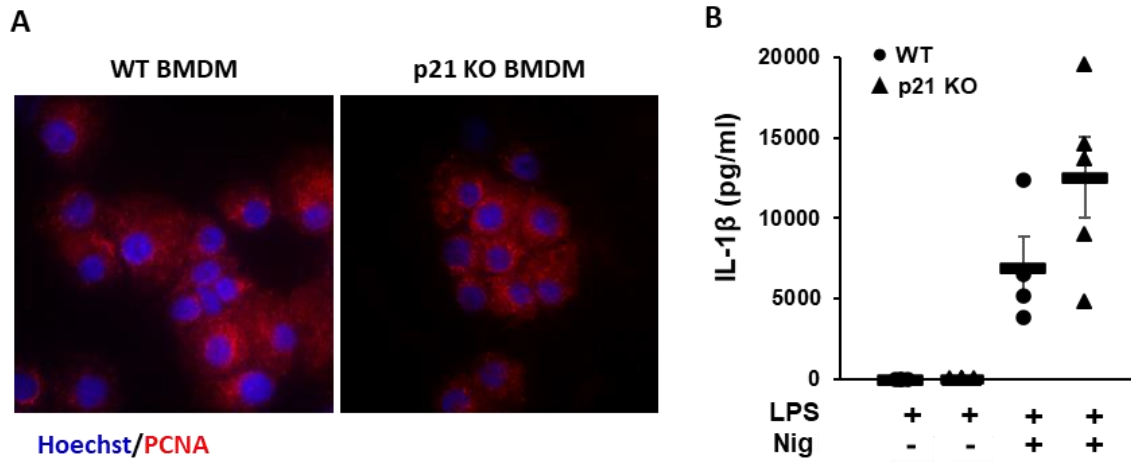
Preventing the interaction of PCNA with its partners by both p21 peptide and T2AA inhibits non-canonical NLRP3 inflammasome activation in THP-1 macrophagic cell line. **(A)** ELISA quantification of IL-1 $\beta$  secreted by PMA-differentiated THP-1 macrophages cultured for 2,5 h with (+) or without (-) *E.coli* bacteria at a multiplicity of infection of 20, followed by a 16 h incubation period with penicillin/streptomycin in absence (-) or presence (+) of 5  $\mu$ M p21, 5  $\mu$ M mutated p21 (p21m) or 10  $\mu$ M T2AA (n= 12 to 14 in 4 independent experiments). Results are expressed as mean  $\pm$  sem of normalized data from independent experiments. For each independent experiment, results were normalized to the mean of the positive control (Nig+, ranging from 1705,3 to 8366,1 pg/ml). Non-parametric Mann-Whitney tests were performed, \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. **(B)** Western blot analysis of CASPASE-4 (Pro-CASP4, pro-CASPASE-4) and GASDERMIN D (p30, N-terminal cleaved fragment of GSDMD) in PMA-differentiated THP-1 macrophages cultured for 2,5 h with (+*E.coli*) or without *E.coli* bacteria at a multiplicity of infection of 20, followed by a 16 h incubation period with penicillin/streptomycin in absence or presence of 5  $\mu$ M p21, 5  $\mu$ M mutated p21 (p21m) or 10  $\mu$ M T2AA. Tubulin serves as a loading control. Caspase-4 antibody detects pro-CASP4 (45 kDa) and processing intermediate forms of CASP4 (40 kDa and 32 kDa). For GSDMD, representative of two independent experiments.



**FIGURE 4**

PCNA could be a scaffold for NLRP3-NEK7 interaction. **(A)** Assessment of the PCNA-ASC interaction in PMA-differentiated THP-1 macrophages using the Duolink® proximity ligation

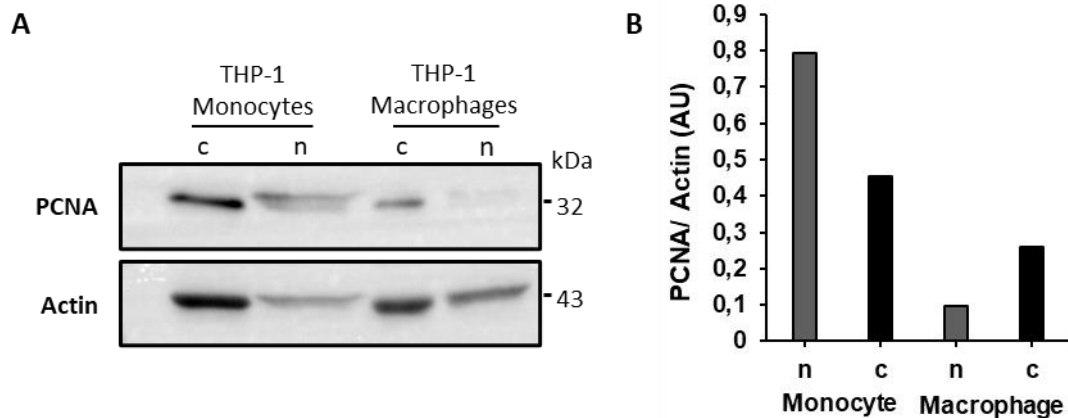
assay (PLA). Cells were untreated (ctrl) or treated with 20  $\mu$ M nigericin during the indicated times. PCNA-ASC proximity induced a red fluorescence. DAPI was used for nuclear staining (blue). 40x magnification. **(B, C, E, F)** Co-immunoprecipitation (co-IP) experiments were performed on cytosol from PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl), treated 40 min with 20  $\mu$ M nigericin (Nig) or pretreated 1 h with 10  $\mu$ M p21 followed by 40 min incubation with 20  $\mu$ M nigericin (p21+Nig). Co-IP using beads coated with anti-PCNA pAb (IP: PCNA) or with control isotype Ab (IP: IgG ctrl) were performed. Indicated proteins were detected by western blot analysis (WB) on the exclusion (EX) and elution (EL) fractions obtained by co-IP. For ASC detection, representative of three independent experiments (except p21+Nig, n=1). **(D)** Localization of PCNA and NLRP3 using specific immunofluorescence microscopy analysis performed on PMA-differentiated THP-1 macrophages treated 40 min with 20  $\mu$ M nigericin (Nig). Blue, Hoechst; red, PCNA; green, NLRP3. 40x magnification.



**FIGURE 5**

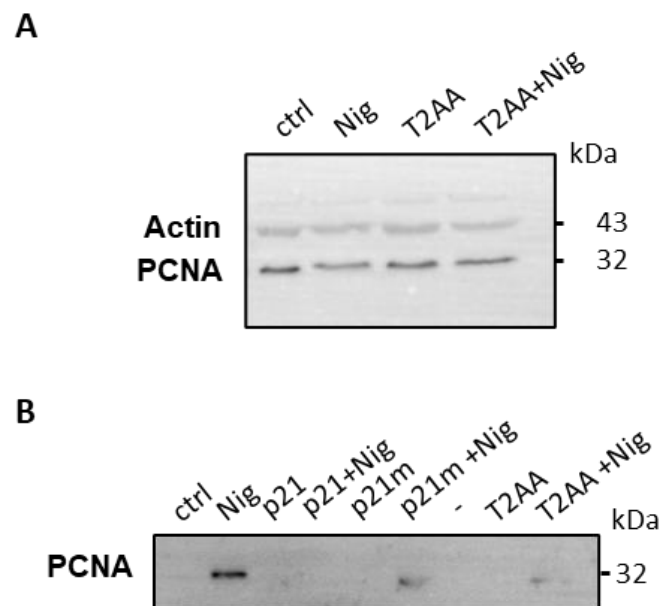
Increase NLRP3 inflammasome activation in bone marrow derived-macrophages from p21<sup>-/-</sup> mice. **(A)** Cytoplasmic localization of PCNA in bone marrow derived-macrophages (BMDM) from wild type (WT) and p21<sup>-/-</sup> (p21 KO) mice was shown using PCNA-specific immunofluorescence microscopy analysis. Red, PCNA; blue, Hoechst. 100x magnification. **(B)** ELISA quantification of IL-1β secreted by WT and p21<sup>-/-</sup> BMDM cultured for 4 h with (+) 200 ng/ml LPS followed by 2 h incubation in absence (-) or presence (+) of 5 μM nigericin. Each symbol represents one mouse. Bars indicate mean values ± sem.

## SUPPLEMENTARY FIGURES



### Supplementary Figure S1

**(A)** Western blot analysis of PCNA expressed in nuclear (n) and cytoplasmic (c) protein lysates from THP-1 monocytes or PMA-differentiated THP-1 macrophages.  $\beta$ -actin serves as loading control. **(B)** Densitometric analysis of bands obtained in (A). Cytoplasmic (c) and nuclear (n) PCNA were measured making the PCNA/Actin ratios.

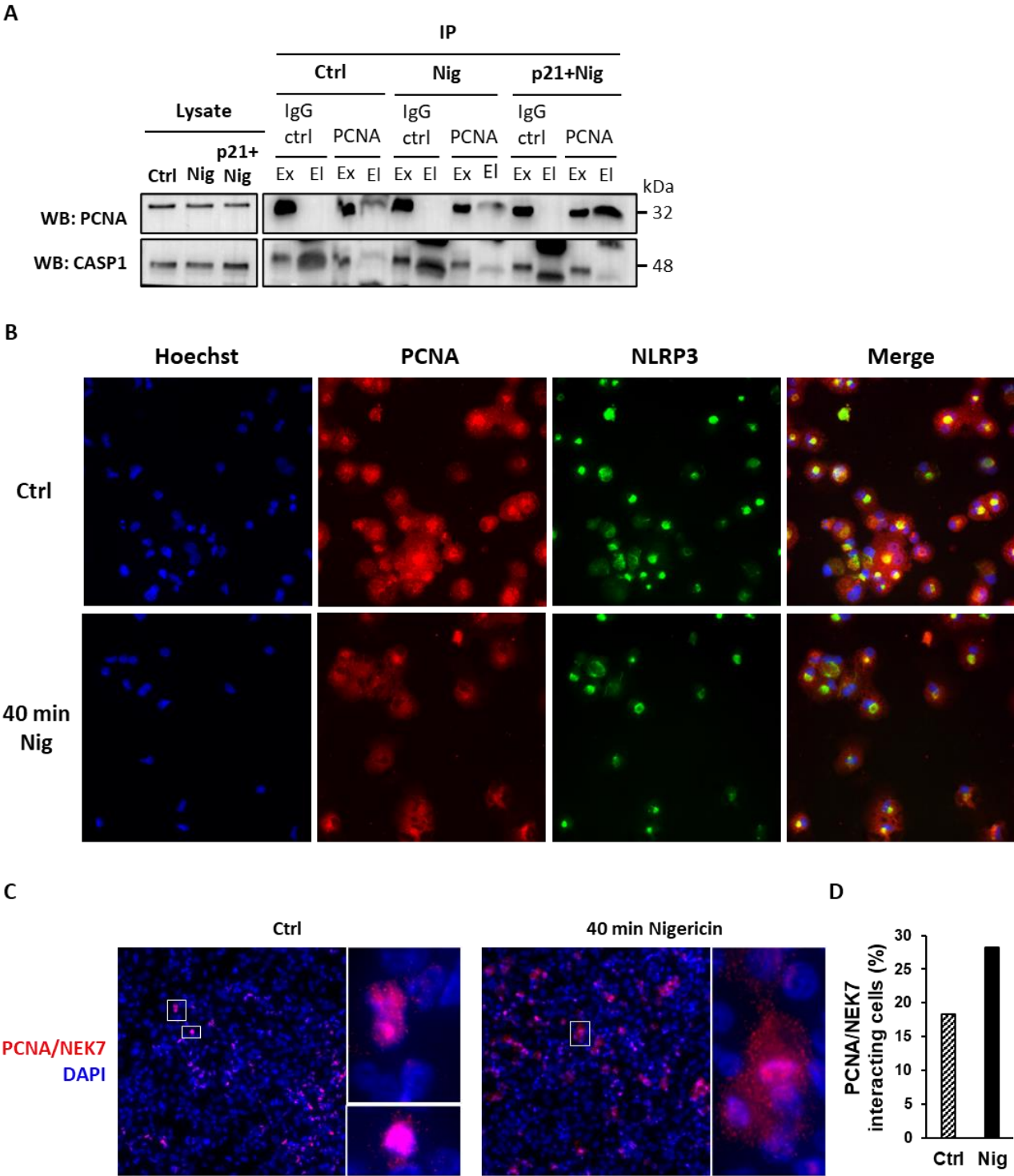


### Supplementary Figure S2

**(A)** Western blot analysis of PCNA in PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl) or pretreated 1 h with or without 10  $\mu$ M T2AA followed by 1 h incubation with or without 20  $\mu$ M nigericin.  $\beta$ -actin serves as a loading control. Representative of three independent experiments. **(B)** Western blot analysis of PCNA in the culture supernatant of PMA-



differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl) or pretreated 1 h with or without 10  $\mu$ M p21, 10  $\mu$ M p21m or 10  $\mu$ M T2AA followed by 1 h incubation with or without 20  $\mu$ M nigericin.



**Supplementary Figure S3**

(A) Co-immunoprecipitation (co-IP) experiments were performed on cytosol from PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl), treated 40 min with 20  $\mu$ M nigericin (Nig)

or pretreated 1 h with 10  $\mu$ M p21 followed by 40 min incubation with 20  $\mu$ M nigericin (p21+Nig). Co-IP using beads coated with anti-PCNA pAb (IP: PCNA) or with control isotype Ab (IP: IgG ctrl) were performed. Indicated proteins were detected by western blot analysis (WB) on the exclusion (EX) and elution (EL) fractions obtained by co-IP. Representative of two experiments (except p21+Nig, n=1). **(B)** Localization of PCNA and NLRP3 using specific immunofluorescence microscopy analysis performed on PMA-differentiated THP-1 macrophages untreated (ctrl, upper panel) or treated 40 min with 20  $\mu$ M nigericin (Nig, lower panel). Blue, Hoechst; red, PCNA; green, NLRP3. 40x magnification. **(C)** Assessment of the PCNA-NEK7 interaction in PMA-differentiated THP-1 macrophages using the Duolink<sup>®</sup> proximity ligation assay (PLA). Cells were untreated (ctrl) or treated with 20  $\mu$ M nigericin during 40 min. PCNA-NEK7 proximity induced a red/pink fluorescence. DAPI was used for nuclear staining (blue). 20x magnification. Surrounded cells are magnified. **(D)** Quantification of the number of cells with a PCNA-NEK7 proximity-induced fluorescence in (C). A total of 694 and 823 cells for untreated (ctrl) and nigericin-treated (Nig) PMA-differentiated THP-1 macrophages, respectively, was counted. Results are expressed as the percentage of PCNA-NEK7 proximity-induced fluorescence positive cells.

## Article 2

### **Dysregulation of neutrophil oxidant production and interleukin-1-related cytokines in granulomatosis with polyangiitis**

Jennifer Amsler\*, Judith Everts-Graber\*, Katherine R Martin, Arnaud

Roccabianca, Chloé Lopes, Léa Tourneur, Julie Mocek, Alexandre Karras, Jean-Marc

Naccache, Bernard Bonnotte, Maxime Samson, Thomas Hanslik, Xavier Puéchal,

Benjamin Terrier, Loïc Guillevin, Antoine Néel, Luc Mouthon, Véronique Witko-

Sarsat

\*These two authors contributed equally to the work

### **Accepté à Rheumatology**

Les vascularites à ANCA (anticorps cytoplasmiques anti-neutrophiles) sont un groupe de maladies auto-immunes rares qui affectent principalement les vaisseaux sanguins. Ces affections sont caractérisées par une inflammation des parois des vaisseaux, ce qui peut entraîner des dommages aux organes et aux tissus irrigués par ces vaisseaux sanguins. Il existe plusieurs types de vascularites à ANCA, parmi lesquelles l'une des plus courantes est la granulomatose avec polyangéite (GPA) (Jennette 2013). Anciennement appelée granulomatose de Wegener, elle affecte principalement les voies respiratoires supérieures et inférieures, ainsi que les reins et d'autres organes (Jennette 2013).

Les ANCA sont des anticorps dirigés contre certaines protéines présentes dans les neutrophiles. La GPA est associée à des ANCA dirigés contre la sérine protéase 3 des neutrophiles (PR3) et moins fréquemment la myéloperoxydase (MPO) (Lamprecht et al. 2018 ; Kitching et al. 2020). Les neutrophiles sont capables de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via l'activation de la NADPH-oxydase. Cependant, l'activation incontrôlée de la NADPH-oxydase des neutrophiles peut entraîner de graves dommages à l'hôte et un stress oxydatif. Des études antérieures ont montré que les ANCA peuvent activer les neutrophiles in vitro pour générer de grandes quantités de ROS (Schreiber, Luft, et Kettritz 2004). Les

neutrophiles jouent un rôle clé dans la vascularite associée aux ANCA, à la fois en tant que cibles de l'auto-immunité et facilitateurs des lésions vasculaires.

Dans la GPA, les données concernant la production de ROS par les neutrophiles ne sont pas claires. En outre, des données récentes suggèrent que la production de ROS pourrait avoir un effet anti-inflammatoire grâce à la régulation de l'inflammasome et des cytokines liées à l'IL-1 (Schreiber, Luft, et Kettritz 2015). Nous avons donc analysé la production de ROS par les neutrophiles de patients atteints de GPA et étudié son association avec les cytokines liées à l'IL-1 et l'autoantigène PR3. Pour cette étude, soixante-douze patients atteints de GPA ont été inclus dans la cohorte prospective NEUTROVASC. La production de ROS a été évaluée dans le sang total des patients atteints de GPA active et comparée à celle des mêmes patients en rémission, ou à des témoins sains. Nous avons analysé, les associations entre la production de ROS, l'expression membranaire de PR3 sur les neutrophiles, les taux sériques de cytokines liées à l'IL-1 ainsi que les protéines liées à l'inflammasome.

Cette étude a permis l'observation d'un défaut important dans la production de ROS par les neutrophiles de patients atteints de GPA active par rapport aux témoins sains, indépendamment du traitement aux glucocorticoïdes. Les taux sériques de cytokines liées à l'IL-1 ont été significativement augmentés chez les patients atteints de GPA, en particulier chez les patients présentant une atteinte rénale, et les taux de ces cytokines sont revenus à la normale après que les patients ont atteint une rémission. De plus, les protéines liées à l'inflammasome étaient significativement dérégulées dans le cytosol des neutrophiles ainsi que dans le sérum des patients GPA. En conclusion, la production de ROS et la régulation de l'inflammasome dans les neutrophiles des patients atteints de GPA sont perturbées et pourraient constituer une cible thérapeutique potentielle.

Forte de mon expérience sur l'inflammasome, j'ai, pendant ma deuxième année de thèse, participé à cette étude sur la régulation des cytokines inflammatoires associées à l'activation de l'inflammasome dans la GPA. J'ai ainsi mené les expériences qui ont permis de montrer que les taux sériques des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-18 et IL-36 $\gamma$  étaient significativement augmentés chez les patients atteints de GPA, en particulier chez ceux présentant une atteinte rénale, avec un retour à des taux normaux après traitement. J'ai également mené les expériences qui ont montré que la protéine adaptatrice ASC, composant de l'inflammasome, était diminué significativement dans le cytosol des neutrophiles des patients GPA avant traitement. La corrélation inverse entre l'expression de la protéine ASC cytoplasmique et les

taux sériques d'IL-18 renforce l'hypothèse selon laquelle l'inflammasome est activé dans les neutrophiles de patients GPA et que les composants de l'inflammasome, dont ASC et FADD, pourraient être sécrétés dans la circulation de façon concomitante à l' IL-1 $\beta$  (Franklin et al. 2014; Baroja-Mazo et al. 2014; Mouasni et al. 2019).



Basic science

## Dysregulation of neutrophil oxidant production and interleukin-1–related cytokines in granulomatosis with polyangiitis

Jennifer Amsler <sup>1,2,3,†</sup>, Judith Everts-Graber <sup>1,2,3,†</sup>, Katherine R Martin <sup>1,2,4</sup>, Arnaud Roccbianca <sup>1,2</sup>, Chloé Lopes <sup>1,2</sup>, Léa Tourneur <sup>1,2</sup>, Julie Mocek <sup>1,2</sup>, Alexandre Karras <sup>5</sup>, Jean-Marc Naccache <sup>6</sup>, Bernard Bonnotte <sup>7</sup>, Maxime Samson <sup>7</sup>, Thomas Hanslik <sup>8</sup>, Xavier Puéchal <sup>1,2,9</sup>, Benjamin Terrier <sup>1,2,9</sup>, Loïc Guillevin <sup>1,2,9</sup>, Antoine Néel <sup>10,11</sup>, Luc Mouthon <sup>1,2,9</sup>, Véronique Witko-Sarsat <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR 8104, Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris Cité, Paris, France

<sup>3</sup>Department of Rheumatology and Immunology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland

<sup>4</sup>Inflammation Division, WEHI, and Department of Medical Biology, University of Melbourne, Parkville, Australia

<sup>5</sup>Department of Nephrology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

<sup>6</sup>Department of Pulmonology-Allergology-Thoracic Oncology, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Paris, France

<sup>7</sup>Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU Dijon, Dijon, France

<sup>8</sup>Service de Médecine Interne, Hôpital Ambroise-Paré, AP-HP, Boulogne Billancourt, France

<sup>9</sup>Department of Internal Medicine, Centre de Référence pour les Maladies Systémiques Autoimmunes Rares d'Île de France, Cochin Hospital, AP-HP, Paris, France

<sup>10</sup>Service de Médecine Interne, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>11</sup>CHU Nantes, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, Nantes Université, Nantes, France

\*Correspondence to: Véronique Witko-Sarsat, INSERM U1016, Institut Cochin, 27 rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France.

E-mail: veronique.witko@inserm.fr

<sup>†</sup>J.A. and J.E.-G. contributed equally.

### Abstract

**Objectives:** Neutrophils play a key role in ANCA-associated vasculitis, both as targets of autoimmunity and as facilitators of vascular damage. In granulomatosis with polyangiitis (GPA), the data regarding the production of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils are unclear. Further, recent data suggests that ROS production could have an anti-inflammatory effect through the regulation of inflammasomes and IL-1–related cytokines. We aimed to analyse ROS production in neutrophils from patients with GPA and investigate its association with IL-1–related cytokines and the autoantigen PR3.

**Methods:** Seventy-two GPA patients with disease flare were included in the NEUTROVASC prospective cohort study. ROS production in whole blood of patients with active GPA was evaluated and compared with that in the same patients in remission or healthy controls. Associations between ROS production, PR3 membrane expression on neutrophils, serum levels of IL-1–related cytokines as well as inflammasome-related proteins were analysed.

**Results:** We observed a robust defect in ROS production by neutrophils from patients with active GPA compared with healthy controls, independent of glucocorticoid treatment. Serum levels of IL-1–related cytokines were significantly increased in GPA patients, particularly in patients with kidney involvement, and levels of these cytokines returned to normal after patients achieved remission. Further, inflammasome-related proteins were significantly dysregulated in the cytosol of neutrophils as well as the serum from GPA patients.

**Conclusion:** Our data suggests that ROS production and regulation of inflammasomes in neutrophils from patients with GPA are disturbed and may be a potential therapeutic target.

**Trial registration:** ClinicalTrials.gov, <https://www.clinicaltrials.gov>, NCT01862068.

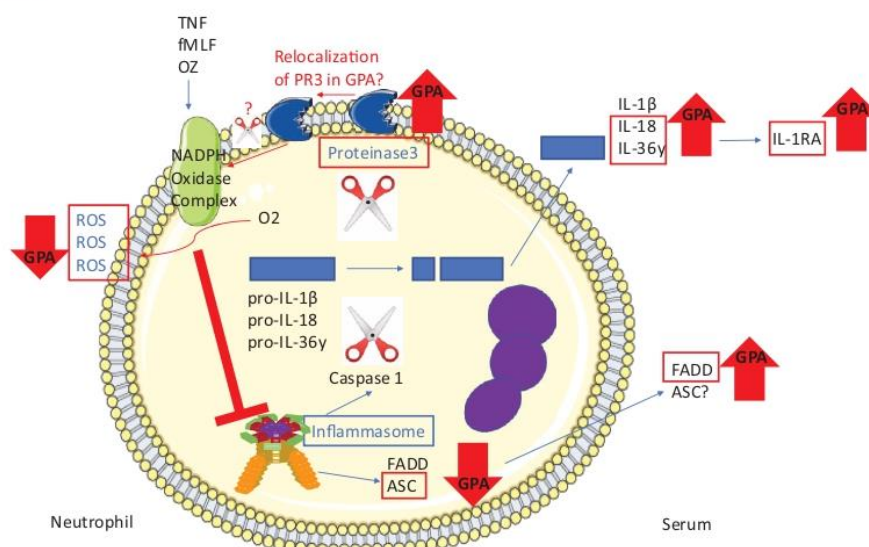
Received: 18 June 2023. Accepted: 6 October 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Rheumatology. All rights reserved.

For permissions, please email: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



## Graphical abstract



**Keywords:** vasculitis, oxidant, neutrophil, interleukin-1, inflammasome.

#### Rheumatology key messages

- Neutrophils from untreated patients with active granulomatosis with polyangiitis (GPA) have decreased reactive oxygen species production.
- GPA patients have increased levels of IL-1-related cytokines, which are linked to inflammasome activation.
- Antioxidants as a treatment strategy should be used with caution.

## Introduction

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is a rare and severe systemic autoimmune disease characterized by granulomatous inflammation and necrotizing vasculitis, predominantly affecting the respiratory tract and kidney [1]. GPA is associated with ANCA directed against the neutrophil serine protease proteinase 3 (PR3) and less frequently myeloperoxidase (MPO) [2, 3].

Neutrophils play a key pathophysiological role in ANCA-associated vasculitis (AAV) as both the target autoantigen and facilitators of vascular damage [3, 4]. Strong evidence indicates neutrophils mediate tissue damage in patients with AAV. They are abundant in the perivascular infiltrate surrounding arteries, arterioles and capillaries, particularly in the renal glomeruli and lungs [4].

In health, neutrophils are one of the first lines of defence in infection or tissue injury [5]. A key mechanism used to defend against bacteria is their ability to generate reactive oxygen species (ROS) via activation of NADPH oxidase. Importantly, uncontrolled neutrophil NADPH oxidase activation can result in severe damage to the host and oxidative stress.

Previous studies have shown that ANCA can activate neutrophils *in vitro* to generate large amounts of ROS [6], which are assumed to mediate vascular endothelium damage *in vivo* [7–10]. However, there is an ongoing debate as to whether

ROS production is paradoxically decreased in GPA patients or if this observed effect is solely due to glucocorticoid treatment. Two older studies have shown that glucocorticoids can influence neutrophil activity and ROS production in AAV and other patients [11, 12]. A more recent study found that neutrophils from treated and untreated patients with active AAV had a decreased capacity to generate ROS; however, that study included only a very small cohort of untreated patients [11–13].

A defect in ROS production can contribute to granulomatous lesions and bacterial infections, as shown in chronic granulomatous disease (CGD) [14]. Whether granuloma formation in GPA is also due to decreased ROS production remains undetermined. In terms of infections, GPA patients are not only at higher risk for bacterial infections [15], but are also at increased risk for chronic nasal and bronchial carriage of *Staphylococcus aureus*, found in 63% and 40% of GPA patients compared with 25% and 0% in healthy controls (HCs), respectively [16, 17]. It is yet to be investigated whether disease-related neutrophil dysfunction contributes to this phenomenon. The paradoxical finding of decreased ROS production in AAV is supported by another observation that NADPH oxidase-derived ROS may have anti-inflammatory properties in AAV. Indeed, mice lacking gp91phox or p47phox, which have defective NADPH activation, had accelerated disease in the MPO-ANCA-induced

glomerulonephritis model [18]. That study reported that NADPH oxidase can restrain inflammasome activation in ANCA-induced glomerulonephritis in murine monocytes and neutrophils [18]. In human monocytes, an inverse correlation was found between ANCA-induced ROS generation and IL-1 $\beta$  production [18].

Here, we examine the ability of neutrophils isolated from untreated GPA patients during a disease flare to generate ROS with or without physiologic stimuli. Further, we provide evidence that IL-1-related cytokines and inflammasome-related proteins are dysregulated in GPA patients.

## Materials and methods

### Study design

Patients who fulfilled the ACR classification criteria of 1990 [19] for AAV were recruited to the prospective multicentre NEUTROVASC study between May 2012 and May 2018 [Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) no. 2010-AOM10055, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01862068]. Blood samples from HCs were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS) in Paris. Patients and HCs gave written informed consent to participate in the NEUTROVASC study, which was approved by the Cochin Hospital Ethics Committee (CPP authorization #2011-12797) in accordance with the Declaration of Helsinki. Seventy-two GPA patients and 25 HCs were enrolled.

### Characteristics of patients

GPA patients were eligible for this study if they had active disease at the time of recruitment (M0), determined by a BVAS 3.0 of 3 or more [20]. Patients were followed-up 12 months after inclusion in the study (M12). Clinical and biological data were collected at the time of AAV diagnosis. Biological assessments and clinical manifestations at M0 and M12 are described in [Supplementary Table S1](#), available at *Rheumatology* online. Most patients (60%) were untreated at M0. Involvement of each organ system was assessed according to the BVAS.

### Collection of samples

Blood was collected into EDTA vacutainer tubes, and neutrophils were isolated using the Ficoll-Histopaque Gradient, as previously described [21].

### Measurement of ROS production by NADPH oxidase in whole-blood neutrophils

Production of NADPH oxidase-induced ROS was measured in whole blood from HCs or patients with GPA by chemiluminescence in a single-photon luminometer (AutoLumat LB953; Berthold, Victoria, Australia) with cyclic hydrazide luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione). One microlitre of blood per sample was resuspended in 100  $\mu$ l of HBSS and 100  $\mu$ l of luminol (10  $\mu$ M) was added to each tube. ROS production was measured under basal conditions and in response to (i) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1  $\mu$ g/ml final concentration), (ii) formylated peptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-MLF, 1  $\mu$ M final concentration) or (iii) opsonized zymosan (OZ, 100  $\mu$ g/ml final concentration). To measure responses to f-MLF and OZ, samples were either primed with TNF (20 ng/ml final concentration)

for 15 min at 37°C or left untreated. ROS production was measured in duplicate over 120 min and the results expressed as peak maximum per 1000 neutrophils [22].

### ELISA

Serum levels of ILs and Fas-associated death domain (FADD) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The IL-1RA ELISA kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA, KAC1181), IL-18 ELISA kit (MBL, 7620), IL-36 $\gamma$  DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, DY2320-05) were used to perform the ELISAs according to manufacturer's instructions. FADD ELISA was performed as previously described [23].

### Measurement of ASC protein expression in isolated neutrophils using western blot analysis

Isolated neutrophils from HCs or vasculitis patients were solubilized in a lysis buffer containing detergent (1% triton) [21]. Samples were separated on an SDS-PAGE gel and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA), as previously described [24]. Membranes were probed with anti-actin (Sigma, St. Louis, MO, USA, A2066; 1:1000 dilution) or anti-ASC (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, 13833; 1:1000) antibodies overnight at 4°C. After washing, secondary anti-rabbit IgG (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA; 1:5000) antibodies were applied. Immunoreactivity was visualized using enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Biosciences, Amersham, UK). Images were acquired and quantified using a Fusion FX7 imaging system (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany).

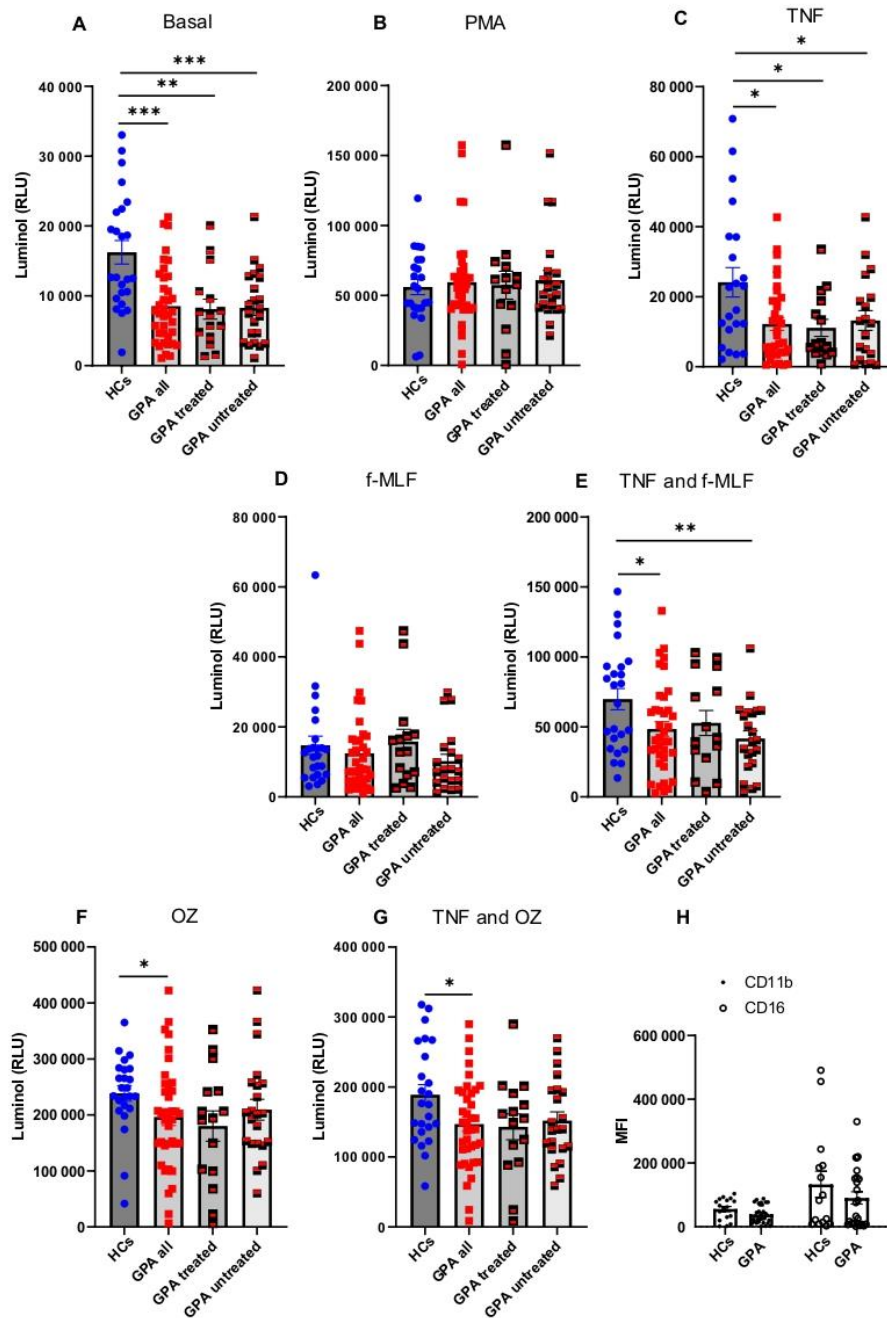
### Measurement of membrane expression of neutrophil activation marker flow cytometry analysis

Membrane PR3, CD16 and CD11b expression was assessed as previously described [21] using mouse anti-PR3 (Sanquin, Amsterdam, Netherlands, clone CLB12.8), mouse anti-CD16 (eBiosciences, Santa Clara, CA, USA, 16-0167-82) and a fluorochrome-conjugated anti-mouse IgG (Immunotech). Cells were acquired and analysed on a BD Accuri flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### Statistics

Data are shown as means  $\pm$  s.e.m. Statistical analyses were performed using Prism GraphPad 6 software. Comparisons were made using the Student paired *t* test or Wilcoxon matched-pairs test, when comparing GPA patients at M0 with the same GPA patients at M12. Comparisons were made using the Student unpaired *t* test or the non-parametric Mann-Whitney test when comparing GPA patients with HCs or comparing GPA patients with kidney involvement with GPA patients without kidney involvement, where appropriate. Correlations were assessed using the Pearson or Spearman tests. Differences were considered significant when the *P*-value was below 0.05.





**Figure 1.** The basal ROS production of neutrophils from GPA patients is reduced compared with healthy controls. (A) NADPH-dependent ROS production in neutrophils measured in whole blood collected from 24 HCs and 38 GPA patients using chemiluminescence. ROS production under resting conditions in all patients as well as in patients with ( $n=15$ ) or without any treatment at study inclusion ( $n=22$ ) and HCs. (B) ROS production after stimulation with PMA in 23 HCs and in 36 GPA patients, including treated ( $n=14$ ) and untreated ( $n=21$ ) patients. (C) ROS production after stimulation with TNF in 22 HCs and in 35 GPA patients, including 15 treated and 19 untreated patients and one patient with missing clinical data concerning treatment. (D) ROS production after stimulation with f-MLF in 24 HCs and 36 GPA patients as well as in 15 untreated and 20 treated patients. (E) ROS production after stimulation with TNF and f-MLF in 24 HCs and in 38 GPA patients, including 15 untreated and 22 treated patients and one patient with missing clinical data concerning treatment. (G) ROS production after stimulation with TNF and OZ in 24 HCs and in 38 GPA patients, including 15 untreated and 22 treated patients at study inclusion. (H) Membrane expression of the Fc gamma receptor III (CD16) measured by flow cytometry in 20 HCs and 23 GPA patients. (A–G) Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of the peak ROS production expressed as the peak of Relative Light Units (RLU), and the results are expressed per 1000 neutrophils. (H) Data are the mean  $\pm$  S.E.M. of the Mean Fluorescence Intensity (MFI). Significant differences between two groups were determined using unpaired *t*-tests or Mann–Whitney tests, when appropriate; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . GPA: granulomatosis with polyangiitis; ROS: reactive oxygen species; RLU: Relative Light Units; HC: healthy control; f-MLF: formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; OZ: opsonized zymosan

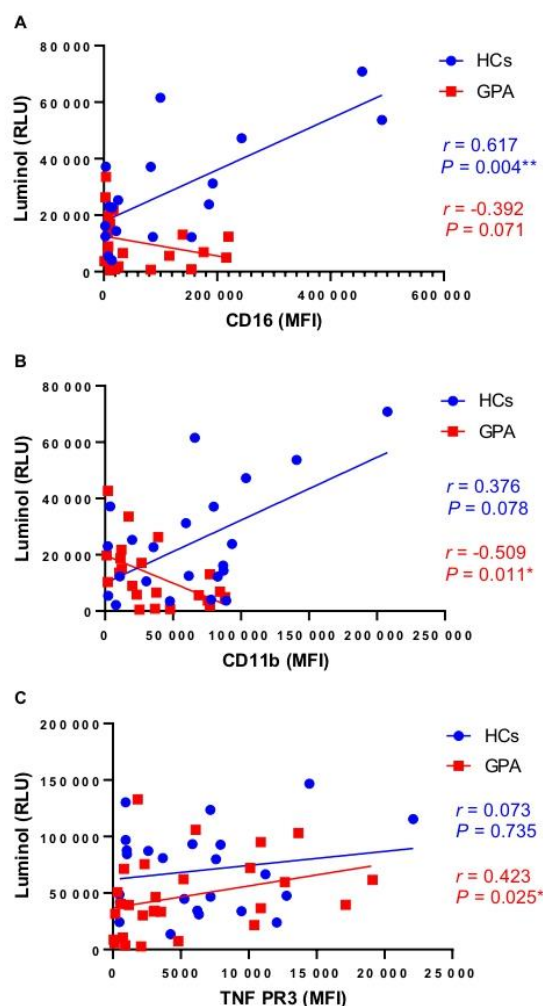
## Results

### ROS production in untreated GPA patients with active disease is decreased and returns to normal after treatment

ROS production was measured in HCs and GPA patients at a disease flare (M0) under basal conditions (Fig. 1A) and in response to PMA, a direct activator of protein kinase C (Fig. 1B). Under basal conditions, neutrophils from patients with active GPA (M0) produced less ROS than HC neutrophils, independent of immunosuppressive or immunomodulating treatment at M0, suggesting no significant influence of glucocorticoids on ROS production (Fig. 1A). In contrast, we observed no difference in ROS generation in neutrophils stimulated with PMA from HCs or GPA patients, indicating no underlying defect in NADPH oxidase components and no change in the ability of NADPH oxidase to produce high ROS levels (Fig. 1B).

### Disturbed NADPH oxidase signalling affects ROS production in response to physiologic stimuli in neutrophils from patients with active GPA

Next, we measured the effect of physiological agonists that mimic bacterial stimulation on ROS production. Neutrophils were activated through the FPR1 receptor by the bacterial formylated peptide f-MLF (Fig. 1D and E) or by a component of the yeast cell wall, OZ (Fig. 1F and G). Neutrophils stimulated with TNF alone showed decreased ROS production in GPA patients compared with HCs (Fig. 1C). This was not observed when the neutrophils were stimulated with f-MLF alone (Fig. 1D); however, ROS production was significantly decreased in neutrophils stimulated with f-MLF in GPA patients compared with HCs. This strongly suggests a defect in the intracellular signalling pathways rather than a deficiency in NADPH oxidase components, supported by the observation that there was no difference upon stimulation with PMA (Fig. 1E). Examining the effect of treatment, the defect in ROS production in neutrophils stimulated with TNF and f-MLF was only significantly different in untreated patients (Fig. 1E). Neutrophils from GPA patients produced significantly less ROS than those from HCs after phagocytosis of OZ in the presence or absence of TNF priming (Fig. 1F and G). Given ROS production following OZ stimulation depends on various phagocytosis receptors, including CD11b and CD16, levels of these proteins were measured [25]. Despite decreased ROS production after OZ stimulation, the expression of these two receptors did not differ significantly between GPA patients and HCs (Fig. 1H). We examined the correlation between expression of these receptors and ROS production after TNF priming, which induces adhesion-dependent NADPH oxidase activation [26]. As expected, there was a significant correlation between membrane expression of CD16 and ROS production and a trend towards a positive correlation between CD11b and ROS production in neutrophils from HCs (Fig. 2A, 2B). This confirms that CD16 expression and CD11b expression are associated with neutrophil activation. Surprisingly, neutrophils from GPA patients had a significant inverse correlation between CD11b and ROS production and a trend towards an inverse correlation between CD16 and ROS production (Fig. 2A, 2B). This inverse correlation in GPA neutrophils suggests that, although there is no significant decrease in CD16 and CD11b membrane expression, there may be a defect in the TNF-induced intracellular



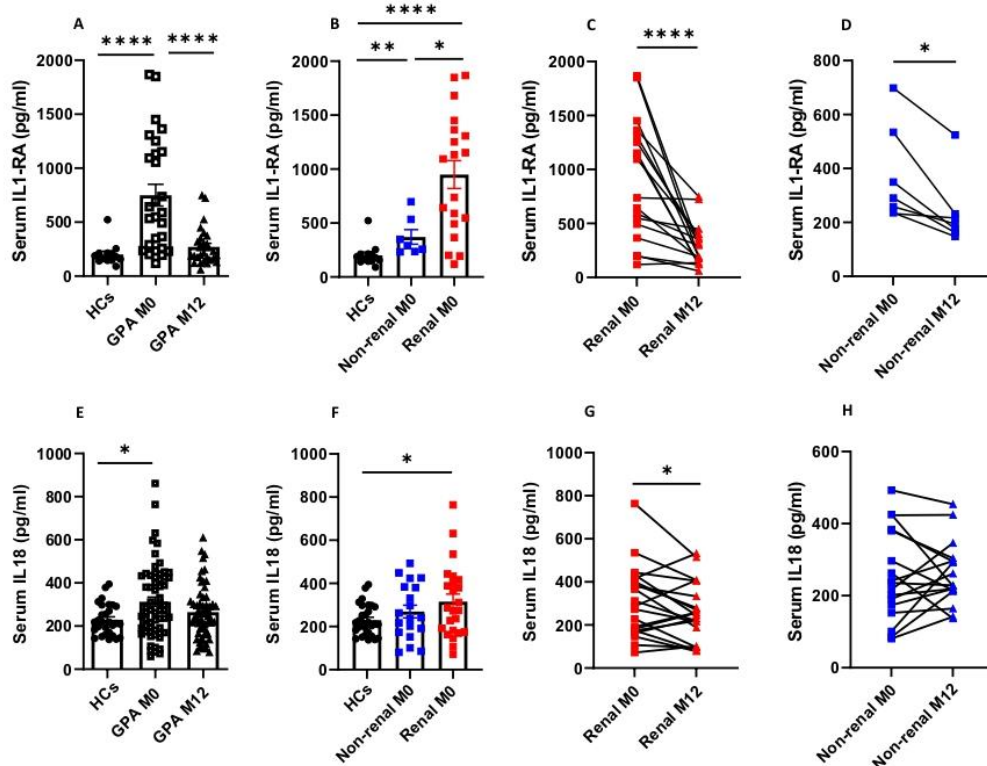
**Figure 2.** TNF-stimulated ROS production of neutrophils from GPA patients is inversely correlated with membrane expression of the activation marker CD11b. (A) Correlation of neutrophil ROS production in the presence of TNF and membrane expression of CD16 in 18 HCs and 21 GPA patients. (B) Correlation of ROS production in the presence of TNF and membrane expression of CD11b in 22 HCs and 22 GPA patients. (C) Correlation of ROS production in the presence of TNF and f-MLF and membrane expression of PR3 in TNF-stimulated neutrophils in 24 HCs and 28 GPA patients. Data are presented as the mean  $\pm$  s.e.m. of the peak ROS production expressed as the peak of Relative Light Units (RLU), and the results are expressed per 1000 neutrophils. CD16 and CD11b and PR3 expression are presented as mean  $\pm$  s.e.m. of Mean Fluorescence Intensity (MFI). Significant correlations were determined using a non-parametric Spearman correlation;  $r$ - and  $P$ -values are displayed. ROS: reactive oxygen species; GPA: granulomatosis with polyangiitis; HC: healthy control; f-MLF: formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; RLU: Relative Light Units; MFI: Mean Fluorescence Intensity

signalling pathways controlling NADPH oxidase-dependent ROS production.

### ROS production in neutrophils from GPA patients with active disease is correlated with membrane PR3 expression

To further explore ROS production in GPA patients, we examined whether there was an association between neutrophil ROS production and disease severity. We found no





**Figure 3.** IL-1RA and IL-18 serum levels are increased in GPA patients depending on the disease activity. (A) Serum IL-1RA levels in 27 GPA patients at disease flare (M0) and in remission (M12) and in 13 HCs. (B) Serum IL-1RA levels in GPA patients with ( $n=19$ ) and without ( $n=7$ ) kidney involvement at disease flare (M0) and in HCs ( $n=13$ ). Serum IL-1RA levels in 18 GPA patients with kidney involvement (C) and 7 GPA patients without kidney involvement (D) at disease flare (M0) and in remission (M12). (E) Serum IL-18 levels in GPA patients at disease flare (M0,  $n=62$ ) or after remission (M12,  $n=58$ ) and in HCs ( $n=29$ ). (F) Serum IL-18 levels in GPA patients with ( $n=24$ ) and without kidney involvement ( $n=19$ ) at disease flare (M0) and in HCs ( $n=29$ ). (G) Serum IL-18 levels in GPA patients with kidney involvement (G,  $n=21$ ) or without kidney involvement (H,  $n=17$ ) at disease flare (M0) and in remission (M12). Concentrations of IL-1RA and IL-18 levels are displayed as pg/ml. Data are the mean  $\pm$  s.e.m. Significant differences between groups were determined using an unpaired  $t$ -test or a Mann-Whitney test when appropriate, and a paired  $t$ -test (for M0-M12) or a Wilcoxon test when appropriate. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ . GPA: granulomatosis with polyangiitis; M0: at the time of recruitment; M12: 12 months after inclusion in the study; HC: healthy control

correlation between disease activity (as assessed by BVAS) and ROS production in whole-blood neutrophils in our patient cohort, neither under basal conditions nor after stimulation with PMA, f-MLF or OZ. This was regardless of TNF priming. Further, no significant difference in ROS production was observed between the 13 GPA patients without kidney involvement and the 22 with kidney involvement under any conditions (data not shown). There was also no association between BVAS or ANCA levels and ROS production. However, we found a positive correlation between PR3 membrane expression and ROS production following stimulation with TNF and f-MLF in GPA patients, but not in HCs (Fig. 2C). This suggests a possible dysregulation in PR3 localization related to NADPH oxidase function in GPA.

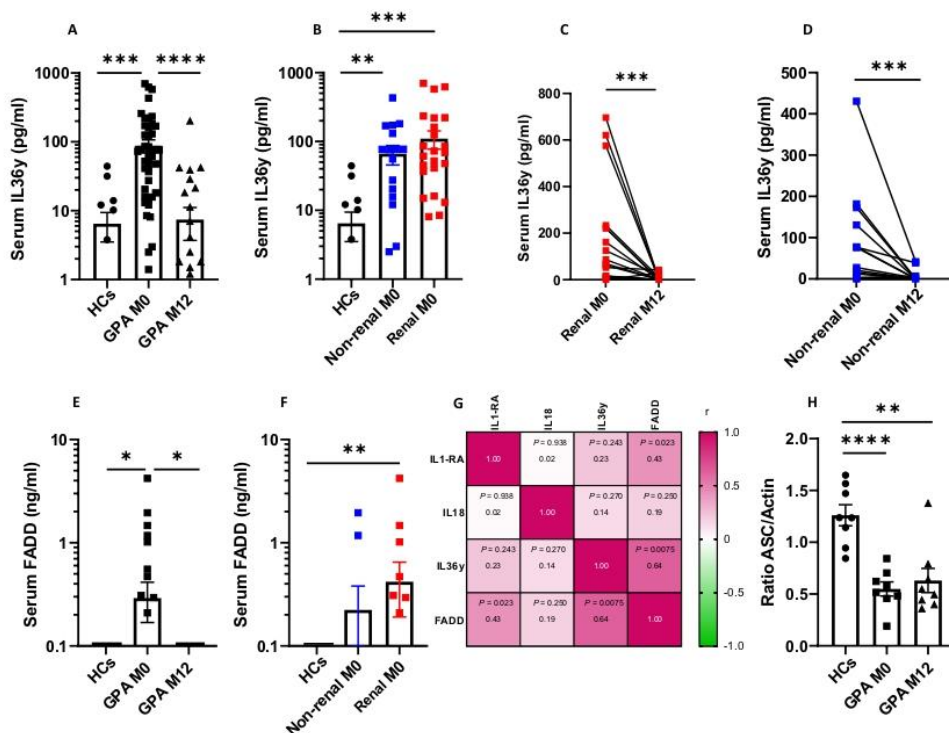
#### Serum IL-1-related cytokine levels are increased in GPA patients with active disease

NADPH oxidase defect has been shown to be associated with increased inflammasome activation [18]. Thus, we investigated inflammasome-related cytokines, including IL-1 family members [27]. As PR3 is known to cleave the proform of IL-1 $\beta$  and may also cleave IL-18 and IL-36y [24, 28–30], we

examined a possible association between the membrane expression of PR3 and the IL-1-related cytokines. As IL-1 $\beta$  was undetectable in sera of most GPA patients, we tested IL-1RA, a marker of inflammation and a natural antagonist of IL-1 $\beta$  that usually parallels IL-1 $\beta$  levels. There was a significant inverse correlation between serum IL-1RA and neutrophil membrane expression of PR3, regardless of TNF priming, in GPA patients (Supplementary Fig. S1A, available at *Rheumatology* online). However, we found no correlation between membrane PR3 expression and IL-18 and IL-36y.

IL-1RA was significantly upregulated in GPA patients at M0 and returned to HC levels by M12 (Fig. 3A), and this was unrelated to treatment at M0 (Supplementary Fig. S2A, available at *Rheumatology* online). IL-1RA levels were significantly higher in patients with than without kidney involvement (Fig. 3B), which was confirmed in the untreated subgroup (Supplementary Fig. S2B, available at *Rheumatology* online). A significant decrease in IL-1RA was observed at M12 in patients with and without kidney involvement (Fig. 3C and D), which was again confirmed in untreated patients (Supplementary Fig. S2C and D, available at *Rheumatology* online).

Serum IL-18 was significantly increased in GPA patients at M0, independent of treatment (Fig. 3E and Supplementary



**Figure 4.** IL-36 $\gamma$  serum levels are increased in GPA patients depending on the disease activity. (A) Serum IL-36 $\gamma$  levels in GPA patients at disease flare (M0,  $n = 62$ ) and after treatment to achieve remission (M12,  $n = 57$ ) and in HCs ( $n = 18$ ). (B) Serum IL-36 $\gamma$  levels in GPA patients with ( $n = 32$ ) and without kidney involvement ( $n = 23$ ) at disease flare (M0) and in HCs ( $n = 18$ ). Serum IL-36 $\gamma$  levels in GPA patients with (C,  $n = 26$ ) or without (D,  $n = 19$ ) kidney involvement at disease flare (M0) and in remission (M12). (E) Serum FADD levels in 40 GPA patients at disease flare (M0) and in remission (M12) and HCs ( $n = 19$ ). (F) Serum FADD levels in GPA patients with ( $n = 19$ ) and without ( $n = 14$ ) kidney involvement at disease flare (M0) and in HCs ( $n = 19$ ). (G) Correlation matrix of the IL-1-related cytokines as well as FADD. (H) Intracellular ASC/Actin ratios from neutrophil cytosol of 8 HCs as well as 8 GPA patients at M0 and M12. Concentrations of IL-36 $\gamma$  levels are displayed as pg/ml. Concentrations of FADD levels are displayed as ng/ml. Values between 0 and 1 pg/ml or 0 and 1 ng/ml are not displayed because of the logarithmic scale of the y-axis. Data are the mean  $\pm$  s.e.m. Significant differences between groups were determined using an unpaired t-test or a Mann-Whitney test when appropriate and a paired t-test or Wilcoxon test (for M0–M12) when appropriate. Significant correlations were determined using the non-parametric Spearman correlation;  $r$ - and  $P$ -values are displayed. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . GPA: granulomatosis with polyangiitis; M0: at the time of recruitment; M12: 12 months after inclusion in the study; HC: healthy control; FADD: Fas-associated death domain

Fig. S3A, available at *Rheumatology* online). In the subgroup analysis of patients with and without kidney involvement, this increase was only significant in patients with kidney involvement (Fig. 3F), again independent of treatment (Supplementary Fig. 3B, available at *Rheumatology* online). The increase in serum IL-18 returned to HC levels at M12 in patients with kidney involvement (Fig. 3G). In patients without kidney involvement (Fig. 3H), and in subgroup analyses of treated and untreated patients (Supplementary Fig. S3C and D, available at *Rheumatology* online), levels did not change significantly at M12.

There was a significant increase in serum IL-36 $\gamma$  in GPA patients at M0 compared with HCs, which normalized to HC levels at M12 (Fig. 4A). This observation was independent of treatment at M0 (Supplementary Fig. S4A, available at *Rheumatology* online). We found no significant difference in serum levels of IL-36 $\gamma$ , regardless of renal involvement or treatment status at M0 (Fig. 4B and Supplementary Fig. S4B, available at *Rheumatology* online). IL-36 $\gamma$  returned to HC levels in patients, regardless of kidney involvement or treatment at M0 (Fig. 4C and D and Supplementary Fig. S4C and D, available at *Rheumatology* online).

#### Inflammasome-related proteins are activated in GPA patients with active disease

To assess inflammasome-activity in GPA patients, we analysed FADD, a protein secreted after NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome activation in human monocytes/macrophages [30]. In our cohort of patients, FADD was significantly increased in the sera of GPA patients at M0 compared with HCs, and by M12 the levels were equivalent to those in HCs (Fig. 4E). This observation was again independent of treatment of patients at M0 (Supplementary Fig. S5A, available at *Rheumatology* online). There was no difference between patients with or without kidney involvement (Fig. 4F). Despite this, the difference between patients with kidney involvement and HCs was greater compared to patients with and without kidney involvement, similar to the results obtained for IL-36 $\gamma$  and IL-1RA and independent of treatment (Fig. 4F and Supplementary Fig. S5B, available at *Rheumatology* online). We found a positive correlation between FADD and both IL-1RA and IL-36 $\gamma$ , with the greatest significance in correlation between IL-36 $\gamma$  and FADD (Fig. 4G). To strengthen our hypothesis of inflammasome activation in neutrophils of GPA patients, we



quantified Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) (a key adaptor protein involved in activation of the inflammasome) in the neutrophil cytosol of GPA patients [27]. Interestingly, we found a significant decrease in ASC in the neutrophil cytosol of GPA patients at M0 (Fig. 4H), which was inversely correlated to IL-18 (Supplementary Fig. S5C, available at *Rheumatology* online). An explanation could be that, after activating the inflammasome, neutrophils from GPA patients release this protein into the circulation, similarly to FADD. This suggests a role of the inflammasome in the pathogenesis of GPA.

## Discussion

In this study, we showed a significant decrease in NADPH oxidase-dependent ROS production in neutrophils from untreated GPA patients compared with HCs at basal state. ROS production was also significantly lower in neutrophils from GPA patients after stimulation with physiologic stimuli such as bacterial peptides (f-MLF) and phagocytosis of yeast components (OZ) after priming with TNF. These physiologic stimuli activate different phosphorylation signalling pathways to trigger NADPH oxidase activation. For instance, activation of the MAP kinase pathway is common after stimulation of neutrophils with f-MLF and OZ [31–33]. In contrast, our study demonstrates that HCs and GPA neutrophils have the same capacity to assemble the NADPH oxidase complex, evidenced by normal ROS production after stimulation by PMA, a direct activator of protein kinase C, indicating no alteration in this latter phosphorylation cascade or direct defects in NADPH oxidase assembly in GPA neutrophils. We did not stimulate ROS production by ANCA, because this has already been investigated by other groups [6]. However, using a variety of agonists we were able to provide novel findings related to neutrophil activation in GPA patients.

Whether NADPH oxidase-dependent ROS production is also dysregulated in microscopic polyangiitis (MPA) has not been investigated yet. Nonetheless, preliminary data obtained in our cohort of 12 MPA patients compared with 24 HCs showed that ROS production is not different at the basal state or following PMA, f-MLF or OZ activation, suggesting that the defect in NADPH oxidase-dependent ROS production could be specific to GPA patients (Supplementary Fig. S6, available at *Rheumatology* online).

Whether glucocorticoids modulate NADPH oxidase activity remains controversial. Two studies showed that glucocorticoids were associated with reduced ROS formation [11, 12], while a more recent publication reported no association with glucocorticoids in AAV patients with active disease, consistent with our finding [13]. The discrepancy between our findings and the study by Macconi *et al.* [12] may relate to the sample size or dose of glucocorticoid treatment. While our study assessed ROS production in neutrophils from 38 GPA patients, Macconi *et al.* examined only 6 patients treated with a very high dose of glucocorticoids (1.5 mg/kg bodyweight i.v. methylprednisolone for 3 days). In our study, only 3/26 (11.5%) of all treated patients received i.v. methylprednisolone prior to blood withdrawal. Nevertheless, the large number of untreated GPA patients with a disease flare in our study showed decreased ROS production, which is highly suggestive of being due to the underlying pathology rather than any drug effect.

As previously described, NADPH oxidase can restrain inflammasome-induced IL-1 $\beta$  production in monocytes and neutrophils in a murine model of ANCA-induced glomerulonephritis [18]. We found a significant increase in the serum levels of IL-1-related cytokines (such as IL-1RA, IL-18 and IL-36 $\gamma$ ) in GPA patients, particularly in those patients with kidney involvement. The finding that IL-18 increases in GPA patients with active disease is in line with previous findings reported in the literature [34]. Additionally, we analysed FADD, a protein secreted following NLRP3 inflammasome activation in human monocytes/macrophages and considered a surrogate marker of inflammasome activation [23]. In our study, FADD was significantly increased in sera from GPA patients with active disease compared with HCs and levels normalized during remission. Given the positive correlation between IL-1RA and IL-36 $\gamma$  with FADD, we suggest involvement of the inflammasome in the pathogenesis of GPA. The involvement of the neutrophil inflammasome in GPA patients is supported by an intracellular decrease in the key adaptor protein of inflammasome activation, called ASC. The inverse correlation of cytoplasmic ASC and serum levels of IL-18 strengthen our hypothesis that the inflammasome is activated in GPA and that ASC might be released into circulation after being activated, similarly to FADD. These results suggest that inflammasome-related proteins such as serum FADD or neutrophil ASC may be used as clinical biomarkers for assessing disease activity in GPA [35].

Previous studies from our group [36] and others [37] highlight a key role for membrane PR3 in GPA pathophysiology [4, 38]. Neutrophil-derived proteases including PR3 can destroy vessels by causing endothelial cell apoptosis [39] and can promote the generation of IL-1 $\beta$ , both *in vivo* in mice and *in vitro* in response to ANCA [40]. PR3 can enzymatically process IL-1 $\beta$  and may also cleave IL-18 [28] and IL-36 [30]. Furthermore, we have previously shown that apoptosis can increase membrane expression of PR3, which in turn subverts immune silencing and anti-inflammatory pathways induced in macrophages after phagocytosis of apoptotic cells [29]. This effect was dependent on the IL-1 receptor on macrophages, highlighting a key role of IL-1 $\beta$  in this process [21, 41]. In this study, we have shown an inverse correlation between PR3 expression and serum IL-1RA levels in GPA patients, which was unexpected. Taking into account the cytokine-binding capacity of PR3, as demonstrated for IL-32, it can be hypothesized that membrane PR3 could bind soluble IL-1RA, thereby decreasing its serum levels [42]. However, this remains speculative, and further studies of the IL-1-related system in GPA are needed to fully interpret our results.

Lastly, we showed that ROS production after stimulation with TNF and f-MLF was positively correlated with PR3 membrane expression in GPA patients. This same correlation was not seen in HCs. It is worth noting that PR3 can mediate protein associations through its hydrophobic patch, as previously described [43, 44]. Importantly, PR3 is known to be associated with components of NADPH oxidase, especially GP91phox, in turn decreasing its activity [45]. Our findings suggest a possible dysregulation in the localization of PR3 related to NADPH oxidase function.

Although we do not provide any molecular insight regarding the identification of the proteins regulating NADPH oxidase activity that can be targeted by PR3 in neutrophils from GPA patients, our work highlights for the first time that



neutrophils from GPA patients with a disease flare have an intrinsic abnormal regulation of NADPH oxidase activation.

Based on our findings that PR3 is correlated with ROS production and IL-1-related cytokines, we propose that PR3 plays a key role in connecting defective ROS production and increased release of IL-1-related cytokines by a novel circuit that might be specific for this pathophysiological condition. This may be due to the ability of PR3 to associate with or cleave key proteins involved in inflammation and autoimmunity [46].

Taken together, our data shows defective ROS production by neutrophils from GPA patients, unrelated to treatment, and an increase in IL-1-related cytokines as well as a dysregulated connection with membrane expression of the autoantigen PR3.

### Supplementary material

Supplementary material is available at *Rheumatology* online.

### Data availability

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

### Contribution statement

J.A., J.E.G., K.M., A.R., J.M., C.L. and L.T. performed the experiments. J.A., J.E.G., K.M. and A.R. analysed the results. A.R., J.N., M.S., T.H., X.P., B.T., L.G., A.N. and L.M. recruited the patients and collected the clinical data. J.A., J.E.G., K.M. and V.W.S. wrote the manuscript. V.W.S. and L.M. conceived the project and obtained fundings. All authors approved the final version to be submitted for publication.

### Funding

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale grant [EQU202003010155] (to V.W.S.); the Investissements d'Avenir programme [ANR-11-IDEX-0005-02], the Sorbonne Paris Cité, LabEx INFLAMEX (to V.W.S. and L.M.); LabEx LipSTIC [ANR-11-LABX-0021], the Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Ministry of Health, PHRC [2010-AOM10055] (to L.M.) and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP). J.G.E. and J.A. were supported by a fellowship from the Swiss Society of Rheumatology. K.R.M. was supported by an Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) fellowship [1092602]. C.L. is supported by a scholarship from the French Ministry of Tertiary Education.

**Disclosure statement:** X.P. reports support from GlaxoSmithKline and Vifor for Congress inscription and/or travel. X.P. reports grants from Roche Pharma as investigator of academic studies of ANCA-associated vasculitis for which rituximab was provided by Roche Pharma. X.P. has been an investigator in studies evaluating avacopan (ChemoCentryx) in ANCA-associated vasculitis. X.P. has been an investigator in studies evaluating vilobelimumab (InflaRx) in ANCA-associated vasculitis. K.M. has received a grant from Arthritis Australia and project funding from CSL Innovation. B.T. has received consulting fees from Vifor Pharma, AstraZeneca, and GlaxoSmithKline. B.T. has received payment for presentations from Vifor Pharma, AstraZeneca, GlaxoSmithKline,

Pfizer, Boehringer Ingelheim, and Janssen. A.N. has received consulting fees and payment for presentations from Vifor Pharma. All the other authors have declared no conflicts of interest.

### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the technical expertise of Rémy Tristan and Nicolas Tamas; Muriel Andrieu and Karine Labroquère of the Cochin Cytometry and Immunobiology facility; and the Etablissement Français du Sang (Saint Antoine Hospital, Paris, France). We thank the clinicians of the Groupe Français d'Etude des vascularites (GFEV) and of the NEUTROVASC study for patient recruitment: Amélie Servettaz, Isabelle Marie, Mohamed Hamidou, Gilles Hayem, Philippe Rémy, Jonathan London, Pascal Cohen and Jacques Cadranet. Special thanks go to Hicham Kardaoui and Séverine Ait-el-Ghaz-Poignant from the Unité de Recherche Clinique de Cochin (URC).

### References

- Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA *et al.* 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65:1–11.
- Lamprecht P, Kerstein A, Klapa S *et al.* Pathogenetic and clinical aspects of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitides. *Front Immunol* 2018;9:680.
- Kitching AR, Anders HJ, Basu N *et al.* ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6:71.
- Aymonnier K, Amsler J, Lamprecht P, Salama A, Witko-Sarsat V. The neutrophil: a key resourceful agent in immune-mediated vasculitis. *Immunol Rev* 2023;314:326–56.
- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014;15:602–11.
- Schreiber A, Luft FC, Kettritz R. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int* 2004; 65:2172–83.
- Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 4115–9.
- Ben-Smith A, Dove SK, Martin A, Wakelam MJ, Savage CO. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies from patients with systemic vasculitis activate neutrophils through distinct signaling cascades: comparison with conventional Fcγ receptor ligation. *Blood* 2001;98:1448–55.
- Radford DJ, Lord JM, Savage CO. The activation of the neutrophil respiratory burst by anti-neutrophil cytoplasm autoantibody (ANCA) from patients with systemic vasculitis requires tyrosine kinases and protein kinase C activation. *Clin Exp Immunol* 1999; 118:171–9.
- Reumaux D, Vossebeld PJ, Roos D, Verhoeven AJ. Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fcγ receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* 1995;86:3189–95.
- Fukushima K, Ando M, Ito K, Suga M, Araki S. Stimulus- and cumulative dose-dependent inhibition of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by polymorphonuclear leukocytes of patients receiving corticosteroids. *J Clin Lab Immunol* 1990;33:117–23.
- Macconi D, Zanoli AF, Orisio S *et al.* Methylprednisolone normalizes superoxide anion production by polymorphs from patients with ANCA-positive vasculitides. *Kidney Int* 1993;44:215–20.
- Johansson Å, C, Ohlsson, S, Pettersson, Å *et al.* Impaired phagocytosis and reactive oxygen species production in phagocytes is associated with systemic vasculitis. *Arthritis Res Ther* 2016;18:92.



14. Blancas-Galicia L, Santos-Chávez E, Deswarte C *et al.* Genetic, Immunological, and Clinical Features of the First Mexican Cohort of Patients with Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol* 2020;40:475–93.
15. Charlier C, Henegar C, Launay O *et al.* Risk factors for major infections in Wegener granulomatosis: analysis of 113 patients. *Ann Rheum Dis* 2009;68:658–63.
16. Kallenberg CG, Tadema H. Vasculitis and infections: contribution to the issue of autoimmunity reviews devoted to “autoimmunity and infection”. *Autoimmun Rev* 2008;8:29–32.
17. Richter AG, Stockley RA, Harper L, Thickett DR. Pulmonary infection in Wegener granulomatosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2009;64:692–7.
18. Schreiber A, Luft FC, Kettritz R. Phagocyte NADPH oxidase restrains the inflammasome in ANCA-induced GN. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:411–24.
19. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA *et al.* The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener’s granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1101–7.
20. Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ *et al.* Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994;87:671–8.
21. Everts-Graber J, Martin KR, Thiebtemont N *et al.* Proteomic analysis of neutrophils in ANCA-associated vasculitis reveals a dysregulation in proteinase 3-associated proteins such as annexin-A1 involved in apoptotic cell clearance. *Kidney Int* 2019;96:397–408.
22. Ohayon D, De Chiara A, Dang PM *et al.* Cytosolic PCNA interacts with p47phox and controls NADPH oxidase NOX2 activation in neutrophils. *J Exp Med* 2019;216:2669–87.
23. Mouasni S, Gonzalez V, Schmitt A *et al.* The classical NLRP3 inflammasome controls FADD unconventional secretion through microvesicle shedding. *Cell Death Dis* 2019;10:190.
24. Gabillet J, Millet A, Pederzoli-Ribeil M *et al.* Proteinase 3, the autoantigen in granulomatosis with polyangiitis, associates with calreticulin on apoptotic neutrophils, impairs macrophage phagocytosis, and promotes inflammation. *J Immunol* 2012;189:2574–83.
25. Le Cabec V, Carréno S, Moisan A, Bordier C, Maridonneau-Parini I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *J Immunol* 2002;169:2003–9.
26. Nathan C, Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist’s guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 2013;13:349–61.
27. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D *et al.* NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol* 2015;4:296–307.
28. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: variations on a Common Theme. *Immunity* 2015;42:991–1004.
29. Millet A, Martin KR, Bonnefoy F *et al.* Proteinase 3 on apoptotic cells disrupts immune silencing in autoimmune vasculitis. *J Clin Invest* 2015;125:4107–21.
30. Elias M, Zhao S, Le HT *et al.* IL-36 in chronic inflammation and fibrosis—bridging the gap? *J Clin Invest* 2021;131:e144336.
31. Hawkins PT, Davidson K, Stephens LR. The role of PI3Ks in the regulation of the neutrophil NADPH oxidase. *Biochem Soc Symp* 2007;59–67.
32. Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M *et al.* Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol* 2013;85:92–100.
33. van der Veen BS, Chen M, Müller R *et al.* Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody pathogenicity in vitro and in vivo. *Ann Rheum Dis* 2011;70:356–65.
34. Novick D, Elbirt D, Dinarello CA, Rubinstein M, Sthoeger ZM. Interleukin-18 binding protein in the sera of patients with Wegener’s granulomatosis. *J Clin Immunol* 2009;29:38–45.
35. Mouasni S, Tourneur L. FADD at the Crossroads between Cancer and Inflammation. *Trends Immunol* 2018;39:1036–53.
36. Witko-Sarsat V, Lesavre P, Lopez S *et al.* A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1224–33.
37. Bauer S, Abdgawad M, Gunnarsson L *et al.* Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007;81:458–64.
38. Martin KR, Witko-Sarsat V. Proteinase 3: the odd one out that became an autoantigen. *J Leukoc Biol* 2017;102:689–98.
39. Massicotte-Azarniouch D, Herrera CA, Jennette JC, Falk RJ, Free ME. Mechanisms of vascular damage in ANCA vasculitis. *Semin Immunopathol* 2022;44:325–45.
40. Schreiber A, Pham CT, Hu Y *et al.* Neutrophil serine proteases promote IL-1 $\beta$  generation and injury in necrotizing crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:470–82.
41. Harper L, Cockwell P, Adu D, Savage CO. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 2001;59:1729–38.
42. Novick D, Rubinstein M, Azam T *et al.* Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3316–21.
43. Hajjar E, Mihajlovic M, Witko-Sarsat V, Lazaridis T, Reuter N. Computational prediction of the binding site of proteinase 3 to the plasma membrane. *Proteins* 2008;71:1655–69.
44. Kantari C, Millet A, Gabillet J *et al.* Molecular analysis of the membrane insertion domain of proteinase 3, the Wegener’s autoantigen, in RBL cells: implication for its pathogenic activity. *J Leukoc Biol* 2011;90:941–50.
45. Tal T, Sharabani M, Aviram I. Cationic proteins of neutrophil azurophilic granules: protein-protein interaction and blockade of NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol* 1998;63:305–11.
46. Brieske C, Lamprecht P, Kerstein-Staehle A. Immunogenic cell death as driver of autoimmunity in granulomatosis with polyangiitis. *Front Immunol* 2022;13:1007092.

# Discussion et perspectives



# Discussion

L'inflammasome NLRP3 et la protéine PCNA sont deux acteurs clés respectivement de la réponse immunitaire et de la régulation de la prolifération cellulaire. L'inflammasome NLRP3 est un complexe multiprotéiques cytoplasmique impliqué dans la réponse inflammatoire et la défense immunitaire de l'organisme, tandis que PCNA est une protéine nucléaire essentielle à la réplication et à la réparation de l'ADN. Bien que ces deux molécules aient traditionnellement des fonctions distinctes dans des compartiments cellulaires différents, des découvertes récentes ont révélé un possible lien surprenant entre elles.

L'inflammasome NLRP3 est un complexe multiprotéique qui joue un rôle clé dans la réponse immunitaire innée. Il est composé de plusieurs protéines, dont NLRP3, ASC, et la Caspase-1. Son rôle principal est de détecter les signaux de danger, tels que les infections bactériennes, les cristaux, ou les lésions cellulaires, et d'initier une réponse inflammatoire en activant la Caspase-1. Cette activation entraîne la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , ainsi que la pyroptose, une forme de mort cellulaire inflammatoire.

PCNA, quant à elle, est largement connue pour son rôle dans la réplication de l'ADN, où elle agit comme une pince moléculaire, favorisant l'activité des ADN polymérases. Elle est également impliquée dans la réparation de l'ADN en recrutant des protéines nécessaires à la correction des lésions. Cependant, ces dernières années, des études ont révélé que PCNA peut également se retrouver dans le cytoplasme de certaines cellules différenciées, notamment des neutrophiles. Cette relocalisation de PCNA dans le cytoplasme a suscité l'intérêt de cette recherche, car dans le cytoplasme PCNA régule l'activation des pro-Caspases apoptotiques. En tant que protéine d'échafaudage, PCNA pourrait potentiellement jouer un rôle clé en tant que plateforme de régulation de l'inflammasome NLRP3 en interagissant avec les Caspases qui font partie intégrante de ce complexe inflammatoire.

## **I. PCNA un nouveau régulateur de l'inflammasome NLRP3**

### **1) Effet sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique**

Dans notre étude, nous avons identifié que PCNA pourrait avoir un effet sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 dépendant de sa localisation cytoplasmique. En effet, l'inhibition de son interaction avec ses partenaires n'a montré d'effet que dans les cellules THP-1

différenciées en macrophages mais n'a montré en revanche aucun effet dans les monocytes THP-1 où la protéine PCNA est majoritairement nucléaire, indiquant ainsi que la localisation majoritairement cytoplasmique de PCNA pourrait être indispensable pour son rôle de régulateur dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Dans notre étude nous avons utilisé deux inhibiteurs de l'interaction de PCNA avec ses partenaires, le peptide p21 et le T2AA (**Figure 15**). Le peptide p21 est un peptide inhibiteur du PCNA issu de la protéine p21 qui est la protéine partenaire de PCNA présentant la plus grande affinité d'interaction connue avec elle (Waga et al. 1994). La majorité des partenaires interagissant avec la protéine PCNA, y compris p21, possède une courte séquence d'acides aminés caractéristique appelée boîte PIP qui se lie à l'IDCL de PCNA (Figure 15A) (Gulbis et al. 1996). Le T2AA est un inhibiteur non peptidique de PCNA qui, comme p21, peut se lier à une cavité profonde de PCNA qui interagit avec la boîte PIP, l'IDCL. Le T2AA peut également se lier à un autre site, une cavité peu profonde présente à l'interface de l'homotrimère PCNA adjacente à la lysine 164 (Figure 15B) (Punchihewa et al. 2012).

Le peptide p21 a un effet inhibiteur significatif sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique dans notre modèle d'étude. En effet, lorsqu'il est utilisé pour entraver l'interaction de la protéine PCNA avec ses partenaires, il conduit à une réduction notable de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigéricine. De plus, le peptide p21 a également un impact sur le clivage de la pro-Caspase-1 et de la GSDMD, des événements moléculaires cruciaux dans le processus d'activation de l'inflammasome et l'induction de pyroptose. En revanche, le peptide p21 ne diminue pas significativement l'activation de l'inflammasome induite par les cristaux de monosodium urate.

De la même façon, le T2AA, autre inhibiteur de l'interaction entre PCNA et ses partenaires, peut induire une inhibition de l'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique dans notre modèle, mais son effet semble varier en fonction du stimulus d'activation. Par exemple, il réduit de manière significative la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par les cristaux de monosodium urate, mais il n'a aucune tendance à diminuer la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse à la nigéricine. De plus, le T2AA induit également une diminution du clivage de la pro-Caspase-1 et de la GSDMD induite par le MSU, suggérant qu'il affecte également les étapes moléculaires impliquées dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules THP-1 macrophagiques.

Ces résultats indiquent que PCNA, en tant que protéine d'échafaudage, pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3 en interagissant avec divers partenaires protéiques. L'effet inhibiteur du peptide p21 et du T2AA sur cette interaction suggère que PCNA pourrait servir de plateforme de régulation cruciale pour le fonctionnement de l'inflammasome NLRP3 en réponse à différentes stimulations. De façon notable, différentes substances inhibitrices de l'interaction de PCNA (p21 et T2AA) ont montré des effets différents sur l'inflammasome en fonction du type de stimulus inflammatoire. Cela suggère que la régulation par PCNA est contexte-dépendante et que des mécanismes spécifiques pourraient être impliqués. Il est important de comprendre ces mécanismes spécifiques pour pouvoir dans le futur développer des thérapies ciblées. Pour mieux appréhender cette différence d'effet, il conviendra dans un premier temps d'étudier d'autres activateurs de l'inflammasome NLRP3, en plus de la nigéricine et des cristaux de MSU, pour obtenir une image plus complète de la régulation de cette voie inflammatoire canonique. Nous pourrions ainsi déterminer si l'effet des inhibiteurs dépend du type de stimuli : toxines formant des pores, cristaux, ATP, agents infectieux... ; ou si l'effet dépend plus des mécanismes moléculaire et cellulaire induits : efflux de potassium, mobilisation du calcium, rupture des lysosomes ou encore des signaux mitochondriaux...

En effet, différentes études ont montré que selon les stimuli d'induction de l'inflammasome NLRP3, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui en découlaient différaient. En plus de la nigéricine, d'autres toxines bactériennes sont capables d'activer l'inflammasome NLRP3 en perturbant l'homéostasie ionique cellulaire. Lorsque la membrane cellulaire est endommagée ou que des pores sont formés, cela peut entraîner une fuite d'ions potassium hors des cellules, ce qui est perçu comme un signal de danger par l'inflammasome NLRP3. En effet, la maïtotoxine produite par la microalgue *Gambierdiscus toxicus* (Mariathasan et al. 2006), la candidalysine produite par le champignon microscopique *Candida Albicans* (Kasper et al. 2018) ou encore l'Hémolysine BL (HBL) produite par *Bacillus cereus* (Mathur et al. 2019) sont des toxines entraînant l'activation de l'inflammasome NLRP3 par un efflux de potassium. De plus, l'ATP extracellulaire est également un stimulus activateur induisant l'activation de l'inflammasome NLRP3 via un efflux de potassium (Mariathasan et al. 2006). En plus des cristaux de MSU, d'autres types de cristaux tels que les cristaux de silice et les cristaux d'alun peuvent activer l'inflammasome NLRP3 en induisant des dommages et rupture des lysosomes (Hornung et al. 2008). Examiner comment la protéine PCNA cytoplasmique affecterait la

réponse inflammatoire selon le signal/mécanisme d'activation pourrait révéler des différences mécanistiques subtiles. Explorer d'autres activateurs comme l'ATP, une autre toxine formant des pores comme la maïtotoxine et un autre type de cristaux comme les cristaux d'alun nous permettrait de révéler comment la protéine PCNA cytoplasmique pourrait influencer sur la réponse inflammatoire dans différentes situations. En étudiant la régulation de l'inflammasome NLRP3 par la protéine PCNA cytoplasmique en réponse à divers activateurs, nous pourrions ainsi obtenir une compréhension plus complète de son rôle dans la réponse inflammatoire et des différents mécanismes sous-jacents. Cela pourrait également avoir des implications pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, en orientant sur l'utilisation d'un type d'inhibiteur plutôt qu'un autre, selon les maladies inflammatoires concernées.

## **2) Co-sécrétion de PCNA avec les composants inflammatoires ?**

Dans notre étude, nous avons observé que PCNA interagit avec la protéine NLRP3 en condition basale ou après activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigéricine, dans les cellules THP-1 macrophagiques. Nous avons également montré que PCNA est relarguée dans le milieu extracellulaire après l'activation de l'inflammasome par la nigéricine. Or, une autre étude a montré que, dans les monocytes THP-1, les différents composants de l'inflammasome NLRP3, tels que la Caspase-1, ASC, NLRP3, FADD et l'IL-1 $\beta$ , sont sécrétés hors de la cellule dans des microvésicules dérivées de la membrane plasmique (Mouasni et al. 2019). PCNA pourrait donc être co-sécrétée dans ces microvésicules en même temps que les autres composants de l'inflammasome, et pourrait même interagir avec NLRP3 jusqu'à cette sécrétion extracellulaire. Il faudrait dans un premier temps vérifier que les composants de l'inflammasome sont également présents dans le sécrétome des cellules macrophagiques après activation de l'inflammasome, puis vérifier la présence de vésicules extracellulaires et enfin voir si le complexe PCNA/NLRP3 est présent dans ces vésicules.

## **3) Régulation de l'inflammasome non canonique**

Nos résultats de recherche montrent que PCNA pourrait jouer un rôle dans la régulation à la fois de l'inflammasome NLRP3 canonique et non canonique, bien que les mécanismes précis puissent différer en fonction des stimuli. En effet, nous avons montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique par la phagocytose de bactéries *E.coli* entéro-pathogènes est perturbée par l'inhibition de l'interaction de PCNA avec ses partenaires

par le peptide p21 ou par le T2AA. En effet, le peptide p21 et le T2AA entraînent une réduction de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  normalement induite par la phagocytose d'*E.coli*. Cependant, ni le p21 ni le T2AA ne semblent inhiber la Caspase-4 (pas de diminution de la pro-forme), qui est activée en premier lieu lors de l'activation non canonique. De plus, la GSDMD, qui est clivée par la Caspase-4 dans cette voie, n'a pas non plus été impactée par les inhibiteurs p21 et T2AA. Ces résultats suggèrent que la protéine PCNA cytoplasmique pourrait réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique, mais sans affecter directement l'axe Caspase-4/GSDMD. Il faudrait donc poursuivre l'étude en étudiant l'activation secondaire de la voie canonique induite par l'efflux de potassium induit par les pores de GSDMD préalablement formés suite à l'activation de la Caspase-4. En effet, l'hypothèse envisagée est que la protéine PCNA cytoplasmique régulerait seulement l'activation de l'inflammasome classique composé de NLRP3-ASC-Caspase-1. Il faudrait donc regarder l'effet des peptides inhibiteurs de l'interaction de PCNA sur le clivage de la pro-Caspase-1 dans les macrophages THP1 activées par la phagocytose de bactéries *E.coli*.

#### **4) Régulation de l'inflammasome canonique dans les macrophages murins**

Afin d'être dans des conditions plus physiologiques, nous avons poursuivi notre étude dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) de souris sauvages (WT) et invalidées pour la protéine p21 (KO p21). Nous avons ainsi montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigéricine après un amorçage au LPS induisait la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans les deux types de cellules. Cependant, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  semblait plus élevée dans les BMDM KO p21 que dans les BMDM WT. Ces résultats préliminaires semblent confirmer nos résultats obtenus sur une lignée cellulaire, sur des cellules primaires murines.

Cependant, il convient de souligner que l'une des limites de notre étude réside dans le fait que nous n'avons pas pu effectuer d'expériences sur des cellules primaires humaines. Cette absence de données sur des cellules primaires humaines limite la généralisation de nos résultats à la physiologie humaine et souligne la nécessité de poursuivre la recherche dans ce domaine pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 par PCNA dans un contexte clinique.

Nos résultats obtenus dans les macrophages murins nous ont cependant permis de montrer que la protéine p21 pourrait agir comme un répresseur naturel de l'activation de

l'inflammasome NLRP3 *in vivo*. Il faudra maintenant poursuivre cette étude en observant l'effet de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les BMBM WT et KO p21 sur le clivage de la pro-Caspase-1 et sur le clivage de la GSDMD. Un point important sera également de déterminer si la protéine p21 pourrait réprimer l'activation de l'inflammasome NLRP3 quel que soit le stimulus, en testant l'effet d'autres activateurs de l'inflammasome NLRP3. Il sera également intéressant d'examiner les conséquences de la régulation de p21 dans des modèles murins de maladies auto-inflammatoires ou auto-immunes connues pour impliquer l'inflammasome NLRP3, comme la goutte ou la polyarthrite rhumatoïde. De telles études *in vivo* permettraient de mieux comprendre le rôle de p21 en tant que régulateur de l'inflammasome NLRP3 dans un contexte physiologique et pourraient potentiellement ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler l'activation de l'inflammasome dans le traitement des maladies inflammatoires. En particulier, nous avons comme projet de travailler en collaboration avec le Pr Hang Korng Ea et son équipe qui ont développé un modèle de goutte chez la souris. Ce modèle consiste en l'injection de cristaux de monosodium urate (MSU) dans une poche à air créée sur le dos de la souris (Renaudin et al. 2020). Les cristaux de MSU utilisés sont similaires à ceux observés chez les patients atteints de goutte. Cette injection induit une réponse inflammatoire locale, caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires, une production accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ . Leur modèle permet d'étudier divers aspects de la goutte, notamment les mécanismes inflammatoires, les réponses immunitaires et les voies de signalisation impliquées dans la maladie. Nous pourrions ainsi induire leur modèle de goutte dans les souris WT et KO p21, afin de déterminer si l'absence de protéine p21 provoquerait une inflammation dépendante de l'inflammasome NLRP3 accrue.

### **5) Régulation de l'inflammasome NLRP3 dans les neutrophiles ?**

La protéine PCNA cytoplasmique a été initialement décrite dans les neutrophiles, premières cellules recrutées lors d'une inflammation. Les neutrophiles sont dotés de divers mécanismes pour éliminer les agents pathogènes, tels que l'activation de la NADPH oxydase pour générer des ROS et la sécrétion de protéines antimicrobiennes, y compris des sérine protéases et des molécules antibiotiques. De plus, comme les macrophages, les neutrophiles participent à la libération des cytokines inflammatoires qui amplifient la réponse immunitaire et attirent d'autres cellules immunitaires sur le site de l'infection par activation de complexe

inflammasome (Paget et al. 2022). Cependant, les neutrophiles produisent moins d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'activation de l'inflammasome NLRP3 que les macrophages. Toutefois, lors des réponses immunitaires, les neutrophiles sont abondamment recrutés sur le site de l'infection et de l'inflammation, ce qui compense la quantité limitée d'IL-1 $\beta$  produite par les neutrophiles par rapport aux macrophages. Bien que les neutrophiles possèdent différentes voies de signalisation pouvant conduire à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Tourneur et Witko-Sarsat 2019), ils sont capables, tout comme les macrophages, d'induire la formation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à de multiples stimuli comme la nigéricine et l'ATP extracellulaire. Certains mécanismes moléculaires et cellulaires associés sont également similaires, comme l'induction d'un efflux de potassium en réponse au stimuli précédemment cités ou encore aux infections bactériennes (Mankan et al. 2012 ; Bakele et al. 2014 ; Paget et al. 2022). Les cristaux peuvent également induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les neutrophiles, notamment les cristaux de MSU et de silice (Goldberg et al. 2017 ; Yokose et al. 2018). Le LPS des bactéries phagocytées induit également l'activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique (Chen et al. 2018 ; Kovacs et al. 2020). D'après la littérature, les mécanismes d'activation canonique (activation de la Caspase-1) et non canonique (activation de la Caspase-11 puis de la Caspase-1) de l'inflammasome NLRP3 semblent similaires entre les macrophages et les neutrophiles (Paget et al. 2022). Il sera donc intéressant de regarder si la protéine PCNA cytoplasmique pourrait réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 canonique et non canonique dans les neutrophiles de la même manière que dans les macrophages.

Dans les neutrophiles, la Caspase-11 va cliver la GSDMD dont les fragments N-terminaux vont aller former des pores dans les membranes des granules azurophiles et des organites intracellulaires plutôt que dans la membrane plasmique, entraînant la libération de protéases qui participent à la délobulation nucléaire, à la citrullination des histones, à l'extrusion de l'ADN et à la rupture de l'enveloppe nucléaire et donc *in fine* à la formation de NET (neutrophil extracellular traps) et à la mort inflammatoire associée « la NETose » (K. W. Chen et al. 2018). Dans notre étude, nous avons montré que dans les macrophages THP-1, la protéine PCNA cytoplasmique peut réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 non canonique, mais n'affecte pas l'axe Caspase-4/GSDMD. Il sera pertinent de confirmer cette observation dans le neutrophile car, dans le cas contraire, PCNA pourrait participer à la régulation de la formation de NETs et à l'induction de la « NETose ».

De plus, une étude de 2021 a montré que l'inflammasome canonique NLRP3 participe à la « NETose » (Münzer et al. 2021). Cette étude a montré que la formation de l'inflammasome NLRP3 est dépendante de la peptidylarginine désiminase 4 (PAD4), protéine régulant la formation de NETs en citrullinant les histones, dans les neutrophiles. La suppression génétique de la voie de signalisation NLRP3 ou l'inhibition pharmacologique de NLRP3 ont conduit à des altérations du processus de formation de NET. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de l'interaction de PCNA avec ses partenaires, dans les neutrophiles, au niveau de la formation de NETs et de la signalisation PAD4.

Initialement, les neutrophiles ont été décrits comme des cellules dans lesquelles il n'y avait pas d'induction de pyroptose (Karmakar et al. 2016 ; 2015 ; Chen et al. 2018). A présent, il est décrit que les neutrophiles sont en réalité résistants à la pyroptose. En effet, Karmakar a montré dans les neutrophiles, que les fragments N-terminaux de GSDMD obtenus après clivage par la Caspase-1 suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 ne se localisaient pas de manière significative dans les membranes plasmiques. Les pores de GSDMD à la membrane plasmique n'étaient pas suffisants pour induire une pyroptose, mais étaient suffisants pour la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Karmakar et al. 2020). Cependant, une étude plus récente a montré qu'il y avait induction de pyroptose médiée par l'activation de la GSDMD dépendante de la Caspase-1 induite par l'ATP ou la nigéricine dans les neutrophiles murins (Chauhan et al. 2022). Il est d'ailleurs envisageable que la mort nécrotique associée à la production de NETs et qualifiée de « NETose » corresponde en réalité à une forme de pyroptose spécifiques aux neutrophiles. Nous pourrions donc étudier l'effet de l'inhibition de l'interaction de PCNA avec ses partenaires, dans les neutrophiles, également au niveau de la voie GSDMD/pyroptose.

Comme précédemment indiqué, il existe des différences entre les voies d'activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages et des neutrophiles. Notamment, il n'existe pas de voie alternative dans les neutrophiles. Il sera donc important d'étudier l'implication de la protéine PCNA cytoplasmique dans la régulation de l'inflammasome alternatif des macrophages pour décrire ensuite d'éventuelles nouvelles différences entre les macrophages et les neutrophiles.



## II. Mécanistique de la régulation de l'inflammasome NLRP3 canonique par PCNA

### 1) Interaction de PCNA avec NLRP3 et NEK7

Notre étude a révélé que PCNA pourrait interagir avec différents composants de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules macrophagiques THP-1. Ces interactions ont été observées avant et/ou après activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigéricine dans notre modèle. Ces interactions suggèrent que PCNA agirait également comme une protéine d'échafaudage ou de liaison dans l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. En effet, nous avons montré par co-immunoprécipitation que PCNA interagit avec NLRP3 après l'activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigéricine mais également à l'état basal. Or, comme expliqué précédemment, avant activation de l'inflammasome, la protéine NLRP3 est présente dans la cellule de manière inactive sous forme de cage protégeant le domaine PYD et empêchant une activation prématurée de NLRP3 (Andreeva et al. 2021 ; Hochheiser et al. 2022). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que la protéine PCNA fasse partie intégrante de ce complexe inactif de NLRP3, et jouerait peut-être un rôle dans l'activation de celui-ci. Nous avons également montré, lors de nos expériences de co-immunoprécipitation, que PCNA pourrait interagir dans le cytoplasme avec NEK7, une protéine nécessaire à l'activation de NLRP3, seulement après activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigéricine. A l'état basal, il semblerait que PCNA et NEK7 puissent interagir, mais essentiellement dans le compartiment nucléaire, comme démontré par notre test de liaison de proximité. Toutefois, ceci concerne moins de 20% des cellules, probablement celles pour lesquelles la différenciation des cellules THP-1 en macrophages n'est pas totale et donc dans lesquelles une petite portion de PCNA est restée localisée dans le cytoplasme. En revanche, quasi aucune interaction cytoplasmique de PCNA et NEK7 n'est observée à l'état basal, ce qui est concordant avec les résultats de co-immunoprécipitation qui ne montrent pas d'interaction PCNA-NEK7 dans les cellules THP-1 non stimulées, les protéines nucléaires n'ayant pas été solubilisées dans nos expériences. De plus, l'interaction cytoplasmique est abrogée après inhibition de l'interaction de PCNA avec ses partenaires par le peptide p21. Il a été décrit que l'interaction de NEK7 avec les domaines riches en leucine de NLRP3 au niveau du MTOC permettait le changement de conformation de la cage inactive en disque actif, permettant ainsi la libération des domaines PYD et leur oligomérisation avec ASC, et *in fine*, de la formation des inflammasomes complets (L. Xiao, Magupalli, et Wu 2023). Les protéines NLRP3-PCNA-NEK7 semblent donc pouvoir interagir

étroitement et collaborer pour déclencher l'activation de la protéine NLRP3. L'interaction PCNA-NLRP3 en amont de l'activation de l'inflammasome NLRP3 pourrait peut-être faciliter le recrutement de NEK7, nécessaire à l'activation de NLRP3. Cette interaction favoriserait l'assemblage complet de l'inflammasome et l'activation subséquente de la Caspase-1, conduisant à la maturation de l'IL-1 $\beta$  et à l'inflammation.

Un modèle possible de la régulation de l'inflammasome NLRP3, activé spécifiquement par la nigéricine, par PCNA, pourrait donc être décrit comme suit (**Figure 16**) :

- Étape 1 : Localisation de PCNA dans le cytoplasme

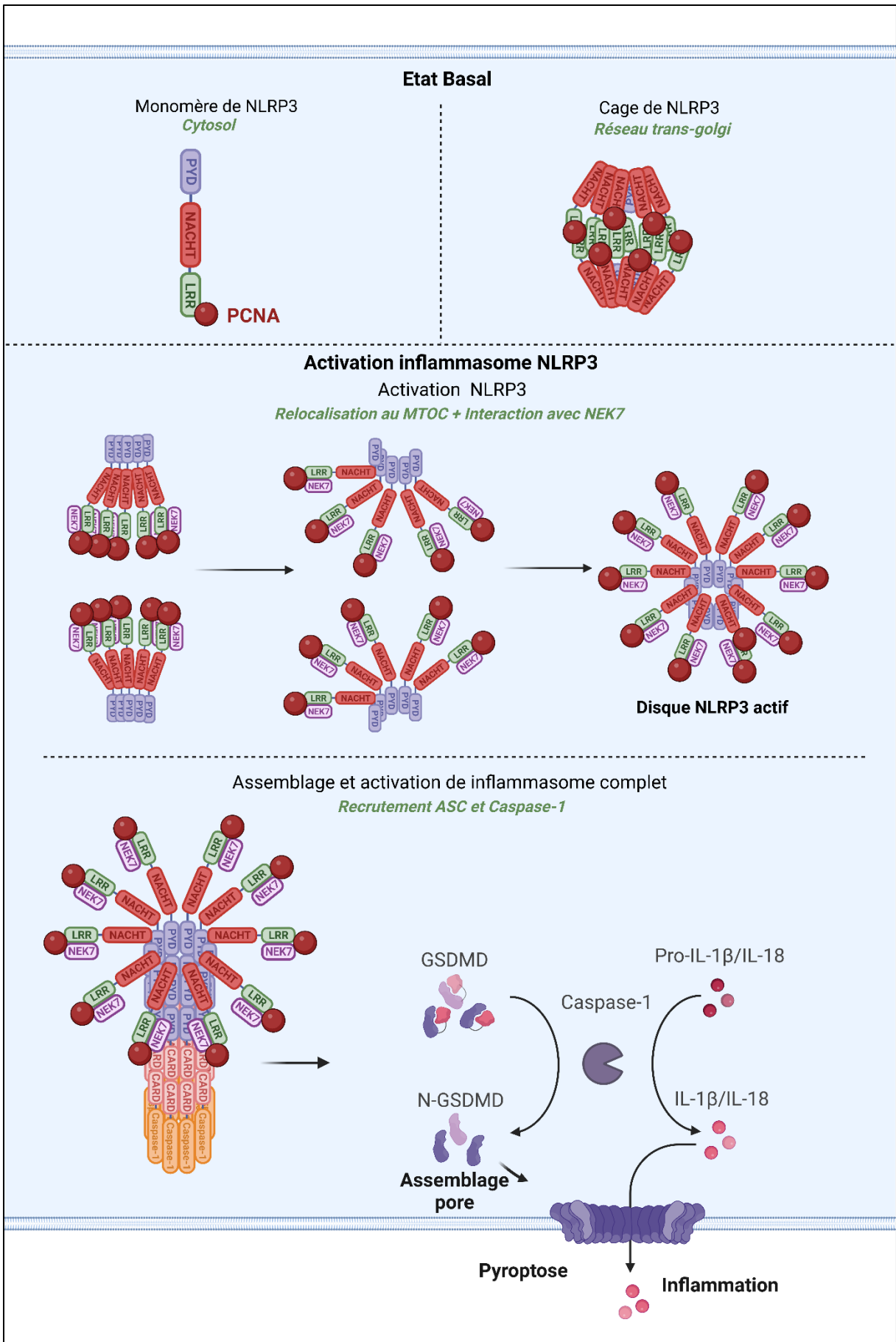
La première étape de ce modèle consiste en la présence de PCNA dans le compartiment cytoplasmique. En effet, PCNA est de base une protéine nucléaire, mais qui peut être transloquée du noyau vers le cytoplasme lors du processus de différenciation comme cela a déjà été montré dans les neutrophiles (Bouayad et al. 2012), puis dans les macrophages de la lignée THP-1 et les BMDM de souris dans notre étude. Cette relocalisation cytoplasmique de PCNA semble essentielle pour son implication dans la régulation de l'inflammasome NLRP3. Il est important de souligner que nous ne savons pas si la protéine PCNA cytoplasmique impliquée dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 serait sous forme monomérique, trimérique ou les deux.

- Étape 2 : Interaction entre PCNA et NLRP3 inactif

Notre étude a permis de montrer que PCNA, une fois localisée dans le cytoplasme, pourrait interagir avec NLRP3 à l'état basal et pourrait donc faire partie du complexe en forme de cage inactif. Cette interaction pourrait être essentielle à la fois pour l'inactivation et pour l'activation de NLRP3.

- Étape 3 : Activation de NLRP3 et recrutement de NEK7

L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique cytoplasmique qui joue un rôle clé dans la détection des signaux de danger et l'initiation de la réponse inflammatoire. Lorsqu'il est activé, NLRP3 inactif est relocalisé au niveau du MTOC où il va interagir avec la protéine NEK7, permettant ainsi un changement conformationnel et son activation en disque actif. Il a été précédemment suggéré que l'association du complexe NLRP3-NEK7 à elle seule pourrait ne pas être capable d'induire pleinement l'activation de NLRP3 (Sharif et al. 2019). PCNA pourrait donc servir de plateforme de recrutement pour la protéine NEK7 au niveau de NLRP3.



## Figure 16: Modèle de régulation de l'inflammasome NLRP3 canonique par la protéine PCNA cytoplasmique dans les macrophages

Ce schéma représente un modèle possible de la régulation de l'inflammasome NLRP3 par l'intermédiaire de la protéine PCNA cytoplasmique. Ce modèle illustre comment la protéine PCNA, initialement localisée dans le cytoplasme des cellules macrophagiques, pourrait jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 en facilitant le recrutement de NEK7, l'assemblage de l'inflammasome et l'activation subséquente de la Caspase-1, conduisant à la maturation de l'interleukine-1 $\beta$  et l'interleukine-18 (IL-1 $\beta$  et IL-18) et à la mort par pyroptose. Created with BioRender.com

### - Étape 4 : Assemblage de l'inflammasome

NLRP3 sous forme active se présente sous la forme d'un disque avec les domaines PYD accessibles. NLRP3 va alors pouvoir recruter ASC via des interactions homotypiques entre les domaines PYD – PYD et induire la formation de speck de ASC. Une fois ASC assemblée avec NLRP3, il y a recrutement de la pro-Caspase-1 via des interactions homotypiques entre les domaines CARD – CARD pour former l'inflammasome NLRP3 complet et actif.

### - Étape 5 : Activation de la pro-Caspase-1

Une fois que l'inflammasome NLRP3 est complètement assemblé, il peut activer la pro-Caspase-1. Cette activation de la pro-Caspase-1 est essentielle pour la maturation de l'IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires ainsi que pour l'induction de la mort par pyroptose.

En résumé, ce modèle suggère que PCNA, une fois localisée dans le cytoplasme, pourrait interagir avec NLRP3, facilitant ainsi possiblement l'inactivation et/ou l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et l'activation subséquente de la Caspase-1 (**Figure 16**). Cette régulation de l'inflammasome par PCNA pourrait avoir des implications importantes dans la réponse inflammatoire et pourrait varier en fonction du contexte cellulaire et des stimuli inflammatoires.

Il faudra maintenant déterminer les sites d'interaction spécifiques entre PCNA et NLRP3 et PCNA et NEK7. D'après la structure des complexes inactifs de NLRP3 sous forme de cage, il est probable que l'interaction ne se fasse pas au niveau du domaine PYD. De plus, NEK7 interagit avec NLRP3 au niveau de son domaine LRR, PCNA pourrait donc interagir également avec ce domaine, permettant la formation d'un complexe, mais cela reste à confirmer. Il faudrait également poursuivre l'étude mécanistique en utilisant d'autres activateurs de l'inflammasome NLRP3 que la nigéricine. La différence d'effet observé entre l'inhibition

d'interaction de PCNA et ses partenaires par le p21 et le T2AA pourrait également s'expliquer par une différence de partenaires d'interaction selon le stimulus initial. Cela impliquerait que d'autres protéines que NLRP3 et NEK7 puissent également interagir avec PCNA, ce qu'il faudra déterminer.

## **2) Régulation par modification post-traductionnelle ?**

Comme mentionné dans l'introduction, l'inflammasome NLRP3 et PCNA subissent de nombreuses et diverses modifications post-traductionnelles, telles que l'ubiquitination, la phosphorylation ou encore l'acétylation. Il serait intéressant d'explorer comment ces modifications pourraient influencer la capacité de PCNA à réguler l'inflammasome NLRP3. Certaines modifications post-traductionnelles pourraient être communes aux deux protéines et pourraient même faire partie du processus de régulation.

En effet, l'acétylation est une modification post-traductionnelle courante des protéines dans les cellules et impliquée à la fois dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 (Zhao et al. 2019 ; He et al. 2020) et de la protéine PCNA nucléaire (Stanislav N. Naryzhny et Lee 2004; Yu et al. 2009).

Les activateurs de l'inflammasome NLRP3 provoquent une diminution du niveau de NAD<sup>+</sup>, ce qui entraîne la désactivation de la Sirtuine 2, une histone désacétylase NAD-dépendante, conduisant à une augmentation de l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline et de NLRP3 lui-même (M. He et al. 2020). Plus précisément, la lysine acétyltransférase 5 (KAT5) va venir acétyler NLRP3 au niveau de la lysine 24, facilitant ainsi son interaction avec NEK7 et son oligomérisation (K. Zhao et al. 2019). L'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline, quant à elle, favorise le déplacement de NLRP3 depuis les mitochondries le long des microtubules vers la région périnucléaire (Misawa et al. 2013). Cette relocalisation permet un rapprochement spatial entre les protéines ASC provenant des mitochondries et les protéines NLRP3 provenant du réticulum endoplasmique, contribuant ainsi à l'activation de l'inflammasome.

La protéine PCNA cytoplasmique joue un rôle essentiel dans la régulation de divers processus cellulaires, notamment la glycolyse (Ohayon et al. 2016). Plus spécifiquement, elle interagit avec des enzymes glycolytiques telles que la Nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) pour stimuler la glycolyse. Or, NAMPT est une enzyme clé impliquée dans la biosynthèse du NAD<sup>+</sup>. On pourrait donc imaginer que l'induction de l'inflammasome NLRP3,



inhibant ainsi l'activation de NLRP3 et entravant le recrutement de NEK7. De plus, cette désacétylation empêche le transport de NLRP3 vers ASC située dans les mitochondries. Cependant, dès que l'inflammasome NLRP3 est activé, PCNA se dissocierait de NAMPT, entraînant une réduction de la production de NAD<sup>+</sup> et, par conséquent, une inhibition subséquente de la SIRT2. En l'absence de l'activité de la SIRT2, PCNA et l' $\alpha$ -tubuline subiraient une acétylation, favorisant ainsi le recrutement de NLRP3 au niveau du MTOC et l'interaction du complexe NLRP3/PCNA avec NEK7. Ce processus permet également le rapprochement spatial entre NLRP3 et ASC par le biais des microtubules acétylés, facilitant ainsi l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Created with BioRender.com

PCNA pourrait également être directement impliquée dans le transport de NLRP3. En effet, il a été montré que PCNA pouvait interagir avec la  $\gamma$ -tubuline, permettant ainsi le transport de PCNA du cytoplasme vers le noyau (Corvaisier et al. 2021). Un mécanisme similaire pourrait permettre le transport de PCNA, en complexe avec la tubuline, vers le centrosome. Ainsi, PCNA pourrait servir de plateforme de transport pour NLRP3 via son interaction avec NLRP3 lui-même et la tubuline composant les microtubules.

Le modèle proposé (**Figure 17**), qui reste à démontrer, est en accord avec le rôle clé des modifications post-traductionnelles, notamment l'acétylation, dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 et de PCNA, et pourrait avoir des implications importantes dans les processus inflammatoires. Cependant, il est important de noter que la compréhension complète de la régulation de PCNA et de l'inflammasome NLRP3 par l'acétylation nécessite des recherches supplémentaires pour identifier les sites potentiels d'acétylation spécifiques, les conséquences fonctionnelles précises et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

## Perspectives

Les perspectives de recherche sur le rôle de PCNA dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 offrent de nombreuses opportunités passionnantes pour la compréhension de la réponse inflammatoire et le développement de nouvelles thérapies. Voici quelques domaines potentiels de recherche et de développement à explorer :

- Recherche de régulations spécifiques : Il serait intéressant de déterminer si PCNA pourrait réguler spécifiquement l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à certains types de stimuli inflammatoires. Par exemple, comment la protéine PCNA modifierait-elle la réponse à des infections bactériennes par rapport à d'autres stimuli, tels que les cristaux inflammatoires ?
- Élucidation des mécanismes moléculaires : Il est essentiel de poursuivre les études visant à comprendre en détail les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'interaction entre PCNA et l'inflammasome NLRP3. Cela comprendrait la cartographie des sites d'interaction par cristallographie, la détermination des partenaires protéiques spécifiques impliqués selon le stimulus d'induction et la compréhension des conditions qui déclenchent cette interaction. Il faudrait également pousser l'étude de l'interaction de PCNA avec d'autres partenaires indispensables aux voies canonique et non canonique tels que FADD et la Caspase-8.
- Détermination de l'implication de PCNA cytoplasmique dans la régulation d'autres inflammasomes : PCNA pouvant réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 en partie via son interaction avec NLRP3, il serait intéressant de regarder également dans d'autres inflammasomes NLRP présentant des similitudes conformationnelles avec NLRP3 tels que NLRP6, NLRP7 ou encore NLRP12, si la protéine PCNA cytoplasmique pourrait également agir comme un régulateur.
- Déterminer si NAMPT est impliquée dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 par PCNA : Pour confirmer notre hypothèse, il faudra montrer l'existence d'une interaction NAMPT/PCNA à l'état basal dans les macrophages, puis une diminution/absence d'interaction une fois l'inflammasome NLRP3 activé. L'acétylation de NLRP3 en réponse à ces changements d'interaction devra également être étudiée.



- Déterminer le rôle de PCNA dans le transport de NLRP3 lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 : Nous pourrions étudier par co-immuprécipitation l'interaction de PCNA avec la tubuline avant et après activation de l'inflammasome NLRP3. Nous pourrions également regarder son interaction avec d'autres protéines impliquées dans le transport de NLRP3 par les microtubules telles que MARK4.
- Développement de modèles animaux : La création de modèles murins ou d'autres modèles animaux permettrait d'étudier le rôle de PCNA dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 *in vivo*. Cela permettrait de mieux comprendre comment ces mécanismes fonctionneraient dans un organisme entier et pourrait avoir des implications pour le développement de thérapies ciblées.
- Recherche sur les implications cliniques : Explorer le lien entre PCNA cytoplasmique et les maladies inflammatoires, telles que les maladies auto-inflammatoires, auto-immunes, les infections et autres affections caractérisées par une réponse inflammatoire excessive, pourrait aider à identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Il serait également intéressant d'examiner comment les variations génétiques de PCNA pourraient être liées à la susceptibilité aux maladies inflammatoires, et auto-inflammatoires en particulier.
- Développement de thérapies ciblées : Comprendre le rôle de PCNA dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 pourrait ouvrir la voie au développement de thérapies ciblées visant à moduler l'interaction entre PCNA et les composants de l'inflammasome. Cela pourrait inclure des médicaments qui renforcent ou inhibent spécifiquement les interactions, en fonction du contexte clinique.

En conclusion, mon travail de thèse a permis la découverte de nouveaux régulateurs potentiels direct ou indirect, de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages THP-1 humains et primaires murins : les protéines PCNA et p21 cytoplasmiques. Il ouvre ainsi un tout nouveau champ d'investigation qui en est à son balbutiement. La recherche sur le rôle de la protéine PCNA cytoplasmique dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 pourrait avoir un impact significatif sur notre compréhension des mécanismes inflammatoires et sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter les maladies inflammatoires. Il s'agit d'un domaine de recherche en évolution qui promet de révéler de nouvelles informations sur les mécanismes de la réponse immunitaire innée.

# Annexe

# Abstract Congrès Phagocyte Workshop

## **Discovery of a new NLRP3 inflammasome regulator: the cytoplasmic PCNA**

*Chloé Lopes<sup>1</sup>, Véronique Witko-Sarsat<sup>1</sup>, Léa Remy-Tourneur<sup>1</sup>.*

*<sup>1</sup>Université Paris Cité, INSERM U1016, CNRS 8104, Institut Cochin, Paris, France.*

PCNA is a nuclear scaffolding protein essential for DNA replication. Its functions depend on associated proteins. In the neutrophil, a differentiated cell that does not proliferate, PCNA is exclusively cytosolic, and is anti-apoptotic by interacting with procaspases-3/8/9/10. Procaspase-1 is the major effector of the NLRP3 inflammasome, a multiprotein complex that induces inflammation. PCNA could therefore serve as a regulatory platform for this inflammasome via its interaction with its components such as procaspase-1. The peptide p21 and T2AA are two compounds capable of dissociating the interactions of PCNA with its partners by binding to different sites. They are pro-apoptotic and anti-inflammatory in different models, making PCNA a target in inflammatory diseases. Using an in vitro study model consisting of the culture of the human myelomonocytic line THP-1, I first showed that, during the differentiation of THP-1 cells into macrophages by PMA, there was a predominantly cytoplasmic relocation of PCNA. Macrophage THP-1 cells are therefore a good model to study the regulation of the NLRP3 inflammasome by cytoplasmic PCNA. I then showed that inhibition of the interaction of cytoplasmic PCNA protein with these partners resulted in inhibition of the NLRP3 inflammasome signalling pathway. Indeed, stimulation of macrophage THP-1 cells with the bacterial toxin nigericin, the most potent activator of the NLRP3 inflammasome, induces a strong secretion of IL-1 $\beta$ . In contrast, I showed that inhibition of PCNA by the peptide p21 resulted in strong inhibition of IL-1 $\beta$  secretion after activation of the NLRP3 inflammasome by nigericin. This inhibition is not observed in monocytic THP-1 cells in which PCNA is predominantly localised in the nucleus. I also confirmed this decrease in the activation of the NLRP3 pathway by showing an inhibition of both procaspase-1 cleavage and pyroptosis-activating gasdermin D (GSDMD) cleavage. These initial results therefore confirmed the involvement of the cytoplasmic PCNA protein in the regulation of nigericin-induced NLRP3 inflammasome activation. The lack of effect of the T2AA inhibitor indicates a site-specific effect of PCNA on the NLRP3 inflammasome. I also showed colocalization of PCNA with different components of the inflammasome (ASC, Caspase-1 and NLRP3) basally or after activation (speck formation) by nigericin. This project will provide a better understanding of how PCNA regulates inflammation in macrophages. It should open new therapeutic tracks in the field of inflammatory diseases (gout, rheumatoid arthritis, diabetes, etc.).

Contribution: LT conceived, designed and supervised the study. LT and CL designed and performed the experiments. CL and LT analyzed the results. VWS financed the project.

# Bibliographie

- A, Peng, Xinyi Xu, Chenglin Wang, Jing Yang, Shida Wang, Jiewen Dai, et Ling Ye. 2018. « EZH2 promotes DNA replication by stabilizing interaction of POL $\delta$  and PCNA via methylation-mediated PCNA trimerization ». *Epigenetics & Chromatin* 11 (août): 44. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0213-1>.
- Aglietti, Robin A., Alberto Estevez, Aaron Gupta, Monica Gonzalez Ramirez, Peter S. Liu, Nobuhiko Kayagaki, Claudio Ciferri, Vishva M. Dixit, et Erin C. Dueber. 2016. « GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (28): 7858-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607769113>.
- Agostini, Laetitia, Fabio Martinon, Kimberly Burns, Michael F. McDermott, Philip N. Hawkins, et Jürg Tschopp. 2004. « NALP3 Forms an IL-1 $\beta$ -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder ». *Immunity* 20 (3): 319-25. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00046-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00046-9).
- Ahmad, Muhammad Israr, Salman Masood, Daniel Moreira Furlanetto, et Savvas Nicolaou. 2021. « Urate Crystals; Beyond Joints ». *Frontiers in Medicine* 8 (juin): 649505. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.649505>.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, et Osamu Takeuchi. 2006. « Pathogen Recognition and Innate Immunity ». *Cell* 124 (4): 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- Aksentijevich, Ivona, Mirosława Nowak, Mustapha Mallah, Jae Jin Chae, Wendy T. Watford, Sigrun R. Hofmann, Leonard Stein, et al. 2002. « De Novo CIAS1 Mutations, Cytokine Activation, and Evidence for Genetic Heterogeneity in Patients with Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID): A New Member of the Expanding Family of Pyrin-Associated Autoinflammatory Diseases ». *Arthritis and Rheumatism* 46 (12): 3340-48. <https://doi.org/10.1002/art.10688>.
- Al Natour, Banan, Fionnuala T. Lundy, Imad About, Charlotte Jeanneau, Yvonne Dombrowski, et Ikhlas A. El Karim. 2023. « Regulation of Caries-Induced Pulp Inflammation by NLRP3 Inflammasome: A Laboratory-Based Investigation ». *International Endodontic Journal* 56 (2): 193-202. <https://doi.org/10.1111/iej.13855>.
- Allam, Ramanjaneyulu, Kate E. Lawlor, Eric Chi-Wang Yu, Alison L. Mildenhall, Donia M. Moujalled, Rowena S. Lewis, Francine Ke, et al. 2014. « Mitochondrial Apoptosis Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation but Non-Apoptotic Caspase-8 Is Required for Inflammasome Priming ». *EMBO Reports* 15 (9): 982-90. <https://doi.org/10.15252/embr.201438463>.
- Allen, Irving C., Erin McElvania-TeKippe, Justin E. Wilson, John D. Lich, Janelle C. Arthur, Jonathan T. Sullivan, Miriam Braunstein, et Jenny P. Y. Ting. 2013. « Characterization of NLRP12 during the in Vivo Host Immune Response to *Klebsiella Pneumoniae* and *Mycobacterium Tuberculosis* ». *PLoS One* 8 (4): e60842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060842>.
- Alnemri, Emad S. 2010. « Sensing Cytoplasmic Danger Signals by the Inflammasome ». *Journal of Clinical Immunology* 30 (4): 512-19. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9419-0>.
- Al-Qazazi, Ruaa, Patricia D. A. Lima, Sasha Z. Prisco, Francois Potus, Asish Dasgupta, Kuang-Hueih Chen, Lian Tian, et al. 2022. « Macrophage-NLRP3 Activation Promotes Right Ventricle Failure in Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 206 (5): 608-24. <https://doi.org/10.1164/rccm.202110-2274OC>.
- Amer, Amal, Luigi Franchi, Thirumala-Devi Kanneganti, Mathilde Body-Malapel, Nesrin Ozören, Graham Brady, Sasha Meshinchi, et al. 2006. « Regulation of *Legionella*

- Phagosome Maturation and Infection through Flagellin and Host Ipaf ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (46): 35217-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604933200>.
- Anand, Paras K., R. K. Subbarao Malireddi, John R. Lukens, Peter Vogel, John Bertin, Mohamed Lamkanfi, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2012. « NLRP6 Negatively Regulates Innate Immunity and Host Defence against Bacterial Pathogens ». *Nature* 488 (7411): 389-93. <https://doi.org/10.1038/nature11250>.
- Anderson, JP, JL Mueller, A Misaghi, S Anderson, M Sivagnanam, RD Kolodner, et HM Hoffman. 2008. « Initial description of the human NLRP3 promoter ». *Genes and immunity* 9 (8): 721-26. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.66>.
- Andreeva, Liudmila, Liron David, Shaun Rawson, Chen Shen, Teerithveen Pasricha, Pablo Pelegrin, et Hao Wu. 2021. « NLRP3 Cages Revealed by Full-Length Mouse NLRP3 Structure Control Pathway Activation ». *Cell* 184 (26): 6299-6312.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.011>.
- Antonopoulos, Christina, Hana M. Russo, Caroline El Sanadi, Bradley N. Martin, Xiaoxia Li, William J. Kaiser, Edward S. Mocarski, et George R. Dubyak. 2015. « Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (33): 20167-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652321>.
- Anton-Pampols, Paula, Clara Diaz-Requena, Laura Martinez-Valenzuela, Francisco Gomez-Preciado, Xavier Fulladosa, Anna Vidal-Alabro, Joan Torras, Núria Lloberas, et Juliana Draibe. 2022. « The Role of Inflammasomes in Glomerulonephritis ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (8): 4208. <https://doi.org/10.3390/ijms23084208>.
- Arthur, Janelle C., John D. Lich, Zhengmao Ye, Irving C. Allen, Denis Gris, Justin E. Wilson, Monika Schneider, et al. 2010. « Cutting Edge: NLRP12 Controls Dendritic and Myeloid Cell Migration to Affect Contact Hypersensitivity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (8): 4515-19. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002227>.
- Ataide, Marco A., Warrison A. Andrade, Dario S. Zamboni, Donghai Wang, Maria do Carmo Souza, Bernardo S. Franklin, Samir Elian, et al. 2014. « Malaria-Induced NLRP12/NLRP3-Dependent Caspase-1 Activation Mediates Inflammation and Hypersensitivity to Bacterial Superinfection ». *PLOS Pathogens* 10 (1): e1003885. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003885>.
- Aymonnier, Karen, Jennifer Amsler, Peter Lamprecht, Alan Salama, et Véronique Witko-Sarsat. 2023. « The Neutrophil: A Key Resourceful Agent in Immune-Mediated Vasculitis ». *Immunological Reviews* 314 (1): 326-56. <https://doi.org/10.1111/imr.13170>.
- Aymonnier, Karen, Julie Ng, Laura E. Fredenburgh, Katherin Zambrano-Vera, Patrick Münzer, Sarah Gutch, Shoichi Fukui, et al. 2022. « Inflammasome Activation in Neutrophils of Patients with Severe COVID-19 ». *Blood Advances* 6 (7): 2001-13. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005949>.
- Bakele, Martina, Melanie Joos, Sofia Burdi, Nicolas Allgaier, Simone Pöschel, Birgit Fehrenbacher, Martin Schaller, et al. 2014. « Localization and Functionality of the Inflammasome in Neutrophils ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (8): 5320-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505636>.
- Banerjee, Ishita, Bharat Behl, Morena Mendonca, Gaurav Shrivastava, Ashley J. Russo, Antoine Menoret, Arundhati Ghosh, et al. 2018. « Gasdermin D Restrains Type I Interferon Response to Cytosolic DNA by Disrupting Ionic Homeostasis ». *Immunity* 49 (3): 413-426.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.006>.
- Banerjee, Poulomi, Elizabeth Elliott, Olivia M. Rifai, Judi O'Shaughnessy, Karina McDade, Sharon Abrahams, Siddharthan Chandran, Colin Smith, et Jenna M. Gregory. 2022.

- « NLRP3 Inflammasome as a Key Molecular Target Underlying Cognitive Resilience in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *The Journal of Pathology* 256 (3): 262-68. <https://doi.org/10.1002/path.5846>.
- Baroja-Mazo, Alberto, Fatima Martín-Sánchez, Ana I. Gomez, Carlos M. Martínez, Joaquín Amores-Iniesta, Vincent Compan, Maria Barberà-Cremades, et al. 2014. « The NLRP3 Inflammasome Is Released as a Particulate Danger Signal That Amplifies the Inflammatory Response ». *Nature Immunology* 15 (8): 738-48. <https://doi.org/10.1038/ni.2919>.
- Barry, Rachael, Sidonie Wicky John, Gianmaria Liccardi, Tencho Tenev, Isabel Jaco, Chih-Hong Chen, Justin Choi, et al. 2018. « SUMO-mediated regulation of NLRP3 modulates inflammasome activity ». *Nature Communications* 9 (août): 3001. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05321-2>.
- Barton, Gregory M. 2008. « A calculated response: control of inflammation by the innate immune system ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2): 413-20. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>.
- Bauernfeind, Franz, Andrea Ablasser, Eva Bartok, Sarah Kim, Jonathan Schmid-Burgk, Taner Cavlar, et Veit Hornung. 2011. « Inflammasomes: Current Understanding and Open Questions ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (5): 765-83. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0567-4>.
- Bauernfeind, Franz G., Gabor Horvath, Andrea Stutz, Emad S. Alnemri, Kelly MacDonald, David Speert, Teresa Fernandes-Alnemri, et al. 2009. « Cutting Edge: NF-kappaB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (2): 787-91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>.
- Bauernfried, Stefan, et Veit Hornung. 2021. « Human NLRP1: From the shadows to center stage ». *The Journal of Experimental Medicine* 219 (1): e20211405. <https://doi.org/10.1084/jem.20211405>.
- Bauernfried, Stefan, Matthias J. Scherr, Andreas Pichlmair, Karl E. Duderstadt, et Veit Hornung. 2021. « Human NLRP1 Is a Sensor for Double-Stranded RNA ». *Science (New York, N.Y.)* 371 (6528): eabd0811. <https://doi.org/10.1126/science.abd0811>.
- Belyakova, N. V., R. A. Pantina, R. A. Kovalev, M. V. Filatov, et S. N. Naryzhny. 2017. « [Quaternary structures of human cytoplasmic and nuclear PCNA are the same] ». *Biomeditsinskaja Khimiia* 63 (4): 356-60. <https://doi.org/10.18097/PBMC20176304356>.
- Bergsbaken, Tessa, Susan L. Fink, et Brad T. Cookson. 2009. « Pyroptosis: host cell death and inflammation ». *Nature reviews. Microbiology* 7 (2): 99-109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>.
- Billon, Pierre, Jian Li, Jean-Philippe Lambert, Yizhang Chen, Véronique Tremblay, Joseph S. Brunzelle, Anne-Claude Gingras, et al. 2017. « Acetylation of PCNA Sliding Surface by Eco1 Promotes Genome Stability through Homologous Recombination ». *Molecular Cell* 65 (1): 78-90. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.033>.
- Boehm, Elizabeth M., Melissa S. Gildenberg, et M. Todd Washington. 2016. « The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication ». *The Enzymes* 39: 231-54. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.003>.
- Boise, L. H., et C. M. Collins. 2001. « Salmonella-Induced Cell Death: Apoptosis, Necrosis or Programmed Cell Death? ». *Trends in Microbiology* 9 (2): 64-67. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01937-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01937-5).

- Bomar, Martha G., Ming-Tao Pai, Shiou-Ru Tzeng, Shawn Shun-Cheng Li, et Pei Zhou. 2007. « Structure of the Ubiquitin-Binding Zinc Finger Domain of Human DNA Y-Polymerase Eta ». *EMBO Reports* 8 (3): 247-51. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400901>.
- Booshehri, Laela M., et Hal M. Hoffman. 2019. « CAPS and NLRP3 ». *Journal of Clinical Immunology* 39 (3): 277-86. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00638-z>.
- Bose, Santanu, Jesus A. Segovia, Sudha R. Somarajan, Te-Hung Chang, T. R. Kannan, et Joel B. Baseman. 2014. « ADP-Ribosylation of NLRP3 by *Mycoplasma pneumoniae* CARDS Toxin Regulates Inflammasome Activity ». *mBio* 5 (6): e02186-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02186-14>.
- Bouayad, Dikra, Magali Pederzoli-Ribeil, Julie Mocek, Céline Candalh, Jean-Benoît Arlet, Olivier Hermine, Nathalie Reuter, Noélie Davezac, et Véronique Witko-Sarsat. 2012. « Nuclear-to-cytoplasmic Relocalization of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) during Differentiation Involves a Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1)-dependent Export and Is a Prerequisite for PCNA Antiapoptotic Activity in Mature Neutrophils ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (40): 33812-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367839>.
- Bravo, R., et J. E. Celis. 1980. « A Search for Differential Polypeptide Synthesis throughout the Cell Cycle of HeLa Cells ». *The Journal of Cell Biology* 84 (3): 795-802. <https://doi.org/10.1083/jcb.84.3.795>.
- Bravo, R., R. Frank, P. A. Blundell, et H. Macdonald-Bravo. 1987. « Cyclin/PCNA Is the Auxiliary Protein of DNA Polymerase-Delta ». *Nature* 326 (6112): 515-17. <https://doi.org/10.1038/326515a0>.
- Bronner, Denise N., Basel H. Abuaita, Xiaoyun Chen, Katherine A. Fitzgerald, Gabriel Nuñez, Yongqun He, Xiao-Ming Yin, et Mary X.D. O’Riordan. 2015. « Endoplasmic Reticulum stress activates the inflammasome via NLRP3-caspase-2 driven mitochondrial damage ». *Immunity* 43 (3): 451-62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.008>.
- Broz, Petr, Jakob von Moltke, Jonathan W. Jones, Russell E. Vance, et Denise M. Monack. 2010. « Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing ». *Cell Host & Microbe* 8 (6): 471-83. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.11.007>.
- Broz, Petr, et Denise M. Monack. 2013. « Newly Described Pattern Recognition Receptors Team up against Intracellular Pathogens ». *Nature Reviews Immunology* 13 (8): 551-65. <https://doi.org/10.1038/nri3479>.
- Broz, Petr, Pablo Pelegrín, et Feng Shao. 2020. « The Gasdermins, a Protein Family Executing Cell Death and Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 20 (3): 143-57. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0228-2>.
- Bruey, Jean-Marie, Nathalie Bruey-Sedano, Frederic Luciano, Dayong Zhai, Ruchi Balpai, Chunyan Xu, Christina L. Kress, et al. 2007. « Bcl-2 and Bcl-XL Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with NALP1 ». *Cell* 129 (1): 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.045>.
- Bruning, John B., et Yousif Shamoo. 2004. « Structural and Thermodynamic Analysis of Human PCNA with Peptides Derived from DNA Polymerase-Delta P66 Subunit and Flap Endonuclease-1 ». *Structure (London, England: 1993)* 12 (12): 2209-19. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.018>.
- Bryan, Nicole B., Andrea Dorfleutner, Yon Rojanasakul, et Christian Stehlik. 2009. « Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like



- protein containing a caspase recruitment domain (ASC) ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (5): 3173-82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802367>.
- Burian, Marc, Morna F. Schmidt, et Amir S. Yazdi. 2023. « The NLRP1 inflammasome in skin diseases ». *Frontiers in Immunology* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1111611>.
- Burnet, F. M. 1959. *The clonal selection theory of acquired immunity*. Nashville: Vanderbilt University Press. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/34425>.
- . 1961. « Immunological Recognition of Self ». *Science (New York, N.Y.)* 133 (3449): 307-11. <https://doi.org/10.1126/science.133.3449.307>.
- Campden, Rhiannon I., et Yifei Zhang. 2019. « The Role of Lysosomal Cysteine Cathepsins in NLRP3 Inflammasome Activation ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 670 (juillet): 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.015>.
- Caneparo, Valeria, Santo Landolfo, Marisa Gariglio, et Marco De Andrea. 2018. « The Absent in Melanoma 2-Like Receptor IFN-Inducible Protein 16 as an Inflammasome Regulator in Systemic Lupus Erythematosus: The Dark Side of Sensing Microbes ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01180>.
- Cao, Zhenrui, Yanhao Wang, Zhimin Long, et Guiqiong He. 2019. « Interaction between Autophagy and the NLRP3 Inflammasome ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 51 (11): 1087-95. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz098>.
- Carvalho Ribeiro, Marcelle de, et Gyongyi Szabo. 2022. « Role of the Inflammasome in Liver Disease ». *Annual Review of Pathology* 17 (janvier): 345-65. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-032521-102529>.
- Case, Christopher L., et Craig R. Roy. 2011. « Asc Modulates the Function of NLRC4 in Response to Infection of Macrophages by Legionella pneumophila ». *mBio* 2 (4): e00117-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00117-11>.
- Casson, Cierra N., Janet Yu, Valeria M. Reyes, Frances O. Taschuk, Anjana Yadav, Alan M. Copenhaver, Hieu T. Nguyen, Ronald G. Collman, et Sunny Shin. 2015. « Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (21): 6688-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421699112>.
- Cazzalini, Ornella, Sabrina Sommatis, Micol Tillhon, Ilaria Dutto, Angela Bachi, Alexander Rapp, Tiziana Nardo, et al. 2014. « CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis ». *Nucleic Acids Research* 42 (13): 8433-48. <https://doi.org/10.1093/nar/gku533>.
- Celis, J. E., R. Bravo, P. M. Larsen, et S. J. Fey. 1984. « Cyclin: A Nuclear Protein Whose Level Correlates Directly with the Proliferative State of Normal as Well as Transformed Cells ». *Leukemia Research* 8 (2): 143-57. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(84\)90135-8](https://doi.org/10.1016/0145-2126(84)90135-8).
- Chan, Amy H., et Kate Schroder. 2020. « Inflammasome Signaling and Regulation of Interleukin-1 Family Cytokines ». *The Journal of Experimental Medicine* 217 (1): e20190314. <https://doi.org/10.1084/jem.20190314>.
- Chauhan, Dhruv, Dieter Demon, Lieselotte Vande Walle, Oonagh Paerewijck, Annalisa Zecchin, Leslie Bosseler, Karin Santoni, et al. 2022. « GSDMD Drives Canonical Inflammasome-Induced Neutrophil Pyroptosis and Is Dispensable for NETosis ». *EMBO Reports* 23 (10): e54277. <https://doi.org/10.15252/embr.202154277>.
- Cheat, Banndith, Coralie Torrens, Asmaa Foda, Brigitte Baroukh, Jeremy Sadoine, Lotfi Slimani, Véronique Witko-Sarsat, Olivier Huck, Marjolaine Gosset, et Jérôme Bouchet. 2022.

- « NLRP3 Is Involved in Neutrophil Mobilization in Experimental Periodontitis ». *Frontiers in Immunology* 13: 839929. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.839929>.
- Chen, Grace Y., Maochang Liu, Fuyuan Wang, John Bertin, et Gabriel Núñez. 2011. « A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (12): 7187-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100412>.
- Chen, Grace Y., et Gabriel Nuñez. 2010. « Sterile Inflammation: Sensing and Reacting to Damage ». *Nature Reviews Immunology* 10 (12): 826-37. <https://doi.org/10.1038/nri2873>.
- Chen, J., P. K. Jackson, M. W. Kirschner, et A. Dutta. 1995. « Separate Domains of P21 Involved in the Inhibition of Cdk Kinase and PCNA ». *Nature* 374 (6520): 386-88. <https://doi.org/10.1038/374386a0>.
- Chen, Jueqi, et Zhijian J. Chen. 2018. « PtdIns4P on Dispersed Trans-Golgi Network Mediates NLRP3 Inflammasome Activation ». *Nature* 564 (7734): 71-76. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0761-3>.
- Chen, Kaiwen W., Mercedes Monteleone, Dave Boucher, Gabriel Sollberger, Divya Ramnath, Nicholas D. Condon, Jessica B. von Pein, Petr Broz, Matthew J. Sweet, et Kate Schroder. 2018. « Noncanonical Inflammasome Signaling Elicits Gasdermin D-Dependent Neutrophil Extracellular Traps ». *Science Immunology* 3 (26): eaar6676. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6676>.
- Chen, Liang, Justin E. Wilson, Mark J. Koenigsnecht, Wei-Chun Chou, Stephanie A. Montgomery, Agnieszka D. Truax, W. June Brickey, et al. 2017. « NLRP12 Attenuates Colon Inflammation by Maintaining Colonic Microbial Diversity and Promoting Protective Commensal Bacterial Growth ». *Nature Immunology* 18 (5): 541-51. <https://doi.org/10.1038/ni.3690>.
- Chen, Yuyi, Qiudong Yang, Chunhua Lv, Yue Chen, Wenhua Zhao, Wenlei Li, Hongyu Chen, Hua Wang, Wen Sun, et Hua Yuan. 2021. « NLRP3 Regulates Alveolar Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis by Promoting Osteoclastic Differentiation ». *Cell Proliferation* 54 (2): e12973. <https://doi.org/10.1111/cpr.12973>.
- Chen, Zhuming, Huan Zhong, Jinsong Wei, Sien Lin, Zhixian Zong, Fan Gong, Xinqia Huang, et al. 2019. « Inhibition of Nrf2/HO-1 Signaling Leads to Increased Activation of the NLRP3 Inflammasome in Osteoarthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 21 (1): 300. <https://doi.org/10.1186/s13075-019-2085-6>.
- Choe, Katherine N., et George-Lucian Moldovan. 2017. « Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork ». *Molecular cell* 65 (3): 380-92. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.020>.
- Chui, Ashley J., Marian C. Okondo, Sahana D. Rao, Kuo Gai, Andrew R. Griswold, Darren C. Johnson, Daniel P. Ball, et al. 2019. « N-Terminal Degradation Activates the NLRP1B Inflammasome ». *Science (New York, N.Y.)* 364 (6435): 82-85. <https://doi.org/10.1126/science.aau1208>.
- Chung, Lawton K., Yong Hwan Park, Yueting Zheng, Igor E. Brodsky, Patrick Hearing, Daniel L. Kastner, Jae Jin Chae, et James B. Bliska. 2016. « The Yersinia Virulence Factor YopM Hijacks Host Kinases to Inhibit Type III Effector-Triggered Activation of the Pyrin Inflammasome ». *Cell Host & Microbe* 20 (3): 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.018>.
- Codolo, Gaia, Nicoletta Plotegher, Tommaso Pozzobon, Marco Brucale, Isabella Tessari, Luigi Bubacco, et Marina de Bernard. 2013. « Triggering of Inflammasome by Aggregated  $\alpha$ -

- Synuclein, an Inflammatory Response in Synucleinopathies ». *PLoS One* 8 (1): e55375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055375>.
- Coers, Jörn, Russell E. Vance, Mary F. Fontana, et William F. Dietrich. 2007. « Restriction of Legionella Pneumophila Growth in Macrophages Requires the Concerted Action of Cytokine and Naip5/Ipaf Signalling Pathways ». *Cellular Microbiology* 9 (10): 2344-57. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00963.x>.
- Cohen, Sophie, Carline E. Tacke, Bart Straver, Natasja Meijer, Irene M. Kuipers, et Taco W. Kuijpers. 2012. « A Child with Severe Relapsing Kawasaki Disease Rescued by IL-1 Receptor Blockade and Extracorporeal Membrane Oxygenation ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 71 (12): 2059-61. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201658>.
- Compan, Vincent, Alberto Baroja-Mazo, Gloria López-Castejón, Ana I. Gomez, Carlos M. Martínez, Diego Angosto, María T. Montero, et al. 2012. « Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation ». *Immunity* 37 (3): 487-500. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.013>.
- Cookson, B. T., et M. A. Brennan. 2001. « Pro-Inflammatory Programmed Cell Death ». *Trends in Microbiology* 9 (3): 113-14. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01936-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01936-3).
- Corrales, Leticia, Seng-Ryong Woo, Jason B. Williams, Sarah M. McWhirter, Thomas W. Dubensky Jr., et Thomas F. Gajewski. 2016. « Antagonism of the STING Pathway via Activation of the AIM2 Inflammasome by Intracellular DNA ». *The Journal of Immunology* 196 (7): 3191-98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502538>.
- Corvaisier, Matthieu, Jingkai Zhou, Darina Malycheva, Nicola Cornella, Dimitrios Chioureas, Nina M. S. Gustafsson, Catalina Ana Rosselló, et al. 2021. « The  $\gamma$ -Tubulin Meshwork Assists in the Recruitment of PCNA to Chromatin in Mammalian Cells ». *Communications Biology* 4 (1): 767. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02280-1>.
- Cunha, Larissa D., Alexandre L. N. Silva, Juliana M. Ribeiro, Danielle P. A. Mascarenhas, Gustavo F. S. Quirino, Leonardo L. Santos, Richard A. Flavell, et Dario S. Zamboni. 2017. « AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome ». *Cell Reports* 20 (4): 794-805. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.086>.
- Curtin, James F., Naiyou Liu, Marianela Candolfi, Weidong Xiong, Hikmat Assi, Kader Yagiz, Matthew R. Edwards, et al. 2009. « HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression ». *PLoS Medicine* 6 (1): e10. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000010>.
- Dalbeth, Nicola, Anna L. Gosling, Angelo Gaffo, et Abhishek Abhishek. 2021. « Gout ». *Lancet (London, England)* 397 (10287): 1843-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00569-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00569-9).
- Dalbeth, Nicola, Bregina Pool, Greg D. Gamble, Timothy Smith, Karen E. Callon, Fiona M. McQueen, et Jillian Cornish. 2010. « Cellular Characterization of the Gouty Tophus: A Quantitative Analysis ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (5): 1549-56. <https://doi.org/10.1002/art.27356>.
- Danis, V A, A J Kulesz, D S Nelson, et P M Brooks. 1990. « Cytokine regulation of human monocyte interleukin-1 (IL-1) production in vitro. Enhancement of IL-1 production by interferon (IFN) gamma, tumour necrosis factor-alpha, IL-2 and IL-1, and inhibition by IFN-alpha. » *Clinical and Experimental Immunology* 80 (3): 435-43.

- Davis, Beckley K., Haitao Wen, et Jenny P-Y. Ting. 2011. « The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases ». *Annual review of immunology* 29: 707-35. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405>.
- De Biasio, Alfredo, et Francisco J. Blanco. 2013. « Proliferating Cell Nuclear Antigen Structure and Interactions: Too Many Partners for One Dancer? » *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 91: 1-36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411637-5.00001-9>.
- De Chiara, Alessia, Magali Pederzoli-Ribeil, Julie Mocek, Céline Candalh, Patrick Mayeux, Arnaud Millet, et Véronique Witko-Sarsat. 2013. « Characterization of Cytosolic Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Neutrophils: Antiapoptotic Role of the Monomer ». *Journal of Leukocyte Biology* 94 (4): 723-31. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212637>.
- De March, Matteo, et Alfredo De Biasio. 2017. « The Dark Side of the Ring: Role of the DNA Sliding Surface of PCNA ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52 (6): 663-73. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1364218>.
- De March, Matteo, Nekane Merino, Susana Barrera-Vilarmau, Ramon Crehuet, Silvia Onesti, Francisco J. Blanco, et Alfredo De Biasio. 2017. « Structural basis of human PCNA sliding on DNA ». *Nature Communications* 8 (janvier): 13935. <https://doi.org/10.1038/ncomms13935>.
- Degen, Morris, José Carlos Santos, Kristyna Pluhackova, Gonzalo Cebrero, Saray Ramos, Gytis Jankevicius, Ella Hartenian, et al. 2023. « Structural Basis of NINJ1-Mediated Plasma Membrane Rupture in Cell Death ». *Nature* 618 (7967): 1065-71. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05991-z>.
- Deora, Vandana, John D. Lee, Eduardo A. Albornoz, Luke McAlary, Cyril J. Jagaraj, Avril A. B. Robertson, Julie D. Atkin, et al. 2020. « The Microglial NLRP3 Inflammasome Is Activated by Amyotrophic Lateral Sclerosis Proteins ». *Glia* 68 (2): 407-21. <https://doi.org/10.1002/glia.23728>.
- Dias, Catarina, Veit Hornung, et Jesper Nylandsted. 2022. « A Novel NINJ1-Mediated Regulatory Step Is Essential for Active Membrane Rupture and Common to Different Cell Death Pathways ». *Faculty Reviews* 11: 41. <https://doi.org/10.12703/r-01-0000021>.
- Dinarello, C. A. 1984. « Interleukin-1 ». *Reviews of Infectious Diseases* 6 (1): 51-95. <https://doi.org/10.1093/clinids/6.1.51>.
- Dinarello, Charles A. 2009. « Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family ». *Annual Review of Immunology* 27: 519-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- . 2013. « Overview of the Interleukin-1 Family of Ligands and Receptors ». *Seminars in Immunology* 25 (6): 389-93. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.001>.
- . 2018. « Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity ». *Immunological reviews* 281 (1): 8-27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>.
- Dinarello, Charles A., et Jos W.M. van der Meer. 2013. « Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans ». *Seminars in immunology* 25 (6): 469-84. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.008>.
- Dinarello, Charles, Daniela Novick, SooHun Kim, et Gilles Kaplanski. 2013. « Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein ». *Frontiers in Immunology* 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00289>.

- Ding, Jingjin, Kun Wang, Wang Liu, Yang She, Qi Sun, Jianjin Shi, Hanzi Sun, Da-Cheng Wang, et Feng Shao. 2016. « Pore-Forming Activity and Structural Autoinhibition of the Gasdermin Family ». *Nature* 535 (7610): 111-16. <https://doi.org/10.1038/nature18590>.
- Ding, Ming-Hui, Peng-Gang Xu, Ying Wang, Bao-di Ren, et Jun-Li Zhang. 2023. « Resveratrol Attenuates Ankylosing Spondylitis in Mice by Inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 Pathway and Regulating Gut Microbiota ». *Immunological Investigations* 52 (2): 194-209. <https://doi.org/10.1080/08820139.2022.2154162>.
- Ding, Tao, Shaofei Wang, Xuyao Zhang, Wenjing Zai, Jiajun Fan, Wei Chen, Qi Bian, et al. 2018. « Kidney Protection Effects of Dihydroquercetin on Diabetic Nephropathy through Suppressing ROS and NLRP3 Inflammasome ». *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 41 (mars): 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.01.026>.
- Dionne, Isabelle, Ravi K. Nookala, Stephen P. Jackson, Aidan J. Doherty, et Stephen D. Bell. 2003. « A Heterotrimeric PCNA in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus Solfataricus* ». *Molecular Cell* 11 (1): 275-82. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00824-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00824-9).
- Domingo-Fernández, Raquel, Rebecca C. Coll, Jay Kearney, Samuel Breit, et Luke A. J. O'Neill. 2017. « The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 $\beta$  transcription and activate the NLRP3 inflammasome ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (29): 12077-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797126>.
- Dostert, Catherine, Greta Guarda, Jackeline F. Romero, Philippe Menu, Olaf Gross, Aubry Tardivel, Mario-Luca Suva, et al. 2009. « Malarial Hemozoin Is a Nalp3 Inflammasome Activating Danger Signal ». *PloS One* 4 (8): e6510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006510>.
- Dostert, Catherine, Virginie Pétrilli, Robin Van Bruggen, Chad Steele, Brooke T Mossman, et Jürg Tschopp. 2008. « Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica ». *Science (New York, N.Y.)* 320 (5876): 674-77. <https://doi.org/10.1126/science.1156995>.
- Duewell, Peter, Hajime Kono, Katey J. Rayner, Cherilyn M. Sirois, Gregory Vladimer, Franz G. Bauernfeind, George S. Abela, et al. 2010. « NLRP3 Inflammasomes Are Required for Atherogenesis and Activated by Cholesterol Crystals ». *Nature* 464 (7293): 1357-61. <https://doi.org/10.1038/nature08938>.
- Duong, Bao H., Michio Onizawa, Juan A. Oses-Prieto, Rommel Advincula, Alma Burlingame, Barbara A. Malynn, et Averil Ma. 2015. « A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 $\beta$  protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity ». *Immunity* 42 (1): 55-67. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.031>.
- Ea, Hang-Korng, et Frédéric Lioté. 2009. « Advances in Understanding Calcium-Containing Crystal Disease ». *Current Opinion in Rheumatology* 21 (2): 150-57. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283257ba9>.
- Elia, Andrew E.H., Alexander P. Boardman, David C. Wang, Edward L. Huttlin, Robert A. Everley, Noah Dephoure, Chunshui Zhou, Itay Koren, Steven P. Gygi, et Stephen J. Elledge. 2015. « Quantitative Proteomic Atlas of Ubiquitination and Acetylation in the DNA Damage Response ». *Molecular cell* 59 (5): 867-81. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.006>.
- Elinav, Eran, Till Strowig, Andrew L. Kau, Jorge Henao-Mejia, Christoph A. Thaiss, Carmen J. Booth, David R. Peaper, et al. 2011. « NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic

- Microbial Ecology and Risk for Colitis ». *Cell* 145 (5): 745-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>.
- Elliott, Eric I., Alexis N. Miller, Balaji Banoth, Shankar S. Iyer, Aleksandr Stotland, Jerrold P. Weiss, Roberta A. Gottlieb, Fayyaz S. Sutterwala, et Suzanne L. Cassel. 2018. « Mitochondrial assembly of the NLRP3 inflammasome complex is initiated at priming ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200 (9): 3047-52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701723>.
- Eltay, Eiba G., et Thomas Van Dyke. 2023. « Resolution of Inflammation in Oral Diseases ». *Pharmacology & Therapeutics* 247 (juillet): 108453. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108453>.
- Ermler, Megan E., Zachary Traylor, Krupen Patel, Stefan A. Schattgen, Sivapriya K. Vanaja, Katherine A. Fitzgerald, et Amy G. Hise. 2014. « Rift Valley fever virus infection induces activation of the NLRP3 inflammasome ». *Virology* 449 (janvier): 174-80. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.015>.
- Fan, Zheng, Ming Lu, Chen Qiao, Yan Zhou, Jian-Hua Ding, et Gang Hu. 2016. « MicroRNA-7 Enhances Subventricular Zone Neurogenesis by Inhibiting NLRP3/Caspase-1 Axis in Adult Neural Stem Cells ». *Molecular Neurobiology* 53 (10): 7057-69. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9620-5>.
- Faustin, Benjamin, Lydia Lartigue, Jean-Marie Bruey, Frederic Luciano, Eduard Sergienko, Beatrice Bailly-Maitre, Niels Volkmann, Dorit Hanein, Isabelle Rouiller, et John C. Reed. 2007. « Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation ». *Molecular Cell* 25 (5): 713-24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.032>.
- Fernandes-Alnemri, Teresa, Seokwon Kang, Connor Anderson, Junji Sagara, Katherine A. Fitzgerald, et Emad S. Alnemri. 2013. « Cutting Edge: TLR Signaling Licenses IRAK1 for Rapid Activation of the NLRP3 Inflammasome ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (8): 3995-99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301681>.
- Finger, Joshua N., John D. Lich, Lauren C. Dare, Michael N. Cook, Kristin K. Brown, Chaya Duraiswami, John Bertin, et Peter J. Gough. 2012. « Autolytic Proteolysis within the Function to Find Domain (FIIND) Is Required for NLRP1 Inflammasome Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (30): 25030-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378323>.
- Fink, Susan L., Tessa Bergsbaken, et Brad T. Cookson. 2008. « Anthrax Lethal Toxin and Salmonella Elicit the Common Cell Death Pathway of Caspase-1-Dependent Pyroptosis via Distinct Mechanisms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11): 4312-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707370105>.
- Firestein, Gary S. 2003. « Evolving Concepts of Rheumatoid Arthritis ». *Nature* 423 (6937): 356-61. <https://doi.org/10.1038/nature01661>.
- Flister, Michael J., Matthew J. Hoffman, Angela Lemke, Sasha Z. Prisco, Nathan Rudemiller, Caitlin C. O'Meara, Shirng-Wern Tsaih, et al. 2015. « SH2B3 Is a Genetic Determinant of Cardiac Inflammation and Fibrosis ». *Circulation: Cardiovascular Genetics* 8 (2): 294-304. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000527>.
- Fore, Faith, Cut Indriputri, Janet Mamutse, et Jusak Nugraha. 2020. « TLR10 and Its Unique Anti-Inflammatory Properties and Potential Use as a Target in Therapeutics ». *Immune Network* 20 (3): e21. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e21>.

- Formiga, Rodrigo de Oliveira, Lucie Pesenti, Maha Zohra Ladjemi, Philippe Frachet, Muriel Andrieu, Souganya Many, Vaarany Karunanithy, et al. 2022. « Cytosolic PCNA Interacts with S100A8 and Controls an Inflammatory Subset of Neutrophils in COVID-19 ». medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.10.12.22280984>.
- Franchi, Luigi, Amal Amer, Mathilde Body-Malapel, Thirumala-Devi Kanneganti, Nesrin Ozören, Rajesh Jagirdar, Naohiro Inohara, et al. 2006. « Cytosolic Flagellin Requires Ipaf for Activation of Caspase-1 and Interleukin 1beta in Salmonella-Infected Macrophages ». *Nature Immunology* 7 (6): 576-82. <https://doi.org/10.1038/ni1346>.
- Franchi, Luigi, Tatjana Eigenbrod, Raúl Muñoz-Planillo, Ulas Ozkurede, Yun-Gi Kim, Chakrabarti Arindam, Michael Gale, et al. 2014. « Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K<sup>+</sup> Efflux ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (8): 4214-22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400582>.
- Franchi, Luigi, Tatjana Eigenbrod, et Gabriel Núñez. 2009. « Cutting Edge: TNF-Alpha Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (2): 792-96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900173>.
- Franchi, Luigi, Thirumala-Devi Kanneganti, George R. Dubyak, et Gabriel Núñez. 2007. « Differential Requirement of P2X7 Receptor and Intracellular K<sup>+</sup> for Caspase-1 Activation Induced by Intracellular and Extracellular Bacteria ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (26): 18810-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610762200>.
- Franchi, Luigi, Raul Muñoz-Planillo, et Gabriel Núñez. 2012. « Sensing and Reacting to Microbes through the Inflammasomes ». *Nature Immunology* 13 (4): 325-32. <https://doi.org/10.1038/ni.2231>.
- Franchi, Luigi, Joshua Stoolman, Thirumala-Devi Kanneganti, Amrisha Verma, Reuben Ramphal, et Gabriel Núñez. 2007. « Critical Role for Ipaf in Pseudomonas Aeruginosa-Induced Caspase-1 Activation ». *European Journal of Immunology* 37 (11): 3030-39. <https://doi.org/10.1002/eji.200737532>.
- Franklin, Bernardo S., Lukas Bossaller, Dominic De Nardo, Jacqueline M. Ratter, Andrea Stutz, Gudrun Engels, Christoph Brenker, et al. 2014. « The Adaptor ASC Has Extracellular and “prionoid” Activities That Propagate Inflammation ». *Nature Immunology* 15 (8): 727-37. <https://doi.org/10.1038/ni.2913>.
- Freeman, Tracey L., et Talia H. Swartz. 2020. « Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19 ». *Frontiers in Immunology* 11: 1518. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01518>.
- Freudenthal, Bret D., Lokesh Gakhar, S. Ramaswamy, et M. Todd Washington. 2010. « Structure of Monoubiquitinated PCNA and Implications for Translesion Synthesis and DNA Polymerase Exchange ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (4): 479-84. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1776>.
- Friggeri, Arnaud, Yanping Yang, Sami Banerjee, Yong-Jun Park, Gang Liu, et Edward Abraham. 2010. « HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the  $\alpha\beta 3$ -integrin ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 299 (6): C1267-76. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00152.2010>.
- Fu, Dragony, Leona D. Samson, Ullrich Hübscher, et Barbara van Loon. 2015. « The Interaction between ALKBH2 DNA Repair Enzyme and PCNA Is Direct, Mediated by the Hydrophobic Pocket of PCNA and Perturbed in Naturally-Occurring ALKBH2 Variants ». *DNA Repair* 35 (novembre): 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.008>.

- Fukuda, Keitaro, Ken Okamura, Rebecca L. Riding, Xueli Fan, Khashayar Afshari, Nazgol-Sadat Haddadi, Sean M. McCauley, et al. 2021. « AIM2 Regulates Anti-Tumor Immunity and Is a Viable Therapeutic Target for Melanoma ». *The Journal of Experimental Medicine* 218 (9): e20200962. <https://doi.org/10.1084/jem.20200962>.
- Gaidt, Moritz M., Thomas S. Ebert, Dhruv Chauhan, Tobias Schmidt, Jonathan L. Schmid-Burgk, Francesca Rapino, Avril A. B. Robertson, Matthew A. Cooper, Thomas Graf, et Veit Hornung. 2016. « Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway ». *Immunity* 44 (4): 833-46. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012>.
- Gaidt, Moritz M., et Veit Hornung. 2017. « Alternative Inflammasome Activation Enables IL-1 $\beta$  Release from Living Cells ». *Current Opinion in Immunology* 44 (février): 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.007>.
- Gali, Himabindu, Szilvia Juhasz, Monika Morocz, Ildiko Hajdu, Karoly Fatyol, Valeria Szukacsov, Peter Burkovics, et Lajos Haracska. 2012. « Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork ». *Nucleic Acids Research* 40 (13): 6049-59. <https://doi.org/10.1093/nar/gks256>.
- Galli, Stephen J., Niels Borregaard, et Thomas A. Wynn. 2011. « Phenotypic and Functional Plasticity of Cells of Innate Immunity: Macrophages, Mast Cells and Neutrophils ». *Nature Immunology* 12 (11): 1035-44. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>.
- Gallucci, Stefania, et Polly Matzinger. 2001. « Danger Signals: SOS to the Immune System ». *Current Opinion in Immunology* 13 (1): 114-19. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00191-6).
- Geijtenbeek, Teunis B. H., et Sonja I. Gringhuis. 2009. « Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses ». *Nature Reviews Immunology* 9 (7): 465-79. <https://doi.org/10.1038/nri2569>.
- Ghonime, Mohammed G., Obada R. Shamaa, Srabani Das, Ramadan A. Eldomany, Teresa Fernandes-Alnemri, Emad S. Alnemri, Mikhail A. Gavrilin, et Mark D. Wewers. 2014. « Inflammasome Priming by Lipopolysaccharide Is Dependent upon ERK Signaling and Proteasome Function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (8): 3881-88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301974>.
- Gilljam, Karin M., Emadoldin Feyzi, Per A. Aas, Mirta M. L. Sousa, Rebekka Müller, Cathrine B. Vågbø, Tara C. Catterall, et al. 2009. « Identification of a Novel, Widespread, and Functionally Important PCNA-Binding Motif ». *The Journal of Cell Biology* 186 (5): 645-54. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903138>.
- Goldberg, Emily L., Jennifer L. Asher, Ryan D. Molony, Albert C. Shaw, Caroline J. Zeiss, Chao Wang, Ludmilla A. Morozova-Roche, Raimund I. Herzog, Akiko Iwasaki, et Vishwa Deep Dixit. 2017. «  $\beta$ -hydroxybutyrate deactivates neutrophil NLRP3 inflammasome to relieve gout flares ». *Cell reports* 18 (9): 2077-87. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.004>.
- Gong, Tao, Yanqing Yang, Tengchuan Jin, Wei Jiang, et Rongbin Zhou. 2018. « Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes ». *Trends in Immunology* 39 (5): 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.01.009>.
- Gong, Tao, et Rongbin Zhou. 2020. « ApoC3: An “alarmin” Triggering Sterile Inflammation ». *Nature Immunology* 21 (1): 9-11. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0562-3>.
- Gong, Yi-Nan, Xiaoming Wang, Jiayi Wang, Zhenxiao Yang, Shan Li, Jieling Yang, Liping Liu, Xiaoguang Lei, et Feng Shao. 2010. « Chemical Probing Reveals Insights into the Signaling Mechanism of Inflammasome Activation ». *Cell Research* 20 (12): 1289-1305. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.135>.



- Goubau, Delphine, Jan Rehwinkel, et Caetano Reis e Sousa. 2010. « PYHIN Proteins: Center Stage in DNA Sensing ». *Nature Immunology* 11 (11): 984-86. <https://doi.org/10.1038/ni1110-984>.
- Gratton, Sarah B., Kenneth J. Scalapino, et Kenneth H. Fye. 2009. « Case of Anakinra as a Steroid-Sparing Agent for Gout Inflammation ». *Arthritis and Rheumatism* 61 (9): 1268-70. <https://doi.org/10.1002/art.24694>.
- Green, Jack P., Shi Yu, Fátima Martín-Sánchez, Pablo Pelegrin, Gloria Lopez-Castejon, Catherine B. Lawrence, et David Brough. 2018. « Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (40): E9371-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812744115>.
- Guan, Kai, Congwen Wei, Zirui Zheng, Ting Song, Feixiang Wu, Yanhong Zhang, Ye Cao, et al. 2015. « MAVS Promotes Inflammasome Activation by Targeting ASC for K63-Linked Ubiquitination via the E3 Ligase TRAF3 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (10): 4880-90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402851>.
- Gugliandolo, Agnese, Sabrina Giacoppo, Placido Bramanti, et Emanuela Mazzon. 2018. « NLRP3 Inflammasome Activation in a Transgenic Amyotrophic Lateral Sclerosis Model ». *Inflammation* 41 (1): 93-103. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0667-5>.
- Gulbis, J. M., Z. Kelman, J. Hurwitz, M. O'Donnell, et J. Kuriyan. 1996. « Structure of the C-Terminal Region of P21(WAF1/CIP1) Complexed with Human PCNA ». *Cell* 87 (2): 297-306. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81347-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81347-1).
- Guo, C., R. Fu, S. Wang, Y. Huang, X. Li, M. Zhou, J. Zhao, et N. Yang. 2018. « NLRP3 Inflammasome Activation Contributes to the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis ». *Clinical and Experimental Immunology* 194 (2): 231-43. <https://doi.org/10.1111/cei.13167>.
- Guo, Chuansheng, Zhexu Chi, Danlu Jiang, Ting Xu, Weiwei Yu, Zhen Wang, Sheng Chen, et al. 2018. « Cholesterol Homeostatic Regulator SCAP-SREBP2 Integrates NLRP3 Inflammasome Activation and Cholesterol Biosynthetic Signaling in Macrophages ». *Immunity* 49 (5): 842-856.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.021>.
- Guo, Chuansheng, Shujun Xie, Zhexu Chi, Jinhua Zhang, Yangyang Liu, Li Zhang, Mingzhu Zheng, et al. 2016. « Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome ». *Immunity* 45 (4): 802-16. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.008>.
- Gurung, Prajwal, Paras K. Anand, R. K. Subbarao Malireddi, Lieselotte Vande Walle, Nina Van Opendenbosch, Christopher P. Dillon, Ricardo Weinlich, Douglas R. Green, Mohamed Lamkanfi, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2014. « FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (4): 1835-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302839>.
- Gurung, Prajwal, R. K. Subbarao Malireddi, Paras K. Anand, Dieter Demon, Lieselotte Vande Walle, Zhiping Liu, Peter Vogel, Mohamed Lamkanfi, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2012. « Toll or Interleukin-1 Receptor (TIR) Domain-Containing Adaptor Inducing Interferon- $\beta$  (TRIF)-Mediated Caspase-11 Protease Production Integrates Toll-like Receptor 4 (TLR4) Protein- and Nlrp3 Inflammasome-Mediated Host Defense against Enteropathogens ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (41): 34474-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401406>.

- Hagar, Jon A., Daniel A. Powell, Youssef Aachoui, Robert K. Ernst, et Edward A. Miao. 2013. « Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6151): 1250-53. <https://doi.org/10.1126/science.1240988>.
- Halle, Annett, Veit Hornung, Gabor C. Petzold, Cameron R. Stewart, Brian G. Monks, Thomas Reinheckel, Katherine A. Fitzgerald, Eicke Latz, Kathryn J. Moore, et Douglas T. Golenbock. 2008. « The NALP3 Inflammasome Is Involved in the Innate Immune Response to Amyloid- $\beta$  ». *Nature Immunology* 9 (8): 857-65. <https://doi.org/10.1038/ni.1636>.
- Hamilton, Claire, et Paras K. Anand. 2019. « Right place, right time: localisation and assembly of the NLRP3 inflammasome ». *F1000Research* 8 (mai): F1000 Faculty Rev-676. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18557.1>.
- Hamzaoui, Kamel, et Agnès Hamzaoui. 2023. « Vasculitis and the NLRP3 Inflammasome ». *Current Opinion in Rheumatology*, août. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000962>.
- Han, SeungHye, Travis B. Lear, Jacob A. Jerome, Shristi Rajbhandari, Courtney A. Snively, Dexter L. Gulick, Kevin F. Gibson, Chunbin Zou, Bill B. Chen, et Rama K. Mallampalli. 2015. « Lipopolysaccharide Primes the NALP3 Inflammasome by Inhibiting Its Ubiquitination and Degradation Mediated by the SCFFBXL2 E3 Ligase ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (29): 18124-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645549>.
- Hara, Hideki, Sergey S. Seregin, Dahai Yang, Koichi Fukase, Mathias Chamillard, Emad S. Alnemri, Naohiro Inohara, Grace Y. Chen, et Gabriel Núñez. 2018. « The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection ». *Cell* 175 (6): 1651-1664.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.047>.
- Harijith, Anantha, David L. Ebenezer, et Viswanathan Natarajan. 2014. « Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation ». *Frontiers in Physiology* 5 (septembre): 352. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00352>.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, et S. J. Elledge. 1993. « The P21 Cdk-Interacting Protein Cip1 Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases ». *Cell* 75 (4): 805-16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-g).
- Harper, J. W., S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L. H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, et E. Swindell. 1995. « Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by P21 ». *Molecular Biology of the Cell* 6 (4): 387-400. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.4.387>.
- Hazuda, D. J., J. C. Lee, et P. R. Young. 1988. « The Kinetics of Interleukin 1 Secretion from Activated Monocytes. Differences between Interleukin 1 Alpha and Interleukin 1 Beta ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (17): 8473-79.
- He, Ming, Hou-Hsien Chiang, Hanzhi Luo, Zhifang Zheng, Qi Qiao, Li Wang, Mingdian Tan, et al. 2020. « An Acetylation Switch of the NLRP3 Inflammasome Regulates Aging-associated Chronic Inflammation and Insulin Resistance ». *Cell metabolism* 31 (3): 580-591.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.009>.
- He, Wan-ting, Haoqiang Wan, Lichen Hu, Pengda Chen, Xin Wang, Zhe Huang, Zhang-Hua Yang, Chuan-Qi Zhong, et Jiahuai Han. 2015. « Gasdermin D Is an Executor of Pyroptosis and Required for Interleukin-1 $\beta$  Secretion ». *Cell Research* 25 (12): 1285-98. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>.

- He, Yuan, Hideki Hara, et Gabriel Núñez. 2016. « Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation ». *Trends in Biochemical Sciences* 41 (12): 1012-21. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>.
- He, Yuan, Melody Y. Zeng, Dahai Yang, Benny Motro, et Gabriel Núñez. 2016. « NEK7 Is an Essential Mediator of NLRP3 Activation Downstream of Potassium Efflux ». *Nature* 530 (7590): 354-57. <https://doi.org/10.1038/nature16959>.
- Heilig, Rosalie, et Petr Broz. 2018. « Function and Mechanism of the Pyrin Inflammasome ». *European Journal of Immunology* 48 (2): 230-38. <https://doi.org/10.1002/eji.201746947>.
- Henao-Mejia, Jorge, Eran Elinav, Chengcheng Jin, Liming Hao, Wajahat Z. Mehal, Till Strowig, Christoph A. Thaiss, et al. 2012. « Inflammasome-Mediated Dysbiosis Regulates Progression of NAFLD and Obesity ». *Nature* 482 (7384): 179-85. <https://doi.org/10.1038/nature10809>.
- Heneka, Michael T., Markus P. Kummer, Andrea Stutz, Andrea Delekate, Stephanie Schwartz, Ana Vieira-Saecker, Angelika Griep, et al. 2013. « NLRP3 Is Activated in Alzheimer's Disease and Contributes to Pathology in APP/PS1 Mice ». *Nature* 493 (7434): 674-78. <https://doi.org/10.1038/nature11729>.
- Heneka, Michael T., Róisín M. McManus, et Eicke Latz. 2018. « Inflammasome Signalling in Brain Function and Neurodegenerative Disease ». *Nature Reviews Neuroscience* 19 (10): 610-21. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>.
- Hernandez-Cuellar, Eduardo, Kohsuke Tsuchiya, Hideki Hara, Rendong Fang, Shunsuke Sakai, Ikuo Kawamura, Shizuo Akira, et Masao Mitsuyama. 2012. « Cutting Edge: Nitric Oxide Inhibits the NLRP3 Inflammasome ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (11): 5113-17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202479>.
- Hishiki, Asami, Hiroshi Hashimoto, Tomo Hanafusa, Keijiro Kamei, Eiji Ohashi, Toshiyuki Shimizu, Haruo Ohmori, et Mamoru Sato. 2009. « Structural Basis for Novel Interactions between Human Translesion Synthesis Polymerases and Proliferating Cell Nuclear Antigen ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (16): 10552-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809745200>.
- Hochheiser, Inga V., Michael Pilsl, Gregor Hagelueken, Jonas Moecking, Michael Marleaux, Rebecca Brinkschulte, Eicke Latz, Christoph Engel, et Matthias Geyer. 2022. « Structure of the NLRP3 Decamer Bound to the Cytokine Release Inhibitor CRID3 ». *Nature* 604 (7904): 184-89. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04467-w>.
- Hoegel, Carsten, Boris Pfander, George-Lucian Moldovan, George Pyrowolakis, et Stefan Jentsch. 2002. « RAD6-Dependent DNA Repair Is Linked to Modification of PCNA by Ubiquitin and SUMO ». *Nature* 419 (6903): 135-41. <https://doi.org/10.1038/nature00991>.
- Hoelz, Derek J., Randy J. Arnold, Lacey E. Dobrolecki, Waleed Abdel-Aziz, Andrew P. Loehrer, Milos V. Novotny, Lauren Schnaper, Robert J. Hickey, et Linda H. Malkas. 2006. « The Discovery of Labile Methyl Esters on Proliferating Cell Nuclear Antigen by MS/MS ». *Proteomics* 6 (17): 4808-16. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600142>.
- Hoffman, H. M., J. L. Mueller, D. H. Broide, A. A. Wanderer, et R. D. Kolodner. 2001. « Mutation of a New Gene Encoding a Putative Pyrin-like Protein Causes Familial Cold Autoinflammatory Syndrome and Muckle-Wells Syndrome ». *Nature Genetics* 29 (3): 301-5. <https://doi.org/10.1038/ng756>.
- Hornick, Emma E., Balaji Banoth, Ann M. Miller, Zeb R. Zacharias, Nidhi Jain, Mary E. Wilson, Katherine N. Gibson-Corley, et al. 2018. « Nlrp12 Mediates Adverse Neutrophil

- Recruitment during Influenza Virus Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 200 (3): 1188-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700999>.
- Hornung, Veit, Franz Bauernfeind, Annett Halle, Eivind O. Samstad, Hajime Kono, Kenneth L. Rock, Katherine A. Fitzgerald, et Eicke Latz. 2008. « Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization ». *Nature immunology* 9 (8): 847-56. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>.
- Hornung, Veit, et Eicke Latz. 2010. « Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation ». *European journal of immunology* 40 (3): 620-23. <https://doi.org/10.1002/eji.200940185>.
- Hou, Lei, Le Yang, Na Chang, Xinhao Zhao, Xuan Zhou, Chengbin Dong, Fuquan Liu, Lin Yang, et Liying Li. 2020. « Macrophage Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Blockade Attenuates Liver Inflammation and Fibrogenesis Triggered by NLRP3 Inflammasome ». *Frontiers in Immunology* 11 (juin): 1149. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01149>.
- Hoving, J. Claire, Gillian J. Wilson, et Gordon D. Brown. 2014. « Signalling C-Type Lectin Receptors, Microbial Recognition and Immunity ». *Cellular Microbiology* 16 (2): 185-94. <https://doi.org/10.1111/cmi.12249>.
- Hsu, Li-Chung, Syed R. Ali, Shauna McGillivray, Ping-Hui Tseng, Sanjeev Mariathasan, Eric W. Humke, Lars Eckmann, et al. 2008. « A NOD2-NALP1 Complex Mediates Caspase-1-Dependent IL-1 $\beta$  Secretion in Response to Bacillus Anthracis Infection and Muramyl Dipeptide ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (22): 7803-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802726105>.
- Hu, Zehan, Chuangye Yan, Peiyuan Liu, Zhiwei Huang, Rui Ma, Chenlu Zhang, Ruiyong Wang, et al. 2013. « Crystal Structure of NLRC4 Reveals Its Autoinhibition Mechanism ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6142): 172-75. <https://doi.org/10.1126/science.1236381>.
- Hughes, Mark M., et Luke A. J. O'Neill. 2018. « Metabolic Regulation of NLRP3 ». *Immunological Reviews* 281 (1): 88-98. <https://doi.org/10.1111/imr.12608>.
- Humphries, Fiachra, Ronan Bergin, Ruaidhri Jackson, Nezira Delagic, Bingwei Wang, Shuo Yang, Alice V. Dubois, Rebecca J. Ingram, et Paul N. Moynagh. 2018. « The E3 Ubiquitin Ligase Pellino2 Mediates Priming of the NLRP3 Inflammasome ». *Nature Communications* 9 (1): 1560. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03669-z>.
- Indiani, Chiara, et Mike O'Donnell. 2006. « The Replication Clamp-Loading Machine at Work in the Three Domains of Life ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (10): 751-61. <https://doi.org/10.1038/nrm2022>.
- Inoue, Akira, Sotaro Kikuchi, Asami Hishiki, Youming Shao, Richard Heath, Benjamin J. Evison, Marcelo Actis, Christine E. Canman, Hiroshi Hashimoto, et Naoaki Fujii. 2014. « A Small Molecule Inhibitor of Monoubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Inhibits Repair of Interstrand DNA Cross-Link, Enhances DNA Double Strand Break, and Sensitizes Cancer Cells to Cisplatin ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 7109-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.520429>.
- Iyer, Shankar S., Qiong He, John R. Janczy, Eric I. Elliott, Zhenyu Zhong, Alicia K. Olivier, Jeffrey J. Sadler, et al. 2013. « Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation ». *Immunity* 39 (2): 311-23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>.
- Jäger, Benedikt, Benjamin Seeliger, Oliver Terwolbeck, Gregor Warnecke, Tobias Welte, Meike Müller, Christian Bode, et Antje Prasse. 2021. « The NLRP3-Inflammasome-Caspase-1 Pathway Is Upregulated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Acute Exacerbations and

- Is Inducible by Apoptotic A549 Cells ». *Frontiers in Immunology* 12: 642855. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.642855>.
- Jakobsen, Martin R., et Søren R. Paludan. 2014. « IFI16: At the Interphase between Innate DNA Sensing and Genome Regulation ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25 (6): 649-55. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.06.004>.
- Jamilloux, Yvan, Sophie Jarraud, Gérard Lina, Jérôme Etienne, et Florence Ader. 2012. « Legionella, légionellose ». *médecine/sciences* 28 (6-7): 639-45. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012286018>.
- Jamilloux, Yvan, Flora Magnotti, Alexandre Belot, et Thomas Henry. 2018. « The Pyrin Inflammasome: From Sensing RhoA GTPases-Inhibiting Toxins to Triggering Autoinflammatory Syndromes ». *Pathogens and Disease* 76 (3). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty020>.
- Janeway, C. A. 1989. « Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54 Pt 1: 1-13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>.
- . 1992. « The Immune System Evolved to Discriminate Infectious Nonself from Noninfectious Self ». *Immunology Today* 13 (1): 11-16. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90198-G](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90198-G).
- Jennette, J. Charles. 2013. « Overview of the 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides ». *Clinical and experimental nephrology* 17 (5): 603-6. <https://doi.org/10.1007/s10157-013-0869-6>.
- Jia, Chang, Jian Zhang, Huanwen Chen, Yingzhi Zhuge, Huiqiao Chen, Fanyu Qian, Kailiang Zhou, et al. 2019. « Endothelial Cell Pyroptosis Plays an Important Role in Kawasaki Disease via HMGB1/RAGE/Cathepsin B Signaling Pathway and NLRP3 Inflammasome Activation ». *Cell Death & Disease* 10 (10): 778. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2021-3>.
- Jin, Tengchuan, Andrew Perry, Jiansheng Jiang, Patrick Smith, James A. Curry, Leonie Unterholzner, Zhaozhao Jiang, et al. 2012. « Structures of the HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor ». *Immunity* 36 (4): 561-71. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.014>.
- Jin, Ying, Christina M. Mailloux, Katherine Gowan, Sheri L. Riccardi, Gregory LaBerge, Dorothy C. Bennett, Pamela R. Fain, et Richard A. Spritz. 2007. « NALP1 in Vitiligo-Associated Multiple Autoimmune Disease ». *The New England Journal of Medicine* 356 (12): 1216-25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061592>.
- Juliana, Christine, Teresa Fernandes-Alnemri, Seokwon Kang, Andrew Farias, Fengsong Qin, et Emad S. Alnemri. 2012. « Non-Transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (43): 36617-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407130>.
- Kaczmarek, Agnieszka, Peter Vandenabeele, et Dmitri V. Krysko. 2013. « Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance ». *Immunity* 38 (2): 209-23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003>.
- Kalantari, Parisa, Rosane B. DeOliveira, Jennie Chan, Yolanda Corbett, Vijay Rathinam, Andrea Stutz, Eicke Latz, Ricardo T. Gazzinelli, Douglas T. Golenbock, et Katherine A. Fitzgerald. 2014. « Dual Engagement of the NLRP3 and AIM2 Inflammasomes by Plasmodium-Derived Hemozoin and DNA during Malaria ». *Cell Reports* 6 (1): 196-210. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.014>.

- Karan, Dev, Ossama Tawfik, et Seema Dubey. 2017. « Expression Analysis of Inflammasome Sensors and Implication of NLRP12 Inflammasome in Prostate Cancer ». *Scientific Reports* 7 (1): 4378. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04286-4>.
- Karki, Rajendra, Si Ming Man, R. K. Subbarao Malireddi, Prajwal Gurung, Peter Vogel, Mohamed Lamkanfi, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2015. « Concerted Activation of the AIM2 and NLRP3 Inflammasomes Orchestrates Host Protection against Aspergillus Infection ». *Cell Host & Microbe* 17 (3): 357-68. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.006>.
- Karmakar, Mausita, Michael A. Katsnelson, George R. Dubyak, et Eric Pearlman. 2016. « Neutrophil P2X7 Receptors Mediate NLRP3 Inflammasome-Dependent IL-1 $\beta$  Secretion in Response to ATP ». *Nature Communications* 7 (février): 10555. <https://doi.org/10.1038/ncomms10555>.
- Karmakar, Mausita, Michael Katsnelson, Hesham A. Malak, Neil G. Greene, Scott J. Howell, Amy G. Hise, Andrew Camilli, Aras Kadioglu, George R. Dubyak, et Eric Pearlman. 2015. « Neutrophil IL-1 $\beta$  Processing Induced by Pneumolysin Is Mediated by the NLRP3/ASC Inflammasome and Caspase-1 Activation and Is Dependent on K<sup>+</sup> Efflux ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (4): 1763-75. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401624>.
- Karmakar, Mausita, Martin Minns, Elyse N. Greenberg, Jose Diaz-Aponte, Kersi Pestonjamas, Jennifer L. Johnson, Joseph K. Rathkey, et al. 2020. « N-GSDMD Trafficking to Neutrophil Organelles Facilitates IL-1 $\beta$  Release Independently of Plasma Membrane Pores and Pyroptosis ». *Nature Communications* 11 (1): 2212. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16043-9>.
- Kashiwaba, Shu-ichiro, Rie Kanao, Yuji Masuda, Rika Kusumoto-Matsuo, Fumio Hanaoka, et Chikahide Masutani. 2015. « USP7 Is a Suppressor of PCNA Ubiquitination and Oxidative-Stress-Induced Mutagenesis in Human Cells ». *Cell Reports* 13 (10): 2072-80. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.014>.
- Kasper, Lydia, Annika König, Paul-Albert Koenig, Mark S. Gresnigt, Johannes Westman, Rebecca A. Drummond, Michail S. Lionakis, et al. 2018. « The fungal peptide toxin Candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes ». *Nature Communications* 9 (octobre): 4260. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06607-1>.
- Katsnelson, Michael A., L. Graham Rucker, Hana M. Russo, et George R. Dubyak. 2015. « K<sup>+</sup> Efflux Agonists Induce NLRP3 Inflammasome Activation Independently of Ca<sup>2+</sup> Signaling ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (8): 3937-52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402658>.
- Kawashima, Akira, Tadayoshi Karasawa, Kenji Tago, Hiroaki Kimura, Ryo Kamata, Fumitake Usui-Kawanishi, Sachiko Watanabe, et al. 2017. « ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 199 (10): 3614-22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700184>.
- Kayagaki, Nobuhiko, Opher S. Kornfeld, Bettina L. Lee, Irma B. Stowe, Karen O'Rourke, Qingling Li, Wendy Sandoval, et al. 2021. « NINJ1 Mediates Plasma Membrane Rupture during Lytic Cell Death ». *Nature* 591 (7848): 131-36. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03218-7>.
- Kayagaki, Nobuhiko, Irma B. Stowe, Bettina L. Lee, Karen O'Rourke, Keith Anderson, Søren Warming, Trinna Cuellar, et al. 2015. « Caspase-11 Cleaves Gasdermin D for Non-

- Canonical Inflammasome Signalling ». *Nature* 526 (7575): 666-71. <https://doi.org/10.1038/nature15541>.
- Kayagaki, Nobuhiko, Søren Warming, Mohamed Lamkanfi, Lieselotte Vande Walle, Salina Louie, Jennifer Dong, Kim Newton, et al. 2011. « Non-Canonical Inflammasome Activation Targets Caspase-11 ». *Nature* 479 (7371): 117-21. <https://doi.org/10.1038/nature10558>.
- Kayagaki, Nobuhiko, Michael T. Wong, Irma B. Stowe, Sree Ranjani Ramani, Lino C. Gonzalez, Sachiko Akashi-Takamura, Kensuke Miyake, et al. 2013. « Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4 ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6151): 1246-49. <https://doi.org/10.1126/science.1240248>.
- Kerur, Nagaraj, Mohanan Valiya Veetil, Neelam Sharma-Walia, Virginie Bottero, Sathish Sadagopan, Pushpalatha Otageri, et Bala Chandran. 2011. « IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection ». *Cell Host & Microbe* 9 (5): 363-75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.008>.
- Khanna, Kunjan, Hui Yan, Muneshwar Mehra, Nidhi Rohatgi, Gabriel Mbalaviele, et Roberta Faccio. 2023. « Tmem178 Negatively Regulates IL-1 $\beta$  Production through Inhibition of the NLRP3 Inflammasome ». *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, mars, 2023.03.07.531385. <https://doi.org/10.1101/2023.03.07.531385>.
- Khare, Sonal, Andrea Dorfleutner, Nicole B. Bryan, Chawon Yun, Alexander D. Radian, Lucia de Almeida, Yon Rojanasakul, et Christian Stehlik. 2012. « An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages ». *Immunity* 36 (3): 464-76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.001>.
- Khare, Sonal, Rojo A. Ratsimandresy, Lúcia de Almeida, Carla M. Cuda, Stephanie L. Rellick, Alexander V. Misharin, Melissa C. Wallin, et al. 2014. « The PYRIN Domain-Only Protein POP3 Inhibits ALR Inflammasomes and Regulates Responses to Infection with DNA Viruses ». *Nature Immunology* 15 (4): 343-53. <https://doi.org/10.1038/ni.2829>.
- Kim, Byung Ju, et Hoyun Lee. 2008. « Lys-110 is essential for targeting PCNA to replication and repair foci, and the K110A mutant activates apoptosis ». *Biology of the cell* 100 (12): 675-86. <https://doi.org/10.1042/BC20070158>.
- Kim, Richard Y., James W. Pinkerton, Ama T. Essilfie, Avril A. B. Robertson, Katherine J. Baines, Alexandra C. Brown, Jemma R. Mayall, et al. 2017. « Role for NLRP3 Inflammasome-Mediated, IL-1 $\beta$ -Dependent Responses in Severe, Steroid-Resistant Asthma ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 196 (3): 283-97. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1830OC>.
- Kim, Sang-Yeob, Soyoun Kim, Dong-Jun Bae, Seung-Yoon Park, Ga-Young Lee, Gyeong-Min Park, et In-San Kim. 2017. « Coordinated balance of Rac1 and RhoA plays key roles in determining phagocytic appetite ». *PLoS ONE* 12 (4): e0174603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174603>.
- Kim, Sarah, Franz Bauernfeind, Andrea Ablasser, Gunther Hartmann, Katherine A. Fitzgerald, Eicke Latz, et Veit Hornung. 2010. « *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 Inflammasome ». *European journal of immunology* 40 (6): 1545-51. <https://doi.org/10.1002/eji.201040425>.
- Kim, Seong-Kyu, Yoon Jeong Cho, et Jung-Yoon Choe. 2018. « NLRP3 Inflammasomes and NLRP3 Inflammasome-Derived Proinflammatory Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Ankylosing Spondylitis ». *Clinica Chimica Acta*;

- International Journal of Clinical Chemistry* 486 (novembre): 269-74.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.08.022>.
- Kinoshita, Takeshi, Yetao Wang, Mizuho Hasegawa, Ryu Imamura, et Takashi Suda. 2005. « PYPAF3, a PYRIN-Containing APAF-1-like Protein, Is a Feedback Regulator of Caspase-1-Dependent Interleukin-1beta Secretion ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (23): 21720-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410057200>.
- Kitching, A. Richard, Hans-Joachim Anders, Neil Basu, Elisabeth Brouwer, Jennifer Gordon, David R. Jayne, Joyce Kullman, et al. 2020. « ANCA-Associated Vasculitis ». *Nature Reviews. Disease Primers* 6 (1): 71. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0204-y>.
- Ko, Jung Hwa, Sun-Ok Yoon, Hyun Ju Lee, et Joo Youn Oh. 2017. « Rapamycin Regulates Macrophage Activation by Inhibiting NLRP3 Inflammasome-P38 MAPK-NFkB Pathways in Autophagy- and P62-Dependent Manners ». *Oncotarget* 8 (25): 40817-31. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17256>.
- Kochaniak, Anna B., Satoshi Habuchi, Joseph J. Loparo, Debbie J. Chang, Karlene A. Cimprich, Johannes C. Walter, et Antoine M. van Oijen. 2009. « Proliferating Cell Nuclear Antigen Uses Two Distinct Modes to Move along DNA ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (26): 17700-710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008706>.
- Kono, Hajime, et Kenneth L. Rock. 2008. « How dying cells alert the immune system to danger ». *Nature reviews. Immunology* 8 (4): 279-89. <https://doi.org/10.1038/nri2215>.
- Kortmann, Jens, Sky W. Brubaker, et Denise M. Monack. 2015. « Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin ». *The Journal of Immunology* 195 (3): 815-19. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403100>.
- Kovacs, Stephen B., Changhoon Oh, Vivien I. Maltez, Benjamin D. McGlaughon, Ambika Verma, Edward A. Miao, et Youssef Aachoui. 2020. « Neutrophil Caspase-11 Is Essential to Defend against a Cytosol-Invasive Bacterium ». *Cell Reports* 32 (4): 107967. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107967>.
- Krishna, T. S., X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers, et J. Kuriyan. 1994. « Crystal Structure of the Eukaryotic DNA Polymerase Processivity Factor PCNA ». *Cell* 79 (7): 1233-43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90014-0).
- Krokan, Hans E., et Magnar Bjørås. 2013. « Base Excision Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.
- Kroker, Alice J., et John B. Bruning. 2015. « P21 Exploits Residue Tyr151 as a Tether for High-Affinity PCNA Binding ». *Biochemistry* 54 (22): 3483-93. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00241>.
- Kubota, Tetsuo, et Ryuji Koike. 2010. « Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes: Background and Therapeutics ». *Modern Rheumatology* 20 (3): 213-21. <https://doi.org/10.1007/s10165-009-0271-0>.
- Kumagai, Yutaro, et Shizuo Akira. 2010. « Identification and Functions of Pattern-Recognition Receptors ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (5): 985-92. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.058>.
- Kuriakose, Teneema, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2018. « ZBP1: Innate Sensor Regulating Cell Death and Inflammation ». *Trends in Immunology* 39 (2): 123-34. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.002>.
- Lamkanfi, Mohamed, et Vishva M. Dixit. 2012. « Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 137-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155745>.



- Lamkanfi, Mohamed, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2010. « Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 42 (6): 792-95. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.01.008>.
- Lamprecht, Peter, Anja Kerstein, Sebastian Klapa, Susanne Schinke, Christian M. Karsten, Xinhua Yu, Marc Ehlers, et al. 2018. « Pathogenetic and Clinical Aspects of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Vasculitides ». *Frontiers in Immunology* 9: 680. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00680>.
- Lang, Tali, Jacinta P. W. Lee, Kirstin Elgass, Anita A. Pinar, Michelle D. Tate, Elizabeth H. Aitken, Huapeng Fan, et al. 2018. « Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation ». *Nature Communications* 9 (juin): 2223. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04581-2>.
- LaRock, Christopher N., et Brad T. Cookson. 2013. « Burning Down the House: Cellular Actions during Pyroptosis ». *PLOS Pathogens* 9 (12): e1003793. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003793>.
- Lau, Jenny Moi-Fong, et Yvonne Dombrowski. 2018. « The Innate Immune Receptor NLRP12 Maintains Intestinal Homeostasis by Regulating Microbiome Diversity ». *Cellular & Molecular Immunology* 15 (3): 193-95. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.61>.
- Lee, Bali, Christopher Hoyle, Rose Wellens, Jack P. Green, Fatima Martin-Sanchez, Daniel M. Williams, Billie J. Matchett, et al. 2023. « Disruptions in endocytic traffic contribute to the activation of the NLRP3 inflammasome ». *Science Signaling* 16 (773): eabm7134. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abm7134>.
- Lee, Geun-Shik, Naeha Subramanian, Andrew I. Kim, Ivona Aksentijevich, Raphaela Goldbach-Mansky, David B. Sacks, Ronald N. Germain, Daniel L. Kastner, et Jae Jin Chae. 2012. « The Calcium-Sensing Receptor Regulates the NLRP3 Inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP ». *Nature* 492 (7427): 123-27. <https://doi.org/10.1038/nature11588>.
- Lemire, Paul, Susan J. Robertson, Heather Maughan, Ivan Tattoli, Catherine J. Streutker, Jaye M. Platnich, Daniel A. Muruve, Dana J. Philpott, et Stephen E. Girardin. 2017. « The NLR Protein NLRP6 Does Not Impact Gut Microbiota Composition ». *Cell Reports* 21 (13): 3653-61. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.026>.
- Lemmers, Bénédicte, Leonardo Salmena, Nicolas Bidère, Helen Su, Elzbieta Matysiak-Zablocki, Kiichi Murakami, Pamela S. Ohashi, et al. 2007. « Essential Role for Caspase-8 in Toll-like Receptors and NFkappaB Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (10): 7416-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606721200>.
- Lerner, Alana G., John-Paul Upton, P.V.K. Praveen, Rajarshi Ghosh, Yoshimi Nakagawa, Aeid Igbaria, Sarah Shen, et al. 2012. « IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death during endoplasmic reticulum stress ». *Cell metabolism* 16 (2): 250-64. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.007>.
- Levy, Maayan, Christoph A. Thaiss, David Zeevi, Lenka Dohnalová, Gili Zilberman-Schapira, Jemal Ali Mahdi, Eyal David, et al. 2015. « Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling ». *Cell* 163 (6): 1428-43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.048>.
- Li, Xuan, Sarah Thome, Xiaodan Ma, Mamta Amrute-Nayak, Alison Finigan, Lauren Kitt, Leanne Masters, et al. 2017. « MARK4 Regulates NLRP3 Positioning and Inflammasome Activation through a Microtubule-Dependent Mechanism ». *Nature Communications* 8 (juin): 15986. <https://doi.org/10.1038/ncomms15986>.

- Lin, Keng-Mean, Wei Hu, Ty Dale Troutman, Michelle Jennings, Travis Brewer, Xiaoxia Li, Sambit Nanda, Philip Cohen, James A. Thomas, et Chandrashekar Pasare. 2014. « IRAK-1 Bypasses Priming and Directly Links TLRs to Rapid NLRP3 Inflammasome Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2): 775-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320294111>.
- Liu, Fengliang, Qingli Niu, Xiuzhen Fan, Connie Liu, Jie Zhang, Zhi Wei, Wei Hou, et al. 2017. « Priming and Activation of Inflammasome by Canarypox Virus Vector ALVAC via the cGAS/IFI16–STING–Type I IFN Pathway and AIM2 Sensor ». *The Journal of Immunology* 199 (9): 3293-3305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700698>.
- Liu, Hui, Leiming You, Jun Wu, Mengfan Zhao, Rui Guo, Haili Zhang, Rina Su, Qin Mao, Di Deng, et Yu Hao. 2020. « Berberine Suppresses Influenza Virus-Triggered NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages by Inducing Mitophagy and Decreasing Mitochondrial ROS ». *Journal of Leukocyte Biology* 108 (1): 253-66. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0320-358RR>.
- Liu, Weiwei, Xia'nian Liu, Yu Li, Junjie Zhao, Zhenshan Liu, Zhuqin Hu, Ying Wang, et al. 2017. « LRRK2 Promotes the Activation of NLRC4 Inflammasome during Salmonella Typhimurium Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (10): 3051-66. <https://doi.org/10.1084/jem.20170014>.
- Liu, Xing, Zhibin Zhang, Jianbin Ruan, Youdong Pan, Venkat Giri Magupalli, Hao Wu, et Judy Lieberman. 2016a. « Inflammasome-Activated Gasdermin D Causes Pyroptosis by Forming Membrane Pores ». *Nature* 535 (7610): 153-58. <https://doi.org/10.1038/nature18629>.
- . 2016b. « Inflammasome-Activated Gasdermin D Causes Pyroptosis by Forming Membrane Pores ». *Nature* 535 (7610): 153-58. <https://doi.org/10.1038/nature18629>.
- Liu-Bryan, Ru, Peter Scott, Anya Sydlaske, David M. Rose, et Robert Terkeltaub. 2005. « Innate Immunity Conferred by Toll-like Receptors 2 and 4 and Myeloid Differentiation Factor 88 Expression Is Pivotal to Monosodium Urate Monohydrate Crystal-Induced Inflammation ». *Arthritis and Rheumatism* 52 (9): 2936-46. <https://doi.org/10.1002/art.21238>.
- Lonnemann, G., S. Endres, J. W. Van der Meer, J. G. Cannon, K. M. Koch, et C. A. Dinarello. 1989. « Differences in the Synthesis and Kinetics of Release of Interleukin 1 Alpha, Interleukin 1 Beta and Tumor Necrosis Factor from Human Mononuclear Cells ». *European Journal of Immunology* 19 (9): 1531-36. <https://doi.org/10.1002/eji.1830190903>.
- Lopez-Castejon, Gloria, Nadia M. Luheshi, Vincent Compan, Stephen High, Roger C. Whitehead, Sabine Flitsch, Aleksandr Kirov, Igor Prudovsky, Eileithya Swanton, et David Brough. 2013. « Deubiquitinases Regulate the Activity of Caspase-1 and Interleukin-1 $\beta$  Secretion via Assembly of the Inflammasome ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (4): 2721-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422238>.
- Lu, Alvin, Venkataraman Kabaleeswaran, Tianmin Fu, Venkat Giri Magupalli, et Hao Wu. 2014. « Crystal Structure of the F27G AIM2 PYD Mutant and Similarities of Its Self-Association to DED/DED Interactions ». *Journal of Molecular Biology* 426 (7): 1420-27. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.029>.
- Lu, Alvin, Yang Li, Qian Yin, Jianbin Ruan, Xiong Yu, Edward Egelman, et Hao Wu. 2015. « Plasticity in PYD Assembly Revealed by Cryo-EM Structure of the PYD Filament of AIM2 ». *Cell Discovery* 1 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.13>.

- Lu, Alvin, VenkatGiri Magupalli, Jianbin Ruan, Qian Yin, Maninjay K. Atianand, Matthijn Vos, Gunnar F. Schröder, Katherine A. Fitzgerald, Hao Wu, et Edward H. Egelman. 2014. « Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-dependent Inflammasomes ». *Cell* 156 (6): 1193-1206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008>.
- Lu, Ben, Takahisa Nakamura, Karen Inouye, Jianhua Li, Yiting Tang, Peter Lundbäck, Sergio I Valdes-Ferrer, et al. 2012. « Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release ». *Nature* 488 (7413): 670-74. <https://doi.org/10.1038/nature11290>.
- Ludlow, Louise E. A., Ricky W. Johnstone, et Christopher J. P. Clarke. 2005. « The HIN-200 Family: More than Interferon-Inducible Genes? » *Experimental Cell Research* 308 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.032>.
- Lugrin, Jérôme, et Fabio Martinon. 2018. « The AIM2 Inflammasome: Sensor of Pathogens and Cellular Perturbations ». *Immunological Reviews* 281 (1): 99-114. <https://doi.org/10.1111/imr.12618>.
- Ma, Ming, Guoyang Li, Minghui Qi, Wei Jiang, et Rongbin Zhou. 2021. « Inhibition of the Inflammasome Activity of NLRP3 Attenuates HDM-Induced Allergic Asthma ». *Frontiers in Immunology* 12: 718779. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.718779>.
- Ma, Zhe, et Blossom Damania. 2016. « The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses ». *Cell Host & Microbe* 19 (2): 150-58. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.010>.
- Madsen, P., K. Ogata, et J. E. Celis. 1987. « PCNA (Cyclin) Autoantibodies and Monoclonal Antibodies Reveal Similar Patterns of Cyclin (PCNA) Antigen Staining in Human Cultured Cells ». *Leukemia* 1 (3): 220-25.
- Mailand, Niels, Ian Gibbs-Seymour, et Simon Bekker-Jensen. 2013. « Regulation of PCNA-Protein Interactions for Genome Stability ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (5): 269-82. <https://doi.org/10.1038/nrm3562>.
- Mamantopoulos, Michail, Francesca Ronchi, Filip Van Hauwermeiren, Sara Vieira-Silva, Bahtiyar Yilmaz, Liesbet Martens, Yvan Saeyns, et al. 2017. « Nlrp6- and ASC-Dependent Inflammasomes Do Not Shape the Commensal Gut Microbiota Composition ». *Immunity* 47 (2): 339-348.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.011>.
- Man, Si Ming, Andrew Ekpenyong, Panagiotis Tourlomousis, Sarra Achouri, Eugenia Cammarota, Katherine Hughes, Alessandro Rizzo, et al. 2014. « Actin Polymerization as a Key Innate Immune Effector Mechanism to Control Salmonella Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (49): 17588-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419925111>.
- Man, Si Ming, Rajendra Karki, Miwa Sasai, David E. Place, Sannula Kesavardhana, Jamshid Temirov, Sharon Frase, et al. 2016. « IRGB10 liberates bacterial ligands for sensing by the AIM2 and caspase-11–NLRP3 inflammasomes ». *Cell* 167 (2): 382-396.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.012>.
- Mangan, Matthew S. J., Edward J. Olhava, William R. Roush, H. Martin Seidel, Gary D. Glick, et Eicke Latz. 2018. « Targeting the NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Diseases ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 17 (8): 588-606. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97>.
- Mankan, Arun K., Therese Dau, Dieter Jenne, et Veit Hornung. 2012. « The NLRP3/ASC/Caspase-1 Axis Regulates IL-1 $\beta$  Processing in Neutrophils ». *European Journal of Immunology* 42 (3): 710-15. <https://doi.org/10.1002/eji.201141921>.
- Manna, Saikat, William J. Howitz, Nathan J. Oldenhuis, Alexander C. Eldredge, Jingjing Shen, Fnu Naorem Nihesh, Melissa B. Lodoen, Zhibin Guan, et Aaron P. Esser-Kahn. 2018.

- « Immunomodulation of the NLRP3 Inflammasome through Structure-Based Activator Design and Functional Regulation via Lysosomal Rupture ». *ACS Central Science* 4 (8): 982-95. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00218>.
- Mansfield, Elizabeth, Jae Jin Chae, Hirsh D. Komarow, Tilmann M. Brotz, David M. Frucht, Ivona Aksentijevich, et Daniel L. Kastner. 2001. « The Familial Mediterranean Fever Protein, Pyrin, Associates with Microtubules and Colocalizes with Actin Filaments ». *Blood* 98 (3): 851-59. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.851>.
- Manukyan, Gayane, et Rustam Aminov. 2016. « Update on Pyrin Functions and Mechanisms of Familial Mediterranean Fever ». *Frontiers in Microbiology* 7: 456. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00456>.
- Mao, Kairui, Shuzhen Chen, Mingkuan Chen, Yonglei Ma, Yan Wang, Bo Huang, Zhengyu He, et al. 2013. « Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock ». *Cell Research* 23 (2): 201-12. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.6>.
- Mariathasan, Sanjeev, Kim Newton, Denise M. Monack, Domagoj Vucic, Dorothy M. French, Wyne P. Lee, Meron Roose-Girma, Sharon Erickson, et Vishva M. Dixit. 2004. « Differential Activation of the Inflammasome by Caspase-1 Adaptors ASC and Ipaf ». *Nature* 430 (6996): 213-18. <https://doi.org/10.1038/nature02664>.
- Mariathasan, Sanjeev, David S. Weiss, Kim Newton, Jacqueline McBride, Karen O'Rourke, Meron Roose-Girma, Wyne P. Lee, Yvette Weinrauch, Denise M. Monack, et Vishva M. Dixit. 2006. « Cryopyrin Activates the Inflammasome in Response to Toxins and ATP ». *Nature* 440 (7081): 228-32. <https://doi.org/10.1038/nature04515>.
- Martin, Clémence, Delphine Ohayon, Manal Alkan, Julie Mocek, Magali Pederzoli-Ribeil, Céline Candalh, Guiti Thevenot, et al. 2016. « Neutrophil-Expressed P21/Waf1 Favors Inflammation Resolution in Pseudomonas Aeruginosa Infection ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54 (5): 740-50. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0047OC>.
- Martinson, Fabio, Kimberly Burns, et Jürg Tschopp. 2002. « The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-Beta ». *Molecular Cell* 10 (2): 417-26. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00599-3).
- Martinson, Fabio, Annick Mayor, et Jürg Tschopp. 2009. « The Inflammasomes: Guardians of the Body ». *Annual Review of Immunology* 27: 229-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>.
- Martinson, Fabio, Virginie Pétrilli, Annick Mayor, Aubry Tardivel, et Jürg Tschopp. 2006. « Gout-Associated Uric Acid Crystals Activate the NALP3 Inflammasome ». *Nature* 440 (7081): 237-41. <https://doi.org/10.1038/nature04516>.
- Martinson, Fabio, et Jürg Tschopp. 2005. « NLRs Join TLRs as Innate Sensors of Pathogens ». *Trends in Immunology* 26 (8): 447-54. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.06.004>.
- Marzano, A. V., S. Tavecchio, M. Venturini, R. Sala, P. Calzavara-Pinton, et M. Gattorno. 2015. « Urticarial Vasculitis and Urticarial Autoinflammatory Syndromes ». *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia: Organo Ufficiale, Societa Italiana Di Dermatologia E Sifilografia* 150 (1): 41-50.
- Masters, Seth L., Aisling Dunne, Shoba L. Subramanian, Rebecca L. Hull, Gillian M. Tannahill, Fiona A. Sharp, Christine Becker, et al. 2010. « Activation of the NLRP3 Inflammasome by Islet Amyloid Polypeptide Provides a Mechanism for Enhanced IL-1 $\beta$  in Type 2 Diabetes ». *Nature Immunology* 11 (10): 897-904. <https://doi.org/10.1038/ni.1935>.

- Mathews, Michael B., Robert M. Bernstein, B. Robert Franza, et James I. Garrels. 1984. « Identity of the Proliferating Cell Nuclear Antigen and Cyclin ». *Nature* 309 (5966): 374-76. <https://doi.org/10.1038/309374a0>.
- Mathur, Anukriti, Shouya Feng, Jenni A. Hayward, Chinh Ngo, Daniel Fox, Ines I. Atmosukarto, Jason D. Price, et al. 2019. « A multi-component toxin from *Bacillus cereus* incites inflammation and shapes host outcome via the NLRP3 inflammasome ». *Nature microbiology* 4 (2): 362-74. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0318-0>.
- Matunis, Michael J. 2002. « On the Road to Repair: PCNA Encounters SUMO and Ubiquitin Modifications ». *Molecular Cell* 10 (3): 441-42. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00653-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00653-6).
- Matzinger, P. 1994. « Tolerance, danger, and the extended family ». *Annual review of immunology* 12: 991-1045. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>.
- Matzinger, Polly. 2002. « The Danger Model: A Renewed Sense of Self ». *Science* 296 (5566): 301-5. <https://doi.org/10.1126/science.1071059>.
- Maury, C. P., E. Salo, et P. Pelkonen. 1988. « Circulating Interleukin-1 Beta in Patients with Kawasaki Disease ». *The New England Journal of Medicine* 319 (25): 1670-71. <https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192515>.
- Mayor, Annick, Fabio Martinon, Thibaut De Smedt, Virginie Pétrilli, et Jürg Tschopp. 2007. « A Crucial Function of SGT1 and HSP90 in Inflammasome Activity Links Mammalian and Plant Innate Immune Responses ». *Nature Immunology* 8 (5): 497-503. <https://doi.org/10.1038/ni1459>.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. « Origin and Physiological Roles of Inflammation ». *Nature* 454 (7203): 428-35. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.
- Mehto, Subhash, Swati Chauhan, Kautilya Kumar Jena, Nishant Ranjan Chauhan, Parej Nath, Rinku Sahu, Kollori Dhar, Saroj Kumar Das, et Santosh Chauhan. 2019. « IRGM restrains NLRP3 inflammasome activation by mediating its SQSTM1/p62-dependent selective autophagy ». *Autophagy* 15 (9): 1645-47. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1628544>.
- Mehto, Subhash, Kautilya Kumar Jena, Parej Nath, Swati Chauhan, Srinivasa Prasad Kolapalli, Saroj Kumar Das, Pradyumna Kumar Sahoo, Ashish Jain, Gregory A. Taylor, et Santosh Chauhan. 2019. « The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy ». *Molecular Cell* 73 (3): 429-445.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.018>.
- Menu, P, A Mayor, R Zhou, A Tardivel, H Ichijo, K Mori, et J Tschopp. 2012. « ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway ». *Cell Death & Disease* 3 (1): e261. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.132>.
- Messaed, Christiane, Elie Akoury, Ugljesa Djuric, Jibin Zeng, Maya Saleh, Lucy Gilbert, Muhieddine Seoud, Salman Qureshi, et Rima Slim. 2011. « NLRP7, a Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptor Protein, Is Required for Normal Cytokine Secretion and Co-Localizes with Golgi and the Microtubule-Organizing Center ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (50): 43313-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306191>.
- Meunier, Etienne, Mathias S. Dick, Roland F. Dreier, Nura Schürmann, Daniela Kenzelmann Broz, Søren Warming, Merone Roose-Girma, et al. 2014. « Caspase-11 Activation Requires Lysis of Pathogen-Containing Vacuoles by IFN-Induced GTPases ». *Nature* 509 (7500): 366-70. <https://doi.org/10.1038/nature13157>.

- Miao, Edward A., Robert K. Ernst, Monica Dors, Dat P. Mao, et Alan Aderem. 2008. « Pseudomonas Aeruginosa Activates Caspase 1 through Ipaf ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7): 2562-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712183105>.
- Miao, Edward A., Irina A. Leaf, Piper M. Treuting, Dat P. Mao, Monica Dors, Anasuya Sarkar, Sarah E. Warren, Mark D. Wewers, et Alan Aderem. 2010. « Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria ». *Nature immunology* 11 (12): 1136-42. <https://doi.org/10.1038/ni.1960>.
- Misawa, Takuma, Michihiro Takahama, Tatsuya Kozaki, Hanna Lee, Jian Zou, Tatsuya Saitoh, et Shizuo Akira. 2013. « Microtubule-Driven Spatial Arrangement of Mitochondria Promotes Activation of the NLRP3 Inflammasome ». *Nature Immunology* 14 (5): 454-60. <https://doi.org/10.1038/ni.2550>.
- Mishra, Bibhuti B., Vijay A. K. Rathinam, Gregory W. Martens, Amanda J. Martinot, Hardy Kornfeld, Katherine A. Fitzgerald, et Christopher M. Sasseti. 2013. « Nitric oxide controls tuberculosis immunopathology by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  processing ». *Nature immunology* 14 (1): 52-60. <https://doi.org/10.1038/ni.2474>.
- Mitroulis, Ioannis, Panagiotis Skendros, et Konstantinos Ritis. 2010. « Targeting IL-1beta in Disease; the Expanding Role of NLRP3 Inflammasome ». *European Journal of Internal Medicine* 21 (3): 157-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2010.03.005>.
- Miyachi, K., M. J. Fritzler, et E. M. Tan. 1978. « Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 121 (6): 2228-34.
- Mogensen, Trine H. 2009. « Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses ». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2): 240-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>.
- Moldovan, George-Lucian, Donniphath Dejsuphong, Mark I. R. Petalcorin, Kay Hofmann, Shunichi Takeda, Simon J. Boulton, et Alan D. D'Andrea. 2012. « Inhibition of homologous recombination by the PCNA-interacting protein PARI ». *Molecular Cell* 45 (1): 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.010>.
- Moldovan, George-Lucian, Boris Pfander, et Stefan Jentsch. 2007. « PCNA, the Maestro of the Replication Fork ». *Cell* 129 (4): 665-79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>.
- Moltke, Jakob von, Norver J. Trinidad, Mahtab Moayeri, Alexander F. Kintzer, Samantha B. Wang, Nico van Rooijen, Charles R. Brown, et al. 2012. « Rapid Induction of Inflammatory Lipid Mediators by the Inflammasome in Vivo ». *Nature* 490 (7418): 107-11. <https://doi.org/10.1038/nature11351>.
- Monteiro, Rosário, et Isabel Azevedo. 2010. « Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome ». *Mediators of Inflammation* 2010: 289645. <https://doi.org/10.1155/2010/289645>.
- Morrone, Seamus, Mariusz Matyszewski, Xiong Yu, Michael Delannoy, Edward Egelman, et Jungsan Sohn. 2015. « Assembly-driven activation of the AIM2 foreign-dsDNA sensor provides a polymerization template for downstream ASC ». *Nature communications* 6 (juillet): 7827. <https://doi.org/10.1038/ncomms8827>.
- Mortimer, Leanne, France Moreau, Justin A. MacDonald, et Kris Chadee. 2016. « NLRP3 Inflammasome Inhibition Is Disrupted in a Group of Auto-Inflammatory Disease CAPS Mutations ». *Nature Immunology* 17 (10): 1176-86. <https://doi.org/10.1038/ni.3538>.
- Mouasni, Sara, Virginie Gonzalez, Alain Schmitt, Evangeline Bennana, François Guillonéau, Sylvie Mistou, Jérôme Avouac, et al. 2019. « The Classical NLRP3 Inflammasome

- Controls FADD Unconventional Secretion through Microvesicle Shedding ». *Cell Death & Disease* 10 (3): 190. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1412-9>.
- Müller, Rebekka, Kristine Misund, Toril Holien, Siri Bachke, Karin M. Gilljam, Thea K. Våtsveen, Torstein B. Rø, Emanuele Bellacchio, Anders Sundan, et Marit Otterlei. 2013. « Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Protein Interactions Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells ». *PLoS One* 8 (7): e70430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070430>.
- Muñoz-Planillo, Raúl, Peter Kuffa, Giovanni Martínez-Colón, Brenna L. Smith, Thekkelnaycke M. Rajendiran, et Gabriel Núñez. 2013. « K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter ». *Immunity* 38 (6): 1142-53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>.
- Münzer, Patrick, Roberto Negro, Shoichi Fukui, Lucas di Meglio, Karen Aymonnier, Long Chu, Deya Cherpokova, et al. 2021. « NLRP3 Inflammasome Assembly in Neutrophils Is Supported by PAD4 and Promotes NETosis Under Sterile Conditions ». *Frontiers in Immunology* 12 (mai): 683803. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683803>.
- Murakami, Tomohiko, Johan Ockinger, Jiujiu Yu, Vanessa Byles, Aisleen McColl, Aldebaran M. Hofer, et Tiffany Horng. 2012. « Critical Role for Calcium Mobilization in Activation of the NLRP3 Inflammasome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (28): 11282-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109>.
- Murao, Atsushi, Monowar Aziz, Haichao Wang, Max Brenner, et Ping Wang. 2021. « Release mechanisms of major DAMPs ». *Apoptosis* 26 (3): 152-62. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>.
- Murdoch, Sharlene, Ugljesa Djuric, Batool Mazhar, Muheiddine Seoud, Rabia Khan, Rork Kuick, Rashmi Bagga, et al. 2006. « Mutations in NALP7 Cause Recurrent Hydatidiform Moles and Reproductive Wastage in Humans ». *Nature Genetics* 38 (3): 300-302. <https://doi.org/10.1038/ng1740>.
- Nakahira, Kiichi, Jeffrey Adam Haspel, Vijay AK Rathinam, Seon-Jin Lee, Tamas Dolinay, Hilaire C Lam, Joshua A Englert, et al. 2011. « Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release ». *Nature immunology* 12 (3): 222-30. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- Naryzhny, S. N. 2008. « Proliferating Cell Nuclear Antigen: A Proteomics View ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (23): 3789-3808. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8305-x>.
- Naryzhny, Stanislav N., et Hoyun Lee. 2004. « The Post-Translational Modifications of Proliferating Cell Nuclear Antigen: Acetylation, Not Phosphorylation, Plays an Important Role in the Regulation of Its Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 20194-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312850200>.
- Nathan, Carl. 2002. « Points of Control in Inflammation ». *Nature* 420 (6917): 846-52. <https://doi.org/10.1038/nature01320>.
- Netea, Mihai G., Leo A.B. Joosten, Eicke Latz, Kingston H.G. Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G. Stunnenberg, Luke A.J. O'Neill, et Ramnik J. Xavier. 2016. « Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease ». *Science (New York, N.Y.)* 352 (6284): aaf1098. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>.
- Netea, Mihai G., Claudia A. Nold-Petry, Marcel F. Nold, Leo A. B. Joosten, Bastian Opitz, Jonathan H. M. van der Meer, Frank L. van de Veerdonk, et al. 2009. « Differential Requirement for the Activation of the Inflammasome for Processing and Release of IL-

- 1beta in Monocytes and Macrophages ». *Blood* 113 (10): 2324-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146720>.
- Ninomiya-Tsuji, Jun, Taisuke Kajino, Koichiro Ono, Toshihiko Ohtomo, Masahiko Matsumoto, Masashi Shiina, Masahiko Mihara, Masayuki Tsuchiya, et Kunihiro Matsumoto. 2003. « A Resorcylic Acid Lactone, 5Z-7-Oxozeaenol, Prevents Inflammation by Inhibiting the Catalytic Activity of TAK1 MAPK Kinase Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (20): 18485-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207453200>.
- Normand, Sylvain, Anne Delanoye-Crespin, Aude Bressenot, Ludovic Huot, Teddy Grandjean, Laurent Peyrin-Biroulet, Yves Lemoine, David Hot, et Mathias Chamailard. 2011. « Nod-like Receptor Pyrin Domain-Containing Protein 6 (NLRP6) Controls Epithelial Self-Renewal and Colorectal Carcinogenesis upon Injury ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23): 9601-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100981108>.
- Nurmi, Katariina, Ilona Kareinen, Juhani Virkanen, Kristiina Rajamäki, Vesa-Petteri Kouri, Kirsi Vaali, Anna-Liisa Levonen, et al. 2017. « Hemin and Cobalt Protoporphyrin Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation by Enhancing Autophagy: A Novel Mechanism of Inflammasome Regulation ». *Journal of Innate Immunity* 9 (1): 65-82. <https://doi.org/10.1159/000448894>.
- Ohayon, Delphine, Alessia De Chiara, Nicolas Chapuis, Céline Candalh, Julie Mocek, Jean-Antoine Ribeil, Lamya Haddaoui, et al. 2016. « Cytoplasmic Proliferating Cell Nuclear Antigen Connects Glycolysis and Cell Survival in Acute Myeloid Leukemia ». *Scientific Reports* 6 (octobre): 35561. <https://doi.org/10.1038/srep35561>.
- Ohayon, Delphine, Alessia De Chiara, Pham My-Chan Dang, Nathalie Thieblemont, Simon Chatfield, Viviana Marzaioli, Sabrina Sofia Burgener, et al. 2019. « Cytosolic PCNA Interacts with P47phox and Controls NADPH Oxidase NOX2 Activation in Neutrophils ». *The Journal of Experimental Medicine* 216 (11): 2669-87. <https://doi.org/10.1084/jem.20180371>.
- Olaisen, Camilla, Rebekka Müller, Aina Nedal, et Marit Otterlei. 2015. « PCNA-Interacting Peptides Reduce Akt Phosphorylation and TLR-Mediated Cytokine Secretion Suggesting a Role of PCNA in Cellular Signaling ». *Cellular Signalling* 27 (7): 1478-87. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.009>.
- Oppenheim, Joost J., et De Yang. 2005. « Alarmins: Chemotactic Activators of Immune Responses ». *Current Opinion in Immunology* 17 (4): 359-65. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.002>.
- Orlowski, Gregory M., Jeff D. Colbert, Shruti Sharma, Matthew Bogyo, Stephanie A. Robertson, et Kenneth L. Rock. 2015. « Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 $\beta$  Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 $\beta$  Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (4): 1685. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500509>.
- Ortega, Janice, Jessie Y. Li, Sanghee Lee, Dan Tong, Liya Gu, et Guo-Min Li. 2015. « Phosphorylation of PCNA by EGFR inhibits mismatch repair and promotes misincorporation during DNA synthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (18): 5667-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417711112>.
- Paget, Christophe, Emilie Doz-Deblauwe, Nathalie Winter, et Benoit Briard. 2022. « Specific NLRP3 Inflammasome Assembling and Regulation in Neutrophils: Relevance in Inflammatory and Infectious Diseases ». *Cells* 11 (7): 1188. <https://doi.org/10.3390/cells11071188>.



- Palazón-Riquelme, Pablo, Jonathan D Worboys, Jack Green, Ana Valera, Fatima Martín-Sánchez, Carolina Pellegrini, David Brough, et Gloria López-Castejón. 2018. « USP7 and USP47 deubiquitinases regulate NLRP3 inflammasome activation ». *EMBO Reports* 19 (10): e44766. <https://doi.org/10.15252/embr.201744766>.
- Pandian, Nagakannan, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2022. « PANoptosis: A Unique Innate Immune Inflammatory Cell Death Modality ». *The Journal of Immunology* 209 (9): 1625-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200508>.
- Papin, S., S. Cuenin, L. Agostini, F. Martinon, S. Werner, H.-D. Beer, C. Grütter, M. Grütter, et J. Tschopp. 2007. « The SPRY Domain of Pypin, Mutated in Familial Mediterranean Fever Patients, Interacts with Inflammasome Components and Inhibits proIL-1 $\beta$  Processing ». *Cell Death & Differentiation* 14 (8): 1457-66. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402142>.
- Park, Sangjun, Christine Juliana, Sujeong Hong, Pinaki Datta, Inhwa Hwang, Teresa Fernandes-Alnemri, Je-Wook Yu, et Emad S. Alnemri. 2013. « The mitochondrial anti-viral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity ». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (8): 10.4049/jimmunol.1301170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301170>.
- Paudel, Sagar, Laxman Ghimire, Liliang Jin, Pankaj Baral, Shanshan Cai, et Samithamby Jeyaseelan. 2019. « NLR4 Suppresses IL-17A-Mediated Neutrophil-Dependent Host Defense through Upregulation of IL-18 and Induction of Necroptosis during Gram-Positive Pneumonia ». *Mucosal Immunology* 12 (1): 247-57. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0088-2>.
- Pelegrin, Pablo, et Annmarie Surprenant. 2006. « Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor ». *The EMBO Journal* 25 (21): 5071-82. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>.
- Peng, Bo, Janice Ortega, Liya Gu, Zhijie Chang, et Guo-Min Li. 2019. « Phosphorylation of proliferating cell nuclear antigen promotes cancer progression by activating the ATM/Akt/GSK3 $\beta$ /Snail signaling pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (17): 7037-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007897>.
- Perregaux, D., et C. A. Gabel. 1994. « Interleukin-1 Beta Maturation and Release in Response to ATP and Nigericin. Evidence That Potassium Depletion Mediated by These Agents Is a Necessary and Common Feature of Their Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (21): 15195-203.
- Pétrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, et J. Tschopp. 2007. « Activation of the NALP3 Inflammasome Is Triggered by Low Intracellular Potassium Concentration ». *Cell Death & Differentiation* 14 (9): 1583-89. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195>.
- Pfander, Boris, George-Lucian Moldovan, Meik Sacher, Carsten Hoege, et Stefan Jentsch. 2005. « SUMO-Modified PCNA Recruits Srs2 to Prevent Recombination during S Phase ». *Nature* 436 (7049): 428-33. <https://doi.org/10.1038/nature03665>.
- Piccini, Alessandra, Sonia Carta, Sara Tassi, Denise Lasiglié, Gianluca Fossati, et Anna Rubartelli. 2008. « ATP Is Released by Monocytes Stimulated with Pathogen-Sensing Receptor Ligands and Induces IL-1 $\beta$  and IL-18 Secretion in an Autocrine Way ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (23): 8067-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709684105>.
- Piippo, Niina, Eveliina Korhonen, Maria Hytti, Heli Skottman, Kati Kinnunen, Natasha Josifovska, Goran Petrovski, Kai Kaarniranta, et Anu Kauppinen. 2018. « Hsp90

- inhibition as a means to inhibit activation of the NLRP3 inflammasome ». *Scientific Reports* 8 (avril): 6720. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25123-2>.
- Pilla, Danielle M., Jon A. Hagar, Arun K. Haldar, Ashley K. Mason, Daniel Degrandi, Klaus Pfeffer, Robert K. Ernst, Masahiro Yamamoto, Edward A. Miao, et Jörn Coers. 2014. « Guanylate Binding Proteins Promote Caspase-11-Dependent Pyroptosis in Response to Cytoplasmic LPS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (16): 6046-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321700111>.
- Place, David E., Parimal Samir, Rajendra Karki, Benoit Briard, Peter Vogel, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2018. « ASK Family Kinases Are Required for Optimal NLRP3 Inflammasome Priming ». *The American Journal of Pathology* 188 (4): 1021-30. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.12.006>.
- Prelich, G., C. K. Tan, M. Kostura, M. B. Mathews, A. G. So, K. M. Downey, et B. Stillman. 1987. « Functional Identity of Proliferating Cell Nuclear Antigen and a DNA Polymerase-Delta Auxiliary Protein ». *Nature* 326 (6112): 517-20. <https://doi.org/10.1038/326517a0>.
- Prestel, Andreas, Nanna Wichmann, Joao M. Martins, Riccardo Marabini, Noah Kassem, Sebastian S. Broendum, Marit Otterlei, et al. 2019. « The PCNA interaction motifs revisited: thinking outside the PIP-box ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (24): 4923-43. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03150-0>.
- Prosperi, E., A. I. Scovassi, L. A. Stivala, et L. Bianchi. 1994. « Proliferating Cell Nuclear Antigen Bound to DNA Synthesis Sites: Phosphorylation and Association with Cyclin D1 and Cyclin A ». *Experimental Cell Research* 215 (2): 257-62. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1341>.
- Punchihewa, Chandanamali, Akira Inoue, Asami Hishiki, Yoshihiro Fujikawa, Michele Connelly, Benjamin Evison, Youming Shao, et al. 2012. « Identification of Small Molecule Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Inhibitor That Disrupts Interactions with PIP-box Proteins and Inhibits DNA Replication ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (17): 14289-300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353201>.
- Py, Bénédicte F., Mi-Sung Kim, Helin Vakifahmetoglu-Norberg, et Junying Yuan. 2013. « Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity ». *Molecular Cell* 49 (2): 331-38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.009>.
- Qu, Yan, Shahram Misaghi, Anita Izrael-Tomasevic, Kim Newton, Laurie L. Gilmour, Mohamed Lamkanfi, Salina Louie, et al. 2012. « Phosphorylation of NLRC4 Is Critical for Inflammasome Activation ». *Nature* 490 (7421): 539-42. <https://doi.org/10.1038/nature11429>.
- Radian, Alexander D., Lucia de Almeida, Andrea Dorfleutner, et Christian Stehlik. 2013. « NLRP7 and related inflammasome activating pattern recognition receptors and their function in host defense and disease ». *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 15 (0): 630-39. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.04.001>.
- Rajabi, Saba, Adel Spotin, Mahmoud Mahami-Oskouei, Behzad Baradaran, Farhad Babaie, Yaghob Azadi, Paria Alizadeh, Reza Valadan, Aleksandra Barac, et Ehsan Ahmadpour. 2022. « Toxoplasma Gondii Activates NLRP12 Inflammasome Pathway in the BALB/c Murine Model ». *Acta Tropica* 225 (janvier): 106202. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106202>.
- Rao, Zebing, Xin Chen, Junxian Wu, Mengjun Xiao, Jing Zhang, Binghao Wang, Lei Fang, et al. 2019. « Vitamin D Receptor Inhibits NLRP3 Activation by Impeding Its BRCC3-Mediated Deubiquitination ». *Frontiers in Immunology* 10 (décembre): 2783. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02783>.

- Rathinam, Vijay A. K., Zhaozhao Jiang, Stephen N. Waggoner, Shruti Sharma, Leah E. Cole, Lisa Waggoner, Sivapriya Kailasan Vanaja, et al. 2010. « The AIM2 Inflammasome Is Essential for Host Defense against Cytosolic Bacteria and DNA Viruses ». *Nature Immunology* 11 (5): 395-402. <https://doi.org/10.1038/ni.1864>.
- Ratner, Dmitry, M. Pontus A. Orning, Megan K. Proulx, Donghai Wang, Mikhail A. Gavrillin, Mark D. Wewers, Emad S. Alnemri, et al. 2016. « The Yersinia Pestis Effector YopM Inhibits Pyrin Inflammasome Activation ». *PLoS Pathogens* 12 (12): e1006035. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006035>.
- Renaudin, Felix, Lucie Orliaguet, Florence Castelli, François Fenaille, Aurelie Prignon, Fawaz Alzaid, Christele Combes, et al. 2020. « Gout and Pseudo-Gout-Related Crystals Promote GLUT1-Mediated Glycolysis That Governs NLRP3 and Interleukin-1 $\beta$  Activation on Macrophages ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 79 (11): 1506-14. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217342>.
- Reyes Ruiz, Valeria M., Jasmine Ramirez, Nawar Naseer, Nicole M. Palacio, Ingharan J. Siddarthan, Brian M. Yan, Mark A. Boyer, Daniel A. Pensinger, John-Demian Sauer, et Sunny Shin. 2017. « Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (50): 13242-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710433114>.
- Richens, Tiffany R., Derek J. Linderman, Sarah A. Horstmann, Cherie Lambert, Yi-Qun Xiao, Robert L. Keith, Darren M. Boé, et al. 2009. « Cigarette Smoke Impairs Clearance of Apoptotic Cells through Oxidant-Dependent Activation of RhoA ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179 (11): 1011-21. <https://doi.org/10.1164/rccm.200807-1148OC>.
- Robinson, Kim S., Daniel Eng Thiam Teo, Kai Sen Tan, Gee Ann Toh, Hsiao Hui Ong, Chrissie Kaishi Lim, Kenneth Lay, et al. 2020. « Enteroviral 3C Protease Activates the Human NLRP1 Inflammasome in Airway Epithelia ». *Science (New York, N.Y.)* 370 (6521): eaay2002. <https://doi.org/10.1126/science.aay2002>.
- Rossol, Manuela, Matthias Pierer, Nora Raulien, Dagmar Quandt, Undine Meusch, Kathrin Rothe, Kristin Schubert, et al. 2012. « Extracellular Ca<sup>2+</sup> Is a Danger Signal Activating the NLRP3 Inflammasome through G Protein-Coupled Calcium Sensing Receptors ». *Nature Communications* 3: 1329. <https://doi.org/10.1038/ncomms2339>.
- Ru, Heng, Xiangmin Ni, Lixia Zhao, Christopher Crowley, Wei Ding, Li-Wei Hung, Neil Shaw, Genhong Cheng, et Zhi-Jie Liu. 2013. « Structural Basis for Termination of AIM2-Mediated Signaling by P202 ». *Cell Research* 23 (6): 855-58. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.52>.
- Rühl, Sebastian, et Petr Broz. 2015. « Caspase-11 Activates a Canonical NLRP3 Inflammasome by Promoting K(+) Efflux ». *European Journal of Immunology* 45 (10): 2927-36. <https://doi.org/10.1002/eji.201545772>.
- Rühl, Sebastian, Kateryna Shkarina, Benjamin Demarco, Rosalie Heilig, José Carlos Santos, et Petr Broz. 2018. « ESCRT-Dependent Membrane Repair Negatively Regulates Pyroptosis Downstream of GSDMD Activation ». *Science (New York, N.Y.)* 362 (6417): 956-60. <https://doi.org/10.1126/science.aar7607>.
- Sakurai, Shigeru, Ken Kitano, Hiroto Yamaguchi, Keisuke Hamada, Kengo Okada, Kotaro Fukuda, Makiyo Uchida, Eiko Ohtsuka, Hiroshi Morioka, et Toshio Hakoshima. 2005. « Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA ». *The EMBO Journal* 24 (4): 683-93. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600519>.

- Samir, Parimal, Sannula Kesavardhana, Deanna M. Patmore, Sebastien Gingras, R. K. Subbarao Malireddi, Rajendra Karki, Clifford S. Guy, et al. 2019. « DDX3X Acts as a Live-or-Die Checkpoint in Stressed Cells by Regulating NLRP3 Inflammasome ». *Nature* 573 (7775): 590-94. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1551-2>.
- Sanada, Fumihito, Yoshiaki Taniyama, Jun Muratsu, Rei Otsu, Hideo Shimizu, Hiromi Rakugi, et Ryuichi Morishita. 2018. « Source of Chronic Inflammation in Aging ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5 (février): 12. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00012>.
- Sandstrom, Andrew, Patrick S. Mitchell, Lisa Goers, Edward W. Mu, Cammie F. Lesser, et Russell E. Vance. 2019. « Functional degradation: A mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes ». *Science* 364 (6435): eaau1330. <https://doi.org/10.1126/science.aau1330>.
- Sano, Soichi, Kosei Oshima, Ying Wang, Susan MacLauchlan, Yasufumi Katanasaka, Miho Sano, María A. Zuriaga, et al. 2018. « Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 $\beta$ /NLRP3 Inflammasome ». *Journal of the American College of Cardiology* 71 (8): 875-86. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.037>.
- Santoni, Karin, David Pericat, Leana Gorse, Julien Buyck, Miriam Pinilla, Laure Prouvensier, Salimata Bagayoko, et al. 2022. « Caspase-1-Driven Neutrophil Pyroptosis and Its Role in Host Susceptibility to *Pseudomonas Aeruginosa* ». *PLoS Pathogens* 18 (7): e1010305. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010305>.
- Santos, José Carlos, Mathias S Dick, Brice Lagrange, Daniel Degrandi, Klaus Pfeffer, Masahiro Yamamoto, Etienne Meunier, Pawel Pelczar, Thomas Henry, et Petr Broz. 2018. « LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation ». *The EMBO Journal* 37 (6): e98089. <https://doi.org/10.15252/embj.201798089>.
- Sarhan, Joseph, Beiyun C. Liu, Hayley I. Muendlein, Peng Li, Rachael Nilson, Amy Y. Tang, Anthony Rongvaux, et al. 2018. « Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (46): E10888-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809548115>.
- Sauer, John-Demian, Sabine Pereyre, Kristina A. Archer, Thomas P. Burke, Bill Hanson, Peter Lauer, et Daniel A. Portnoy. 2011. « *Listeria Monocytogenes* Engineered to Activate the Nlrp4 Inflammasome Are Severely Attenuated and Are Poor Inducers of Protective Immunity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (30): 12419-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019041108>.
- Schauvliege, Reinout, Jill Vanrobaeys, Peter Schotte, et Rudi Beyaert. 2002. « Caspase-11 Gene Expression in Response to Lipopolysaccharide and Interferon-Gamma Requires Nuclear Factor-Kappa B and Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41624-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207852200>.
- Schett, Georg, Jean-Michel Dayer, et Bernhard Manger. 2016. « Interleukin-1 Function and Role in Rheumatic Disease ». *Nature Reviews Rheumatology* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.166>.
- Schlesinger, Naomi, Rieke E. Alten, Thomas Bardin, H. Ralph Schumacher, Mark Bloch, Alberto Gimona, Gerhard Krammer, Valda Murphy, Dominik Richard, et Alexander K. So. 2012. « Canakinumab for Acute Gouty Arthritis in Patients with Limited Treatment Options: Results from Two Randomised, Multicentre, Active-Controlled, Double-Blind Trials and

- Their Initial Extensions ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 71 (11): 1839-48. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200908>.
- Schlesinger, Naomi, Marc De Meulemeester, Andrey Pikhlak, A Eftal Yücel, Dominik Richard, Valda Murphy, Udayasankar Arulmani, Peter Sallstig, et Alexander So. 2011. « Canakinumab relieves symptoms of acute flares and improves health-related quality of life in patients with difficult-to-treat Gouty Arthritis by suppressing inflammation: results of a randomized, dose-ranging study ». *Arthritis Research & Therapy* 13 (2): R53. <https://doi.org/10.1186/ar3297>.
- Schmid-Burgk, Jonathan L., Dhruv Chauhan, Tobias Schmidt, Thomas S. Ebert, Julia Reinhardt, Elmar Endl, et Veit Hornung. 2016. « A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (1): 103-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.700492>.
- Schnappauf, Oskar, Jae Jin Chae, Daniel L. Kastner, et Ivona Aksentijevich. 2019. « The Pyrin Inflammasome in Health and Disease ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01745>.
- Schorn, Christine, Benjamin Frey, Kirsten Lauber, Christina Janko, Moritz Strysio, Hildegard Keppeler, Udo S. Gaipf, et al. 2011. « Sodium Overload and Water Influx Activate the NALP3 Inflammasome ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (1): 35-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139048>.
- Schreiber, Adrian, Friedrich C. Luft, et Ralph Kettritz. 2004. « Membrane Proteinase 3 Expression and ANCA-Induced Neutrophil Activation ». *Kidney International* 65 (6): 2172-83. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00640.x>.
- . 2015. « Phagocyte NADPH Oxidase Restrains the Inflammasome in ANCA-Induced GN ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 26 (2): 411-24. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013111177>.
- Schumann, R. R., C. Belka, D. Reuter, N. Lamping, C. J. Kirschning, J. R. Weber, et D. Pfeil. 1998. « Lipopolysaccharide Activates Caspase-1 (Interleukin-1-Converting Enzyme) in Cultured Monocytic and Endothelial Cells ». *Blood* 91 (2): 577-84.
- Sebesta, Marek, Peter Burkovics, Szilvia Juhasz, Sufang Zhang, Judit E. Szabo, Marietta Y.W.T. Lee, Lajos Haracska, et Lumir Krejci. 2013. « Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans ». *DNA Repair* 12 (9): 691-98. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.05.001>.
- Sebesta, Marek, Christopher D. O. Cooper, Antonio Ariza, Christopher J. Carnie, et Dragana Ahel. 2017. « Structural insights into the function of ZRANB3 in replication stress response ». *Nature Communications* 8 (juin): 15847. <https://doi.org/10.1038/ncomms15847>.
- Sefik, Esen, Rihao Qu, Caroline Junqueira, Eleanna Kaffe, Haris Mirza, Jun Zhao, J. Richard Brewer, et al. 2022. « Inflammasome Activation in Infected Macrophages Drives COVID-19 Pathology ». *Nature* 606 (7914): 585-93. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04802-1>.
- Segal, Anthony W. 2005. « How Neutrophils Kill Microbes ». *Annual review of immunology* 23: 197-223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>.
- Seoane, Paula I., Bali Lee, Christopher Hoyle, Shi Yu, Gloria Lopez-Castejon, Martin Lowe, et David Brough. 2020. « The NLRP3-Inflammasome as a Sensor of Organelle Dysfunction ». *The Journal of Cell Biology* 219 (12): e202006194. <https://doi.org/10.1083/jcb.202006194>.

- Serhan, Charles N., et Bruce D. Levy. 2018. « Resolvins in Inflammation: Emergence of the pro-Resolving Superfamily of Mediators ». American Society for Clinical Investigation. 2 juillet 2018. <https://doi.org/10.1172/JCI97943>.
- Shafferman, Ashley, James D. Birmingham, et Randy Q. Cron. 2014. « High Dose Anakinra for Treatment of Severe Neonatal Kawasaki Disease: A Case Report ». *Pediatric Rheumatology Online Journal* 12: 26. <https://doi.org/10.1186/1546-0096-12-26>.
- Shahi, Abbas, Shima Afzali, Zahra Firoozi, Poopak Mohaghegh, Ali Moravej, Ali Hosseinipour, Maryam Bahmanyar, et Yaser Mansoori. 2023. « Potential Roles of NLRP3 Inflammasome in the Pathogenesis of Kawasaki Disease ». *Journal of Cellular Physiology* 238 (3): 513-32. <https://doi.org/10.1002/jcp.30948>.
- Sharif, Humayun, Li Wang, Wei Li Wang, Venkat Giri Magupalli, Liudmila Andreeva, Qi Qiao, Arthur V. Hauenstein, et al. 2019. « Structural mechanism for NEK7-licensed NLRP3 inflammasome activation ». *Nature* 570 (7761): 338-43. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1295-z>.
- Sharma, Deepika, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2016. « The Cell Biology of Inflammasomes: Mechanisms of Inflammasome Activation and Regulation ». *The Journal of Cell Biology* 213 (6): 617-29. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>.
- Shen, Chen, Runzhi Li, Roberto Negro, Jiewei Cheng, Setu M. Vora, Tian-Min Fu, Anmin Wang, et al. 2021. « Phase Separation Drives RNA Virus-Induced Activation of the NLRP6 Inflammasome ». *Cell* 184 (23): 5759-5774.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.032>.
- Shi, Chong-Shan, Kevin Shenderov, Ning-Na Huang, Juraj Kabat, Mones Abu-Asab, Katherine A. Fitzgerald, Alan Sher, et John H. Kehrl. 2012. « Activation of Autophagy by Inflammatory Signals Limits IL-1 $\beta$  Production by Targeting Ubiquitinated Inflammasomes for Destruction ». *Nature Immunology* 13 (3): 255-63. <https://doi.org/10.1038/ni.2215>.
- Shi, Hexin, Ying Wang, Xiaohong Li, Xiaoming Zhan, Miao Tan, Maggy Fina, Lijing Su, et al. 2016. « NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component ». *Nature immunology* 17 (3): 250-58. <https://doi.org/10.1038/ni.3333>.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Kun Wang, Xuyan Shi, Yue Wang, Huanwei Huang, Yinghua Zhuang, Tao Cai, Fengchao Wang, et Feng Shao. 2015. « Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death ». *Nature* 526 (7575): 660-65. <https://doi.org/10.1038/nature15514>.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Yupeng Wang, Wenqing Gao, Jingjin Ding, Peng Li, Liyan Hu, et Feng Shao. 2014. « Inflammatory Caspases Are Innate Immune Receptors for Intracellular LPS ». *Nature* 514 (7521): 187-92. <https://doi.org/10.1038/nature13683>.
- Shimada, Kenichi, Timothy R. Crother, Justin Karlin, Jargalsaikhan Dagvadorj, Norika Chiba, Shuang Chen, V. Krishnan Ramanujan, et al. 2012. « Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis ». *Immunity* 36 (3): 401-14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>.
- Silveira, Tatiana N., Marco Túlio R. Gomes, Luciana S. Oliveira, Priscila C. Campos, Gabriela G. Machado, et Sergio C. Oliveira. 2017. « NLRP12 Negatively Regulates Proinflammatory Cytokine Production and Host Defense against *Brucella Abortus* ». *European Journal of Immunology* 47 (1): 51-59. <https://doi.org/10.1002/eji.201646502>.

- Singh, Jagjit, Maria L. Habean, et Nikhil Panicker. 2023. « Inflammasome Assembly in Neurodegenerative Diseases ». *Trends in Neurosciences*, août, S0166-2236(23)00174-1. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.07.009>.
- Slade, Dea. 2018. « Maneuvers on PCNA Rings during DNA Replication and Repair ». *Genes* 9 (8): 416. <https://doi.org/10.3390/genes9080416>.
- Slim, Rima, et Evan P. Wallace. 2013. « NLRP7 and the Genetics of Hydatidiform Moles: Recent Advances and New Challenges ». *Frontiers in Immunology* 4: 242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00242>.
- Snouwaert, John N., MyTrang Nguyen, Peter W. Repenning, Rebecca Dye, Eric W. Livingston, Martina Kovarova, Sheryl S. Moy, et al. 2016. « An NLRP3 Mutation Causes Arthropathy and Osteoporosis in Humanized Mice ». *Cell Reports* 17 (11): 3077-88. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.052>.
- So, Alexander, Marc De Meulemeester, Andrey Pikhak, A. Eftal Yücel, Dominik Richard, Valda Murphy, Udayasankar Arulmani, Peter Sallstig, et Naomi Schlesinger. 2010. « Canakinumab for the Treatment of Acute Flares in Difficult-to-Treat Gouty Arthritis: Results of a Multicenter, Phase II, Dose-Ranging Study ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (10): 3064-76. <https://doi.org/10.1002/art.27600>.
- So, Alexander, Thibaut De Smedt, Sylvie Revaz, et Jürg Tschopp. 2007. « A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout ». *Arthritis Research & Therapy* 9 (2): R28. <https://doi.org/10.1186/ar2143>.
- So, Alexander, Annette Ives, Leo A. B. Joosten, et Nathalie Busso. 2013. « Targeting Inflammasomes in Rheumatic Diseases ». *Nature Reviews Rheumatology* 9 (7): 391-99. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.61>.
- So, Alexander K., et Fabio Martinon. 2017. « Inflammation in Gout: Mechanisms and Therapeutic Targets ». *Nature Reviews. Rheumatology* 13 (11): 639-47. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.155>.
- Soehnlein, Oliver, Sabine Steffens, Andrés Hidalgo, et Christian Weber. 2017. « Neutrophils as Protagonists and Targets in Chronic Inflammation ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (4): 248-61. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>.
- Song, Hui, Bingyu Liu, Wanwan Huai, Zhongxia Yu, Wenwen Wang, Jing Zhao, Lihui Han, et al. 2016. « The E3 Ubiquitin Ligase TRIM31 Attenuates NLRP3 Inflammasome Activation by Promoting Proteasomal Degradation of NLRP3 ». *Nature Communications* 7 (décembre): 13727. <https://doi.org/10.1038/ncomms13727>.
- Song, Nan, Zhao-Shan Liu, Wen Xue, Zhao-Fang Bai, Qian-Yi Wang, Jiang Dai, Xin Liu, et al. 2017. « NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation ». *Molecular Cell* 68 (1): 185-197.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.017>.
- Song, Yuri, Hee Sam Na, Eunjoo Park, Mi Hee Park, Hyun Ah Lee, et Jin Chung. 2018. « Streptococcus Mutans Activates the AIM2, NLRP3 and NLRC4 Inflammasomes in Human THP-1 Macrophages ». *International Journal of Oral Science* 10 (3): 23. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0024-z>.
- Spalinger, Marianne R., Stephanie Kasper, Claudia Gottier, Silvia Lang, Kirstin Atrott, Stephan R. Vavricka, Sylvie Scharl, et al. 2016. « NLRP3 Tyrosine Phosphorylation Is Controlled by Protein Tyrosine Phosphatase PTPN22 ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (5): 1783-1800. <https://doi.org/10.1172/JCI83669>.
- Spalinger, Marianne R., Silvia Lang, Claudia Gottier, Xuezhi Dai, David J. Rawlings, Andrew C. Chan, Gerhard Rogler, et Michael Scharl. 2017. « PTPN22 regulates NLRP3-mediated

- IL1B secretion in an autophagy-dependent manner ». *Autophagy* 13 (9): 1590-1601. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1341453>.
- Stoimenov, Ivaylo, et Thomas Helleday. 2009. « PCNA on the Crossroad of Cancer ». *Biochemical Society Transactions* 37 (Pt 3): 605-13. <https://doi.org/10.1042/BST0370605>.
- Stutz, Andrea, Gabor L. Horvath, Brian G. Monks, et Eicke Latz. 2013. « ASC Speck Formation as a Readout for Inflammasome Activation ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1040: 91-101. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1_8).
- Stutz, Andrea, Carl-Christian Kolbe, Rainer Stahl, Gabor L. Horvath, Bernardo S. Franklin, Olivia van Ray, Rebecca Brinkschulte, Matthias Geyer, Felix Meissner, et Eicke Latz. 2017. « NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (6): 1725-36. <https://doi.org/10.1084/jem.20160933>.
- Subramanian, Naeha, Kannan Natarajan, Menna R. Clatworthy, Ze Wang, et Ronald N. Germain. 2013. « The adapter MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation ». *Cell* 153 (2): 348-61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.054>.
- Sun, Lijun, Jiayi Wu, Fenghe Du, Xiang Chen, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 786-91. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>.
- Sun, Yan, Serena Abbondante, Mausita Karmakar, Steven de Jesus Carrion, Chengye Che, Amy G. Hise, et Eric Pearlman. 2018. « Neutrophil Caspase-11 Is Required for Cleavage of Caspase-1 and Secretion of IL-1 $\beta$  in *Aspergillus Fumigatus* Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 201 (9): 2767-75. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701195>.
- Sutterwala, Fayyaz S., Lilia A. Mijares, Li Li, Yasunori Ogura, Barbara I. Kazmierczak, et Richard A. Flavell. 2007. « Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (13): 3235-45. <https://doi.org/10.1084/jem.20071239>.
- Suzuki, Shiho, Luigi Franchi, Yuan He, Raul Muñoz-Planillo, Hitomi Mimuro, Toshihiko Suzuki, Chihiro Sasakawa, et Gabriel Núñez. 2014. « Shigella Type III Secretion Protein MxiI Is Recognized by Naip2 to Induce Nlrp4 Inflammasome Activation Independently of Pkc $\delta$  ». *PLOS Pathogens* 10 (2): e1003926. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003926>.
- Suzuki, Toshihiko, Luigi Franchi, Claudia Toma, Hiroshi Ashida, Michinaga Ogawa, Yuko Yoshikawa, Hitomi Mimuro, Naohiro Inohara, Chihiro Sasakawa, et Gabriel Nuñez. 2007. « Differential Regulation of Caspase-1 Activation, Pyroptosis, and Autophagy via IpaF and ASC in Shigella-Infected Macrophages ». *PLoS Pathogens* 3 (8): e111. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030111>.
- Swanson, Karen V., Meng Deng, et Jenny P.-Y. Ting. 2019. « The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics ». *Nature Reviews Immunology* 19 (8): 477-89. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.
- Swanson, Karen V., Robert D. Junkins, Cathryn J. Kurkjian, Elizabeth Holley-Guthrie, Avani A. Pendse, Rachid El Morabiti, Alex Petrucelli, Glen N. Barber, Chris A. Benedict, et Jenny P.-Y. Ting. 2017. « A Noncanonical Function of cGAMP in Inflammasome Priming and



- Activation ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (12): 3611-26. <https://doi.org/10.1084/jem.20171749>.
- Tacnet-Delorme, Pascale, Julie Gabillet, Simon Chatfield, Nathalie Thieblemont, Philippe Frchet, et Véronique Witko-Sarsat. 2018. « Proteinase 3 Interferes With C1q-Mediated Clearance of Apoptotic Cells ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00818>.
- Takaoka, Akinori, ZhiChao Wang, Myoung Kwon Choi, Hideyuki Yanai, Hideo Negishi, Tatsuma Ban, Yan Lu, et al. 2007. « DAI (DLM-1/ZBP1) Is a Cytosolic DNA Sensor and an Activator of Innate Immune Response ». *Nature* 448 (7152): 501-5. <https://doi.org/10.1038/nature06013>.
- Takawa, Masashi, Hyun-Soo Cho, Shinya Hayami, Gouji Toyokawa, Masaharu Kogure, Yuka Yamane, Yukiko Iwai, et al. 2012. « Histone Lysine Methyltransferase SETD8 Promotes Carcinogenesis by Dereulating PCNA Expression ». *Cancer Research* 72 (13): 3217-27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3701>.
- Takeuchi, Osamu, et Shizuo Akira. 2010. « Pattern Recognition Receptors and Inflammation ». *Cell* 140 (6): 805-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- Tan, C. K., C. Castillo, A. G. So, et K. M. Downey. 1986. « An Auxiliary Protein for DNA Polymerase-Delta from Fetal Calf Thymus ». *The Journal of Biological Chemistry* 261 (26): 12310-16.
- Tang, Donge, Xiaohui Liu, Kezhi Chen, Zhipeng Li, Yong Dai, Jiake Xu, Huan-Tian Zhang, Xuejuan Gao, et Langxia Liu. 2020. « Cytoplasmic PCNA Is Located in the Actin Belt and Involved in Osteoclast Differentiation ». *Aging* 12 (13): 13297-317. <https://doi.org/10.18632/aging.103434>.
- Tang, Juan, Sha Tu, Guoxin Lin, Hui Guo, Chengkai Yan, Qingjun Liu, Ling Huang, et al. 2020. « Sequential ubiquitination of NLRP3 by RNF125 and Cbl-b limits inflammasome activation and endotoxemia ». *The Journal of Experimental Medicine* 217 (4): e20182091. <https://doi.org/10.1084/jem.20182091>.
- Tang, Tiantian, Xueting Lang, Congfei Xu, Xiaqiong Wang, Tao Gong, Yanqing Yang, Jun Cui, et al. 2017. « CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation ». *Nature Communications* 8 (août): 202. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00227-x>.
- Tenthorey, Jeannette L., Roberto A. Chavez, Thornton W. Thompson, Katherine A. Deets, Russell E. Vance, et Isabella Rauch. 2020. « NLRC4 Inflammasome Activation Is NLRP3- and Phosphorylation-Independent during Infection and Does Not Protect from Melanoma ». *The Journal of Experimental Medicine* 217 (7): e20191736. <https://doi.org/10.1084/jem.20191736>.
- Terai, Kenta, Tarek Abbas, Amir A. Jazaeri, et Anindya Dutta. 2010. « CRL4Cdt2 E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates PCNA to promote translesion DNA synthesis ». *Molecular cell* 37 (1): 143. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.018>.
- Tian, Zhong-Gu, Miaomiao Yao, et Jie Chen. 2020. « Micheliolide Alleviates Ankylosing Spondylitis (AS) by Suppressing the Activation of the NLRP3 Inflammasome and Maintaining the Balance of Th1/Th2 via Regulating the NF-κB Signaling Pathway ». *Annals of Translational Medicine* 8 (16): 991. <https://doi.org/10.21037/atm-20-4987>.
- Ting, Jenny P.-Y., Ruth C. Lovering, Emad S. Alnemri, John Bertin, Jeremy M. Boss, Beckley K. Davis, Richard A. Flavell, et al. 2008. « The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature ». *Immunity* 28 (3): 285-87. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.005>.

- Toubai, Tomomi, Hideaki Fujiwara, Corinne Rossi, Mary Riwes, Hiroya Tamaki, Cynthia Zajac, Chen Liu, et al. 2019. « Host NLRP6 Exacerbates Graft-versus-Host Disease Independent of Gut Microbial Composition ». *Nature Microbiology* 4 (5): 800-812. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0373-1>.
- Tourneur, Léa, et Véronique Witko-Sarsat. 2019. « Inflammasome activation: Neutrophils go their own way ». *Journal of Leukocyte Biology* 105 (3): 433-36. <https://doi.org/10.1002/JLB.3CE1118-433R>.
- Truax, Agnieszka D., Liang Chen, Jason W. Tam, Ning Cheng, Hao Guo, A. Alicia Koblansky, Wei-Chun Chou, et al. 2018. « The Inhibitory Innate Immune Sensor NLRP12 Maintains a Threshold against Obesity by Regulating Gut Microbiota Homeostasis ». *Cell Host & Microbe* 24 (3): 364-378.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.009>.
- Tsurimoto, T. 1999. « PCNA Binding Proteins ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 4 (décembre): D849-858. <https://doi.org/10.2741/tsurimoto>.
- Udden, SM Nashir, Youn-Tae Kwak, Victoria Godfrey, Md Abdul Wadud Khan, Shahanshah Khan, Nicolas Loof, Lan Peng, Hao Zhu, et Hasan Zaki. 2019. « NLRP12 suppresses hepatocellular carcinoma via downregulation of cJun N-terminal kinase activation in the hepatocyte ». Édité par Xuetao Cao et Tadatsugu Taniguchi. *eLife* 8 (avril): e40396. <https://doi.org/10.7554/eLife.40396>.
- Ulland, Tyler K., Nidhi Jain, Emma E. Hornick, Eric I. Elliott, Gwendolyn M. Clay, Jeffrey J. Sadler, Kathleen A. M. Mills, et al. 2016. « Nlrp12 Mutation Causes C57BL/6J Strain-Specific Defect in Neutrophil Recruitment ». *Nature Communications* 7 (octobre): 13180. <https://doi.org/10.1038/ncomms13180>.
- Ulrich, Helle D. 2009. « Regulating Post-Translational Modifications of the Eukaryotic Replication Clamp PCNA ». *DNA Repair* 8 (4): 461-69. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.01.006>.
- Unterholzner, Leonie, Sinead E. Keating, Marcin Baran, Kristy A. Horan, Søren B. Jensen, Shruti Sharma, Cherilyn M. Sirois, et al. 2010. « IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA ». *Nature immunology* 11 (11): 997-1004. <https://doi.org/10.1038/ni.1932>.
- Vairapandi, M., N. Azam, A. G. Balliet, B. Hoffman, et D. A. Liebermann. 2000. « Characterization of MyD118, Gadd45, and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Interacting Domains. PCNA Impedes MyD118 AND Gadd45-Mediated Negative Growth Control ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (22): 16810-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.22.16810>.
- Vanaja, Sivapriya Kailasan, Ashley J. Russo, Bharat Behl, Ishita Banerjee, Maya Yankova, Sachin D. Deshmukh, et Vijay A. K. Rathinam. 2016. « Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation ». *Cell* 165 (5): 1106-19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.015>.
- Vandanmagsar, Bolormaa, Yun-Hee Youm, Anthony Ravussin, Jose E. Galgani, Krisztian Stadler, Randall L. Mynatt, Eric Ravussin, Jacqueline M. Stephens, et Vishwa Deep Dixit. 2011. « The NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance ». *Nature Medicine* 17 (2): 179-88. <https://doi.org/10.1038/nm.2279>.
- Vande Walle, Lieselotte, Nina Van Opdenbosch, Peggy Jacques, Amelie Fossoul, Eveline Verheugen, Peter Vogel, Rudi Beyaert, et al. 2014. « Negative Regulation of the NLRP3 Inflammasome by A20 Protects against Arthritis ». *Nature* 512 (7512): 69-73. <https://doi.org/10.1038/nature13322>.

- Vénéreau, Emilie, Chiara Ceriotti, et Marco Emilio Bianchi. 2015. « DAMPs from Cell Death to New Life ». *Frontiers in Immunology* 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00422>.
- Verhoef, Philip A., Sylvia B. Kertesz, Kathleen Lundberg, J. Michelle Kahlenberg, et George R. Dubyak. 2005. « Inhibitory Effects of Chloride on the Activation of Caspase-1, IL-1beta Secretion, and Cytolysis by the P2X7 Receptor ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (11): 7623-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7623>.
- Viganò, Elena, Catherine Emma Diamond, Roberto Spreafico, Akhila Balachander, Radoslaw M. Sobota, et Alessandra Mortellaro. 2015. « Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes ». *Nature Communications* 6 (octobre): 8761. <https://doi.org/10.1038/ncomms9761>.
- Vladimer, Gregory I., Dan Weng, Sara W. Montminy Paquette, Sivapriya Kailasan Vanaja, Vijay A. K. Rathinam, Marie Hjelmseth Aune, Joseph E. Conlon, et al. 2012. « The NLRP12 Inflammasome Recognizes Yersinia Pestis ». *Immunity* 37 (1): 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.006>.
- Volk, Joana K., Elisabeth E. L. Nyström, Sjoerd van der Post, Beatriz M. Abad, Bjoern O. Schroeder, Åsa Johansson, Frida Svensson, et al. 2019. « The Nlrp6 Inflammasome Is Not Required for Baseline Colonic Inner Mucus Layer Formation or Function ». *The Journal of Experimental Medicine* 216 (11): 2602-18. <https://doi.org/10.1084/jem.20190679>.
- Vriz, S, J M Lemaitre, M Leibovici, N Thierry, et M Méchali. 1992. « Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression. » *Molecular and Cellular Biology* 12 (8): 3548-55.
- Waga, S., G. J. Hannon, D. Beach, et B. Stillman. 1994. « The P21 Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases Controls DNA Replication by Interaction with PCNA ». *Nature* 369 (6481): 574-78. <https://doi.org/10.1038/369574a0>.
- Walev, I., J. Klein, M. Husmann, A. Valeva, S. Strauch, H. Wirtz, O. Weichel, et S. Bhakdi. 2000. « Potassium Regulates IL-1 Beta Processing via Calcium-Independent Phospholipase A2 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (10): 5120-24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5120>.
- Wang, Bing, Madhurima Bhattacharya, Sayantan Roy, Yuan Tian, et Qian Yin. 2020. « Immunobiology and Structural Biology of AIM2 Inflammasome ». *Molecular Aspects of Medicine, Inflammasome*, 76 (décembre): 100869. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100869>.
- Wang, Huaying, Chun'er Lv, Shi Wang, Huajuan Ying, Yuesong Weng, et Wanjun Yu. 2018. « NLRP3 Inflammasome Involves in the Acute Exacerbation of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Inflammation* 41 (4): 1321-33. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0780-0>.
- Wang, Penghua, Shu Zhu, Long Yang, Shuang Cui, Wen Pan, Ruaidhri Jackson, Yunjiang Zheng, et al. 2015. « Nlrp6 Regulates Intestinal Antiviral Innate Immunity ». *Science (New York, N.Y.)* 350 (6262): 826-30. <https://doi.org/10.1126/science.aab3145>.
- Wang, Qinyang, Yupeng Wang, Jingjin Ding, Chunhong Wang, Xuehan Zhou, Wenqing Gao, Huanwei Huang, Feng Shao, et Zhibo Liu. 2020. « A Bioorthogonal System Reveals Antitumour Immune Function of Pyroptosis ». *Nature* 579 (7799): 421-26. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2079-1>.
- Wang, Shao-Chun, Yusuke Nakajima, Yung-Luen Yu, Weiya Xia, Chun-Te Chen, Cheng-Chieh Yang, Eric W. McIntush, et al. 2006. « Tyrosine Phosphorylation Controls PCNA

- Function through Protein Stability ». *Nature Cell Biology* 8 (12): 1359-68. <https://doi.org/10.1038/ncb1501>.
- Wang, Wenbiao, Dingwen Hu, Caifeng Wu, Yuqian Feng, Aixin Li, Weiyong Liu, Yingchong Wang, et al. 2020. « STING promotes NLRP3 localization in ER and facilitates NLRP3 deubiquitination to activate the inflammasome upon HSV-1 infection ». *PLoS Pathogens* 16 (3): e1008335. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008335>.
- Wang, Yupeng, Wenqing Gao, Xuyan Shi, Jingjin Ding, Wang Liu, Huabin He, Kun Wang, et Feng Shao. 2017. « Chemotherapy Drugs Induce Pyroptosis through Caspase-3 Cleavage of a Gasdermin ». *Nature* 547 (7661): 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature22393>.
- Wang, Yutao, Xiaohan Ning, Pengfei Gao, Shuxian Wu, Mengyin Sha, Mengze Lv, Xiang Zhou, et al. 2017. « Inflammasome Activation Triggers Caspase-1-Mediated Cleavage of cGAS to Regulate Responses to DNA Virus Infection ». *Immunity* 46 (3): 393-404. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.011>.
- Warbrick, E., W. Heatherington, D. P. Lane, et D. M. Glover. 1998. « PCNA Binding Proteins in *Drosophila Melanogaster* : The Analysis of a Conserved PCNA Binding Domain ». *Nucleic Acids Research* 26 (17): 3925-32. <https://doi.org/10.1093/nar/26.17.3925>.
- Weber, Kassandra, et Joel D. Schilling. 2014. « Lysosomes Integrate Metabolic-Inflammatory Cross-talk in Primary Macrophage Inflammasome Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (13): 9158-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.531202>.
- Wen, Haitao, Denis Gris, Yu Lei, Sushmita Jha, Lu Zhang, Max Tze-Han Huang, Willie June Brickey, et Jenny P.-Y. Ting. 2011. « Fatty Acid-Induced NLRP3-ASC Inflammasome Activation Interferes with Insulin Signaling ». *Nature Immunology* 12 (5): 408-15. <https://doi.org/10.1038/ni.2022>.
- Wickliffe, Katherine E., Stephen H. Leppla, et Mahtab Moayeri. 2008. « Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome ». *Cellular microbiology* 10 (2): 332-43. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01044.x>.
- Wilmanski, Jeanette M., Tanja Petnicki-Ocwieja, et Koichi S. Kobayashi. 2008. « NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases ». *Journal of Leukocyte Biology* 83 (1): 13-30. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607402>.
- Witko-Sarsat, Véronique, Julie Mocek, Dikra Bouayad, Nicola Tamassia, Jean-Antoine Ribeil, Céline Candalh, Noélie Davezac, et al. 2010. « Proliferating Cell Nuclear Antigen Acts as a Cytoplasmic Platform Controlling Human Neutrophil Survival ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (12): 2631-45. <https://doi.org/10.1084/jem.20092241>.
- Witko-Sarsat, Véronique, et Delphine Ohayon. 2016. « Proliferating Cell Nuclear Antigen in Neutrophil Fate ». *Immunological Reviews* 273 (1): 344-56. <https://doi.org/10.1111/imr.12449>.
- Wlodarska, Marta, Christoph A. Thaiss, Roni Nowarski, Jorge Henao-Mejia, Jian-Ping Zhang, Eric M. Brown, Gad Frankel, et al. 2014. « NLRP6 Inflammasome Orchestrates the Colonic Host-Microbial Interface by Regulating Goblet Cell Mucus Secretion ». *Cell* 156 (5): 1045-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.026>.
- Wu, Jianghong, Teresa Fernandes-Alnemri, et Emad S. Alnemri. 2010. « Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 Inflammasomes in Caspase-1 Activation by *Listeria monocytogenes* ». *Journal of Clinical Immunology* 30 (5): 693-702. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9425-2>.

- Xiao, Le, Venkat Giri Magupalli, et Hao Wu. 2023. « Cryo-EM Structures of the Active NLRP3 Inflammasome Disc ». *Nature* 613 (7944): 595-600. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05570-8>.
- Xiao, Tsan Sam. 2015. « The nucleic acid-sensing inflammasomes ». *Immunological reviews* 265 (1): 103-11. <https://doi.org/10.1111/imr.12281>.
- Xing, Yue, Xiaomin Yao, Hua Li, Guang Xue, Qihong Guo, Guiwen Yang, Liguang An, Yan Zhang, et Guangxun Meng. 2017. « Cutting Edge: TRAF6 Mediates TLR/IL-1R Signaling-Induced Nontranscriptional Priming of the NLRP3 Inflammasome ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 199 (5): 1561-66. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700175>.
- Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, et D. Beach. 1993. « P21 Is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases ». *Nature* 366 (6456): 701-4. <https://doi.org/10.1038/366701a0>.
- Xiong, Y., H. Zhang, et D. Beach. 1992. « D Type Cyclins Associate with Multiple Protein Kinases and the DNA Replication and Repair Factor PCNA ». *Cell* 71 (3): 505-14. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90518-h](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90518-h).
- Xu, Hao, Jieliang Yang, Wenqing Gao, Lin Li, Peng Li, Li Zhang, Yi-Nan Gong, et al. 2014. « Innate Immune Sensing of Bacterial Modifications of Rho GTPases by the Pyrin Inflammasome ». *Nature* 513 (7517): 237-41. <https://doi.org/10.1038/nature13449>.
- Xu, Heng, Peng Zhang, Li Liu, et Marietta Y. W. T. Lee. 2001. « A Novel PCNA-Binding Motif Identified by the Panning of a Random Peptide Display Library ». *Biochemistry* 40 (14): 4512-20. <https://doi.org/10.1021/bi010103+>.
- Yan, Yiqing, Wei Jiang, Lei Liu, Xiaqiong Wang, Chen Ding, Zhigang Tian, et Rongbin Zhou. 2015. « Dopamine Controls Systemic Inflammation through Inhibition of NLRP3 Inflammasome ». *Cell* 160 (1-2): 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.047>.
- Yang, C.-A., S.-T. Huang, et B.-L. Chiang. 2014. « Association of NLRP3 and CARD8 Genetic Polymorphisms with Juvenile Idiopathic Arthritis in a Taiwanese Population ». *Scandinavian Journal of Rheumatology* 43 (2): 146-52. <https://doi.org/10.3109/03009742.2013.834962>.
- Yang, Dahai, Yuan He, Raul Muñoz-Planillo, Qin Liu, et Gabriel Núñez. 2015. « Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock ». *Immunity* 43 (5): 923-32. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.009>.
- Yang, Jie, Zhonghua Liu, et Tsan Sam Xiao. 2017. « Post-Translational Regulation of Inflammasomes ». *Cellular & Molecular Immunology* 14 (1): 65-79. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.29>.
- Yang, Kai, Shuo Xu, Hongmei Zhao, Lingshuang Liu, Xiaofang Lv, Fang Hu, Lei Wang, et Qiuxia Ji. 2021. « Hypoxia and Porphyromonas Gingivalis-Lipopolysaccharide Synergistically Induce NLRP3 Inflammasome Activation in Human Gingival Fibroblasts ». *International Immunopharmacology* 94 (mai): 107456. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107456>.
- Yin, Hui, Na Liu, Keshav Raj Sigdel, et Lihua Duan. 2022. « Role of NLRP3 Inflammasome in Rheumatoid Arthritis ». *Frontiers in Immunology* 13: 931690. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931690>.
- Yin, Liang, Yingying Xie, Songyue Yin, Xiaolei Lv, Jia Zhang, Zezong Gu, Haidan Sun, et Siqi Liu. 2015. « The S-Nitrosylation Status of PCNA Localized in Cytosol Impacts the Apoptotic Pathway in a Parkinson's Disease Paradigm ». *PLoS One* 10 (2): e0117546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117546>.

- Yokose, Kohei, Shuzo Sato, Tomoyuki Asano, Makiko Yashiro, Hiroko Kobayashi, Hiroshi Watanabe, Eiji Suzuki, et al. 2018. « TNF- $\alpha$  Potentiates Uric Acid-Induced Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Secretion in Human Neutrophils ». *Modern Rheumatology* 28 (3): 513-17. <https://doi.org/10.1080/14397595.2017.1369924>.
- Yoneyama, Mitsutoshi, et Takashi Fujita. 2009. « RNA Recognition and Signal Transduction by RIG-I-like Receptors ». *Immunological Reviews* 227 (1): 54-65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00727.x>.
- Yoshida, Kaya, Hirohiko Okamura, Yuka Hiroshima, Kaori Abe, Jun-Ichi Kido, Yasuo Shinohara, et Kazumi Ozaki. 2017. « PKR Induces the Expression of NLRP3 by Regulating the NF- $\kappa$ B Pathway in Porphyromonas Gingivalis-Infected Osteoblasts ». *Experimental Cell Research* 354 (1): 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.028>.
- Yu, Yu, Jian-Ping Cai, Bo Tu, Lipeng Wu, Ying Zhao, Xiangyu Liu, Lian Li, et al. 2009. « Proliferating Cell Nuclear Antigen Is Protected from Degradation by Forming a Complex with MutT Homolog2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (29): 19310-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.015289>.
- Zaki, Md Hasan, Si Ming Man, Peter Vogel, Mohamed Lamkanfi, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2014. « Salmonella Exploits NLRP12-Dependent Innate Immune Signaling to Suppress Host Defenses during Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (1): 385-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317643111>.
- Zambalde, Érika Pereira, Isadora Carolina Betim Pavan, Mariana Camargo Silva Mancini, Matheus Brandemarte Severino, Orlando Bonito Scudero, Ana Paula Morelli, Mariene Ribeiro Amorim, et al. 2022. « Characterization of the Interaction Between SARS-CoV-2 Membrane Protein (M) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) as a Potential Therapeutic Target ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12: 849017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.849017>.
- Zamoshnikova, Alina, Christina J. Groß, Steffen Schuster, Kaiwen W. Chen, Anne Wilson, Fabienne Tacchini-Cottier, et Kate Schroder. 2016. « NLRP12 Is a Neutrophil-Specific, Negative Regulator of in Vitro Cell Migration but Does Not Modulate LPS- or Infection-Induced NF- $\kappa$ B or ERK Signalling ». *Immunobiology* 221 (2): 341-46. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.10.001>.
- Zewinger, Stephen, Jochen Reiser, Vera Jankowski, Dalia Alansary, Eunsil Hahm, Sarah Triem, Mira Klug, et al. 2020. « Apolipoprotein C3 Induces Inflammation and Organ Damage by Alternative Inflammasome Activation ». *Nature Immunology* 21 (1): 30-41. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0548-1>.
- Zhang, Ge, He Chen, Yifan Guo, Wei Zhang, Qiuyu Jiang, Si Zhang, Liping Han, She Chen, et Ruyi Xue. 2021. « Activation of Platelet NLRP3 Inflammasome in Crohn's Disease ». *Frontiers in Pharmacology* 12: 705325. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.705325>.
- Zhang, Hongbo, Jiadi Luo, John F. Alcorn, Kong Chen, Songqing Fan, Joseph Pilewski, Aizhong Liu, Wei Chen, Jay K. Kolls, et Jieru Wang. 2017. « AIM2 Inflammasome Is Critical for Influenza-Induced Lung Injury and Mortality ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 198 (11): 4383-93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600714>.
- Zhang, Li, Yun Liu, Boshi Wang, Guiqin Xu, Zhaojuan Yang, Ming Tang, Aihui Ma, et al. 2018. « POH1 deubiquitinates pro-interleukin-1 $\beta$  and restricts inflammasome activity ». *Nature Communications* 9 (octobre): 4225. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06455-z>.

- Zhang, Sufang, Jennifer Chea, Xiao Meng, Yajing Zhou, Ernest Y. C. Lee, et Marietta Y. W. T. Lee. 2008. « PCNA Is Ubiquitinated by RNF8 ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (21): 3399-3404. <https://doi.org/10.4161/cc.7.21.6949>.
- Zhang, Xixi, Cunxian Fan, Haiwei Zhang, Qun Zhao, Yongbo Liu, Chengxian Xu, Qun Xie, et al. 2016. « MLKL and FADD Are Critical for Suppressing Progressive Lymphoproliferative Disease and Activating the NLRP3 Inflammasome ». *Cell Reports* 16 (12): 3247-59. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.103>.
- Zhang, Yajie, Jianqi Wang, Ming Ding, et Yonghao Yu. 2013. « Site-Specific Characterization of the Asp- and Glu-ADP-Ribosylated Proteome ». *Nature Methods* 10 (10): 981-84. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2603>.
- Zhang, Zhibin, Ying Zhang, Shiyu Xia, Qing Kong, Shunying Li, Xing Liu, Caroline Junqueira, et al. 2020. « Gasdermin E suppresses tumor growth by activating anti-tumor immunity ». *Nature* 579 (7799): 415-20. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2071-9>.
- Zhang, Zhirong, Gergö Meszaros, Wan-ting He, Yanfang Xu, Helena de Fatima Magliarelli, Laurent Mailly, Michael Mihlan, et al. 2017. « Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (9): 2671-93. <https://doi.org/10.1084/jem.20162040>.
- Zhang, Zhirong, Rossella Venditti, Li Ran, Zengzhen Liu, Karl Vivot, Annette Schürmann, Juan S. Bonifacino, Maria Antonietta De Matteis, et Romeo Ricci. 2023. « Distinct Changes in Endosomal Composition Promote NLRP3 Inflammasome Activation ». *Nature Immunology* 24 (1): 30-41. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01355-3>.
- Zhao, H., M.-S. Chen, Y.-H. Lo, S. E. Waltz, J. Wang, P.-C. Ho, J. Vasilias, R. Plattner, Y.-L. Wang, et S.-C. Wang. 2014. « The Ron Receptor Tyrosine Kinase Activates C-Abl to Promote Cell Proliferation through Tyrosine Phosphorylation of PCNA in Breast Cancer ». *Oncogene* 33 (11): 1429-37. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.84>.
- Zhao, Kai, Yening Zhang, Xueming Xu, Liping Liu, Lingmin Huang, Ruiheng Luo, Jing Li, Ningjie Zhang, et Ben Lu. 2019. « Acetylation Is Required for NLRP3 Self-Aggregation and Full Activation of the Inflammasome ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2019.12.31.891556>.
- Zhao, Ling-Rui, Run-Lin Xing, Pei-Min Wang, Nong-Shan Zhang, Song-Jiang Yin, Xiao-Chen Li, et Li Zhang. 2018. « NLRP1 and NLRP3 Inflammasomes Mediate LPS/ATP-induced Pyroptosis in Knee Osteoarthritis ». *Molecular Medicine Reports* 17 (4): 5463-69. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8520>.
- Zhao, Wei, Chong-Shan Shi, Kathleen Harrison, Il-Young Hwang, Neel R. Nabar, Min Wang, et John H. Kehrl. 2020. « AKT regulates NLRP3 inflammasome activation by phosphorylating NLRP3 serine 5 ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 205 (8): 2255-64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000649>.
- Zhao, Ying, Yue Quan, Ting Lei, Liumeizi Fan, Xin Ge, et Sheng Hu. 2022. « The Role of Inflammasome NLRP3 in the Development and Therapy of Periodontitis ». *International Journal of Medical Sciences* 19 (10): 1603-14. <https://doi.org/10.7150/ijms.74575>.
- Zhao, Yue, Jiuling Yang, Jianjin Shi, Yi-Nan Gong, Qiuhe Lu, Hao Xu, Liping Liu, et Feng Shao. 2011. « The NLR4 Inflammasome Receptors for Bacterial Flagellin and Type III Secretion Apparatus ». *Nature* 477 (7366): 596-600. <https://doi.org/10.1038/nature10510>.
- Zhen, Yu, et Hu Zhang. 2019. « NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease ». *Frontiers in Immunology* 10: 276. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00276>.

- Zhong, Zhenyu, Shuang Liang, Elsa Sanchez-Lopez, Feng He, Shabnam Shalapour, Xue-jia Lin, Jerry Wong, et al. 2018. « New Mitochondrial DNA Synthesis Enables NLRP3 Inflammasome Activation ». *Nature* 560 (7717): 198-203. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0372-z>.
- Zhong, Zhenyu, Yougang Zhai, Shuang Liang, Yasuo Mori, Renzhi Han, Fayyaz S Sutterwala, et Liang Qiao. 2013. « TRPM2 links oxidative stress to the NLRP3 inflammasome activation ». *Nature communications* 4: 1611. <https://doi.org/10.1038/ncomms2608>.
- Zhou, Jeffrey Y., Mrinal K. Sarkar, Ken Okamura, John E. Harris, Johann E. Gudjonsson, et Katherine A. Fitzgerald. 2023. « Activation of the NLRP1 Inflammasome in Human Keratinocytes by the dsDNA Mimetic Poly(dA:dT) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (5): e2213777120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2213777120>.
- Zhou, Rongbin, Aubry Tardivel, Bernard Thorens, Inpyo Choi, et Jürg Tschopp. 2010. « Thioredoxin-Interacting Protein Links Oxidative Stress to Inflammasome Activation ». *Nature Immunology* 11 (2): 136-40. <https://doi.org/10.1038/ni.1831>.
- Zhou, Rongbin, Amir S. Yazdi, Philippe Menu, et Jürg Tschopp. 2011. « A Role for Mitochondria in NLRP3 Inflammasome Activation ». *Nature* 469 (7329): 221-25. <https://doi.org/10.1038/nature09663>.
- Zhou, Yan, Ming Lu, Ren-Hong Du, Chen Qiao, Chun-Yi Jiang, Ke-Zhong Zhang, Jian-Hua Ding, et Gang Hu. 2016. « MicroRNA-7 Targets Nod-like Receptor Protein 3 Inflammasome to Modulate Neuroinflammation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease ». *Molecular Neurodegeneration* 11 (avril): 28. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0094-3>.
- Zhou, Zhiwei, Huabin He, Kun Wang, Xuyan Shi, Yupeng Wang, Ya Su, Yao Wang, et al. 2020. « Granzyme A from Cytotoxic Lymphocytes Cleaves GSDMB to Trigger Pyroptosis in Target Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 368 (6494): eaaz7548. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7548>.
- Zhu, Hua, Zhihong Jian, Yi Zhong, Yingze Ye, Yonggang Zhang, Xinyao Hu, Bei Pu, Lijuan Gu, et Xiaoxing Xiong. 2021. « Janus Kinase Inhibition Ameliorates Ischemic Stroke Injury and Neuroinflammation Through Reducing NLRP3 Inflammasome Activation via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition ». *Frontiers in Immunology* 12 (juillet): 714943. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714943>.
- Zito, Giovanni, Marco Buscetta, Maura Cimino, Paola Dino, Fabio Bucchieri, et Chiara Cipollina. 2020. « Cellular Models and Assays to Study NLRP3 Inflammasome Biology ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): 4294. <https://doi.org/10.3390/ijms21124294>.
- Zoete, Marcel R. de, Noah W. Palm, Shu Zhu, et Richard A. Flavell. 2014. « Inflammasomes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (12): a016287. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016287>.
- Zu, Yan, Yue Mu, Qiang Li, Shu-Ting Zhang, et Hong-Juan Yan. 2019. « Icariin Alleviates Osteoarthritis by Inhibiting NLRP3-Mediated Pyroptosis ». *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 14 (1): 307. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1307-6>.