

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Immunologie et Maladies Infectieuses

Présentée et soutenue par :

M. Etienne Meunier

le : vendredi 14 décembre 2012

Titre :

Etude des différents signaux d'activation de l'inflammasome dans les
monocytes/macrophages:
Implication dans la réponse inflammatoire vis-à-vis des Nanotubes de
Carbone et de Leishmania infantum

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

UMR-152, Equipe Mrn2i

Directeur(s) de Thèse :

M. Emmanuel Flahaut, M. Bernard Pipy

Rapporteurs :

M. Thierry Jouault, Chargé de Recherches INSERM, LILLE

M. Thomas Henry, Chargé de Recherches INSERM, LYON

Membre(s) du jury :

Mme. Florence Robert-Gangneux, MCU-PH, RENNES - Examineur

M. Denis Hudrisier, Professeur d'Université, TOULOUSE - Examineur

M. Emmanuel Flahaut, Directeur de Recherches CNRS, TOULOUSE - Examineur

M. Bernard Pipy, Directeur de Recherches INSERM, TOULOUSE - Examineur

Mlle. Agnès Coste, MCU, TOULOUSE - Membre invité

**Etude des différents signaux d'activation de
l'inflammasome dans les monocytes / macrophages:
*Implication dans la réponse inflammatoire vis-à-vis
des Nanotubes de carbone et de Leishmania
infantum***

Si c'était à refaire, je ferai la même chose !

Je tiens à adresser ma profonde reconnaissance à

Monsieur le Docteur Thomas Henry

qui a accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur. Son intérêt pour ce travail mais également la discussion qui en a découlée auront été très utiles. Je suis très honoré de sa présence dans ce jury de soutenance. Je lui exprime ici ma plus haute considération.

Monsieur le Docteur Thierry Jouault

pour avoir évalué en sa qualité de rapporteur cette thèse. Je le remercie pour la curiosité et la considération dont il a fait preuve envers ces travaux. Je lui adresse mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude.

Madame le Docteur Florence Robert-Gangneux

pour avoir évalué ce travail et siéger à ce jury. Sa curiosité et son application ont été très appréciables. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Denis Hudrisier

pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail de thèse. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour sa confiance ainsi que ses précieux conseils ayant contribué à l'amélioration de ce manuscrit. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Mademoiselle le Docteur Agnès Coste

pour sa présence, son accompagnement et ses encouragements répétés.

Il est honorant d'avoir pu compter sur elle pour ce jury de thèse.

Qu'elle soit assurée de mon respect et de mon amitié les plus profonds.

Monsieur le Docteur Emmanuel Flahaut

qui a codirigé cette thèse en y apportant conseils et soutien. Je lui suis reconnaissant pour la confiance et le soutien qu'il m'a témoigné.

Je lui adresse mes sincères remerciements ainsi que mon plus profond respect.

Monsieur le Docteur Bernard Pipy

qui a dirigé ce travail de thèse. Il est difficile de témoigner à quelqu'un sa reconnaissance tant l'importance qu'il a eue dans la réussite de ce travail est grande. Je souhaite avant tout partager cette thèse avec lui. Peu de personnes ont une passion aussi communicative pour le rêve et la compréhension en même temps. C'est avec un plaisir non dissimulé que je le remercie. Qu'il trouve ici le gage de ma plus profonde reconnaissance.

.

Allons-y,

Pardonnez avant toute chose le fait que ces remerciements n'auront pas de style mais soyez convaincu qu'ils ont un fond sincère.

Le mois de Septembre 2009 a vu mon intégration dans le laboratoire « MACROPHAGES » alors dirigé par Bernard Pipy puis par Agnès Coste et Laurent Alric. Il est difficile, le moment venu de faire abstraction de tout sentimentalisme lorsque je me remémore ces trois années passées au sein de cette petite équipe ô combien soudée et porteuse de valeurs scientifiques et humaines extrêmement communicatives.

Bref,

Aux statutaires,

Bernard Pipy,

A l'humaniste, à l'homme et au scientifique. Votre esprit a forcé mon admiration et m'a souvent mis face à mes propres contradictions scientifiques mais également morales. Votre capacité à interagir sur n'importe quel sujet laisse en moi un sentiment d'admiration, ainsi que l'envie de progresser. Nos discussions matinales et tardives sur la vie, la société et surtout sur la fonction fondamentale de l'inflammasome, encore lui, et des macrophages dans les situations les plus improbables, votre attention dans les moments de doute et votre élégance à ne pas me tenir rigueur de ce que je ne souhaitais pas dire ou faire me font simplement vous dire Merci. Vous m'avez donné certaines clés, je les utiliserai, soyez en assuré. Il est honorant d'avoir pu travailler sous votre direction.

Emmanuel Flahaut,

Chaque fois que sors du CIRIMAT j'ai le sourire. Ton soutien, ton écoute et ton optimiste à toute épreuve m'ont apporté plus que de raison. Les Nanotubes de carbone bi-parois ont marqué mon esprit et c'est grâce à toi et ta passion communicative pour la chimie du carbone, science qui encore aujourd'hui reste extrêmement floue pour moi. Tu as toujours été là, prêt à foncer à la moindre de mes idées les plus farfelues. En même temps, venant de quelqu'un qui fabrique des « bombes » aux NTCs, ça ne m'étonne guère. Merci pour tes encouragements et tes

précieux conseils. Tu as toujours agit de manière délicate avec moi et cela m'a apporté beaucoup de stabilité mentale. Sincèrement.

Agnès Coste,

Un ouragan. Tu m'as tendu la main plus d'une fois. J'espère en avoir été digne. Ton tempérament, ta rigueur scientifique et ta pédagogie auront été pour moi d'une profonde aide durant ma thèse. Ton caractère assez trempé et ma capacité à être têtu par vents et marrés auront fait des étincelles ! Le célèbre Juanita Banana et les Gipsy Kings témoigneront entre autre des excellents moments passés à te côtoyer. Tout cela pour te dire qu'au delà de la personne que j'apprécie (ça tu le sais déjà), c'est à la scientifique que je veux dire toute l'admiration et le respect que j'ai pour elle. J'espère que tu trouveras ici l'expression de l'ensemble de ma gratitude. A bientôt j'espère dans ce monde si petit qu'est la science. Bonne chance dans cette nouvelle charge de diriger cette équipe.

Hélène Authier,

La nouvelle maman. Chez Georges, un fou rire nous a rapprochés. Depuis, j'ai pu apprendre à connaître à la fois la scientifique acharnée de travail mais aussi la personne. Ta gentillesse, ton écoute et le partage de ton expérience auront été et seront extrêmement bénéfiques.

Bonne route sur le chemin de la maternité et de la recherche.

Philippe Batigne,

Le lucky luke de la blague. L'homme qui murmurait à l'oreille des souris. Ta bonne humeur et ton investissement dans l'entretien des souris ont été très appréciables.

Benedicte,

Toujours un large sourire sur le visage. Associé à une travailleuse hors pair. Tu es précieuse pour un labo. Merci pour ta bonne humeur communicative. Bon génotypage !

A monsieur le professeur Alexis Valentin,

Merci pour votre implication et votre aide dans la recherche d'un poste d'ATER. Vos précieux conseils m'auront été d'une grande aide.

A tous ceux que j'ai côtoyés tout au long de ma thèse au sein de l'équipe MRN2i et autour, Agnes Aubuy, Maryse Beraud, José Bernad, Saliha Mimar, Giselle Llanes, Clarisse Majorel, pour vos sourires, vos conseils et encouragements.

A l'ensemble des membres de l'UMR 152 que je n'ai pas eu le temps de connaître en profondeur et qui m'ont accueilli au sein de cette structure avec le sourire.

Mathieu Berge, Sabine Chapuy-Regaud, Alain Signolles, Christophe Pasquier et Monique Courtade-Saïdi, Merci à vous tous pour votre soutien et le partage de cette passion de l'enseignement. Ces trois années passés à enseigner à vos côtés en Médecine et Pharmacie auront contribué à créer un réel penchant pour cette discipline. Un petit Big up à Messieurs Berge et Signolles.

Aux membres d'Ambiotis...

Aux étudiants,

Dont le travail de l'ombre profite à tous...

David,

Comme tu me le disais, tout s'estompe, seul l'instant présent compte. J'aurai eu la chance de partager avec toi deux très belles années riches en enseignement et en joie. L'amitié née de notre collaboration de thésards est encore présente. Ton humour, tes imitations, le badminton (ou je gagnais rarement je te l'accorde) et surtout ton absence de tolérance apparente envers l'espèce humaine me font encore rire tout seul ! C'est un privilège que de t'avoir comme ami. Viens mon tour de partir à l'aventure dans un nouveau labo, une nouvelle thématique et tes conseils auront été précieux et avisés. Puissent nos chemins se recroiser à nouveau dans la recherche comme à côté.

Chris D,

Monsieur Propre n'a qu'à bien se tenir.

Derrière cette musculature à rendre jaloux Hercule lui-même, est présent un esprit d'une gentillesse et d'analyse à toute épreuve. Un mécano de la recherche comme j'aime à l'appeler. Capable d'opérer à la chaîne des souris en les scarifiant sans sourcilier : Je dis T'es un gagnant Sergio ! Malheureusement la musculature n'aide

pas à gagner au baby foot jeune padawan. Je retiendrais la seule partie que tu as remportée sur un malentendu, en 9 mois... $p > 0,05$ large!

Courage pour la suite, et garde ta gentillesse, elle est indispensable !

Lise L,

Notre chemin s'est croisé une première fois lors de notre entrée à la fac en 2004. Que de chemin parcouru pour ensuite se retrouver en thèse dans ce labo. Te connaître est un plaisir. Derrière ton intransigeance ménagère, se cache une personnalité passionnée, d'une gentillesse et d'une solidarité à toute épreuve. Qu'il doit être difficile pour toi de gérer les bourins masculins de labo... Je te fais une dédicace du Viator et de sa salle de bain manquante ! Je t'ai réellement découverte au cours de cette thèse et l'amitié née de cette collaboration restera indéfectible. Sache également que je ne fais plus le ménage et le nettoyage sans entendre ta voix résonner dans ma tête.

Courage, tu y es presque !

Je te souhaite une bonne continuation et le meilleur pour ta vie de future chercheuse comme personnelle.

Mohammad alias Momo,

Le petit dernier,

J'te promets, fumer des clopes et refaire la vie pendant ce temps là m'aura déstressé dans les moments difficiles. J'ai hâte de voir le Liban gagner la coupe du monde, en attendant que les règles du foot change et que l'on puisse marquer des buts avec les mains. Tu as signé pour trois ans, courage, à l'arrivé cela en vaut réellement la peine. Une belle relation d'amitié s'est créée. En espérant te retrouver un jour ou l'autre, peu importe le contexte, on fumera des clopes, on ira foutre le dawa à l'Envol et regarder des matchs nazes du TFC en tribune honneur! Un rappel, rédiger un rapport de M2 à jusqu'à 23H la veille de le rendre avec toi, ca n'a pas de prix !
Vive les Gipsy !

Bertrand,

Le John Wayne du Western Blot,

Je te rends hommage, car derrière ton caractère bourru se cache un amour de personne associée à un esprit scientifique extrêmement vif. Merci pour ton soutien,

ton aide pour les Western Blot et ELISA... et rappelles toi, on va aux Carmes ce soir !

Aux étudiants que j'ai encadré ou que j'ai pu côtoyer et qui sont ou seront le futur. Pour leur enthousiasme et leur envie d'en découdre avec la recherche. Bonne chance à vous tous !

Mes amis, ma famille, les bobis

Emily,

Sans toi, rien de possible. Tu es le pilier qui toujours m'a remis les idées en place. Tu es la muse de mon imagination, indispensable à l'exercice de ce métier qu'est la recherche. Mon amour n'a cessé de grandir tout au long de ces années. Tu forces mon admiration chaque jour qui passe. Te rappelles-tu du break Xara ? Moi, chaque jour. Merci de m'avoir partagé avec la science au cours de ce passage extrêmement égoïste qu'est une thèse. Ma plus belle réussite n'est pas de défendre mon travail de thèse, c'est d'avoir pu te conquérir et je chéri chacun des moments passés avec toi, oui oui surtout les engueulades ! Je t'aime plus que tout.

Lucie dit « la greluce »,

Ma ptite sœur adorée, le wapetchoupa est terminé.

Qui l'eu crut hein ? Que de moments et de crises partagées !!! Quoi qu'il se passe, faire ta fierté fais également partie de mes objectifs, tu me diras après la soutenance... Je joins Badou que j'ai connu réellement en Egypte. Mec, Mahmoud casse les prix. Je vous embrasse et vous souhaite tout plein de belles choses. Tu es bien accompagnée.

A mes parents,

Vous avez réussi.

Papa, ton amour, ta conscience sociale, ton esprit de réflexion, ton éducation, les valeurs transmises malgré toi, ta manière de raconter l'Histoire méconnue, celle des vrais gens, avec leurs contradictions et leurs réalités, ton soutien dans les moments les plus difficiles, ton indépendance, ton obstination et ton orgueil si si. Même si cela ne te rend pas à l'aise d'en parler, ce catalogue non exhaustif, je te le dédie. Je t'aime

Maman, ton amour, ta pensée parallèle, ton écoute, tes deals, ton éducation et ton attention de chaque instant pour tes enfants, ta tendresse. Nulle personne n'est plus forte et intègre que toi. Je me vante, chaque jour depuis toujours, même sans paroles, de la fierté d'être ton enfant. A toi... que j'aime

Ma grand-mère Paulette,

Que dire de plus si ce n'est que ta droiture et ton amour de grand-mère me rendent heureux dès que je suis à Montouliers. Je t'embrasse fort

A mon Grand père Henry,

Je boirais un canon de Mercurey à ta santé ce soir

Les amis,

Alex, Charlotte, mes amours de Catalans !,

Alex, depuis ce « moment » derrière un platane de la fac avec Boris nous ne nous sommes plus perdus de vue. Tu es un ami très cher à mon cœur et te côtoyer est pour moi un véritable bonheur mais également un honneur. Je sais le peu d'amour que tu portes à ce concept d'honneur. Néanmoins, bien placé il vaut son pesant de cahuetes. Allô, monsieur Alex c'est la gendarmerie de Ramonville... Je n'oublie pas Charlotte et sa manie horripilante de supporter l'USAP. Notre rencontre lors de cette année de M2R aura été un coup de cœur. Et que dire de ce saut miteux à l'élastique que j'ai fais au Mas d'Azil. Tu es un amour de coupine, je t'embrasse fort.

Je vous souhaite le plus beau.

Bobi et bobee,

Au-delà de l'amitié, de la famille et de l'amour,

Il y a les Bobis. Les gars, vous m'avez sorti de la mouise en Terminale, en première année de fac et vous êtes là depuis le CM1 pour les plus vieux. Rien à redire, vous le savez je vous aime, au prochain ricard bien tassé! A Prague, à Madrid, à la caja Madrid, à la boisson, à l'illicite, à la mer, au rap, au camping, au stade toulousain, au stade de France, à la calle sèche, chez tonton, au sein des seins, au bar basque, au Flowers, au cassoulet, vive EPICURE... et j'en oublie. Dr Meuh

Eve et Cazou,

Partager ma scolarité et plus encore à vos cotés est une expérience unique. Vous me manquez. Perfect Fume for ever !

Floriane,

La co-thésarde des DWCNTs coté environnement,

Bon, un congrès en Irlande et ca y est on se connaît. Une pensée à Loic, à la Smithwicks, à la Guinness et à Temple Bar. Une semaine sans manger et à se nourrir de bières... Spéciale dédicace à Polly M, hein Flo ! Ce congrès fut fantastique!

Môsieur Knauf qui n'a de Ronaldo que le maillot,

Merci pour tes précieux conseils et ton soutien au jour le jour. Le foot nous a réunis mais une réelle amitié est née entre nous. Sois assuré de ma gratitude man.

A mes amis précieux ou les gens de passage pour qui je n'ai malheureusement pas le temps de m'épancher par manque de place, Anne-Marie et Kevin, Clit, Enzo, Soline, Sylvianne, Rami, Agathe et Youssef (surnommé M hydrospeed), Fingo et sa droiture, Ncro et Neymo, mon cousin Franck, Laura B, Remi Planes... Sans vous la vie est clairement moins rigolote !

Enfin, une petite dédicace à Isabelle, Arnaud, Anna, Guillaume, Christelle (et son bout de chou), Celine, Emelyne, Vero, Romain : Ce fut pour moi une très bonne expérience, que je sais partagée. Je ne garde que des bons souvenirs.

*A Messieurs Lefte et M*****o*

SOMMAIRE

SOMMAIRE	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS	14
TABLE DES ABREVIATIONS	15
PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. La réaction inflammatoire	18
1. Les différentes phases de l'inflammation	19
a. La phase précoce	19
b. Recrutement de cellules immunitaires sur le site inflammatoire.....	20
c. Résolution de l'inflammation	21
2. Monocytes/macrophages	22
i. Origine	23
ii. Différenciation.....	23
iii. Polarisation des macrophages.....	25
a. Propriétés fonctionnelles.....	27
i. La phagocytose	28
• <i>Processus de la phagocytose et espèces réactives de l'oxygène</i>	29
ii. Chimiokines, cytokines, alarmines.....	30
• <i>Les chimiokines</i>	30
• <i>Les cytokines</i>	31
• <i>Alarmines</i>	33
iii. PRRs et propriétés fonctionnelles des macrophages	34
• <i>Les récepteurs Toll-Like ou TLRs</i>	35
• <i>Les récepteurs Lectine de type-C ou CLR</i> s.....	35
• <i>Les récepteurs éboueur ou scavengers</i>	36
• <i>Les Rig-like rceptors ou RLR</i> s.....	36
• <i>Les Nod-Like Receptors ou NLR</i> s	37
II. Les Inflammasomes	42
1. Les inflammasomes	42
a. Inflammasome AIM2	43
b. Inflammasome Nlrc4	43
c. Inflammasome Nlrp6.....	44
d. Inflammasome Nlrp1	44
2. L'inflammasome Nlrp3	45
a. La découverte de l'inflammasome Nalp3 (puis Nlrp3).....	45
b. Propriétés et activité de l'inflammasome Nlrp3	46
c. Mécanismes d'activation de l'inflammasome Nlrp3.....	47

i.	Hypothèse « Pores »	47
ii.	Hypothèse « Déstabilisation lysosomale »	48
iii.	Hypothèse « ROS »	51
iv.	Hypothèse « Potassium et Gonflement »	53
d.	Quelques mots sur la régulation de l'activité de l'inflammasome	55
i.	Régulation extrinsèque	56
ii.	Régulation intrinsèque	57
e.	Nlrp3 et physiopathologie : focus sur les monocytes et les macrophages	58
III.	Rôle de l'inflammasome Nlrp3 dans la réponse inflammatoire des Monocytes/Macrophages: cas des NanoTubes de Carbone (NTC) et de <i>Leishmania Infantum (L.i)</i>.....	60
1.	Monocytes/Macrophages et Nanotubes de Carbone	61
a.	Les particules	61
b.	Les Nanoparticules	62
i.	Des propriétés nouvelles	62
ii.	Impact des nanoparticules manufacturées dans la société	62
iii.	Les différents types de nanoparticules	64
c.	Cas des Nanotubes de Carbone	65
i.	Propriétés des NTCs	67
•	<i>Propriétés électriques</i>	67
•	<i>Propriétés mécaniques</i>	67
•	<i>Propriétés chimiques</i>	68
ii.	Applications	68
iii.	La réponse immunitaire aux NTCs : focus sur les macrophages.....	68
2.	Monocytes/Macrophages et <i>Leishmania infantum</i>.....	70
a.	Epidemiologie/Tableau clinique	70
b.	Les déterminants des formes cliniques de la leishmaniose	71
c.	Cycle de vie	71
d.	Réponse immune à la leishmania, focus sur les macrophages	74
i.	La reconnaissance par les cellules et les mécanismes microbicides.....	74
•	<i>La reconnaissance indirecte</i>	74
•	<i>La reconnaissance directe</i>	75
ii.	Les espèces radicalaires	77
iii.	Les cytokines et chimiokines	78
iv.	Autres cellules effectrices de la réaction immune à <i>Leishmania</i>	79
•	<i>Les Neutrophiles, le cheval de Troie</i>	79
•	<i>Les NKs et Lymphocytes</i>	79
3.	Objectifs de l'étude	80
	PARTIE 2: RESULTATS.....	81
I.	Travaux de Recherche.....	82

1. Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation	82
a. Introduction	83
b. Article	84
2. Divergent roles for C-type lectin receptors in the modulation of host cell response to <i>Leishmania infantum</i>	95
a. Introduction	95
b. Article	97
PARTIE3 : DISCUSSION	132
1. Importance des signaux de stress intracellulaires dans la réponse inflammatoire de l'inflammasome dans les monocytes/macrophages aux DWCNTs.....	133
2. Importance des signaux de dangers d'origine pathogénique dans l'élimination de <i>Leishmania infantum</i> : rôle primordial des récepteurs Lectine de type-C.....	141
PARTIE 4: REFERENCES.....	145

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1: Schéma simplifié de la phase précoce du processus inflammatoire suite à une infection ¹⁰.
- Figure 2: Origine et différenciation des monocytes/macrophages
- Figure 3: Hétérogénéité et Polarisation des macrophages
- Figure 4: Représentation schématique de la structure d'un TLR et du récepteur à l'IL-1. Modifié de ⁴⁷.
- Figure 5: Les pathologies associées aux NLRs et leurs localisations dans l'organisme ⁵⁰.
- Figure 6: Schéma non exhaustif des différents NLRs et de leurs structures ³⁵. Ici NALP=Nlrp et IPAF=Nlrc4.
- Figure 7: Mécanisme de formation de l'inflammasome Nlrp3. Adaptable aux autres inflammasomes.
- Figure 8: Schéma structural des différents inflammasomes et leurs domaines associés (tiré de ⁵⁶)
- Figure 9: Hypothèse « pores » pour l'activation de Nlrp3 selon Nunez.
- Figure 10: Hypothèse « déstabilisation lysosomale » pour l'activation de Nlrp3. A, le matériel est phagocyté. B, fusion du phagosome avec les lysosomes, altération membranaire par le matériel parasitaire. C, C', libération du contenu phagolysosomal dans le cytoplasme et activation par un mécanisme encore inconnu de l'inflammasome Nlrp3 D.
- Figure 11: Hypothèse « ROS » pour l'activation de Nlrp3. A, les multiples activateurs de Nlrp3 activent la NADPH oxydase ou altèrent l'intégrité mitochondriale. B, B', cela se traduit par la production de ROS et C, l'activation de l'inflammasome Nlrp3.
- Figure 12: Hypothèse « efflux de K⁺ et gonflement cellulaire » pour l'activation de Nlrp3. A, les activateurs de Nlrp3 induisent par un mécanisme encore inconnu un efflux de potassium cellulaire. B, La faible concentration en potassium intracellulaire est un signal activateur de Nlrp3.
- Figure 13: a, Régulation de l'expression de la pro-IL-1 β . Modèle à deux signaux (tiré de ⁹⁴). b, Régulation endogène de l'activation de Nlrp3.
- Figure 14: a, Voies d'exposition de l'homme aux nanoparticules (en rouge) et devenir dans le corps humain (bleu) (d'après ¹⁰⁶). b, Interactions particules/système immunitaire (tiré de ¹¹⁰).
- Figure 15: Représentations (a) d'un feuillet graphène; (b) d'un NTC monoparoi fermé par deux demi-fullerènes ; (c) du fullerène C60 ¹¹³.
- Figure 16: Représentations schématiques d'un nanotube de carbone (a) biparoi et (b) multiparoi (c) mono paroi.
- Figure 17: Les différentes espèces de *Leishmania* listées selon les manifestations cliniques majeures tiré de ¹²⁷.
- Figure 18: Les différents cycles de vie de *Leishmania*, tiré de ¹²⁷.
- Figure 19: Modèle d'activation de l'inflammasome Nlrp3 par les DWCNTs.

Tableau 1: Tableau récapitulatif des différents membres de la famille de l'IL-1 et leurs fonctions immunitaires connues ³².

Tableau 2: Principaux nanoparticules manufacturées ayant un intérêt commercial (d'après ¹⁰⁸).

Tableau 3: Liste non exhaustive des activateurs de l'inflammasome Nlrp3 ainsi que des mécanismes connus.

DL : Déstabilisation lysosomale. Vert, mécanisme consensuel. Rouge, contradiction entre les données de la littérature. Rien, mécanisme pas encore étudié ou réfuté.

TABLE DES ABREVIATIONS

3-MA	3-Methyladenine
AIM2	Absent in melanoma 2
ADN	Acide desoxyribonucléique
DHA	Acide Docosahaénoïque
EPA	Acide Ecosapentaénoïque
ATP	Adenosine tri-phosphate
ASC	Associtaed speck like protein containing a CARD
Bcl	B-cell lymphoma
BSA	Bovine serum albumine
COP	CARD-only proteins
CARD9	Caspase recruitment domaine 9
CCVD	Catalytic Chemical Vapour Deposition
CD	Cluster of differenciation
CIAS1	Cold induced autoinflammatory syndrome 1
CSF	Colony stimulating factor
CMH	Complex majeur d'histocompatibilité
CLR	C-type lectin receptor
DAMP	Damage associated molecular pattern
DD	Death fold domain
DPI	Diphenylene iodonium chloride
HSP	Heat shock protein
HMGB1	High mobility group box-1
IRAK1	IL-1 receptor associated kinase
ITAM	Immuno-receptor tyrosine based activation motif
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukine
<i>L.i</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LC	Leishmaniose cutanée
LV	Leishmaniose viscerale
LRR	Leucine rich repeat
LTB4	Leucotriene B4
LPS	Lippopolysaccharide
LDL	Low density lipoprotein
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein-1 β
MAM	Mitochondria associated ER membranes
MAP	Mitogen activated protein
MSU	Monosodium urate
MWs	Muckle Wells syndrome
MDP	Muramyl dipeptide
Myd88	Myeloïd differenciation factor
NAC	N-acétylcystéine

NACHT	NALP CIIA HET-E TP1
NTC	Nanotubes de carbon
DWCNTs	Double-Walled Carbon Nanotubes
NK	Natural killer
NADPH oxydase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase
Nlrc	Nod like receptor containing a CARD
Nlrp	Nod like receptor containing a PYRIN
NLR	Nod-like receptor
Nlrb	Nod-like receptors containing a BIR
Nlra	Nod-like receptors containing an AD (transactivator domain)
NF-κB	Nuclear factor κB
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PRR	Pattern reconition receptor
PGN	Peptidogycan
P2XR	Plurinergetic 2X receptor
PGE2	Prostaglandine E2
POP	PYRIN-only proteins
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RE	Reticulum endosplasmique
RLR	Rig-like receptor
Syk	Spleen tyrosine kinase
TXNIP	Thioredoxin-interacting protein
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TGF-β	Transforming growth factor β
TNF-α	Tumor necrosis factor α
KO	Knock out
LTA4H	Leukotriene A4 Hydrolase
<i>L.d</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L.m</i>	<i>Leishmania major</i>

PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. La réaction inflammatoire

L'inflammation est la réaction immunitaire la plus anciennement décrite. On retrouve des écrits de 1600 avant JC par les égyptiens. Aulus Cornelius Celsus en a posé les quatre symptômes cardinaux qui la caractérisent aujourd'hui : tumor (tuméfaction), dolor (douleur), calor (chaleur) et color (couleur) ¹⁻³. L'année 1794 vit la publication d'un livre de Hunter intitulé « *A treatise on the blood, inflammation and gun shot wounds* » ⁴. Ce fut le premier apport scientifique sur l'inflammation. Il s'agit de la première réaction immunitaire de l'organisme suite à un contact altérant son intégrité. Hunter souligne l'importance de l'inflammation dans l'élimination de l'infection mais suggère également qu'elle pourrait causer d'elle même des maladies.

L'inflammation est une réponse biologique complexe de type défense immunitaire coordonnée de l'organisme face à une agression par :

- un micro-organisme infectieux ou non
- une atteinte tissulaire et cellulaire d'origine physique ou chimique
- un agent endogène (protéines mutées, dysfonctionnement tissulaire...)

Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique. Elle conduit à l'élimination de l'élément causal et au retour à l'homéostasie du tissu lésé. Une inflammation inadéquate conduit à une mauvaise élimination des éléments causaux et au développement de pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le diabète mais également le cancer ¹⁻³. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme *via* la circulation sanguine. Elle peut alors provoquer des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés. Par exemple une infection mal maîtrisée entraîne un choc septique se traduisant dans les cas les plus graves par le décès ¹⁻³. Le but de la réponse inflammatoire est donc d'être une réponse rapide et organisée afin de réparer les atteintes, tout en assurant l'intégrité du reste de l'organisme.

L'inflammation est principalement associée au système immunitaire, qui peut-être divisé en deux branches interconnectées. L'immunité innée, qui est la plus ancienne, et l'immunité adaptative. L'immunité innée est présente chez tout organisme pluricellulaire. Elle constitue la base cellulaire et moléculaire de l'inflammation. Les cellules du système immunitaire inné possèdent des récepteurs ; les PRRs (Pattern Recognition Receptors) et des voies de signalisation associées,

tous hautement conservés afin de détecter et réagir face à une infection ou à une blessure ⁵. La détection de ces signaux exogènes d'origine microbienne, les PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) ou d'origine particulaire, chimiques ou endogènes, les DAMPs (Damage associated molecular patterns), va conduire à l'initiation de la cascade inflammatoire et à l'activation d'une réponse immunitaire ^{11-3,6}. Classiquement, la réponse inflammatoire est décrite selon quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site inflammatoire, l'élimination de l'élément inflammatoire et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé ¹.

En absence de résolution, une inflammation chronique s'installe qui peut conduire à l'apparition de maladies inflammatoires et de cancers ¹⁻³.

1. Les différentes phases de l'inflammation

a. La phase précoce

Quelle que soit son origine, l'initiation de l'inflammation passe principalement par l'implication de molécules liées à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, conduisant à l'augmentation de protéines pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines...) ¹⁻³. Depuis quelques années, des travaux ont mis en évidence que la maturation des nombreux médiateurs pro-inflammatoires ne se limitait pas seulement à NF- κ B et ses co-facteurs mais aussi à l'activation des caspases inflammatoires ^{2,7}. Les mastocytes et les phagocytes résidents (macrophages et cellules dendritiques) jouent un rôle prépondérant dans l'initiation de la réaction inflammatoire en sécrétant du TNF α , de l'IL-1 β , de l'histamine ou des lipides bioactifs comme les prostaglandines et des leucotriènes ³. Ces molécules vont avoir des actions sur les nombreux types cellulaires immunitaires infiltrant le tissu endommagé. Ainsi, l'histamine, les prostaglandines et l'IL-1 β favorisent la vasodilatation et l'extravasation des neutrophiles et des monocytes, alors que le TNF- α permet la dégranulation des neutrophiles et augmente leur capacité à sécréter des protéases, des peptides antimicrobiens et des espèces oxygénées réactives (ROS pour Reactive oxygen species) ^{3,8,9}.

Les phagocytes sécrètent également des cytokines et des chimiokines, amplifiant la réponse inflammatoire et permettant le recrutement, puis l'activation des lymphocytes ^{1,2}.

b. Recrutement de cellules immunitaires sur le site inflammatoire

La réponse inflammatoire va conduire à l'élimination des agents causaux, grâce à la coopération entre système immunitaire inné et adaptatif. La réponse immunitaire adaptative ne sera pas abordé en détail dans ce manuscrit ayant privilégié le rôle de l'immunité innée au cours de ce travail de thèse.

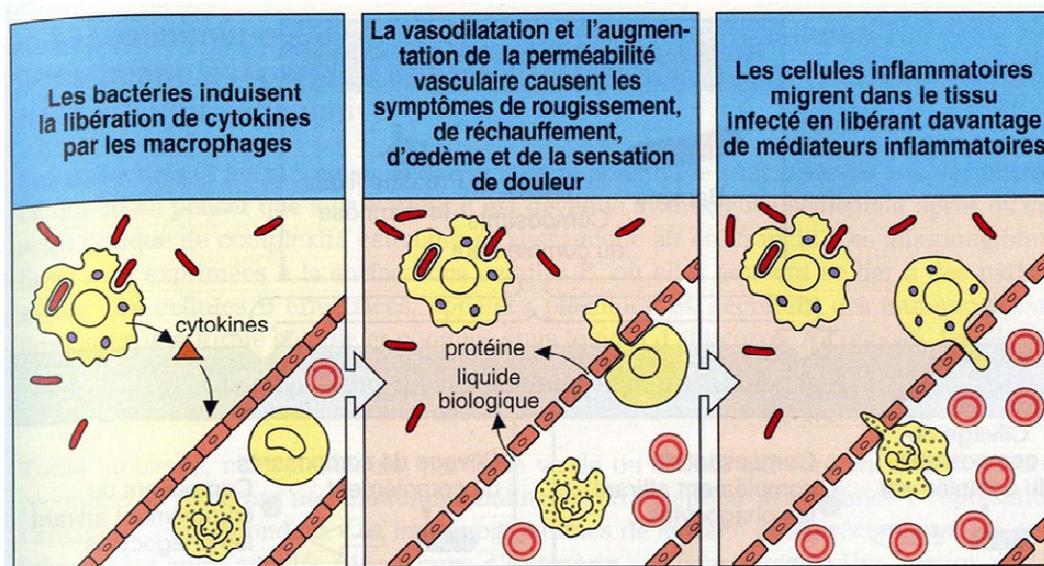


Figure 1: Schéma simplifié de la phase précoce du processus inflammatoire suite à une infection ¹⁰.

Les cytokines et autres facteurs pro-inflammatoires sécrétés suite à la reconnaissance des signaux de danger vont favoriser la vasodilatation et l'extravasation ¹⁻³. Les cytokines, telles le TNF- α et l'IL-1 β ainsi que des médiateurs lipidiques vont conduire à la migration de leucocytes sur le site d'infection, en particulier des neutrophiles puis des monocytes ¹⁻³. Les cellules recrutées les premières et en plus grandes quantités sont les polynucléaires neutrophiles alors que les monocytes/macrophages sont présents plus tardivement. Ces cellules phagocytent les agents inflammatoires qu'ils soient endo- ou exogènes ce qui permet par la suite leur élimination ^{11,12}.

De plus, les neutrophiles sont armés d'une batterie de protéines facilitant la défense de l'organisme, notamment des protéases capables de dégrader les organismes microbiens mais également le tissu hôte ^{1-3,9}. Ces cellules produisent également des

espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces réactives de l'azote (RNS pour reactive nitrogen species) qui participent à la dénaturation des protéines et de l'ADN ¹³.

Les macrophages contribuent grandement à l'élimination des pathogènes via la phagocytose et la sécrétion de protéases, de peptides antimicrobiens, de ROS et de RNS ¹⁴. Le large panel de sécrétion cytokinique, chimiokinique et lipidique des macrophages est également grandement impliqué dans la polarisation de la réponse immunitaire innée et adaptative ¹⁵. Les cellules épithéliales ainsi que les keratinocytes sont également capables de sécréter des peptides antimicrobiens (β -défensines) et forment également une ligne de défense physique face aux agents inflammatoires ^{1-3,9}.

La persistance d'un signal de danger sur le site inflammatoire va conduire à la mise en place d'une réponse spécifique médiée par le système immunitaire adaptatif grâce au recrutement des lymphocytes ¹⁶.

En plus de leur aptitude à sécréter des médiateurs pro-inflammatoires, la reconnaissance des PAMPs par les macrophages et les cellules dendritiques augmentent leur capacité à présenter l'antigène (Ag) aux lymphocytes T. En réponse à une stimulation antigénique, les cellules T naïves prolifèrent et se différencient en cellules T effectrices qui se distinguent par leur production de cytokines et leurs fonctions associées ¹⁷.

c. Résolution de l'inflammation

Comme nous l'avons évoqué précédemment, une réponse inflammatoire non régulée peut conduire à sa pérennisation et à des lésions tissulaires généralisées dans l'organisme, ou encore entraîner un choc septique.

De sa résolution dépend la réussite de la réaction inflammatoire. Celle-ci implique ce que nous appellerons ici les signaux de « tolérance et de réparation » produits par les cellules de l'immunité entre autres. Ainsi, les macrophages jouent un rôle prépondérant dans la résolution de l'inflammation et le retour à l'homéostasie.

Ces signaux, anti-inflammatoires, sont produits pour conduire à la résolution de l'inflammation ¹⁸. Les lipides bioactifs, telles les lipoxines, générées par les lipoxigénases à partir de l'acide arachidonique ont un rôle essentiel dans la

promotion de la résolution du processus inflammatoire et de la réparation tissulaire^{19,20}. Les lipoxines, sécrétées par les macrophages, stoppent l'influx des neutrophiles, facilitent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et facilitent le recrutement de monocytes afin d'éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires^{19,20}. Les protectines et les résolvines, lipides produits à partir de DHA (Acide Docosahénoïque) et EPA (Acide Ecosapentaénoïque), ont été récemment caractérisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires^{19,20}. Les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales libèrent également des inhibiteurs de protéases qui inactivent ainsi les protéases sécrétées par les neutrophiles lors de la phase aiguë de la réponse inflammatoire²¹. De plus, les neutrophiles rentrent ensuite en apoptose et sont phagocytés par les macrophages induisant un vaste programme d'élimination cellulaire ainsi qu'une sécrétion par les macrophages de TGF- β et d'IL-10 favorisant l'arrêt de la réponse inflammatoire^{11,12}

En résumé, initiation (signaux de « dangers ») et arrêt de l'inflammation (signaux de « tolérance et de réparation ») constituent les piliers de la réussite de la réaction inflammatoire et du retour à l'homéostasie tissulaire. Les macrophages de part leur grande capacité d'adaptation due à leur diversité phénotypique et fonctionnelle jouent un rôle prépondérant lors de ces processus.

Ce modèle cellulaire a été notre modèle d'étude au cours des travaux de thèse.

2. Monocytes/macrophages

Elie Metchnikoff mis en évidence la fonction phagocytaire des macrophages. Il nomma ainsi ces cellules les phagocytes en 1883. Malgré de nombreuses années où leur étude a été limitée par un manque d'enthousiasme dû à la découverte de l'immunité à médiation humorale (anticorps), les macrophages sont aujourd'hui décrits pour être des cellules clé de la réponse immunitaire et inflammatoire.

i. Origine

Les monocytes/ macrophages appartiennent au système des phagocytes mononucléés. Leur développement a lieu à partir de la moelle osseuse hématopoïétique. Ainsi, les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes vont se différencier en deux lignages cellulaires, le lignage myéloïde et le lignage lymphoïde. La différenciation des monocytes au niveau de la moelle osseuse (lignage myéloïde) est liée au facteur de croissance CSF-1 (M-CSF, Macrophage Colony Stimulating Factor) reconnu par le récepteur au CFS-1 fortement exprimé par les précurseurs des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques²². Une fois différenciés, les monocytes rejoignent la circulation sanguine où ils représentent environ 10% des leucocytes du sang circulant chez l'Homme avec une demi-vie de 2 à 3 jours en conditions physiologiques²². La pénétration des monocytes sanguins dans les tissus conditionne leur différenciation en macrophages résidents ou en cellules dendritiques sous l'effet de facteurs endogènes²³. Les macrophages sont des cellules hétérogènes, du fait des mécanismes qui gouvernent leur différenciation, mais aussi du fait de leur distribution dans les tissus et leur capacité de réponse à un stimulus^{22,23}. Chaque organe ou tissu possède des macrophages qui présentent des caractéristiques propres dictées par leur microenvironnement particulier. On distinguera par exemple, dans les poumons, les macrophages alvéolaires, les cellules de Kupffer dans le foie, les cellules de Langherans dans la peau, les ostéoclastes dans l'os ou bien les cellules microgliales au niveau du système nerveux central. La figure 2 résume les étapes d'obtention de ces cellules à partir d'un progéniteur myéloïde.

ii. Différenciation

Les macrophages se distinguent des monocytes non seulement de part leur localisation, tissulaire plutôt que sanguine, mais aussi du fait de leur grande taille et de leur système vacuolaire extrêmement développé et varié (endosomes, phagosomes, lysosomes primaires et secondaires, endosomes, phagolysosomes etc...). La propriété fondamentale des macrophages, outre la phagocytose découverte en premier, est de garantir l'homéostasie tissulaire, à travers sa capacité à moduler l'initiation et l'arrêt de la réponse inflammatoire selon les besoins de

l'organisme et à orienter la réponse immune. Pour cela les macrophages présentent une multitude de fonctions. Ils sont caractérisés par leur grande mobilité, leur fort pouvoir de phagocytose, leur capacité sécrétrice, et aussi par leur capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes T via les CMH de classe I et II. Les macrophages sont capables de sécréter les fractions du complément, les cytokines, les chimiokines, les facteurs hématopoïétiques, les prostaglandines, les radicaux libres... Ainsi, chaque propriété fonctionnelle permet au macrophage de répondre de manière spécifique et adapté en fonction des signaux auxquels il sera soumis dans son microenvironnement. Par exemple les macrophages alvéolaires expriment un large panel de récepteurs capables de reconnaître les motifs conservés des microorganismes ce qui leur permet une élimination efficace des microorganismes, et des particules présents dans les alvéoles pulmonaires. De manière intéressante, les ostéoclastes, macrophages du tissu osseux ont un rôle de remodelage de l'os *via* de très grandes capacités phagocytiques et sécrétrices d'enzyme lytiques. Ils participent ainsi activement au renouvellement de l'os.

De manière générale, les signaux responsables des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles que les macrophages acquièrent spécifiquement dans les tissus sont issus de molécules sécrétés ou exprimées par les cellules de leur environnement tissulaire et des composés de la matrice extracellulaire. Ainsi, les molécules d'adhésion (intégrines, molécules de la famille des immunoglobulines, sélectines etc...) exprimées localement par les cellules endothéliales non seulement contrôlent la migration des monocytes à travers l'endothélium, vasculaire mais aussi leur différenciation en macrophages. Il en est de même des cytokines et facteurs de croissance comme le Transforming growth factor β (TGF β), et des chimiokines. Aujourd'hui, il est admis qu'il existe plusieurs populations de monocytes ayant des propriétés fonctionnelles différentes (monocytes résidents, monocytes inflammatoires, monocytes patrouilleurs). Ces monocytes qui sont spécifiquement recrutés au niveau d'un tissu sont à l'origine de macrophages tissulaires ayant des caractéristiques fonctionnelles prédéfinies par le type de monocytes dont ils proviennent.

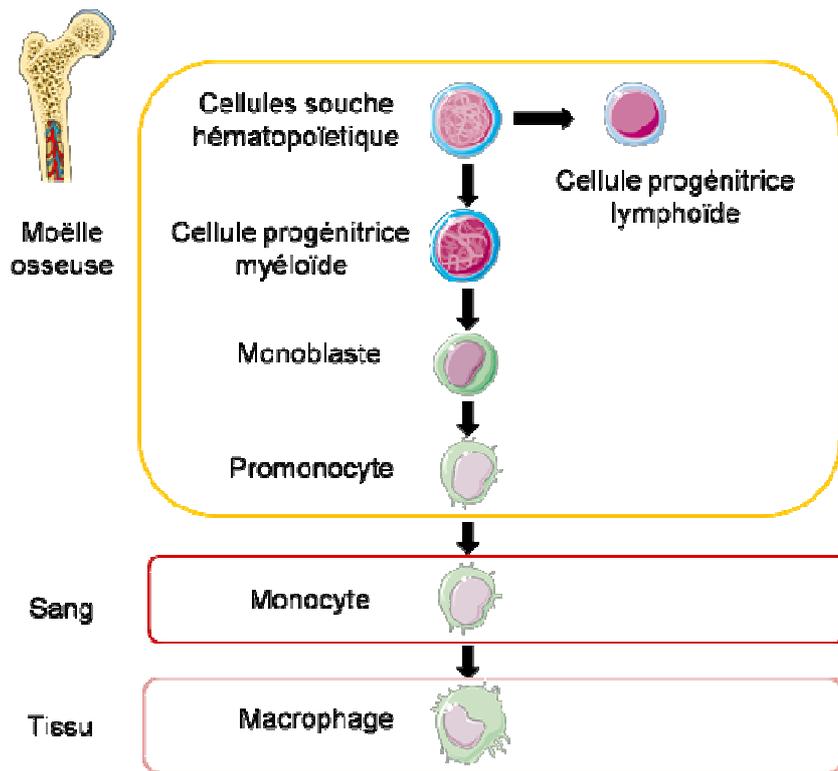


Figure 2: Origine et différenciation des monocytes/macrophages

iii. Polarisation des macrophages

Les fonctions effectrices des monocytes/macrophages sont étroitement liées à leur état d'activation, lui-même influencé par l'environnement cellulaire et moléculaire. Ces cellules, par leur plasticité fonctionnelle et phénotypique répondent aux différents signaux micro-environnementaux (cytokiniques, signaux de dangers...) en se polarisant. Les fonctions effectrices des monocytes/macrophages sont étroitement liées à leur état d'activation, lui-même influencé par l'environnement cellulaire et moléculaire. Les premiers travaux sur l'étude de la polarisation des monocytes/macrophages datent des années 70. Les premiers auteurs abordant ce problème ont mis en évidence que les macrophages exposés à deux signaux successifs, une cytokine, l'interféron- γ (INF- γ) ou le TNF- α et le LPS, composant de la membrane bactérienne, devenaient pro-inflammatoires^{15,24}. Les auteurs classeront ces macrophages comme faisant partie de la voie « classique d'activation » renommée plus tard M1 en référence à la nomenclature Th1/Th2 existante pour les lymphocytes T. Par opposition, tous les macrophages activés par une voie différente de la « voie classique » étaient par extension associés à la « voie alternative » plus

tard renommés M2. En 2003, dans un effort de synthèse et de mise à jour, l'équipe de Gordon crée la classification de la polarisation des macrophages sur le modèle Th1/Th2²⁴. Macrophages M1 et M2 sont classés selon leurs niveaux d'expression de récepteurs (membranaires et intracellulaires) mais aussi en fonction de leur production de médiateurs (cytokines, lipides bioactifs, chimiokines, ROS...). Les données de la littérature ont depuis permis d'affiner la notion de polarisation. En effet, on ne parle plus de dichotomie M1/M2. La polarisation M1/M2 se définit plutôt comme un continuum d'états fonctionnels avec un panel d'expression de récepteurs (PRRs entre autres) et de fonctions. Les macrophages peuvent ainsi être dans un premier temps M1 et initiateurs de la réponse inflammatoire et participer à sa résolution dans un second temps. Mosser et Edwards ont ainsi, en 2008, proposé une nouvelle classification basée sur les propriétés fonctionnelles des macrophages dans le maintien de l'homéostasie^{15,16,24,25}.

Actuellement selon la nomenclature M2 affinée par Mantovani et al on distingue outre les macrophages M1 inflammatoires « stricts » (Th1), les macrophages M2a résultant d'une exposition à l'IL-4 ou à l'IL-13 (Figure 3) qui sont impliqués dans la polarisation inflammatoire de type 2 (Th2/Th17), les macrophages M2b « immunorégulateurs » de l'inflammation de type 2 et les macrophages M2c « réparateurs » des tissus endommagés^{24,25,26}. Bien sûr, chaque polarisation n'est pas un état figé et l'expression des différents marqueurs est souvent soumise à l'environnement cellulaire et soluble des macrophages.

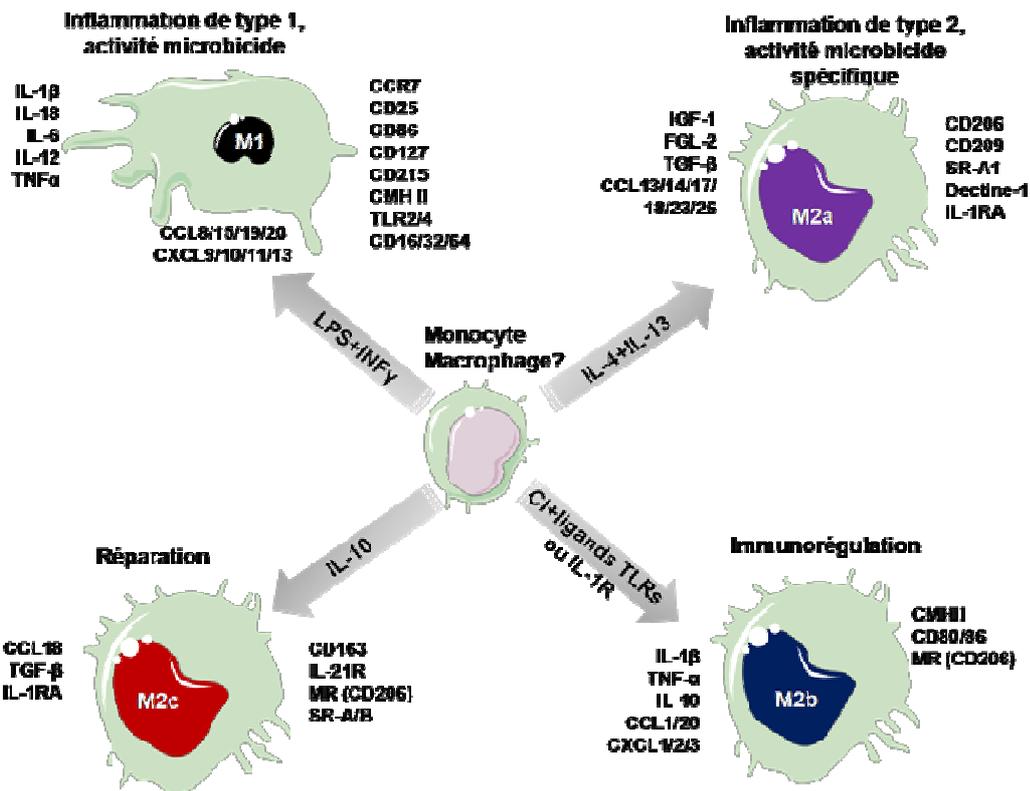


Figure 3: Hétérogénéité et Polarisation des macrophages

a. Propriétés fonctionnelles

Les macrophages sont des sentinelles dont la fonction première est de reconnaître différents « signaux de dangers » issus de microorganismes (motifs conservés, acides nucléiques...), de tissus lésés anormalement (mort cellulaire non physiologique) ou d'éléments exogènes (particules, nanoparticules, détergents, molécules toxiques...) ^{27,28}. La notion de signal de danger développé par Polly Matzinger 1994 dans sa « théorie du danger » complète le paradigme de Janeway sur la discrimination par le système immunitaire du soi et du non soi ^{6,29}. Le non soi est combattu, éliminé alors que le soi est préservé. Cette théorie exclue l'auto-immunité, la puberté, étape où notre corps et notre soi évolue, ou encore la tolérance au fœtus. C'est dans ce contexte que la théorie du danger englobe ces mécanismes immunitaires et introduit la notion selon laquelle les cellules réagissent lorsqu'elles sont stressées, altérées de manière non physiologique en libérant des molécules de danger et activant ainsi le système immunitaire. Ainsi, dans ce système, le caractère étranger d'un pathogène n'est plus une caractéristique indispensable quant à

l'émission d'une réponse et une composante du soi n'est plus une garantie de tolérance.

Les signaux de dangers sont reconnus par les macrophages grâce à l'expression d'un grand nombre de récepteurs de surface, endosomaux et cytoplasmiques. Cette reconnaissance entraîne l'activation des fonctions effectrices des macrophages via la production de cytokines, chimiokines et d'autres médiateurs nécessaires à la coordination d'une réponse inflammatoire. De cette première étape dépend également la coordination des réponses immunes innée et adaptative afin d'obtenir la clairance des signaux de dangers tout en limitant les effets toxiques de la réponse inflammatoire et les dommages tissulaires qui lui sont associés.

i. La phagocytose

La phagocytose est une fonction clé des macrophages. Elle permet l'élimination des microorganismes pathogènes, des cellules sénescents, des débris cellulaires et des particules environnementales ou manufacturées. Elle est donc nécessaire dans la défense immunitaire innée et adaptative anti infectieuse mais également dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

En effet, le processus de phagocytose est nécessaire à l'organogenèse, le remodelage et l'homéostasie tissulaire avec la phagocytose des cellules et des débris apoptotiques. Les cellules sénescents disparaissent selon un processus de mort naturelle, l'apoptose. Ces corps apoptotiques sont phagocytés par les macrophages mais également des phagocytes dits « non professionnels » telles que les cellules épithéliales. Ce processus ne s'accompagne pas d'une production de médiateurs inflammatoires mais est associé à la production de TGF- β due à la reconnaissance de résidus phosphatidyl-serine par des récepteurs de surface des macrophages³⁰. Ce type de phagocytose ne provoque donc pas d'inflammation et permet le renouvellement cellulaire et moléculaire dans les tissus.

En tant que processus immunitaire, la phagocytose est une fonction spécifique des phagocytes « professionnels » que sont les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et les neutrophiles. Cette fonction correspond à la capture, l'ingestion, la dégradation des pathogènes et est associée à la présentation antigénique. La reconnaissance des motifs par les récepteurs de phagocytose se fait par

reconnaissance directe de motifs antigéniques ou indirectement via la reconnaissance d'opsonines (complément, fragments d'immunoglobulines) à la surface du motif antigénique³⁰.

Au-delà du processus de phagocytose en lui-même, cette fonction est un point commun à tous les états de polarisation des macrophages. Le panel de récepteurs qu'ils exprimeront conditionnera le type de ligand qu'ils seront amenés à reconnaître *via* les récepteurs de phagocytose. Il est important de noter que la qualité de la réponse qui s'ensuit est conditionnée par l'expression des récepteurs de phagocytose.

- ***Processus de la phagocytose et espèces réactives de l'oxygène***

La phagocytose se découple en trois phases : reconnaissance, internalisation et dégradation. La reconnaissance des structures d'intérêt par le récepteur déclenche un réarrangement du réseau d'actine ce qui conduit à l'invagination de la membrane plasmique. Les mouvements d'actine filamentaire sous-membranaire conduisent à la formation d'une vésicule entourée de membrane plasmique autour de la structure à internaliser ; c'est le phagosome. La formation du phagosome nécessite la fusion de la membrane plasmique avec de nombreuses vésicules issues d'organelles intracellulaires. La seconde étape commence par la fermeture du phagosome et consiste en sa maturation. Ce processus est lié à sa fusion avec de nombreuses vésicules intracellulaires chargées en enzymes (endosomes, lysosomes...). On mesure la maturation du phagosome grâce à son acidification (pH proche de 4-5) suite à sa fusion avec les lysosomes ; c'est le phagolysosome, qui par son pH acide permet l'activation d'enzymes lysosomiales nécessaires à la dégradation des éléments ingérés³¹. La phagocytose s'accompagne, le plus souvent, d'une hyperactivité oxydative. Les espèces réactives de l'oxygène sont produites au niveau des membranes suite à l'activation de la NADPH oxydase, qui transfère des électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire pour produire l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cet agent oxydant constitue un substrat de choix pour la génération de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2). Dans une réaction catalysée par la myéloperoxydase, l' H_2O_2 sert de substrat à la production de puissants agents oxydants comme le HOCl. Ces espèces se retrouvent en forte concentration dans le phagosome et exercent des

effets cytotoxiques sur les éléments phagocytés. De plus, certains types de macrophages ont la capacité après induction d'une NO synthase (NOS) de produire des dérivés nitrés comme le monoxyde d'azote (NO \cdot), par oxydation des noyaux azotés de la L-arginine. Le NO \cdot Est lui aussi un précurseur d'espèces très réactives comme les péroxynitrites (ONOO \cdot). Nous reviendrons plus en détail sur les différentes sources cellulaires de ROS indépendantes du processus de phagocytose^{11,13}.

Enfin, l'apprêtement de peptides pour la présentation antigénique à la surface des macrophages a lieu au cours de l'étape de dégradation de la particule ingérée. Les peptides dégradés sont alors chargés sur les molécules de CMH de classe II et ré adressées à la membrane permettant leur reconnaissance par les Lymphocytes T CD4 et le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique.

ii. **Chimiokines, cytokines, alarmines**

La production de chimiokines et de cytokines est intimement liée à la différenciation, au type d'activation des monocytes et des macrophages ainsi qu'à la polarisation de la réponse immune dans son ensemble.

Ces médiateurs contribuent au dialogue entre les lymphocytes T et les monocytes/macrophages qui permet à la réponse inflammatoire d'évoluer dans le temps, de modifier le panel de cellules recrutées ainsi que leur répertoire fonctionnel.

• **Les chimiokines**

Le chimiotactisme est un processus essentiel quant au recrutement des effecteurs cellulaires sur le site inflammatoire. En effet, ceux-ci participent activement au maintien de la réaction inflammatoire ou à sa résolution. Outre certains lipides bioactifs (LTB₄, LTA₄), chimiotactiques pour les neutrophiles, les chimiokines (petits peptides de 8-14 kDa) sont les principales molécules permettant de recruter les cellules intervenant dans l'inflammation et la défense immune de l'hôte. Elles se définissent par leur faible poids moléculaire et leur pouvoir chimioattractant spécifique de certains types cellulaires. Ces cytokines chimioattractantes sont reconnues par des récepteurs couplés à des protéines G. Leur nomenclature est

basée sur des caractéristiques spécifiques de leur structure. En effet, ces molécules possèdent quatre résidus cystéines conservés qui, en fonction de leur position, ont permis de définir quatre sous familles : CXC, CC, C et CX3C. Plus de 40 chimiokines ont été identifiées à ce jour³². Les chimiokines permettent un recrutement sélectif des lymphocytes T et de cellules effectrices impliquées spécifiquement dans les réponses immunes de type 1 et de type 2, ces cellules présentant des répertoires de récepteurs aux chimiokines distincts. Les chimiokines impliquées dans le recrutement de lymphocytes T sont essentiellement sécrétées par les monocytes et macrophages et les cellules stromales³². Quoi qu'il en soit, la régulation de la production de chimiokines et de leurs récepteurs s'avère être un élément clef dans le recrutement spécifique de populations cellulaires utiles à la modulation de la réponse inflammatoire. Les autres molécules de la grande famille des cytokines citées précédemment jouent également un rôle prépondérant dans la production des chimiokines et dans la régulation de l'expression de leurs récepteurs à la surface des cellules immunitaires.

- ***Les cytokines***

Le comportement des monocytes/macrophages est étroitement lié à leur environnement cytokinique. En effet, ces molécules constituent des signaux majeurs de différenciation des monocytes et macrophages en induisant la transcription et l'expression de nombreux gènes. Le nombre très important de cytokines et de leurs fonctions associées ne permet pas de dresser une liste complète de ces médiateurs. En effet, on compte, pour la seule famille des interleukines, pas moins de 35 cytokines différentes. Les monocytes/macrophages produisent des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β et IL-18), IL-6 et IL-12 suite à la reconnaissance d'un élément potentiellement dangereux pour l'organisme par les PRRs³³. Le TNF- α principalement produit par les monocytes/macrophages, initie la production d'une cascade de cytokines qui vont favoriser la mise en place de la réponse inflammatoire³⁴. Ces cellules produisent aussi de l'IL-12 et de l'IL-18 en grandes quantités. Ces deux cytokines agissent de façon synergique pour renforcer la polarisation lymphocytaire Th1. Très récemment, la sécrétion des cytokines inflammatoires de la famille de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β et IL-18)

a été associée à l'activation d'un complexe protéique majeur dans le développement de la réponse inflammatoire : l'inflammasome^{35,36}. Ainsi, l'activation de ce complexe permet une réponse très rapide en cytokines inflammatoires ne nécessitant pas de régulation transcriptionnelle directe. La sécrétion des cytokines de la famille de l'IL-1 est indispensable à la mise en place de la réaction inflammatoire via l'activation et le recrutement de nombreux effecteurs cellulaires et la production de nombreux médiateurs solubles^{35,36}. L'importance de ces cytokines dans le processus inflammatoire est telle qu'une mauvaise régulation de la sécrétion de ces médiateurs est à l'origine de nombreuses maladies inflammatoires, d'origine génétique (Syndrome de Muckle Wells, MW...), auto-immune (goutte et pseudo-goutte...) ou environnementales (allergies, asbestose, silicose)^{7,37-40}. Nous reviendrons plus en détail sur les modes d'activation de la sécrétion de ces cytokines par le complexe inflammasome dans l'initiation et le développement de la réaction inflammatoire. Outre la production de cytokines à visée inflammatoire, les macrophages produisent également de l'IL-10, cytokine inhibant la production d'interféron gamma et d'IL-2, deux cytokines pro-inflammatoires produites par les Lymphocytes Th1⁴¹. Elle agit également négativement sur la production de TNF- α par les macrophages. Le TGF- β , produit par les monocytes et les macrophages, permet également de limiter la réponse inflammatoire.

Cytokine	Other names	Systematic name	Immunological function
IL-1 α	IL-1 and leucocyte activating factor (LAF) (both collectively with IL-1 β)	IL-1F1	IL-1RI agonist with proinflammatory action but mainly acts as an intracellular transcriptional regulator
IL-1 β	IL-1 and leucocyte activating factor (LAF) (both collectively with IL-1 α)	IL-1F2	Acts synergistically with TNF- α , activates proinflammatory responses in a wide range of cells, increases expression of adhesion molecules in endothelial cells and promotes diapedesis and the acute phase response
IL-1Ra		IL-1F3	IL-1RI antagonist, prevents IL-1-dependent signalling
IL-18	IFN- γ inducing factor (IGIF), IL-1 γ	IL-1F4	Induces IFN- γ production from T lymphocytes and NK cells and acts synergistically with IL-12 to promote the Th1 response
IL-1F5	IL-1Hy1, FIL1 δ , IL-1L1, IL-1 δ , IL-1H3, IL-1RP3	IL-1F5	Possible IL-1Rrp2 receptor antagonist
IL-1F6	FIL1 ϵ	IL-1F6	Agonist via the IL-1Rrp2 receptor. Increases IL-6, IL-8 production in epithelial cells
IL-1F7	FIL1 ζ , IL-1H4, IL-1RP1, IL-1H1	IL-1F7	Interacts with IL-18 binding protein to reduce IL-18 activity
IL-1F8	FIL-1 η , IL-1H2	IL-1F8	Agonist via the IL-1Rrp2 receptor. Increases IL-6, IL-8 production in epithelial cells. Also up-regulates IL-6 and IL-8 production in chondrocytes and synovial fibroblasts
IL-1F9	IL-1H1, IL-1RP2, IL-1 ϵ	IL-1F9	Agonist via the IL-1Rrp2 receptor. Increases IL-6, IL-8 production in epithelial cells
IL-1F10	IL-1Hy2, FKSG75	IL-1F10	Binds soluble IL-1RI, function unknown
IL-33	NF-HEV	IL-1F11	ST2 receptor agonist. Induces Th2 cytokine expression. Intracellular transcriptional regulator in endothelial cells

Tableau 1: Tableau récapitulatif des différents membres de la famille de l'IL-1 et leurs fonctions immunitaires connues ³³.

- **Alarmines**

Nouvelle catégorie de molécules de la communication inter et intracellulaire récemment découverte. Selon les définitions actuelles, les alarmines ou DAMPs constitueraient l'équivalent cellulaire des PAMPs. Leur classification n'est pas encore bien définie ⁴². Certains proposent de considérer les alarmines comme étant des signaux d'origine aseptiques et les PAMPs des signaux d'origine septiques. Il s'agirait le plus souvent de molécules qui peuvent être sécrétées (notamment par les cellules de l'immunité) en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, ou libérées passivement par les cellules stressées ou altérées de manière non physiologique. Les alarmines permettent le recrutement de cellules immunitaires exprimant les PRRs, notamment des cellules dendritiques, et favorisent ainsi indirectement la réponse immunitaire adaptative. Enfin, elles participent au retour à l'homéostasie en promouvant la reconstruction du tissu lésé ⁴². A ce titre, les macrophages n'échappent pas à ces processus et se retrouvent être de fort producteurs d'alarmines. Certaines cytokines comme l'interleukine IL-1 β et dans une certaine mesure l'IL-33, des protéines de choc thermique (HSP70/90), les défensines

ou bien encore l'acide urique sont des molécules se comportant comme des alarmines. La protéine HMGB1 (High Mobility Group Box-1), une protéine dont le statut n'a cessé de changer depuis sa découverte, dans les années 70 est à ce jour l'alarmine la plus étudiée pour son rôle dans la signalisation immunitaire ^{27,42}.

iii. PRRs et propriétés fonctionnelles des macrophages

La réponse immunitaire innée repose sur la reconnaissance de molécules de danger associées aux microorganismes ou aux particules et autres éléments toxiques, les PAMPs ou de molécules du soi libérées par les cellules des tissus altérés, les DAMPs. Parmi les motifs les plus conservés et reconnus par les macrophages, on distinguera les composants de la paroi des champignons (β -glucanes, mannanes) ou encore le LPS (LipoPolySaccharide), composant des membranes bactériennes Gram négatives ^{1,3,5}. Cela ne s'arrête pas à la reconnaissance des motifs pathogénique. En effet ces récepteurs reconnaissent aussi des molécules du soi dites molécules de danger. Pour ne citer qu'elle, HMGB1 est une alarmine sécrété lors d'altération non physiologique des cellules ^{42,43}. La reconnaissance de ces motifs par les phagocytes est médiée par les PRRs. Les PRRs regroupent plusieurs familles de récepteurs notamment les TLRs (Toll-like Receptors), CLR (C-type Lectin Receptors), les récepteurs scavengers mais aussi les RLRs (Rig-Like Receptors) et les NLRs (Nod-Like Receptors) ^{44,45}. De manière générale, les différents sous type de monocytes et de macrophages peuvent être caractérisés par le répertoire d'expression des PRRs reconnaissant les différents motifs ⁴⁴. Les PRRs peuvent être membranaires de surface ou de compartiments intracellulaires ainsi que cytoplasmiques. De leur localisation dépendra en partie leur fonction et leur spécificité de reconnaissance. Les récepteurs membranaires de surface interviennent dans la phagocytose des éléments particuliers ou non et/ou le déclenchement des voies de signalisation qui vont orienter la réponse fonctionnelle des monocytes macrophages ⁴⁴. Les récepteurs intracellulaires interviennent dans la reconnaissance des éléments intracellulaires ayants pénétrés de façon indépendante de la phagocytose ou libérés dans la cellule.

- **Les récepteurs Toll-Like ou TLRs**

Les TLRs reconnaissent des PAMPs et des DAMPs et regroupent plus de 12 protéines différentes. Ainsi les TLR4 reconnaît le LPS, mais aussi l'alarmine HMGB1²⁷. Le TLR2 lui reconnaît les lipopéptides, les lipoarabinomannanes, les lipomannanes, les acides téichoïques, les glycoprotéines mais aussi la molécule d'alarme endogène, l'acide urique^{46,47}... Le TLR3 reconnaît les ARNs doubles brins. Après engagement, les TLRs initient la voie de signalisation grâce à leur domaine TIR (Toll/IL-1 receptor) intracytoplasmique. A l'exception du TLR3, tous les TLRs recrutent via les domaines TIR des molécules adaptatrices nécessaires à la signalisation Myd88 (Myeloid differentiation factor 88), IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase) aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB et des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases⁴⁸. La réponse inflammatoire déclenchée par les TLRs dépend des TLRs engagés et des molécules adaptatrices recrutées.

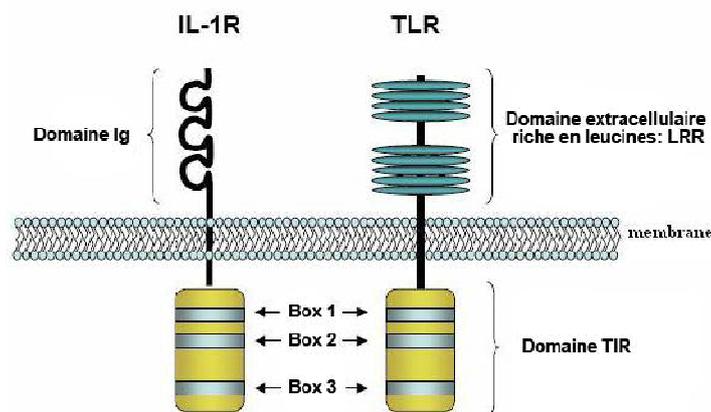


Figure 4: Représentation schématique de la structure d'un TLR et du récepteur à l'IL-1. Modifié de⁴⁸.

- **Les récepteurs Lectine de type-C ou CLR**

Les CLR sont une superfamille de récepteurs possédant un plusieurs domaines lectine de type-C (CTLDs) subdivisés en plusieurs sous groupes. Bien initialement décrits pour leur activité dépendante du calcium, de nombreux CLR ne nécessitent pas de calcium pour fonctionner. Certains de ces récepteurs (Mannose, Dectine-1) participent activement à la défense antifongique⁴⁹. Les réponses

cellulaires induites par les liaisons de ligands semblent dépendre de l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui conditionne la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , IL-8 ou IL-1 β . Par exemple, le récepteur Dectine-1 reconnaît les motifs carbohydrates *via* son unique domaine de reconnaissance. Outre son activité inductrice de la voie NF- κ B, le récepteur Dectine 1 a plus particulièrement été mis en évidence pour coopérer indirectement avec l'activation d'un autre PRR de la famille des NLRs cytoplasmique, l'inflammasome Nlrp3. L'engagement de Dectine1 avec un ligand fongique tel que le β 1-3 Glucan (paroi de *Candida albicans*) conduit à la fois à l'activation cytoplasmique de NF- κ B *via* Syk (Spleen tyrosine kinase) et CARD9 (Caspase Recruitment Domain 9) grâce à son domaine ITAM, mais également à l'activation de la caspase-1 et à la sécrétion spécifique des cytokines inflammatoires de la famille de l'IL-1 (IL-1 β , IL-18, IL-1 α). Le rôle du récepteur Dectine-1 dans l'activation de l'inflammasome sera plus approfondi dans les paragraphes ultérieurs. La production de cytokines telle que le TNF- α en réponse au zymosan, autre composant de la paroi des levures, semble dépendre d'une collaboration étroite entre Dectine-1 et certains TLRs comme le TLR2⁴⁹.

- ***Les récepteurs éboueur ou scavengers***

Ce terme englobe un ensemble de récepteurs de surface qui reconnaissent des composés anioniques, des LDL modifiés par oxydation ou certains pathogènes. Ils sont principalement exprimés par les macrophages et certaines cellules endothéliales. Ils jouent un rôle prépondérant dans le processus de phagocytose et d'élimination des cellules apoptotiques. On distingue trois classes de récepteurs : A, B et C en fonction de leurs caractéristiques structurales. Pour ne citer que lui, le récepteur CD36 de classe B contribue à l'homéostasie des lipoprotéines et dans la clairance des cellules apoptotiques. Il reconnaît également les érythrocytes parasités par *plasmodium falciparum* et participe ainsi à leur clairance.

- ***Les Rig-like rceptors ou RLRs***

Cette famille de récepteurs qui comprend RIG-1, MDA5 et LGP2 a pour fonction la reconnaissance des acides nucléiques viraux et bactériens cytoplasmiques. RIG-1 et

MDA5 ont la capacité d'induire une réponse cellulaire via leurs domaines CARD conduisant à l'activation de NF- κ B et à la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- α et d'interféron de type I. Les autres RLRs ne possèdent pas CARD mais sont associés à ces récepteurs afin de favoriser leur réponse.

- ***Les Nod-Like Receptors ou NLRs***

Au cours de mon doctorat j'ai plus particulièrement travaillé sur l'un des récepteurs de type NOD: Nlrp3, ce qui expliquera le développement plus approfondi des récepteurs NOD. Nous reviendrons plus en détail plus tard sur les fonctions d'un sous groupe des NLRs, les NLRs formateurs de complexes inflammasomes et leur rôle dans l'induction de la réaction inflammatoire. 22 NLRs ont à ce jour été identifiées chez l'Homme et 34 chez la souris ^{35,36}. Les macrophages et plus généralement les cellules de la lignée myéloïde expriment à haut niveau transcriptionnel et protéique la plus grande partie de ces NLRs ^{35,36,50}. Ces récepteurs présentent une organisation structurale en trois parties constituées d'un domaine C-terminal riche en répétition de Leucines (LRRs), un domaine central d'oligomérisation NACHT liant les nucléotides et un domaine N-terminal variable effecteur qui induit les différentes voies de signalisations. Le domaine LRR, présents sur de nombreux récepteurs immunitaires (TLRs, NODs) laisse penser qu'il est impliqué dans la reconnaissance des signaux activateurs des NLRs. Son rôle d'autorégulateur de la protéine à l'état inactif est mieux connu. En effet il est bien établi que non stimulé le domaine LRR cache physiquement le domaine NACHT et qu'à l'état activé le NACHT est libéré ^{35,36,50}.

Les membres de la famille des NLRs sont des PRRs cytosoliques bien caractérisés pour activer NF- κ B (NOD1 et 2) mais aussi pour induire la sécrétion spécifique des cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-1 comme l'IL-1 β , l'IL-18 ou l'IL-1 α (Inflammasomes). NOD2 et Nlrp3 sont les NLRs les plus connus du car leur mutation est associée à l'apparition de graves maladies inflammatoires.

Ainsi, la grande différence entre les différents NLRs provient de leur région N-Terminale, aussi nommé région effectrice, indispensable à la transduction du signal. La majorité des NLRs abritent un domaine « death-fold » (DD) qui peut être, un domaine de reconnaissance de caspases (CARD) ou un site de reconnaissance des motifs PYRIN (PYD) ^{35,36,50}.

L'étude du domaine N-Term permet de distinguer quatre sous-groupes au sein des NLRs :

- Les NLRAs
- Les NLRBs
- Les Nlrps (Nod-Like Receptors containing a PYD, anciennement Nalps)
- Les NlrCs et Naips (Nod-Like Receptors containing a CARD)

Les NlrCs et les Nlrps constituent les deux principales familles de NLRs.

Les récepteurs NlrCs :

2 protéines NlrCs (Nod like receptors containing a CARD) sont les plus connues à ce jour. NOD1 (NlrC1) et NOD2 (NlrC2). Ils répondent aux produits de dégradation dans le cytoplasme du peptidoglycane (PGN) bactérien mais aussi au muramyl dipeptide(MDP) pour NOD2 et à l'acide γ -D-isoglutamyl diaminopimelique pour NOD1. NOD2 possède deux domaines CARD en Nterm alors que NOD1 un seul. L'activation de ces récepteurs induit l'activation de NF- κ B et des MAPK. Les mutations de NOD2 sont associées à la maladie de Crohn et au syndrome de Blau^{35,36,50}. On distingue également NlrC4 dont le domaine CARD permet, une fois oligomérisé, l'activation de la caspase-1 et la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18. NlrC4 est connu pour jouer un rôle dans le contrôle des infections d'origine Gram- (*Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* ou encore *Legionella*).

Les autres NlrCs ne sont pas bien définis. NOD5, mitochondriale aurait une fonction antivirale.

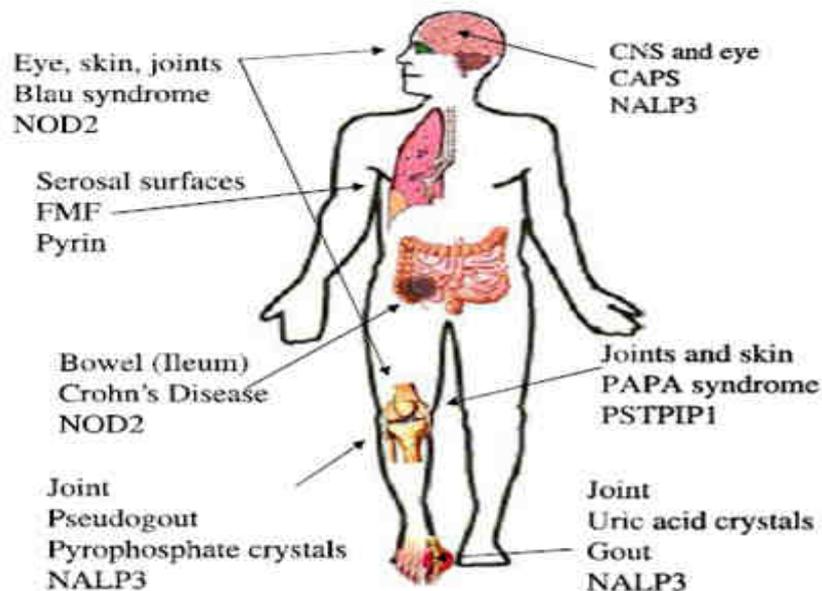


Figure 5: Les pathologies associées aux NLRs et leurs localisations dans l'organisme ⁵¹.

Les Nlrps:

Aujourd'hui, 14 Nlrps sont référencés chez l'Homme. Les rôles de la majorité des Nlrps ne sont pas bien documentés. Les expressions des Nlrps 4, 5, 7, 8, 10 et 11 sont quasi restreintes aux cellules de la lignée germinale ainsi qu'aux embryons avant implantation ³⁶. Nlrp1 et Nlrp3 sont des sous-ensembles de la famille Nlrp. La découverte de Nalp3 (futur Nlrp3) en tant que protéine associée aux désordres inflammatoires provient de l'équipe de Hal Hoffman et de Richard Kolodner. Ils ont identifié le gène CIAS1 qui code pour la protéine Cryopyrin et montrent qu'en N-term elle possède un domaine PYRIN (PYD), un domaine central NACHT et un domaine en C-term contenant des répétitions de leucine (LRR). Les auteurs font remarquer que Cryopyrin possède de nombreuses analogies de domaines avec deux protéines récemment identifiées, Nalp1 (futur Nlrp1) et Nalp2 (futur Nlrp2) ^{52,53}.

La démonstration fonctionnelle et directe de l'implication des Nalps (Nlrps) dans les processus inflammatoires aura lieu en 2002 par Martinon et al ⁵⁴. Les auteurs rapportent que la formation de l'IL-1 β mature nécessite l'activité catalytique de la caspase-1, mais sans en identifier le mécanisme. Par la même occasion, ils soulignent le fait que l'IL-1 β est la première cause d'inflammation aigue et chronique et qu'à ce titre son activité est finement régulé à plusieurs niveaux. Ils identifient le complexe Nalp1/ASC (Associated Speck-like protein containing a CARD) capable

d'activer les caspases-1-5 et d'induire la maturation et la sécrétion de l'IL-1 β . Ils nommeront ce complexe inflammasome. En référence au mot "inflammation" et au suffixe Grec « soma » qui signifie « corps », ces complexes activant les caspases pro-inflammatoires ont donc été appelé « inflammasomes »⁵⁴. Suivra la découverte du complexe inflammasome Nlrp3 l'année suivante. L'inflammasome est un complexe qui, en s'activant, induit la maturation et la sécrétion de la pro-interleukine-1 β en IL-1 β mature pro-inflammatoire par clivage enzymatique. Des études suivantes apportent des éléments quant aux mécanismes et aux signaux capables d'activer cet inflammasome. Les auteurs supposent que le domaine LRR de Nalp1, commun aux TLRs et aux NLRs, est susceptible de reconnaître des signaux de dangers et pourrait être à l'origine de la formation de l'inflammasome. En effet, l'activation de Nalp1 a également été corrélée à une rupture de l'intégrité cellulaire, probablement liée à une libération de signaux de dangers endogène suffisante pour activer l'inflammasome.

Une parenthèse pour souligner qu'à l'état basal, les NLRs ont souvent été associés avec des protéines les inactivant. Par exemple, HSP90 et SGT1 interagissent avec Nlrp3, Nlrc4, NOD1, NOD2 et Nlrp12^{55,56}. Il est ainsi intéressant de noter que ces protéines, une fois libérées permettent l'activation de ces complexes mais peuvent agir elles mêmes comme signal de danger. C'est le cas de HSP90 par exemple, qui, intracellulaire est une protéine chaperonne anti-apoptotique mais une fois libérée de la cellule, elle présente une action activatrice de NF- κ B entre autre. L'idée d'une co-régulation entre NLRs et ces molécules n'est donc pas à exclure.

Pour résumer, alors que les Nlrps NOD1 et NOD2 ont des voies de signalisations qui convergent vers la transcription de cytokines, chimiokines ou de protéines impliquées dans la présentation antigénique, un sous-groupe de la famille des NLRs, les inflammasomes, induit l'activation de cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-1, telles que l'IL-1 β ou l'IL-18, via un processus de clivage protéolytique contrôlé par la Caspase-1. Au sein de cette catégorie on retrouvera la protéine à domaine CARD en N-term de la famille Nlrc, Nlrc4, et les protéines contenant un domaine PYRIN en N-term de la famille Nlrp, Nlrp1, Nlrp3 et Nlrp6.

Par la suite, nous nous concentrerons sur les Nlrps et Nlrps à activité activatrice de caspase-1.

NOD-like receptors

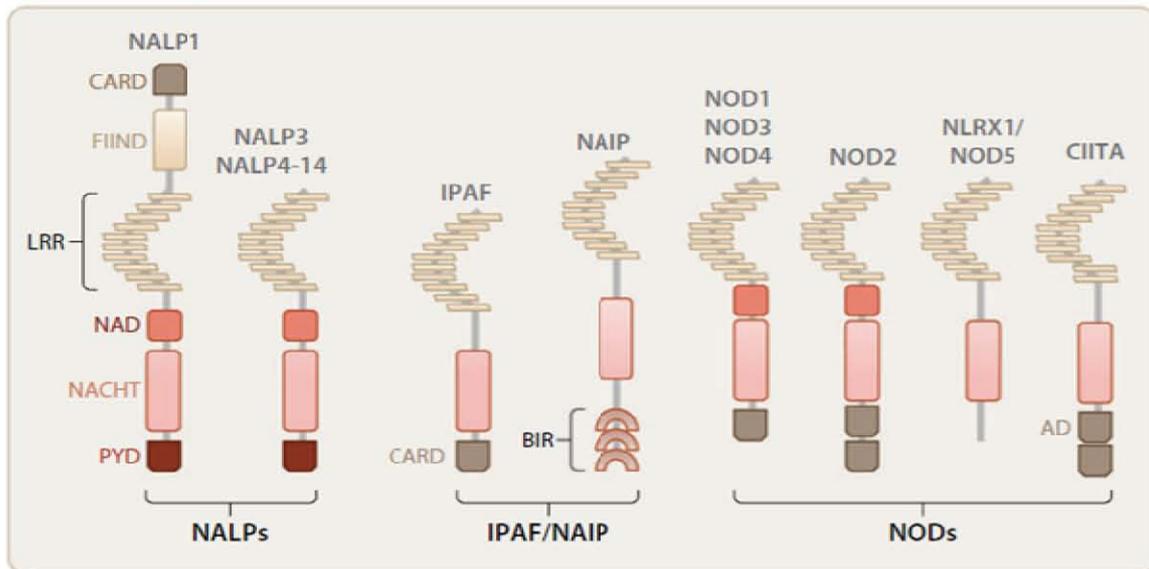


Figure 6: Schéma non exhaustif des différents NLRs et de leurs structures³⁶. Ici NALP=Nlrp et IPAF=Nlrc4.

II. Les Inflammasomes

1. Les inflammasomes

A ce jour, seules 5 protéines ont été caractérisées pour former des complexes inflammasomes. Il est utile de rappeler ici qu'un inflammasome est un complexe protéique cytoplasmique capable d'activer des caspases inflammatoires et d'induire la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18. Les Nlrps 1, 3, 6, AIM2 et Nlrc4 se retrouvent activés par des signaux de dangers multiples d'origine à la fois PAMPs et DAMPs ⁵⁷. Par exemple l'inflammasome Nlrp3 est activé indirectement par les molécules d'ATP libérées par les cellules mortes, les cristaux d'urate, les cellules nécrotiques, les particules et nanoparticules (amiante, silice, aluminium) mais aussi certains composants des pathogènes (pneumolysine de pneumocoques, hémotoïne de *plasmodium falciparum*...) ⁵⁸⁻⁶¹. Nlrp1 a été caractérisé pour réagir aux signaux de la bactérie *bacillus anthracis* ^{36,62}.

Un paradigme central à la fois à l'activation des caspases et à NF- κ B par les NLRs, est la nécessité de s'assembler en complexes oligomérisés grâce à leurs domaines NACHT. Ces plateformes moléculaires activent leurs effecteurs via un phénomène d'auto-activation. La figure 7 illustre le mécanisme général de formation d'un inflammasome à travers l'exemple de Nlrp3. Malgré leur récente découverte, l'importance des inflammasomes dans la mise en place de la réponse inflammatoire, dans l'élimination des pathogènes mais aussi dans l'apparition de graves maladies inflammatoires auto-immunes ne fait plus aucun doute ^{53,57}. Par exemple, des mutations dans Nlrp3 conduisent au syndrome familial de froid ainsi qu'au syndrome de Muckle-Wells, pathologies présentant des épisodes d'inflammation exacerbée ^{7,53}.

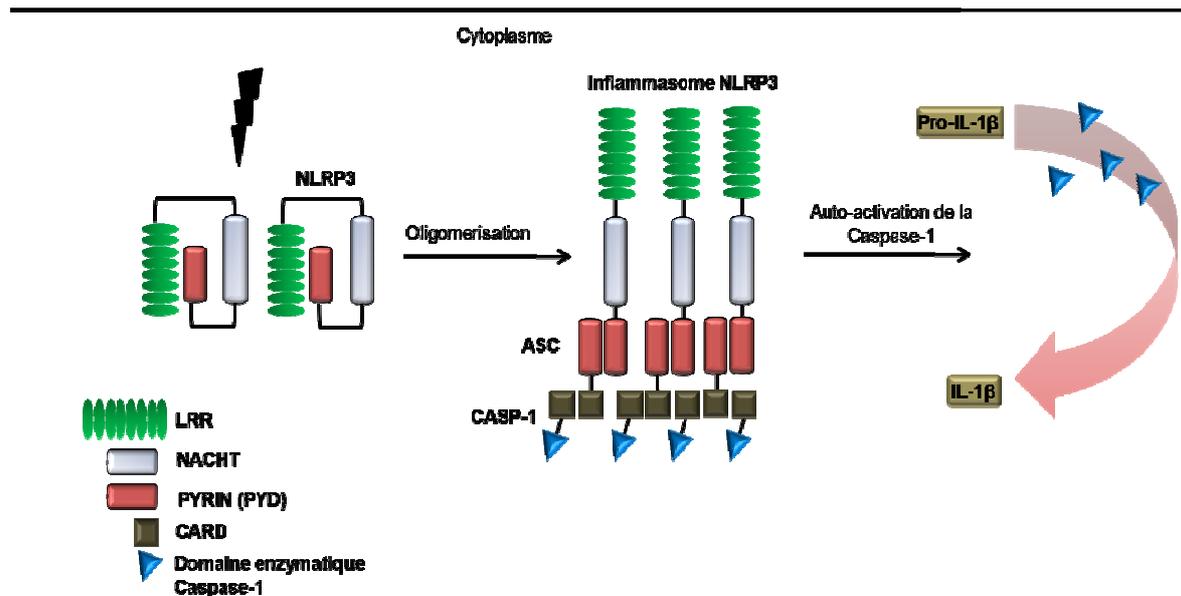


Figure 7: Mécanisme de formation de l'inflammasome Nlrp3. Adaptable aux autres inflammasomes.

a. Inflammasome AIM2

Le cas particulier des inflammasomes. En effet, malgré la présence d'un domaine PYRIN, cette dernière n'appartient pas à la famille NLR mais à la famille HIN-200.

L'inflammasome AIM2 (Absent In Melanoma 2) est composé d'AIM2, ASC et Caspase-1 (Figure 8). Il signale suite à la présence de l'ADN double brin (viral, bactérien ou humain) dans le cytoplasme en promouvant à la fois l'activation de NF- κ B et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18^{63,64,65}.

b. Inflammasome Nlrc4

La protéine Nlrc4 est principalement exprimée dans les cellules de la lignée hématopoïétique. Elle possède un domaine CARD qui lui permet un recrutement direct de la pro-caspase-1, son activation et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Figure 8). Son activation est également associée à une mort cellulaire par pyroptose (mélange de nécrose et d'apoptose). L'inflammasome Nlrc4 est surtout caractérisé pour jouer un rôle dans le contrôle des infections d'origine Gram- (*Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* ou encore *Legionella*). Ces bactéries ont la particularité de posséder un flagelle et Nlrc4 reconnaît une protéine de ce flagelle dans le cytoplasme, la

flagelline. Néanmoins, aucune évidence d'interactions directes entre Nlrc4 et la flagelline n'a pu être démontrée.

Très récemment, un rôle dans le contrôle de l'infection au champignon opportuniste *Candida albicans* a également été mis en évidence⁶⁶⁻⁶⁸.

c. Inflammasome Nlrp6

Son expression est particulièrement élevée dans le Foie, l'intestin, le colon et le rein. Une étude montre le rôle prépondérant de NLRP6 dans l'homéostasie intestinale. En effet, l'utilisation d'un modèle de colite induit par le sel de dextran sulfate montre que les souris déletées pour Nlrp6 présentent une plus grosse inflammation et des processus tumoraux associés exacerbés. Les auteurs notent également que les souris KO pour NLRP6 secrètent néanmoins beaucoup moins d'IL-18, cytokine hautement inflammatoire. Un autre article relate le rôle essentiel de l'IL-18 dans la modification de la flore intestinale mais également dans la réparation et le renouvellement cellulaire de la barrière intestinale. Ceci suggère ici, que l'IL-18, selon le contexte et son lieu de production, présente également un rôle de protection cellulaire et tissulaire indépendant de sa propriété inflammatoire^{69,70}.

d. Inflammasome Nlrp1

Comme écrit précédemment Nlrp1 a initialement été caractérisé comme un membre actif du complexe pro-apoptotique apoptosome du fait de ses interactions avec les caspases-2 et -9. Il est présent dans la majorité des cellules d'origine myéloïde, lymphoïdes ainsi que les cellules non hématopoïétiques. La protéine Nlrp1 se compose à la fois d'un domaine CARD et d'un domaine PYRIN (PYD), nécessaire au recrutement d'ASC. La présence du domaine CARD lui permet de s'affranchir de l'interaction avec ASC pour activer directement les caspase-1 et -5 permettant les libérations des cytokines IL-1 β et IL-18. ASC n'a ici qu'un rôle amplificateur de l'activation de Nlrp1 (Figure 8). A l'état inactif Nlrp1 est associé aux protéines anti-apoptotiques Bcl-XL et Bcl-2 libérées à lorsque Nlrp1 est activé⁷¹.

Le ligand le plus connu activant l'inflammasome Nlrp1 est la toxine létale de *Bacillus anthracis*. Une interaction NOD2/Nlrp1 est avancée mais des études

supplémentaires restent à effectuer afin de confirmer cette interaction ainsi que sa fonction immunitaire ^{57,62}.

2. L'inflammasome Nlrp3

a. La découverte de l'inflammasome Nalp3 (puis Nlrp3)

Historiquement, c'est Nalp1 (Nlrp1) qui fut découvert en premier. Néanmoins, il s'avère qu'aujourd'hui c'est l'inflammasome Nalp3 (Nlrp3) qui est le centre de la majorité des études. A cela deux raisons principales. La première est que les mutations dans le gène de CIAS (codant pour la protéine Nlrp3) sont associées à de nombreux désordres inflammatoires au préalable étudiés. Son étude a redonné un second souffle aux recherches engagées sur ce terrain là. La deuxième raison est que l'inflammasome Nlrp3 est aujourd'hui le mieux caractérisé en terme de quantités de signaux activateurs mais aussi en terme d'implications -physio- patho- logiques. Agostini et al., rapportent en 2004 l'implication de la forme mutée de Nlrp3 dans le syndrome de Muckle Wells (MW) ⁷. En isolant des monocytes sanguins de patients sains ou atteints du syndrome MW, ils montrent que les monocytes de patients mutés produisent spontanément de l'IL-1 β à la différence des monocytes de patients sains pour lesquels une stimulation au LPS est nécessaire. Les auteurs concluent leur travail par l'utilisation clinique d'un récepteur antagoniste à l'IL-1 β , IL-1RA, qui montre son efficacité dans le traitement de patients atteints du MW ⁷.

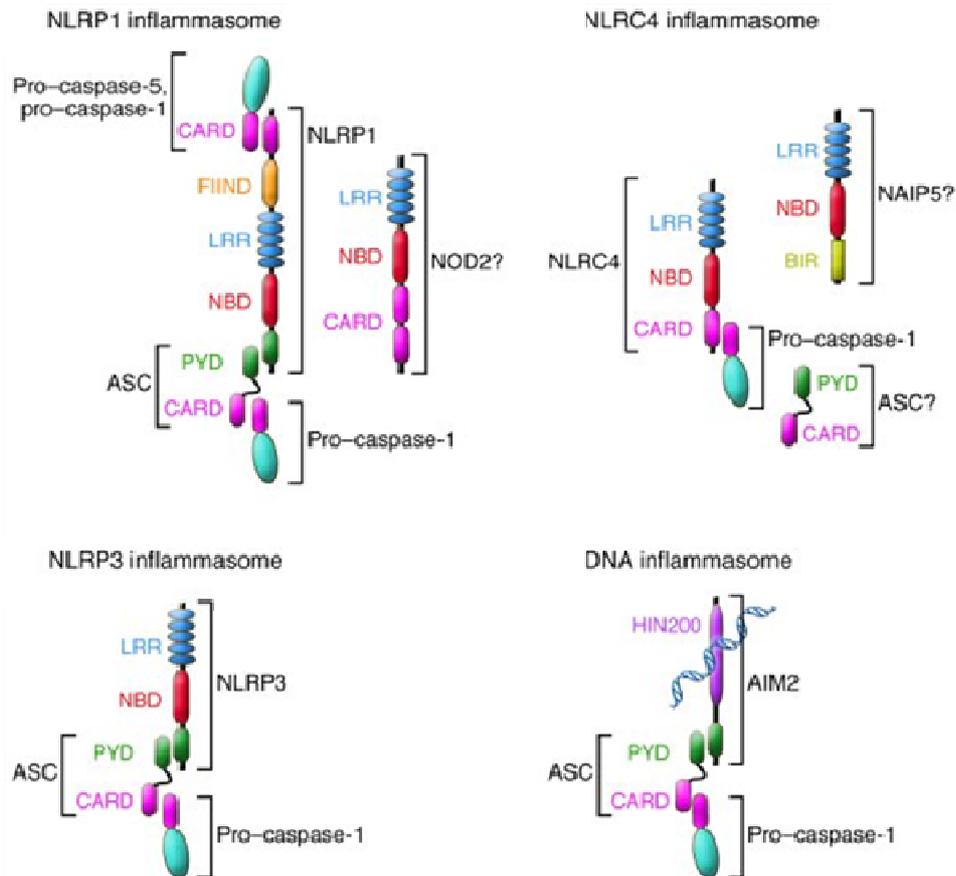


Figure 8: Schéma structural des différents inflammasomes et leurs domaines associés (tiré de 57)

b. Propriétés et activité de l'inflammasome Nlrp3

Il est nécessaire de rappeler qu'à l'état cellulaire latent, le complexe est inactif et nécessite le recrutement d'ASC et de la caspase-1 pour la maturation de l'IL-1 β et l'IL-18. La formation d'IL-1 α active est plus controversée. Sa maturation ne dépend pas de l'activité protéolytique l'inflammasome à proprement parler mais sa sécrétion dépend de sa liaison à la caspase-1. Nlrp3 est majoritairement exprimé dans les monocytes et les cellules dendritiques conventionnelles. Les neutrophiles mais aussi les macrophages de différents tissus expriment également Nlrp3. Par contre son expression est très faible voire nulle dans les lymphocytes, NKs et les éosinophiles 50.

L'expression de Nlrp3 n'est pas restreinte aux cellules hématopoïétiques puisque les keratinocytes humains, les hépatocytes ou les cellules épithéliales intestinales ont également un inflammasome Nlrp3 activable 50. Le nombre élevé de stimuli d'origine

endogène ou exogène auquel l'inflammasome Nlrp3 est extrêmement élevé et variable en termes de structure et de nature physico-chimique provoquant une grande incompréhension du mécanisme d'activation de cet inflammasome. L'hypothèse la plus probable est que ce complexe réagirait plutôt indirectement à des composés *via* la reconnaissance de signaux de stress cellulaires comme les espèces radicalaires de l'oxygène, la dérégulation des flux ioniques ou l'altération de l'intégrité de la membrane plasmique.

L'ensemble des mécanismes qui vont être présentés ont été mis en évidence manière indirecte pour être lié à l'activation de l'inflammasome Nlrp3. Mais la manière dont ce dernier s'active intrinsèquement est encore au stade des spéculations.

c. Mécanismes d'activation de l'inflammasome Nlrp3

i. Hypothèse « Pores »

C'est l'hypothèse que l'équipe de G Nunez a émise en 2007. Ils postulent que l'ouverture de pores membranaires par l'interaction ATP (libéré par la cellule ou ajouté artificiellement)/récepteur P2XR (membranaire) permet aux PAMPs d'accéder au cytoplasme par le canal Pannexine-1, et de se lier physiquement à Nlrp3^{72,73}. Quelques critiques ont été émises quant à cette hypothèse :

- Le canal formé par l'ATP ne laisse passer que les molécules de poids inférieur ou égal à 900 Da, soit bien moins que la majorité des PAMPs
- L'activation de Nlrp3 a également lieu en absence de PAMPs
- L'ATP est un activateur de Nlrp3 indépendant des PAMPs
- Aucune liaison entre PAMPs et l'inflammasome Nlrp3 n'est caractérisée

L'hypothèse pore au sens strict de sa définition par l'équipe de Nunez n'est pas applicable aux résultats obtenus par différentes équipes. Néanmoins, il est possible de la moduler. Il est à noter que l'ATP extracellulaire est un activateur endogène connu de l'inflammasome Nlrp3. L'association alarmines, pathogènes et ATP est alors toute trouvée. Les PAMPs ou les alarmines endogènes, en stressant les cellules, jouent un rôle de libérateur d'ATP. Celui-ci interagit alors de manière autocrine ou paracrine avec son récepteur membranaire P2XR (principalement

P2X7) et provoque l'activation du canal pannexine-1 et de la caspase-1. Le lien entre pannexine-1 et caspase-1 demeure encore flou. Cela a été démontré pour la protéine Tpf1 de *Treponema pallidum* mais aussi avec l'utilisation de vecteur adénoviraux. En plus d'observer une augmentation d'ATP extracellulaire, les auteurs mettent également en évidence qu'en présence d'ATP oxydé (empêchant la liaison ATP/P2X7 et la signalisation associée), la sécrétion d'IL-1 β par les monocytes et macrophages est inhibée en réponse à ces activateurs ^{74,75}. A cela encore, une critique majeure : Certains activateurs de l'inflammasome Nlrp3 n'induisent pas la libération d'ATP comme les particules d'amiante, les cristaux d'hydroxyapatite, le pathogène *Chlamydia pneumoniae* ^{35,40,76,77}. Cependant, ce schéma s'inscrit de plus en plus comme l'un des modes d'activation de Nlrp3.

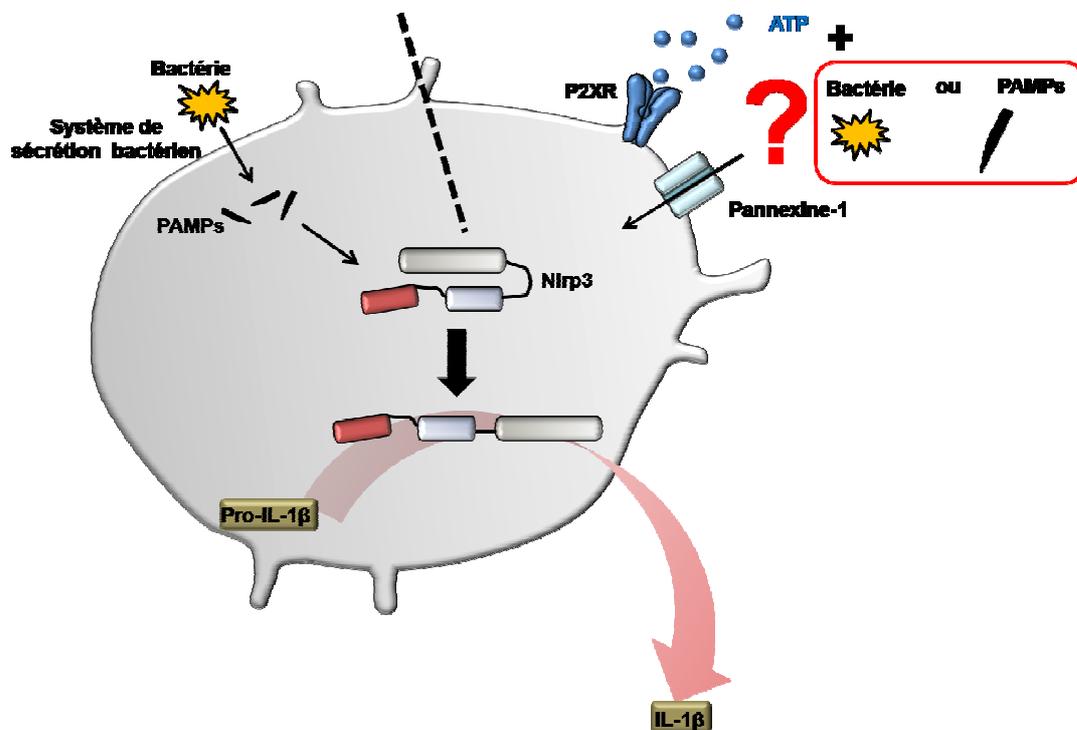


Figure 9: Hypothèse « pores » pour l'activation de Nlrp3 selon Nunez.

ii. Hypothèse « Déstabilisation lysosomale »

L'exposition répétée de personnes aux poussières environnementales telles que l'amiante ou la silice est maintenant bien connue pour être une cause de graves maladies inflammatoires pulmonaires, se traduisant dans les pires situations par l'apparition de cancers, le mésothéliome ⁷⁸. De même que certaines pathologies

inflammatoires chroniques auto-immunes comme la goutte, la maladie d'Alzheimer ou l'athérosclérose se caractérisent par une accumulation d'entités macroscopiques. En 2006, Tshopp et al., établissent un lien entre la libération d'acide urique des cellules mourantes et la formation, déjà connue, des cristaux d'urate aux niveau des articulations de patients atteints de la goutte. Ils mettent en évidence que l'agent principal responsable de la pseudo-goutte, les cristaux d'urate (MSU), agit essentiellement sur l'activation de l'inflammasome Nlrp3 à l'origine de l'établissement d'une réaction inflammatoire chez les patients malades ⁷⁹.

Ils identifient également, l'amiante et la silice, deux particules inflammatoires mais dont les mécanismes d'action *in vitro* n'étaient pas connus jusqu'alors, comme activateurs de l'inflammasome Nlrp3 dans les monocytes et les macrophages. Ils démontrent à cette occasion la nécessité d'un réseau cytosqueletique d'actine fonctionnel pour que ces agents particuliers activent l'inflammasome. Ils en déduisent ainsi l'exigence du processus de phagocytose dans certains cas pour activer Nlrp3. Les activateurs non particuliers (ex : ATP, Maïtotoxine, Nigericine...) ne nécessitent pas la présence d'un réseau d'actine fonctionnel et la non-accumulation d'IL-1 β mature dans le cytoplasme dans ces cas permet d'écarter le rôle de ce cytosquelette dans sa sécrétion ^{35,40}.

Néanmoins, la recherche de particules activatrices de Nlrp3 *via* la phagocytose met en évidence que certains agents phagocytés comme les billes inertes de polystyrène n'activent pas l'inflammasome. Afin de saisir quel est le mécanisme qui, au delà du simple processus de phagocytose st responsable de l'activation de Nlrp3, l'équipe d'Eric Latz démontre en 2008 que certaines particules phagocytées induisent une déstabilisation lysosomale libérant ainsi leur contenu dans le cytoplasme des monocytes et macrophages. Ils relient la libération d'enzymes protéolytiques mais aussi le pH acide des lysosomes à l'activation de Nlrp3. En effet, l'inhibition de l'acidification vacuolaire mais aussi de l'activité cathepsine-B avec des inhibiteurs spécifiques, empêchent l'activation de l'inflammasome en présence d'agents particuliers phagocytés alors qu'aucun changement n'est observé en présence d'activateurs solubles de Nlrp3 ⁸⁰.

Prenons en exemple la silicose, maladie pulmonaire due à l'inhalation répétée de silice et caractérisée par une inflammation chronique et une fibrose pulmonaire progressive. La présence de particules de silice se caractérise non seulement par une forte mortalité des cellules (phagocytaires mais aussi pulmonaires) mais

également une accumulation dans les phagolysosomes des macrophages qui ne peuvent l'éliminer. Cette accumulation conduit à une déstabilisation lysosomiale, responsable en partie de l'activation de Nlrp3 et de la libération d'IL-1 β par les macrophages alvéolaires. La déplétion de Nlrp3 mais aussi l'inhibition des processus de maturation du phagosome permettent de réduire l'incidence de la réaction inflammatoire et fibrotique provoquée par l'inhalation de silice^{39,80}.

Il est aujourd'hui montré que la seule rupture chimique des lysosomes est un activateur de l'inflammasome Nlrp3. Il est assez logique que la cellule phagocytaire reconnaisse en tant que signal de danger le contenu des lysosomes sachant que celui-ci est, en situation physiologique, protégé et séparé du reste du cytoplasme par une membrane plasmique. Depuis, il a également été démontré que des particules endogènes (cristaux de calcium, peptide β -amyloïde, cristaux de cholestérol) activaient également l'inflammasome Nlrp3 via une déstabilisation lysosomale entre autre^{37,81-84}.

De même que pour l'hypothèse « pores », ce mode d'activation de Nlrp3 est dépendant de certains agents et n'est pas commun à tous les activateurs de l'inflammasome Nlrp3.

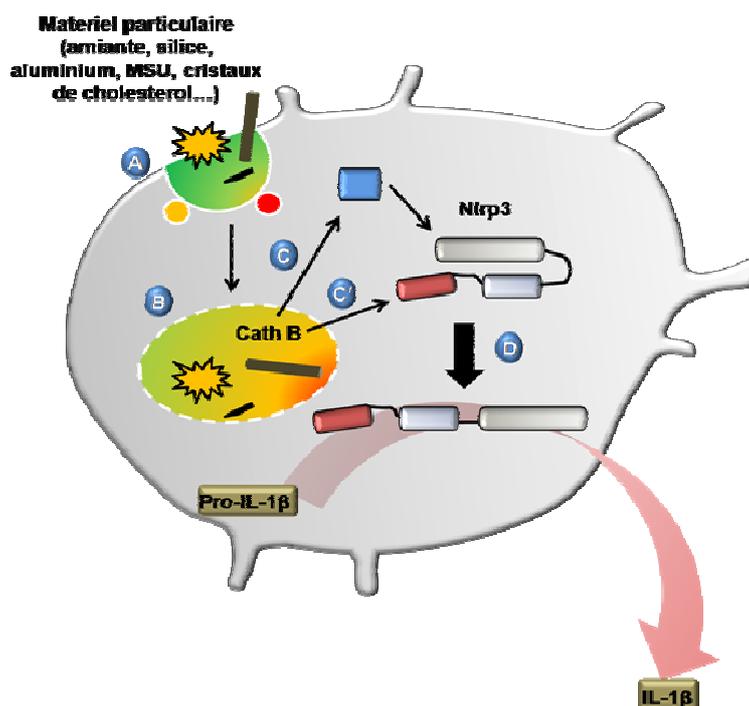


Figure 10: Hypothèse « déstabilisation lysosomale » pour l'activation de Nlrp3. A, le matériel est phagocyté. B, fusion du phagosome avec les lysosomes, altération membranaire par le matériel partitulaire. C, C', libération du contenu phagolysosomal dans le cytoplasme et activation par un mécanisme encore inconnu de l'inflammasome Nlrp3 D.

iii. Hypothèse « ROS »

Cette hypothèse sur l'intervention des substances réactives de l'oxygène (ROS) trouve également ses détracteurs. Il a été démontré que de nombreux activateurs de l'inflammasome Nlrp3 génèrent des ROS et que leur inhibition réduit la sécrétion d'IL-1 β par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Nous avons précédemment abordé le rôle des ROS au cours de la phagocytose ainsi que leurs fonctions immunitaires associées. Néanmoins, une autre source de ROS, beaucoup plus importante que la NADPH oxydase, les xanthines oxydoréductases ou les lipoxygénases et cycloxygénases, a émergé ; la mitochondrie. En effet grâce à sa chaîne de transport des électrons, cet organelle produit énormément de résidus du métabolisme de l'oxygène.

Les ROS interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que l'angiogénèse, la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et la migration cellulaire. La production constitutive de ROS peut cependant causer de

nombreux dommages cellulaires. Il est rapporté dès 2007 que l'amiante mais également l'ATP activent l'inflammasome Nlrp3 via une production de ROS^{36,40}. La NADPH semble impliquée dans le cas de l'amiante et de la silice. Néanmoins, du fait de l'impact non spécifique de nombreux inhibiteurs et du manque de reproductibilité de certains modèles, l'hypothèse généralisée des ROS comme activateurs communs de Nlrp3 est fortement remise en question. En effet, des études publient que certaines particules (nano-SiO₂ et nano-TiO₂) activent Nlrp3 indépendamment des ROS, contredisant l'étude de Tschopp et al., sur l'impact des ROS en réponse à ces nanoparticules^{85,86}. Une autre étude met en évidence que YOPJ, un facteur de virulence de *Yersinia Pestis* est également capable d'induire la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages via un processus où les ROS ne sont pas requis⁸⁷. Les derniers travaux de l'équipe de Tschopp semblent écarter, pour certains agents (ATP, Nigericine) le rôle de la NADPH oxydase dans la production de ROS activateurs de l'inflammasome au profit des ROS mitochondriaux, beaucoup plus importants^{88,89}. Ils ont ainsi mis en évidence que dans le cadre de maladies métaboliques ou en présence de certains activateurs de Nlrp3 solubles (roténone, ATP...), les ROS mitochondriaux jouent un rôle essentiel dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3. Les mitochondries, afin d'éviter les dommages cellulaires induits par une trop forte production de ROS utilisent la mitophagie, un processus dérivé de l'autophagie cellulaire, afin de les éliminer. L'inhibition de la mitophagie avec de la 3-Methyladenine (3-MA) conduit à une production et une accumulation de mitochondries endommagées et une forte production de ROS qui ont été reliés à l'activation de l'inflammasome Nlrp3. L'inhibition de la mitophagie en présence de MSU et de nigericine se matérialise également par une augmentation de l'activité de l'inflammasome Nlrp3^{88,89}. Les auteurs en déduisent que les ROS, selon leur origine mais aussi leur quantité et leur continuité temporelle de production peuvent donc être un signal de danger endogène reconnu par l'inflammasome Nlrp3. Une seule remarque cependant : les ROS ont une durée de vie très courte et signalent à courte distance. Dans ce schéma, soit il est nécessaire d'avoir l'inflammasome Nlrp3 à proximité des mitochondries afin de réagir à ces stimuli, soit la signalisation ROS mitochondriaux-Nlrp3 est indirecte. Ainsi, l'équipe de Tschopp apporte un élément de réponse. Nlrp3 et ASC activés par certains agents (ATP, Nigericine) iraient se localiser près de structures membranaires communes au RE et aux mitochondries, les MAMs (Mitochondria-Associated ER Membranes)⁸⁹. Malgré de nombreuses

études contradictoires, les ROS semblent ainsi constituer un autre signal endogène à la cellule activateur de l'inflammasome Nlrp3 en réponse à de nombreux stimuli. Cependant, il faut considérer l'hypothèse ROS non pas comme le signal essentiel à la constitution d'un inflammasome Nlrp3, mais comme un des signaux l'activant parmi les autres décrits ci-dessus^{88,89}.

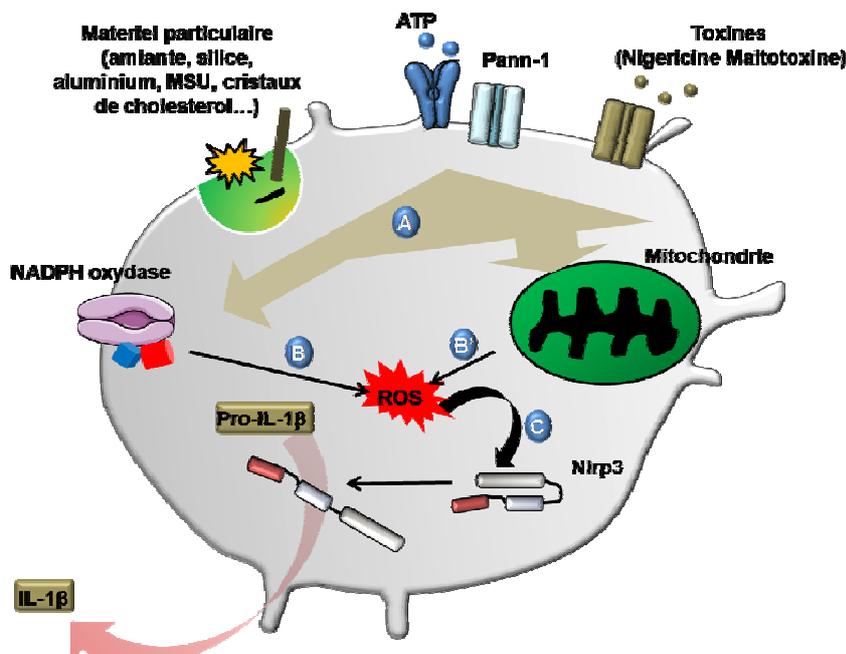


Figure 11: Hypothèse « ROS » pour l'activation de Nlrp3. A, les multiples activateurs de Nlrp3 activent la NADPH oxydase ou altèrent l'intégrité mitochondriale. B, B', cela se traduit par la production de ROS et C, l'activation de l'inflammasome Nlrp3.

iv. Hypothèse « Potassium et Gonflement »

L'ATP et la Nigericine, avant d'être caractérisés comme activateur de l'inflammasome Nlrp3 étaient connus pour induire un déséquilibre ionique dans les cellules en stimulant notamment une sortie de potassium de la cellule. L'équipe de Tschopp met en évidence que l'activation de la caspase-1 par ces molécules est liée à cette sortie de potassium. En bloquant l'efflux de potassium avec des concentrations élevées de potassium dans le milieu de culture (130 à 150 mM), les auteurs inhibent totalement la sécrétion d'IL-1β consécutive à l'activation de l'inflammasome Nlrp3 par l'ATP et la Nigericine^{38,90}. De plus, il est aujourd'hui démontré que la caspase-1 s'auto-active lorsque la concentration intracellulaire en potassium est inférieure à 70mM alors que la concentration physiologique

intracellulaire est de 130-150mM. Des études ultérieures démontrent également que les particules (SiO_2 , amiante, MSU, nano- SiO_2 , nano- TiO_2) induisent l'activation de Nlrp3 via un processus dépendant de l'efflux de potassium^{40,80,86}. Dans le même temps, la même équipe démontre que l'efflux de potassium active également l'inflammasome Nlrp1 en réponse à *bacillus anthracis* mais également de Nlrc4⁹⁰. L'hypothèse potassium, quoique très attrayante doit également être prise avec recul. En effet, la plupart des études ont été faites avec des concentrations extracellulaires élevées en K^+ et sans charges physiologiques en Na^+ . Or une étude met récemment en évidence que la concentration en Na^+ extracellulaire pourrait être impliquée dans la modulation de l'activité de l'inflammasome Nlrp3 indépendamment du potassium⁹¹. Il est donc difficile de conclure définitivement quant au rôle de chacun de ces ions. Cette question sera abordée par un travail où les auteurs démontrent ainsi sur des extraits cellulaires la nécessité d'ASC pour activer la caspase-1 en présence de faibles concentrations de potassium mais pas de fortes concentrations (130mM)⁹⁰. Cela permet ainsi, en gardant une concentration constante de Na^+ , de démontrer définitivement l'implication du potassium dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3 via ASC. Néanmoins une observation a été faite sur les cristaux MSU. Ceux-ci sont riches en sodium. Une fois phagocytés et au contact d'enzymes lysosomales, les ions Na^+ sont dilués. Associé à la perméabilisation des lysosomes, cela produit une entrée d'eau afin de rétablir l'équilibre osmotique de la cellule qui présente alors un aspect gonflé. Dans ce cas là, ce n'est donc pas un efflux de potassium qui serait responsable de l'activation de Nlrp3 mais une dilution de la concentration en K^+ dans le cytoplasme^{92,93}.

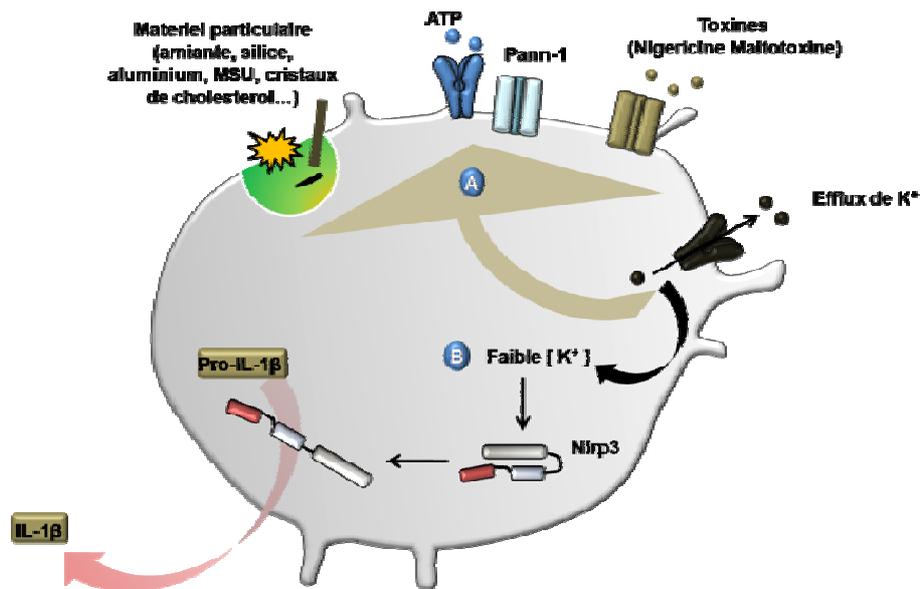


Figure 12: Hypothese « efflux de K⁺ et gonflement cellulaire » pour l'activation de Nlrp3. A, les activateurs de Nlrp3 induisent par un mécanisme encore inconnu un efflux de potassium cellulaire. B, La faible concentration en potassium intracellulaire est un signal activateur de Nlrp3.

d. Quelques mots sur la régulation de l'activité de l'inflammasome

Jusqu'à présent nous n'avons bordé que le rôle activateur de l'inflammasome dans la réponse inflammatoire. Il est néanmoins nécessaire de discuter également de l'autre versant, celui de sa régulation, indispensable à l'arrêt du processus inflammatoire.

L'importance des cytokines IL-1 β et IL-18 dans l'inflammation et l'élimination des signaux de dangers (pathogènes, particules...) mais aussi dans la coopération entre immunité innée et adaptative est telle qu'un échec dans la courbure de l'activation de l'inflammasome peut causer des dommages inflammatoires extrêmement délétères à l'organisme.

Le premier niveau de régulation s'établit de manière transcriptionnelle ; ce que beaucoup appellent le « priming ». Cette étape passe par la signalisation NF- κ B indispensable à la synthèse de la pro-IL1 β mais aussi de Nlrp3 dans une moindre mesure ^{36,94}. Cette étape est critique quant à la future formation de ce complexe. A l'inverse, les monocytes humains par exemple, présentent déjà un inflammasome Nlrp3 constitué et pré-activé. La seule stimulation de la voie NF- κ B suffit à induire la sécrétion d'IL-1 β mature ⁹⁵. Cela est principalement du à la sécrétion constitutive de molécules d'ATP par les monocytes activant directement l'inflammasome Nlrp3, à la

différence des macrophages et des cellules dendritiques. Le type d'acteur cellulaire et sa localisation dans l'organisme constitue ainsi un second moyen de contrôle de l'inflammasome Nlrp3. Les monocytes, sanguins, ont tout intérêt à avoir un inflammasome pré-actif. En effet, la présence d'un PAMPs, particules ou de DAMPs dans le milieu « intérieur » de l'organisme signifie un franchissement des barrières physiques et immunitaires par celui-ci. La réponse des monocytes a donc besoin d'être d'autant plus rapide que le circuit sanguin permet une diffusion du signal de danger à tout l'organisme, extrêmement délétère si non contrôlée.

Les macrophages et cellules dendritiques, du fait de leur position tissulaire (intestin, poumons, peau) entrent régulièrement en contact avec le milieu « extérieur ». Ils sont donc en contact permanent avec les signaux de dangers exogènes. Leur présence ne signifie pas forcément une menace directe et la nécessité d'un second signal trouve ici tout son sens. En effet, le priming pathogénique ou par certains DAMPs fournit aux macrophages un signal inducteur de pro-IL1 β . La formation de l'inflammasome Nlrp3 et la maturation de l'IL-1 β nécessite un second signal. Celui-ci discrimine entre danger et neutralité associés à la première stimulation en détectant, par exemple, les altérations que le microenvironnement du macrophage subira. La détection des signaux de dangers tels que l'ATP libéré par les cellules voisines mortes, ou altérations intracellulaires du macrophage même fourniront le second signal activateur de l'inflammasome et de la réponse immune. Ce schéma, qui sûrement sera amené à évoluer est une évolution très fine des dogmes de l'immunité sur la discrimination soi/non soi.

Il existe de nombreux autres moyens de régulation de l'inflammasome à la fois intrinsèques ou extrinsèques aux cellules. Il ne s'agit pas d'en faire ici un catalogue mais de présenter ceux qui apparaissent les plus consensuels.

i. Régulation extrinsèque

Une étude a récemment montré un rétrocontrôle négatif de l'immunité adaptative sur l'immunité innée dans la résolution de l'inflammation ⁹⁶. La réponse inflammatoire doit se terminer activement sinon elle peut se révéler très dommageable. Les lymphocytes TCD4 effecteurs et mémoires sont capables d'abolir l'activation de la

caspase-1 et la libération d'IL-1 β par les macrophages par un mécanisme nécessitant le contact cellulaire ⁹⁶.

Les interférons de type I (α et β) ont récemment été mis en évidence pour inhiber la transcription des gènes codant pour les pro-IL-1 β et IL-18 via l'induction de la production autocrine et paracrine des macrophages d'IL-10 ^{97,98}.

ii. Régulation intrinsèque

L'autophagie, un processus catabolique évolutif conservé, facilite le recyclage des protéines cellulaires endommagées et des organelles. Durant ce processus les constituants cytosoliques sont adressés à des autophagosomes et adressés aux lysosomes pour dégradation. Il est notamment démontré que la pro-IL1 β est adressée aux autophagosomes pour y être dégradée, limitant ainsi la quantité de substrat disponible à la caspase-1. L'autophagie joue également un rôle dans le recyclage des ROS. Plusieurs études ont mis en évidence que des macrophages déletés pour la protéine ATG16, essentielle dans le processus autophagique, produisaient des quantités transcriptionnelles exagérées de pro-IL1 β mais présentaient également une activité de l'inflammasome Nlrp3 décuplée ^{99,100}.

Les « Pyrin-Only » ou les « Card-Only » Proteins (POPs et COPs respectivement):

Ce sont les régulateurs principaux de l'activité « inflammasome » chez l'Homme. POPs et COPs agissent comme régulateurs de l'inflammasome via leurs domaines PYRIN et CARD respectivement. POP1 a un haut degré d'homologie avec le domaine PYD (PYRIN) d'ASC et agit en la séquestrant, un peu comme un compétiteur, empêchant sa liaison au domaine PYD du NLR. POP2 présente moins d'analogie avec ASC que POP1. Elle est plus spécifique du domaine PYD des inflammasomes Nlrp2, 3 et 7. Elle inhibe la formation de ces complexes en se fixant directement sur le(s) PYD de ces NLRs, ce qui permet de les isoler des autres constituants (ASC et Caspase-1/5) ¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Les protéines COPs sont plus spécifiques des domaines CARDS. Elles présentent de nombreuses analogies de séquence protéique avec les caspases dont la caspase-1. La famille COP compte entre autre COP1 (pseudo-ICE), INCA, ICEBERG, caspase12s et Nod2s, chacune avec des degrés différents de spécificité de liaison à

la caspase-1. L'étude de caspase-12s montre que celle-ci exerce un effet dominant-négatif suppresseur sur la caspase-1. A l'exception de Nod2s, tous ces gènes sont présents sur le locus chromosomique de la caspase-1 et semblent provenir d'étapes de duplications successives de gènes. La présence de ces gènes, exclusivement exprimés chez l'Homme à l'exception de caspase12s, reflète le haut degré de complexité avec lequel les inflammasomes sont régulés pour éviter les dommages inflammatoires ¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

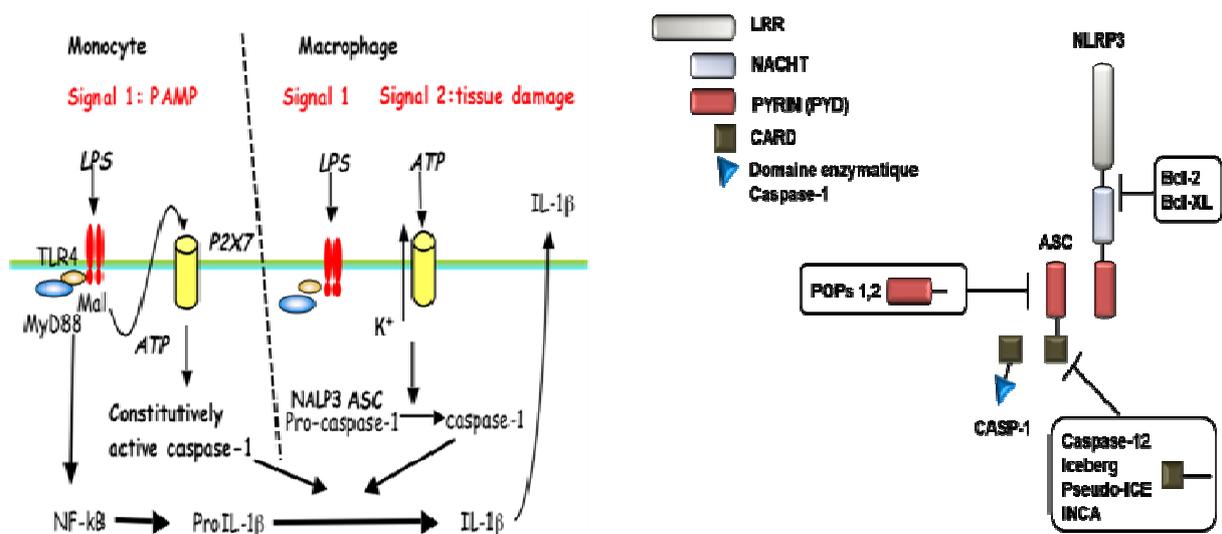


Figure 13: a, Régulation de l'expression de la pro-IL-1β. Modèle à deux signaux (tiré de ⁹⁵). b, Régulation endogène de l'activation de Nlrp3.

e. Nlrp3 et physiopathologie : focus sur les monocytes et les macrophages

Nous avons vu précédemment l'importance des inflammasomes et plus particulièrement de l'inflammasome Nlrp3 dans l'initiation de la réponse inflammatoire et plus généralement dans l'immunité. Il n'est donc pas étonnant que des dérégulations de l'activation de l'inflammasome soient associées à des désordres immunitaires et inflammatoires. Dans les faits, les mutations associées au gène de Nlrp3 (CIAS1) conduisent à l'apparition de maladies inflammatoires déjà citées ci-dessus ^{52,53}.

Les mutations autosomales dans le gène de *Nlrp3* sont associées des inflammasomes pré-activés dans les monocytes et macrophages de patients atteints. Les monocytes produisent et secrètent spontanément de l'IL-1β sans nécessité de stimuli au préalable. Le traitement de ces patients avec un récepteur soluble

antagoniste (IL-1RA) du récepteur de l'IL-1 reverse les symptômes cliniques associés confirmant les liens monocytes-inflammasome-IL-1 β -maladie ^{52,53}. La goutte, l'asbestose ou la silicose se caractérisent par une stimulation continue de l'inflammasome Nlrp3 dans les cellules phagocytaires (monocytes/macrophages) qui n'arrivent pas éliminer par la phagocytose et la maturation phagosomale ces particules (MSU/Amiante/Silice) sécrètent constitutivement de l'IL-1 β , maintenant un état inflammatoire chronique qui participe à la pathogénèse ^{39,40,80}. L'utilisation d'IL-1RA a permis de soigner des patients atteints de la goutte réfractaires aux traitements conventionnels anti-inflammatoires. Aucune étude clinique n'est encore publiée au sujet de l'amiante et la silice, mais l'utilisation d'IL-1RA dans le cadre de la goutte donne des espoirs de succès chez des patients atteints de l'asbestose ou de la silicose. En effet, les souris déplétées pour différents constituants de l'inflammasome Nlrp3 et ayant inhalées ces particules présentent une diminution significative du recrutement des neutrophiles mais aussi de la fibrose pulmonaire ^{39,40,80}.

III. Rôle de l'inflammasome Nlrp3 dans la réponse inflammatoire des Monocytes/Macrophages: cas des NanoTubes de Carbone (NTC) et de *Leishmania Infantum* (L.i)

Un des stimuli induisant le plus fortement l'inflammation est l'infection par un pathogène (viral, bactérien et parasitaire). Cependant, depuis quelques années, un ensemble de stimuli « stériles » ont été mis en évidence incluant le trauma, les toxines, les agents chimiques mais également les particules environnementales (la silice SiO₂, l'aluminium, l'amiante, oxyde de Zinc ZnO, le dioxyde de titane TiO₂ ...) qui induisent la mise en place d'une réaction inflammatoire. En lien avec la théorie du danger développée par Polly Matzinger, bien que l'ensemble de ces composés soient de nature physique et chimique différente, ils conduisent tous à la mise en place d'une inflammation même si les événements initiaux qui induisent et contrôlent la réponse inflammatoire peuvent être différents (cellules cibles, mort cellulaire, ROS, alarmines, déstabilisation lysosomale...). Un point commun cependant, la capacité de ces agents à altérer l'homéostasie et à promouvoir la production de signaux de dangers, de plus en plus caractérisés comme responsables du développement de la réaction inflammatoire. Pour la plupart de ces particules il n'est pas encore très clair si la réponse inflammatoire qui est induite est subversive ou si elle correspond à une réponse immunitaire de l'hôte utile à leur clairance.

Comme nous l'avons abordé précédemment, les monocytes/macrophages, de par leur positions stratégiques de sentinelles mais également leurs propriétés effectrices, jouent un rôle déterminant dans la modulation de l'immunité. La reconnaissance des signaux de dangers par les PRRs, la phagocytose des dérivés endogènes (débris cellulaires, surfactant) et des agents particuliers (polluants, particules environnementales ou manufacturées, micro-organismes) ainsi que la production de signaux d'alarmes endogènes (alarmines, ROS, mort nécrotique...) permet aux monocytes/macrophages d'initier la réponse inflammatoire. Sans que l'on en connaisse les mécanismes moléculaires et biochimiques, le rôle prépondérant des NLRs et plus spécifiquement de l'inflammasome Nlrp3 apparaît central à la reconnaissance de certains signaux de dangers et à l'initiation de la réaction inflammatoire.

Néanmoins, les types de signaux de dangers et les caractéristiques intrinsèques aux pathogènes et aux particules responsables de l'activation de Nlrp3 sont grandement

méconnus. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'activation de cet inflammasome en utilisant comme stimulateurs des agents particuliers, les nanotubes de carbone (NTCs) mais également pathogéniques, le parasite *Leishmania Infantum*. Le modèle cellulaire monocyte/macrophage s'impose compte tenu de leur fonction phagocytaire mais également régulatrice de la réponse inflammatoire.

Les études ont majoritairement été réalisées *in vitro* sur des monocytes et des macrophages, mais *in vivo* l'exposition des souris aux Nanotubes de Carbone (NTCs) s'accompagne d'une inflammation aigue. Ce système *in vitro* nous permet d'avoir une approche causale simplifiée tout en ayant conscience d'une plus grande complexité au sein d'un organisme pluricellulaire.

1. Monocytes/Macrophages et Nanotubes de Carbone

a. Les particules

De nombreuses particules sont connues pour activer l'inflammasome Nlrp3 dans les monocytes/macrophages. Elles peuvent être de nature :

- exogène : les particules de silice, d'amiante ou d'aluminium^{40,80}.
- endogène : les cristaux de cholestérol (athérosclérose), les cristaux de MSU^{79,82}.

L'exposition répétée, notamment professionnelle, à des particules de silice ou d'amiante conduit à de graves pathologies pulmonaires, respectivement silicose et asbestose. Cela se traduit souvent par l'accumulation de dérivés endogènes métaboliques ou pathologiques. Ainsi, la meilleure compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans la détection de matériel particulaire présente une pertinence clinique non négligeable.

Une certitude cependant, la nature particulaire ne suffit pas à activer directement l'inflammasome Nlrp3 dans les macrophages. En effet, les particules d'échappement de diesel ou les billes inertes de polystyrènes n'activent pas Nlrp3.

b. Les Nanoparticules

Il n'existe pas de définition à proprement parler d'une nanoparticule. D'après la norme ISO TS/27687 publiée en 2008, il s'agit d'un nano-objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ ^{105,106}. A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines.

i. Des propriétés nouvelles

Lorsqu'une particule est non nanométrique, ses propriétés physiques et chimiques découlent du matériau qui la constitue : on appelle cela l'effet de volume. Mais lorsqu'elle atteint une taille nanométrique le rapport surface sur volume augmente, les effets de surface ne sont donc plus négligeables vis à-vis de ceux de volume. De plus l'augmentation importante de la proportion d'atomes en surface provoque une augmentation de l'activité surfacique. Ainsi la participation élevée de la surface aux propriétés, combinée à l'augmentation de l'activité surfacique confère de nouvelles propriétés aux nanoparticules. Les particules de taille nanométrique n'ont donc pas les mêmes propriétés que leurs homologues de taille plus importante, d'où leur intérêt technologique ¹⁰⁷.

ii. Impact des nanoparticules manufacturées dans la société

L'essor des nanotechnologies profite à de nombreux secteurs industriels et agroalimentaires mais également dans l'électronique, l'habillement, la peinture ou bien les médicaments ^{107,108}. D'autre part les applications potentielles en médecine, énergie et environnement sont très prometteuses pour la société. L'industrie utilisant des nanoparticules est en plein essor et pourrait représenter un marché de 1000 milliards d'euros en 2015. En 2009, on ne comptabilisait pas moins de 1000 nanomatériaux issus des nanotechnologies dans les produits commercialisés par 485 compagnies dans 24 pays différents ^{107,108}. Les produits contenant des nanoparticules à base de carbone (nanotubes de carbone et fullerènes) sont parmi

les plus utilisés après les nanoparticules d'Argent qui représentent 20% de l'ensemble des composés. Les autres nanoparticules retrouvées dans ces produits sont le zinc (incluant l'oxyde de zinc ZnO), le titane (incluant les oxydes de titane TiO₂), la silice (SiO₂) et l'or.

Cependant la majorité de la recherche s'étant penchée sur les applications des nanoproducts dans la société, on ne connaît pas ou peu leurs implications sur la santé et l'environnement.

Nanoparticules	Exemples d'applications
Métaux	
Fe	Enregistrement magnétique de données analogiques et digitales, décontamination des nappes phréatiques
Al	Agent antimicrobien, circuits électroniques, Cellules solaires,...
Ni	Capaciteur céramique
Ag	Biocide (USA), Encre conductrice transparente
Au	Applications catalytiques (production propylène, oxydation CO,...), applications électriques et optiques (détecteur, appareil optique)
Oxydes	
Al ₂ O ₃	Polissage des puces électroniques, Composant de céramique, agent retardant les flammes, enduit de papier d'impression,...
ZrO ₂	Céramique (capteur oxygène, composant pompe), Spray thermique, prothèses orthopédiques et dentaires, vecteur de médicaments
TiO ₂	Crème solaire, catalyseur, Carrelage et vitre autonettoyante
ZnO	Crème solaire, antifongique, nanolaser, céramique
SiO ₂	Polissage des puces semiconductrices
Carbones	
Fullerène	Cellules solaires, batterie lithium, Membrane proton conductrice, médicaments
SWCNT	Matériaux résistants aux radiations
MWCNT	Peinture automobile, batteries

Tableau 2: Principaux nanoparticules manufacturées ayant un intérêt commercial (d'après ¹⁰⁹).

iii. Les différents types de nanoparticules

Les nanoparticules d'oxyde métallique :

Parmi le vaste choix de ces particules dont de nombreuses sont d'origine naturelles on observera:

- les oxydes de titane (TiO_2)
- les oxydes de fer (Fe_2O_3)
- les oxydes de zinc (ZnO)
- les oxydes d'aluminium (Al_2O_3)
- la silice (SiO_2)

L'augmentation de l'utilisation de ces nanoparticules dans de nombreuses applications (peintures, matériel technologique, alimentation...) susceptibles d'entrer en contact avec l'Homme pose le problème de leur potentielle dangerosité pour la santé. Récemment, les études au sein de l'équipe de Ken Donaldson ¹¹⁰, ont pu mettre en évidence que certaines nanoparticules d'oxyde métallique telles que le ZnO , le CuO ou le NiO induisaient une réponse inflammatoire aiguë et chronique dans les poumons de rats. Les auteurs suggèrent que le potentiel inflammatoire de ces particules est à prendre au sérieux notamment dans leur capacité à stimuler de façon chronique l'activation du système immunitaire. Néanmoins, ils ont aussi mis en évidence que toutes les particules d'oxyde métallique n'induisaient pas de réaction inflammatoire comme par exemple le nano- TiO_2 ou la nano- SiO_2 , suggérant ainsi que les nanoparticules d'oxyde métallique ne peuvent être vues comme une seule entité et qu'une étude précise des dangers de chacune est nécessaire. De nombreuses études contradictoires sont publiées en ce qui concerne le potentiel inflammatoire et toxique du nano- TiO_2 . Récemment, l'équipe de Tschopp ⁸⁶ a pu mettre en évidence un effet pro-inflammatoire du nano- TiO_2 sur des macrophages humains et de souris mais aussi sur des cellules épithéliales, les keratinocytes. Cela suggère qu'en plus d'une grande variabilité dans le type de particules d'oxyde métallique, il n'existe pas d'étude confirmant ou infirmant de manière certaine leur potentiel inflammatoire. Ce qui n'empêche pas la législation en vigueur d'autoriser l'utilisation du nano- TiO_2 dans les crèmes solaires par exemple (<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/r-455.pdf>).

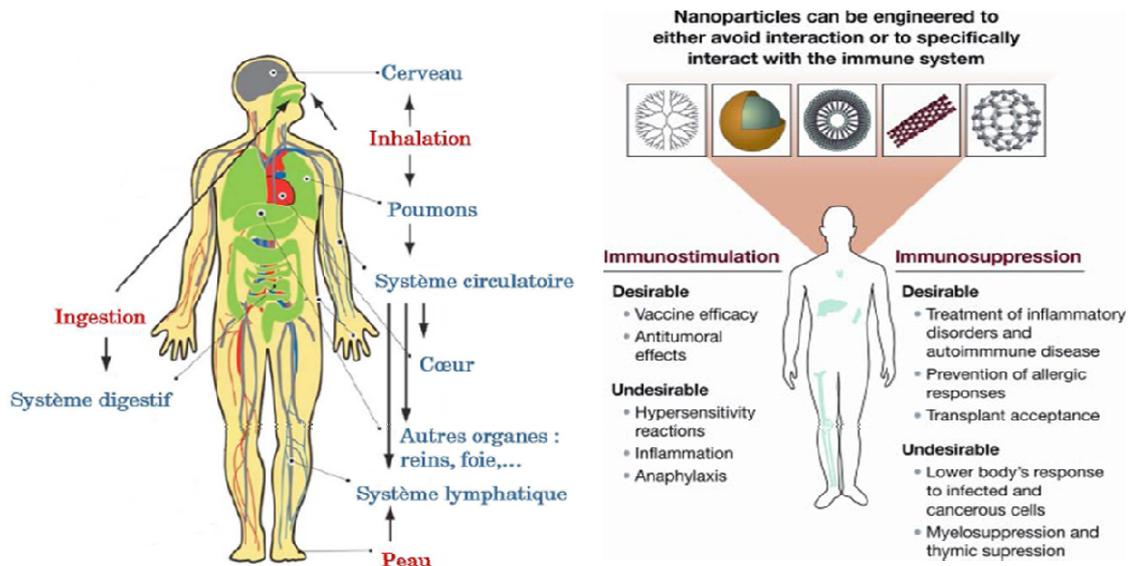


Figure 14: a, Voies d'exposition de l'homme aux nanoparticules (en rouge) et devenir dans le corps humain (bleu) (d'après ¹⁰⁷). b, Interactions particules/système immunitaire (tiré de ¹¹¹).

c. Cas des Nanotubes de Carbone

Depuis leur découverte par Iijima en 1991 ¹¹², les nanotubes de carbone (NTCs) suscitent un grand intérêt scientifique de part leurs propriétés exceptionnelles. Ces nanoparticules ne sont pas uniquement le fruit des technologies actuelles. En effet, bien qu'imparfaits, des NTCs « naturels » ont déjà été observés lors d'émissions de combustions ainsi que dans des carottes de glace vieilles de 10 000 ans.

Les NTCs sont des fibres creuses dont le diamètre est inférieur à 100 nm et dont la longueur varie de quelques microns à quelques centaines de microns (pouvant atteindre le centimètre dans certains cas) ^{112,113}. Ces caractéristiques leur confèrent ainsi un facteur de forme (rapport longueur sur diamètre) extrêmement élevé. Il est possible de décrire simplement la structure d'un NTC comme un feuillet de graphène (carbone) enroulé sur lui-même pour former un tube.

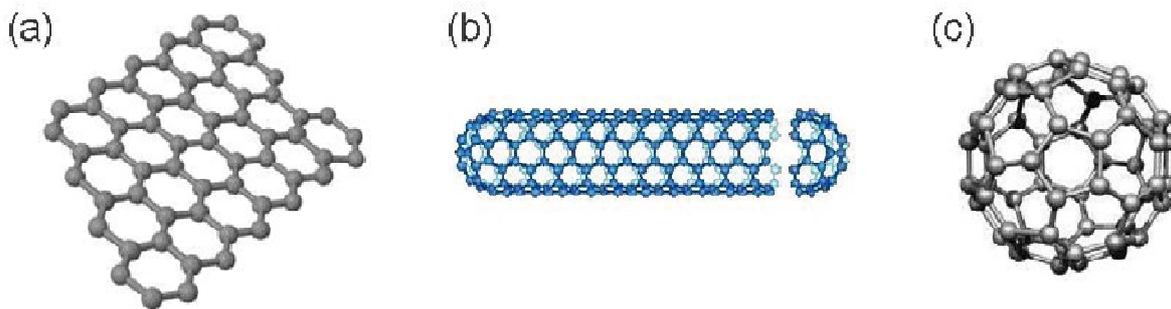


Figure 15: Représentations (a) d'un feuillet graphène; (b) d'un NTC monoparoi fermé par deux demi-fullerènes ; (c) du fullerène C60 ¹¹⁴.

Deux grandes familles de NTCs sont décrites :

- Les NTCs Mono-paroi(en anglais *Single-wall Carbon Nanotubes*, SWCNT)
- Les NTCs Multi-paroi (en anglais *Multi-wall Carbon Nanotubes*, MWCNT)

Viennent s'ajouter les nanotubes de carbones double-parois (en anglais *double-wall carbon nanotubes*, DWCNT) aux propriétés à mi-chemin entre les deux types précédents mais qui appartiennent à la famille des MWCNTs.

Différentes techniques ont été développées afin de produire les NTCs en quantités importantes : l'arc électrique, l'ablation laser et le dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD, pour "Catalytic Chemical Vapour Deposition"). La CCVD présente des avantages indéniables en comparaison des deux techniques déjà abordées précédemment, notamment en terme de contrôle des conditions opératoires mais aussi de mise en œuvre et de cout tout en permettant la production de NTCs à une échelle industrielle. C'est pourquoi elle est aujourd'hui la technique industrielle principale pour la synthèse des NTCs¹¹⁵.

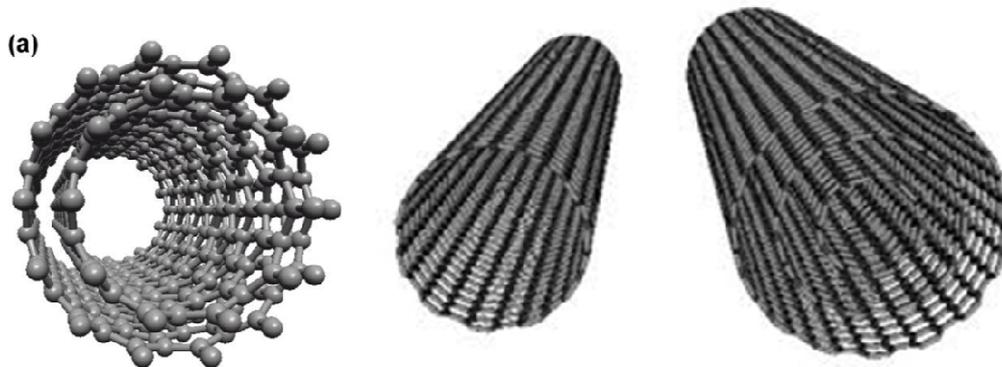


Figure 16: Représentations schématiques d'un nanotube de carbone (a) biparois et (b) multiparois (c) mono paroi.

i. Propriétés des NTCs

Si les NTC suscitent un tel engouement, c'est en partie à cause de leurs propriétés physicochimiques qui suggèrent leur utilisation future dans de nombreux domaines scientifiques mais aussi surtout industriels.

- **Propriétés électriques**

Selon leur hélicité, les NTC peuvent être conducteurs ou semi-conducteurs. Les NTCs sont des semi-conducteurs, c'est-à-dire qu'ils offrent la capacité de réguler la quantité mais aussi la direction du courant d'un champ électrique. Ainsi, ils sont envisagés pour la réalisation de nano-transistors (à effet de champs) et peuvent être appliqués en tant que nano-composants ou que nano-capteurs.

Du fait de la faible diffusion des électrons dans le cas des NTC métalliques et de leur grande stabilité à haute température (jusqu'à 250°C sous air et 1500°C sous vide), les NTC peuvent supporter des densités de courant extrêmement élevées ¹¹⁴.

- **Propriétés mécaniques**

Les propriétés mécaniques des NTCs sont exceptionnelles. Ils sont aujourd'hui, le matériau le plus résistant connu et caractérisé (100 fois plus résistants que l'acier et

4 fois plus que le fil d'araignée). De plus, ils possèdent une grande élasticité et peuvent être courbés facilement sans casser ¹¹⁶.

- ***Propriétés chimiques***

Schématiquement, les propriétés exceptionnelles des NTC ont tendance à se dégrader lorsque le nombre de parois augmente, pour tendre progressivement vers celles du graphite. Constitués d'atomes de carbone, les NTC sont très peu réactifs chimiquement. Seuls les pentagones et les défauts structuraux permettent d'initier les attaques chimiques. Leur structure creuse permet l'insertion de molécules chimiques, ce qui intéresse grandement de nombreux chimistes et biologistes. La fonctionnalisation externe des NTC modifie leur paroi et donc leur interface avec l'environnement. A la différence des SWCNTs, la fonctionnalisation des DWCNT permet de modifier uniquement les propriétés de la paroi externe et de conserver intacte la paroi interne, et donc la majeure partie de leurs propriétés ^{117,118}.

ii. Applications

Tout comme leur production, qui atteints plusieurs centaines de tonnes par an, les applications des NTC sont de plus en plus nombreuses et variées. Ils sont aujourd'hui de plus en plus utilisés dans la fabrication d'objets usuels tels que les écrans plats, les microprocesseurs, certains équipements sportifs comme les raquettes de tennis, les clubs de golf, les carrosseries de formule 1, les cadres de vélo (un vélo dont le cadre contenait des NTCs, lui permettant d'avoir une masse inférieure au kilogramme, a même été utilisé lors du Tour de France 2005). Les NTCs se retrouvent aussi dans les voitures où ils participent à leur renforcement mécanique (Renault et Peugeot).

iii. La réponse immunitaire aux NTCs : focus sur les macrophages

Les NTCs sont souvent comparés aux fibres d'amiante. En effet, tous deux sont des fibres ayant un faible diamètre pour une longueur élevée, et ayant une forte stabilité chimique dans les environnements physiologiques se traduisant par une longue

biopersistence ¹¹⁹. Cependant leur composition chimique est totalement différente de l'amiante.

Un des risques principaux pour l'Homme est que les NTCs aient des effets similaires à l'amiante sur la santé notamment en touchant les poumons des personnes exposées. Ainsi, deux études menées par Craig Poland et Ryman Rasmussen ont pu mettre en avant l'analogie des effets pathologiques provoqués par des NTCs de longueurs et de diamètres variables et par des fibres d'amiante injectées directement dans la cavité pleurale de rats ou de souris ^{113,120}. Il en ressort que, comme pour l'amiante, la longueur des NTCs semble être l'agent causal de la réaction inflammatoire et pathogénique chez ces animaux. Ici le rôle crucial des macrophages dans la réaction inflammatoire est à mettre en lumière. En effet, ce sont eux qui vont essayer de phagocyter les NTCs sans arriver à les ingérer ou à les digérer ¹²¹. Ce processus de phagocytose incomplète dite « frustrée » conduit à la libération d'enzymes lysosomales et à l'altération des membranes cellulaires. Ces deux signaux sont reconnus comme signaux de dangers permettant d'activer l'inflammasome Nlrp3 et d'initier la réaction inflammatoire.

Plus récemment, Murphy et al., ont démontré par des expériences à base de milieux conditionnés, que les NTCs multi-parois affectaient le comportement des macrophages et que leur altération provoquait un signal activateur de la production de cytokines inflammatoires, dont l'IL-1 β , par les cellules mésothéliales amplifiant ainsi la réaction inflammatoire ¹²².

Les NTCs appartiennent à la famille des nanomatériaux. Au sein de cette catégorie ils constituent un échantillon très hétéroclite. En effet les échantillons de NTCs peuvent être mono parois, bi parois ou multi parois et présenter des caractéristiques physicochimiques très différentes ; ils peuvent être synthétisés par les différentes voies décrites précédemment ; les NTC peuvent subir des traitements post-synthèse (purification, fonctionnalisation, mise en suspension) ¹²³⁻¹²⁷.

Il est donc probable qu'il y ait autant de résultats sur leur impact immunitaire que de types de NTCs utilisés pour ces études.

2. Monocytes/Macrophages et *Leishmania infantum*

La leishmaniose est une maladie chronique à manifestation cutanée et/ou viscérale due à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* de la famille des *Trypanosomatidae* et transmises par la piqûre de certaines espèces de phlébotomes, comprenant les mouches du genre *Lutzomyia* et *Phlebotomus*.

Les leishmanioses sont dues à une vingtaine d'espèces différentes du protozoaire du genre *Leishmania*. Les leishmanioses sont des maladies à transmission vectorielle. Celle-ci est assurée par la piqûre de diptères appelés phlébotomes spécifiques des espèces. La répartition géographique des leishmanioses dépend de celle des phlébotomes vecteurs et des mammifères réservoirs. On distinguera les *leishmania* transmises par les *Lutzomyia* dites du nouveau monde car localisées sur le continent américain de celles transmises par *Phlebotomus* dites de l'ancien monde car situées sur les continents européen, africain et asiatique¹²⁸. A noter que la Leishmaniose est une zoonose commune à l'Homme et au chien^{129,130}.

L'infection humaine est provoquée par environ 21 des 30 espèces qui infectent les mammifères.

a. Epidémiologie/Tableau clinique

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires de l'Homme et de nombreux mammifères. Touchant pas moins de 88 pays, elles touchent 2 millions d'humains chaque année pour un total de 12 à 15 millions de personnes infectées^{130,131}. Les formes cliniques classiques des leishmanioses sont viscérales et tégumentaires (cutanées et plus rarement des muqueuses) et sont causées par des espèces distinctes de *Leishmania*. La forme cutanée de la leishmaniose (LC) est associée à un ulcère chronique avec une infiltration de lymphocytes et de monocytes/macrophages très importante. Les leishmanioses cutanées sont étroitement liées aux *Leishmania* des familles *major*, *braziliensis* et *mexicana* entre autres. Les leishmanioses viscérales (LV) sont une forme sévère dans laquelle les parasites ont migré dans les organes vitaux *via* le système réticuloendothélial. Elles se caractérisent par une splénomégalie et des épisodes de fièvres. Elles sont dues aux *Leishmania* du groupe *Leishmania donovani*. Elles sont épidémiques et représentent 90 % des 500 000 nouveaux cas humains mondiaux annuels. Les LV

zoonotiques sont plus rares et sporadiques principalement sur le pourtour du bassin méditerranéen et en Amérique Latine. La physiopathologie de la maladie se caractérise par l'apparition des symptômes d'une infection persistante systémique, y compris la perte d'appétit, perte de poids, fièvre intermittente, la fatigue et l'épuisement. La période d'incubation est habituellement de deux à six mois. Elles sont dues à *Leishmania infantum* (*L.i*), espèce tout particulièrement pathogène pour le chien qui en est aussi le réservoir. *Leishmania infantum* est un parasite opportuniste qui provoque une LV mortelle si non traitée ^{130,131}.

b. Les déterminants des formes cliniques de la leishmaniose

L'issue de l'infection au genre *Leishmania* est modulé à la fois par des facteurs de l'hôte et du parasite. Bien qu'il existe des exceptions notables, les espèces de *Leishmania* sont à la source manifestations spécifiques de la symptomatologie de l'infection. Les déterminants critiques de la susceptibilité ou de la résistance à la leishmaniose se rapportent principalement à l'hôte et à son système immunitaire. Par exemple, des études suggèrent que le fond génétique de l'hôte serait un facteur influençant les manifestations de la maladie au cours de la leishmaniose. L'âge et la malnutrition prédisposent également à la leishmaniose viscérale chez l'homme ^{132,133}.

c. Cycle de vie

Afin de survivre et de compléter leur cycle de vie, les espèces de *Leishmania* s'adaptent à l'environnement de leur hôte par le biais de changements phénotypiques et fonctionnels. *Leishmania* est présente sous sa forme promastigote dans les phlébotomes ¹³⁴. Les promastigotes sont des organismes mobiles avec le corps allongé, et présentent un flagelle antérieur. Le phénotype promastigote va du stade de réplication procyclique au stade infectieux métacyclique compact ¹³⁴. Le passage à la forme métacyclique se traduit par des changements phénotypiques et fonctionnels nécessaires à la survie de *Leishmania* à l'intérieur de l'hôte.

La transmission naturelle a lieu quand un groupe de promastigotes métacycliques est introduit dans un ensemble hémorragique local dans le derme créé par un phlébotome. Après inoculation dans la peau des mammifères, les promastigotes vont rapidement être reconnus et internalisés par les leucocytes phagocytaires *via* la

phagocytose dépendante des récepteurs ¹³⁵⁻¹³⁸. Traditionnellement, les macrophages résidents des tissus sont caractérisés pour être les hôtes préférentiels de *Leishmania*. Les parasites internalisés se retrouvent contenus dans des compartiments intracellulaires particuliers appelés vacuoles parasitophores (VP) dans lesquelles ils se transforment en corps « amastigotes ». Les amastigotes sont distincts phénotypiquement et fonctionnellement des promastigotes de par leur fonction répllicative asexuée intensive et leur résistance élevée à la maturation de phagolysosomes avec les lysosomes ¹³⁹. Bien que la plupart des amastigotes soient observés dans les macrophages tissulaires, il y a de plus en plus d'évidences que ces formes parasitaires peuvent résider dans d'autres cellules hôtes telles que les neutrophiles, des cellules dendritiques et les fibroblastes ^{130,140,141}.

Les espèces de *Leishmania* viscérales sont présentes dans le système réticulo-endothélial, tandis que les espèces causant la leishmaniose cutanée se concentrent essentiellement dans la peau, soit sur le site d'inoculation ou éloigné de ce site ¹³⁰. Le mode de dissémination dans l'organisme n'est pas bien étudié, bien que l'on présume que les parasites migrent à l'intérieur des monocytes vers des sites distaux de l'infection.

Le cycle de vie est complet lors d'un repas sanguin contenant des *Leishmania* sous forme amastigotes dans les cellules immunitaires ou extracellulaires ¹³⁰.

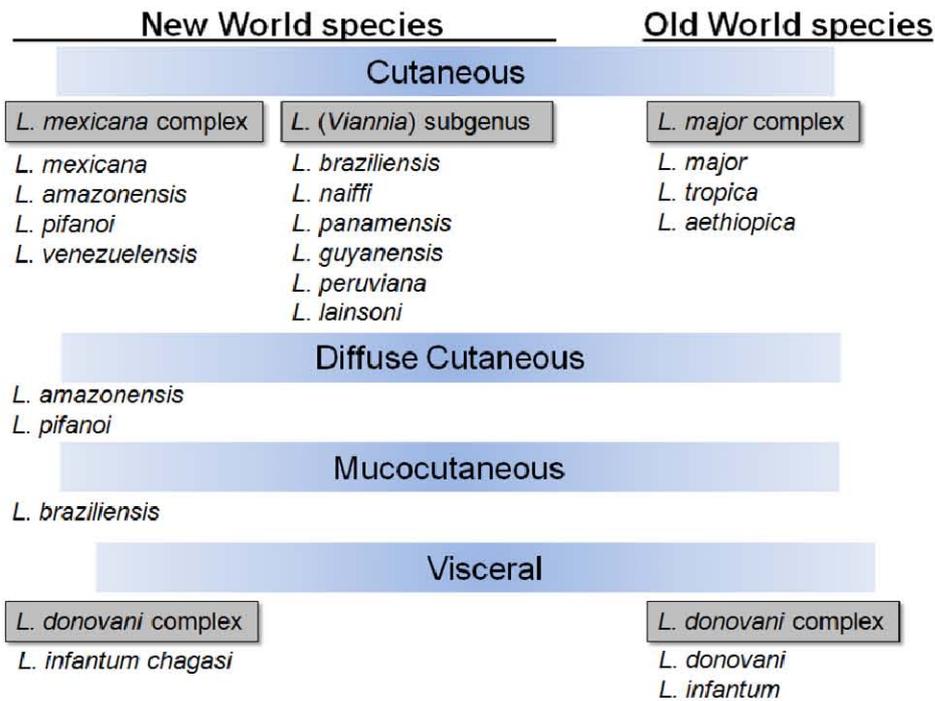


Figure 17: Les différentes espèces de *Leishmania* listées selon les manifestations cliniques majeures tiré de ¹²⁸.

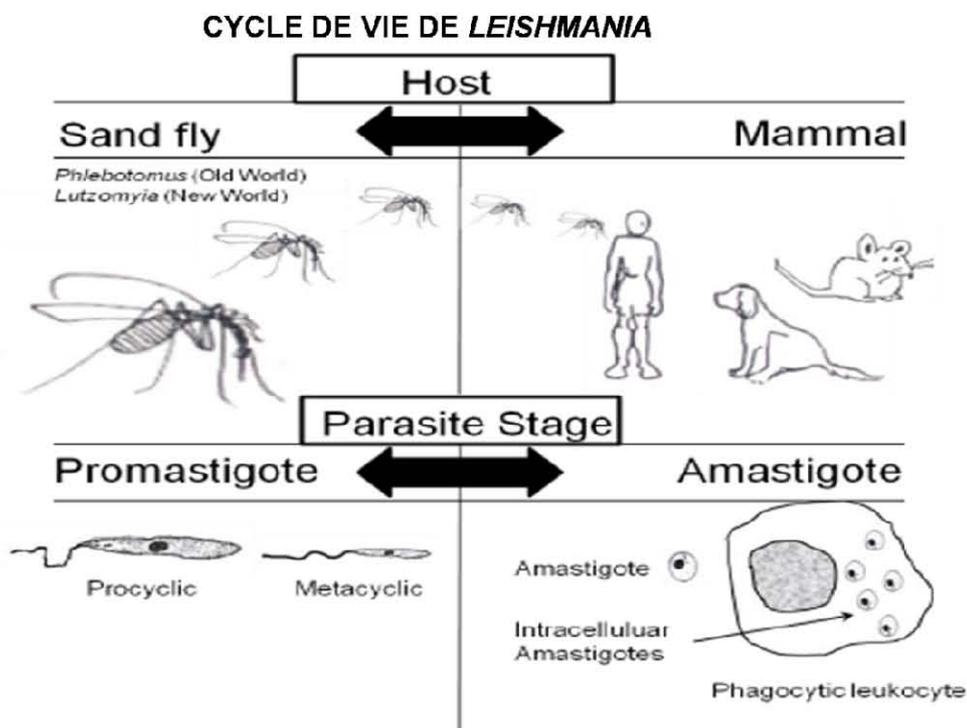


Figure 18: Les différents cycles de vie de *Leishmania*, tiré de ¹²⁸.

d. Réponse immune à la leishmania, focus sur les macrophages

Leishmania est un parasite intracellulaire avec comme réservoir privilégié pour la réplication, les macrophages et cellules dendritiques. Dans le contexte des espèces de leishmaniose viscérale, la réplication incontrôlée du parasite conduit à sa dissémination dans les organes du système réticulo-endothélial de l'hôte et au développement symptomatique de la maladie.

i. La reconnaissance par les cellules et les mécanismes microbicides

Dès l'inoculation primaire de *Leishmania*, la bataille du parasite pour sa survie face aux défenses immunitaires de l'hôte commence. Ce processus implique des interactions entre le parasite et les composantes innées du système immunitaire de l'hôte.

- ***La reconnaissance indirecte***

Les parasites rencontrent rapidement des éléments solubles et cellulaires antimicrobiens. Parce qu'ils sont introduits dans un environnement sanguin, il est fortement suggéré que les parasites sont opsonisés avec des composants sériques essentiellement membres du système du complément (C3) puis reconnus par les récepteurs CR1 et CR3 à la surface des phagocytes^{142,143}.

La littérature met en avant de multiples récepteurs macrophagiques capables d'interagir avec *Leishmania*. Bien que la fonction phagocytaire de ces récepteurs soit redondante entre eux les voies de signalisations activées sont extrêmement variables et semblent être la conséquence de facteurs exprimés par le parasite lui-même. Par exemple, le parasite sous forme promastigote exploite les opsonines présentes dans le sérum, comme le complément qu'il inactive sous forme C3bi grâce à la protéase membranaire GP63, facilitant la phagocytose des stades infectieux de *Leishmania*^{142,143}. Le CR3 a deux sites de liaison pour les particules: un site reconnaissant le complément C3bi inactivé et un site de liaison du complément indépendant des motifs Lectines¹⁴¹. De façon intéressante, la reconnaissance du C3bi à la surface d'érythrocytes par des monocytes humains et des neutrophiles ne s'accompagne pas de la formation de H₂O₂, alors que la liaison du FcyR par les IgG

adsorbés sur des érythrocytes est un fort inducteur d'H₂O₂^{144,145}. De plus, l'activation du CR3 par le C3bi induit une régulation négative de la production d'IL-12 induite par l'IFN- γ ^{141,144,145}.

- **La reconnaissance directe**

Au cours de l'infection, il est probable que *Leishmania* puisse être reconnue par plusieurs récepteurs de la cellule hôte. En effet, l'expression de nombreux PAMPs glycoconjugués par le LPG de surface de *Leishmania* permet l'interaction *Leishmania*/PRRs. Parmi ces PRRs, le récepteur Mannose (MR) semble jouer un rôle important dans la reconnaissance de *Leishmania*. C'est un récepteur lectine de type C exprimé à haut niveau protéique par les macrophages polarisés M2 et les cellules dendritiques mais pas dans les monocytes. Il présente huit domaines en tandem de reconnaissance des glucides, notamment les résidus de sucre terminal d'oligosaccharides de surface microbiennes avec l'affinité suivante: L-fucose > D-mannose > DN-acétylglucosamine >>> D-galactose. Toutefois, le rôle de ce récepteur dans la réponse anti-*Leishmania* du macrophage n'est pas encore clair^{139,146,147}. La présence de mannanes solubles bloque la reconnaissance des formes promastigotes de *L. donovani* jusqu'à 60%¹⁴⁸. Les auteurs démontrent également que les formes amastigotes sont moins bien reconnues par le MR¹⁴⁸. Ce phénomène s'explique par la faible expression de répétitions terminales de mannanes sur le LPG des formes amastigotes de *L. donovani*¹⁴⁸. Toutefois, Akilov et al démontrent *in vivo* que les souris C56BL / 6, KO pour le MR, injectées avec la forme métacyclique de promastigotes de *L. major* (leishmaniose cutanée), ne diffèrent pas dans la formation de lésions ou leurs résolutions¹⁴⁹. De plus les niveaux d'IL-12 et de TNF- α détectés sont similaires entre KO et WT¹⁴⁹. Pour *L. donovani* (leishmaniose viscérale), les macrophages murins KO pour le MR issus de moëlle osseuse prétraités avec des mannanes présentaient la même charge parasitaire au bout de 4H d'infection¹⁴⁹.

Une des explications avancée de cette contradiction est due à une différence d'expression des résidus mannose à la surface des *Leishmania* en fonction de leur virulence et de leur stade de prolifération¹⁵⁰. La fonction précise du récepteurs MR dans la reconnaissance de *Leishmania infantum* et son rôle dans l'établissement des mécanismes microbicides sera abordé dans l'article 2.

En parallèle, le récepteur DC-Sign (homologue humain de SignR3 murin), un autre récepteur Lectine de type-C, semble également être impliqué dans la reconnaissance de *Leishmania* par les cellules dendritiques¹⁵¹. SignR3 est assez proche du récepteur Mannose quant aux ligands qu'il reconnaît avec une affinité plus prononcée pour les glycoprotéines mannosylées et fucosylées¹⁵¹. Cependant, contrairement au MR, la détection des parasites semble être indépendante de la position terminale des résidus mannose sur le LPG. Pour déterminer si DC-Sign reconnaît les résidus sur le LPG, des formes natives ou mutées pour ce glycoconjugué ont été mises en contact avec des cellules K562 transfectées avec DC-Sign. Originellement, les auteurs soulignent que les promastigotes (*L.infantum*) déficients pour le LPG ont une plus grande affinité pour DC-Sign que les formes natives. Il est donc suggéré que DC-Sign, bien que reconnaissant les formes promastigotes, reconnaît plus fortement des résidus masqués par le LPG. Le résidu glycoconjugué de surface des *Leishmania* qui se lie à DC-SIGN n'a pas été identifié. Cependant, les formes promastigotes de *L.major* (cutanée) ne sont pas reconnues par DC-SIGN, ce qui suggère que le ligand est une molécule spécifiquement exprimée par les *Leishmania L. infantum* et *L. donovani* (viscérales).

Bien que son rôle dans le combat de l'infection à *Leishmania* soit peu connu, dans le cadre de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis*, son engagement est associé à une production amplifiée d'IL-10 par les macrophages et cellules dendritiques suite à l'activation de la voie Raf1¹⁵²⁻¹⁵⁴. Cela a pour conséquences de favoriser l'installation de l'infection.

L'invalidation par siRNA de l'expression du TLR2, TLR3, IRAK-1, et MyD88 a aussi révélé la participation de ces deux TLRs dans la production de NO et de TNF- α par les macrophages en réponse à *L.donovani*, autre espèce responsable de la leishmaniose viscérale. La réponse du TLR2 dépend de motifs glycoconjugués contenant des phosphoglycans comme les phospho-mannanes ainsi que des répétitions de galactose. En revanche, la réponse induite par le TLR3 est indépendante de l'expression de glycoconjugués à la membrane de *Leishmania*. Un rôle du TLR3 dans l'activité leishmanicide des macrophages en réponse à l'IFN- γ est également démontré¹⁵⁵.

Enfin, l'implication de Dectin-1 dans la reconnaissance des formes infectieuses promastigotes de *Leishmania* n'est pas encore établie malgré de fortes présomptions dues à l'expression de β -glucan à la surface de *Leishmania infantum*¹⁵⁶. Ce

récepteur est essentiel dans la reconnaissance de *Candida albicans* et dans son élimination^{157,158}. Pour ce faire il signale en promouvant d'une part la transcription de gènes inflammatoires *via* la voie Syk/CARD9 mais également l'activation de l'inflammasome *via* la voie Syk/ROS^{157,158}. En effet, la délétion de Dectine-1, Nlrp3 ou de Nlrc4 est associée à une très grande susceptibilité des souris à l'infection par *Candida albicans* suggérant leur rôle essentiel dans le développement d'une réaction inflammatoire optimale^{157,159}. De plus, la synergie entre Dectine-1 et MR dans la sécrétion de TNF- α mais également d'IL-1 β dans des monocytes humains et macrophages murins infectés par *Candida albicans* a récemment été mise en évidence^{160,161}. En effet, la reconnaissance par MR des mannanes –N-liés potentialise la production de pro-IL1 β par les monocytes humains¹⁶⁰. La maturation de cette cytokine est due à la reconnaissance des β 1.3-glucan par Dectine-1 qui active l'inflammasome Nlrp3¹⁶⁰. Enfin, il est également à noter que l'utilisation de ligands de Dectine-1 améliore grandement l'élimination de *Leishmania in vivo* et constitue un des traitements envisagés dans l'avenir¹⁶². Ainsi, l'importance de ce processus immunitaire dans l'élimination de nombreux pathogènes font de ce récepteur un élément d'étude extrêmement intéressant dans le cas de la *Leishmaniose*. Le rôle précis des récepteurs Lectine de type-C sera abordé dans l'article 2.

ii. Les espèces radicalaires

L'interaction entre les macrophages et *Leishmania* (cutanée et viscérale) conduit à sa phagocytose, la sécrétion de médiateurs inflammatoires comme les cytokines TNF- α et IL-1 β ou la chimiokine IL-8 et le recrutement de polynucléaires neutrophiles sur le lieu de l'infection^{163,164}. Le processus de phagocytose mène à une fusion phagosome-lysosomes toxique pour les formes promastigotes de *Leishmania* notamment en raison de la présence d'enzymes ainsi que d'espèces nitrosylées et radicalaires de l'oxygène extrêmement toxiques pour ce parasite^{163,164}. Deux types de molécules microbicides sont reconnues pour leur efficacité contre *Leishmania*, le NO¹⁶⁵ et les radicaux de l'oxygène¹⁶⁶. En effet, les souris déficientes en l'enzyme iNOS ne peuvent combattre l'infection par *Leishmania* tout comme les macrophages qui en sont dérivés¹⁶⁷. En parallèle, les souris déficientes en gp91 *phox*^{-/-} (ne produisant plus de ROS) ont un défaut de contrôle de l'infection dans le temps¹⁶⁶,

soulignant l'implication de ces deux espèces radicalaires dans l'élimination de ce parasite. Pour retarder la fusion du phagosome avec les lysosomes ainsi que le recrutement des sous-unités de la NADPH oxydase, le parasite promeut la formation de vacuoles parasitophores retardant de 24 à 48 heures la fusion des phagosomes avec les lysosomes, laissant à *Leishmania* le temps de se protéger en se transformant en forme amastigote répliquative résistante au pH acide et aux protéases lysosomales^{131,164}.

iii. Les cytokines et chimiokines

L'autre versant du combat anti-*Leishmania* initié par les macrophages concerne leur capacité à produire des médiateurs solubles pro-inflammatoires capables d'attirer de nouvelles cellules immunitaires sur le lieu de l'infection. Comme décrit précédemment, les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-18, IL-1 α et IL-1 β) jouent un rôle prépondérant dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles *via* l'établissement d'une réponse inflammatoire optimale^{130,136,168-171}. Toutefois, le lien des polynucléaires neutrophiles avec la production d'IL-1 par les macrophages n'est pas encore mis en évidence dans le contexte de leishmaniose malgré de fortes présomptions. En parallèle, la production d'IL-12 et d'IL-18 par les macrophages permet une activation et un recrutement des lymphocytes T et des NKs accompagnée d'une synthèse d'IFN- γ , essentielle dans la production de RNs et des ROS par les macrophages^{168,172}. De plus, l'IL-1 α ou l'IFN- γ favorisent l'élimination de *Leishmania* par les macrophages et les cellules dendritiques^{130,136,168-171}. Alors que ces médiateurs sont essentiels dans la fonction leishmanicide des macrophages, ces parasites ont développé des stratégies qui leur permettent de fortement inhiber leur production dans le temps, leur permettant de se protéger du système immunitaire. Par exemple, l'induction de l'IL-1 β par le LPS ou *S. aureus* est inhibée par de *Leishmania* à des temps tardifs d'infection *in vitro* (48H),^{173,174,175}. Le parasite joue un rôle négatif dans l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β et du TNF- α en induisant une séquence inhibitrice du promoteur¹⁷⁶. Plus récemment, il a été démontré que cette inhibition se faisait par le biais de l'induction de l'IL-10¹⁷⁷.

iv. **Autres cellules effectrices de la réaction immune à *Leishmania***

- ***Les Neutrophiles, le cheval de Troie***

Le rôle des neutrophiles sur le lieu de l'infection n'est pas encore bien élucidé. En effet, les neutrophiles phagocytent également *Leishmania*. Néanmoins, au lieu de mourir sitôt après la phagocytose et d'être ingéré par les macrophages, *Leishmania* rallonge leur durée de vie et stimule le recrutement de nouveaux macrophages sur le site de l'infection *via* la sécrétion de la chimiokine MIP-1 β . De plus, *Leishmania* déclenche la mort apoptotique des neutrophiles de manière à ne pas être inflammatoire. Les polynucléaires neutrophiles sont phagocytés par les macrophages qui se différencient en macrophages M2 régulateurs et sécrètent des cytokines d'arrêt de l'inflammation (IL-10 et TGF- β)^{130,141}. La *Leishmania* peut alors s'établir durablement dans ces cellules. Dans ce processus, la réponse inflammatoire est paradoxale. D'une part elle sert l'organisme en recrutant des effecteurs capables de tuer *Leishmania* (Neutrophiles, Natural Killers, Lymphocytes T et Monocytes) mais elle sert aussi le parasite en lui fournissant par la même occasion un réservoir de cellules, les macrophages et les neutrophiles¹⁶⁴. *Leishmania* corrompt ainsi ces derniers en les empêchant de mourir de manière inflammatoire, ce qui a pour effet leur phagocytose par les macrophages sans induction d'une réponse inflammatoire. La présence de *Leishmania* dans les phagolysosomes des macrophages la rend alors « invisible » au système immunitaire bloquant à la fois sa reconnaissance par les récepteurs membranaires et cytoplasmiques mais également toute présentation antigénique.

- ***Les NKs et Lymphocytes***

La polarisation Th1 est classiquement associée à l'élimination de la *Leishmania* cutanée alors que la polarisation Th2 maintient une sensibilité à l'infection. La dichotomie de ces polarisations distinctes n'est pas retrouvée dans les patients et souris infectées par des espèces viscérales. En effet, on retrouve un recrutement des lymphocytes TCD4 et CD8 mais également de cellules NKs associé à la production d'IFN- γ et à l'élimination de la *Leishmania* mais également la présence en

grande quantité de LT régulateurs forts producteurs d'IL-10 et d'IL-4. Il est donc suggéré que la production simultanée et persistante de ces cytokines suppressives constitue l'élément clé de la répression et de la réponse immunitaire observée chez des patients atteints de leishmaniose viscérale¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

3. Objectifs de l'étude

Ainsi, la réactivité des macrophages à *Leishmania* est fonction des ligands qu'ils reconnaissent directement sur le parasite ou indirectement *via* les facteurs opsonisants. Parmi ces récepteurs nous avons focalisé notre étude sur les récepteurs Lectine de type-C (Dectine-1, Mannose et SignR3) principalement exprimés par les macrophages de type 2. Chacun de ces récepteurs reconnaît des glucoconjugués différents et est impliqué dans la mise en place d'une réponse effectrice du macrophage spécifique. Dectine-1 reconnaît les carbohydrates de type β -glucans alors que Mannose et SignR3 sont plus spécifiques des mannanes et résidus fucosylés. Nous avons ainsi évalué l'importance de chacun de ces récepteurs dans la modulation d'une réponse inflammatoire capable de favoriser ou d'empêcher l'élimination de *Leishmania infantum* par le système immunitaire. Par la suite, nous avons également mis en évidence les différents signaux de stress intracellulaires associés à ces récepteurs Lectine de type-C capables de promouvoir l'élimination de *Leishmania infantum* par les macrophages notamment *via* l'activation des ROS et de l'inflammasome. L'ensemble de ces données peut permettre l'utilisation ultérieure de ces récepteurs comme cible pharmacologique activable dans le but de combattre la leishmaniose.

PARTIE 2: RESULTATS

I. Travaux de Recherche

1. Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation

Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation

Etienne Meunier, BS_{a,b}, Agnès Coste, PhD_{a,b}, David Olganier, PhD_{a,b}, Hélène Authier, PhD_{a,b}, Lise Lefèvre, BS_{a,b}, Christophe Dardenne, BS_{a,b}, José Bernad, PhD_{a,b}, Maryse Béraud, PhD_{a,b}, Emmanuel Flahaut, PhD_c *, Bernard Pipy, PhD_{a, b, *}

a, UMR MD3, EA2405 Polarisation des Macrophages et Récepteurs Nucléaires dans les Pathologies Inflammatoires et Infectieuses, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

b, UMR 152, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

c, UMR CNRS 5085, CIRIMAT/LCMIE, Centre Interuniversitaire de Recherche et Ingénierie des Matériaux, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

* These authors contributed equally to this work.

a. Introduction

Les nanotubes de carbones, de part les exceptionnelles propriétés sont des matériaux très prometteurs dans plusieurs secteurs industriels. Ils présentent une utilisation industrielle en constante progression. De nombreuses études ont au préalable déjà caractérisé leur potentiel inflammatoire se traduisant par une forte production de dérivés endogènes métaboliques pouvant s'avérer pathologiques. Il est donc impératif de déterminer leurs effets sur la santé humaine.

Comme de nombreuses particules et nano-particules, ils sont principalement captés par les cellules phagocytaires tels les monocytes et les macrophages.

Dans cet article, nous rapportons pour la première fois que les nanotubes de carbone bi-parois (DWCNTs), présentant un faible diamètre mais des longueurs allant de quelques μm à plusieurs centaines de μm , synergisent avec les récepteurs TLRs des monocytes humains primaires pour promouvoir la sécrétion d'IL-1 β .

Nous montrons ainsi que la sécrétion d'IL-1 β induite par les DWCNTs dans les monocytes dépend de l'engagement de l'inflammasome Nlrp3 mais également de l'activation de la caspase-1.

L'étude des signaux de dangers conduisant à la sécrétion de l'IL-1 β montre que les ROS ne semblent pas impliqués dans ce processus. Par contre, l'implication de la phagocytose, de l'acidification lysosomale et de la cathepsine-B dans ce processus est clairement établie dans ce travail. De plus, nous isolons également le potassium comme un élément essentiel de l'activation de l'inflammasome Nlrp3 par les DWCNTs.

Au final, cet article permet d'isoler les DWCNTs comme un activateur de l'inflammasome dans les monocytes humains, suggérant qu'ils doivent être utilisés avec précaution. De plus, nous mettons en évidence différents signaux de dangers cellulaires impliqués dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3 par les DWCNTs.

L'étude d'une des propriétés des DWCNTs, leur hydrophobicité, permet d'expliquer partiellement seulement, l'activation de l'inflammasome par ces particules. Comment cette hydrophobicité joue elle un rôle dans la modulation des signaux de dangers cellulaires reste encore à être caractériser.

Une autre hypothèse, l'effet « fibre » des DWCNTs (déjà décrit dans le cadre de l'amiante) pourrait également jouer un rôle dans la libération des signaux de dangers cellulaires. En effet, la longueur des NTCs est de plus en plus suspectée d'être une

caractéristique responsable de la réponse inflammatoire des macrophages. L'empêchement de leur phagocytose due à leur longueur ou leur insertion dans les membranes plasmiques est susceptible d'altérer la physiologie intracellulaire et de promouvoir la libération des signaux cellulaires activateurs de l'inflammasome Nlrp3.

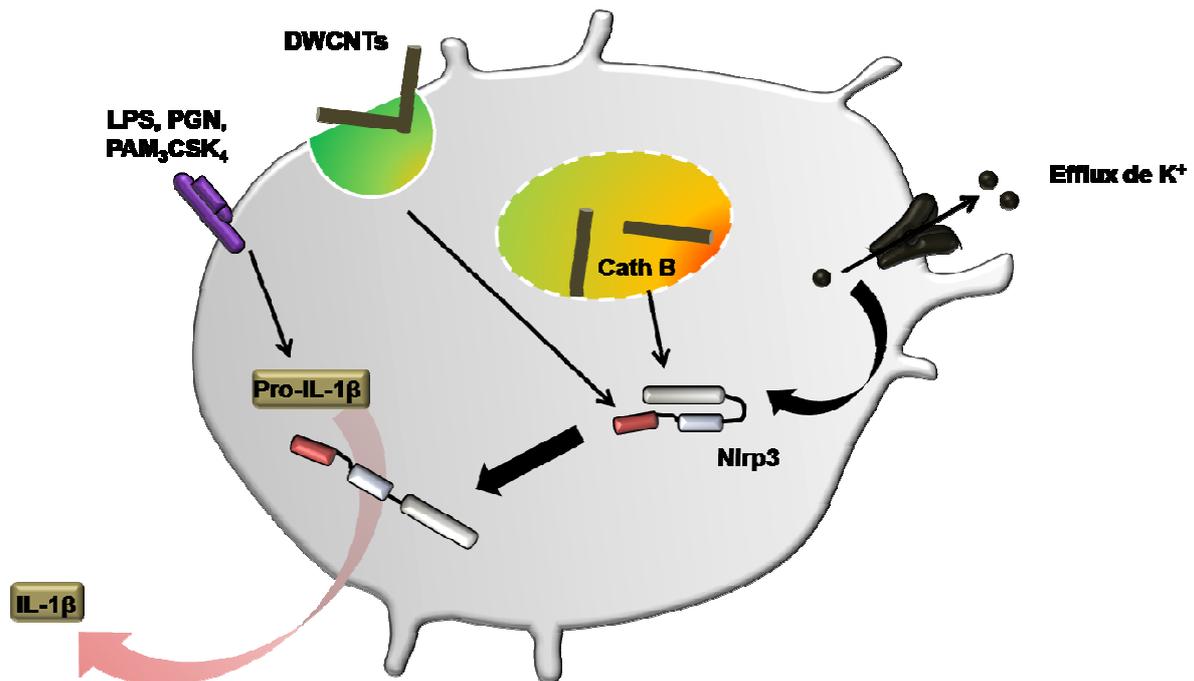


Figure 19: Modèle d'activation de l'inflammasome Nlrp3 par les DWCNTs.

b. Article

Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation

Etienne Meunier, BS^{a,b}, Agnès Coste, PhD^{a,b}, David Ollagnier, PhD^{a,b}, Hélène Authier, PhD^{a,b},
Lise Lefèvre, BS^{a,b}, Christophe Dardenne, BS^{a,b}, José Bernad, PhD^{a,b}, Maryse Béraud, PhD^{a,b},
Emmanuel Flahaut, PhD^c, Bernard Pipy, PhD^{a,b,*}

^aUMR MD3, EA2403 Polarisation des Macrophages et Récepteurs Nucleaires dans les Pathologies Inflammatoires et Infectieuses, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

^bUMR 152, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

^cUMR CNRS 5085, CIRIMAT/ICMIE, Centre Interuniversitaire de Recherche et Ingénierie des Matériaux, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Received 14 June 2011; accepted 7 November 2011

Abstract

Because of their outstanding physical properties, carbon nanotubes (CNTs) are promising new materials in the field of nanotechnology. It is therefore imperative to assess their adverse effects on human health. Monocytes/macrophages that recognize and eliminate the inert particles constitute the main target of CNTs. In this article, we report our finding that double-walled CNTs (DWCNTs) synergize with Toll-like receptor agonists to enhance IL-1 β release in human monocytes. We show that DWCNTs-induced IL-1 β secretion is exclusively linked to caspase-1 and to Nlrp3 inflammasome activation in human monocytes. We also establish that this activation requires DWCNTs phagocytosis and potassium efflux, but not reactive oxygen species (ROS) generation. Moreover, inhibition of lysosomal acidification or cathepsin-B activation reduces DWCNT-induced IL-1 β secretion, suggesting that Nlrp3 inflammasome activation occurs via lysosomal destabilization. Thus, DWCNTs present a health hazard due to their capacity to activate Nlrp3 inflammasome, recalling the inflammation caused by asbestos and hence demonstrating that they should be used with caution.

From the Clinical Editor: This is a very important biosafety/toxicity study regarding double walled carbon nanotubes. The investigators demonstrate that such nanotubes do represent a health hazard due to their capacity to activate Nlrp3 inflammasome, resembling the inflammation caused by asbestos. While further study of this phenomenon is definitely needed, the above findings clearly suggest that special precautions need to be taken when applying these nanoparticles in human disease research.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Double-walled carbon nanotubes; Human monocytes; Nlrp3 inflammasome; IL-1 β inflammation

With the increasing use of carbon nanotubes (CNTs), public concern about their potential risk to human health has also risen.^{1–3} CNTs offer many useful properties, due to their large surface area in comparison with larger particles. They are used for many different purposes, including microelectronics and surface coating. We distinguish three types of CNTs with their own physical and chemical properties: single-walled CNTs (SWCNTs), double-walled CNTs (DWCNTs), and multiwalled CNTs (MWCNTs). DWCNTs (Figure 1, A) are the simplest member of the MWCNTs.^{4–5} This structure offers several

advantages. In particular, the outer wall can be functionalized (even covalently) to enhance dispersion or bring new functionalities while retaining the remarkable mechanical and electronic properties of the inner nanotube.⁶

Recent works highlighted that CNTs induced a strong acute inflammatory reaction through the secretion of pro-inflammatory cytokines in mice treated with SWCNTs.⁷ Indeed, mice intranasally instilled with DWCNTs showed an increase in interleukin (IL)-6 (IL-6) plasma levels.⁸ Consistent with these data, Inoue et al showed that the intratracheal exposure of mice with SWCNTs and MWCNTs promoted secretion of the pro-inflammatory interleukin-1 β (IL-1 β) through their peripheral blood monocytes.⁹ Although the *in vivo* pro-inflammatory potential of CNTs has been suggested, the signaling pathways leading to the increase in the pro-inflammatory cytokine IL-1 β secretion in human monocytes/macrophages has not yet been determined.

No conflict of interest was reported by the authors of this article.
This work was supported by a Pôles de recherche et d'enseignement supérieur, Toulouse (PRES) fellowship awarded to Etienne Meunier.

*Corresponding author.
E-mail address: bernard.pipy@univ-toulouse.fr (B. Pipy).

1549-9634/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.nano.2011.11.004

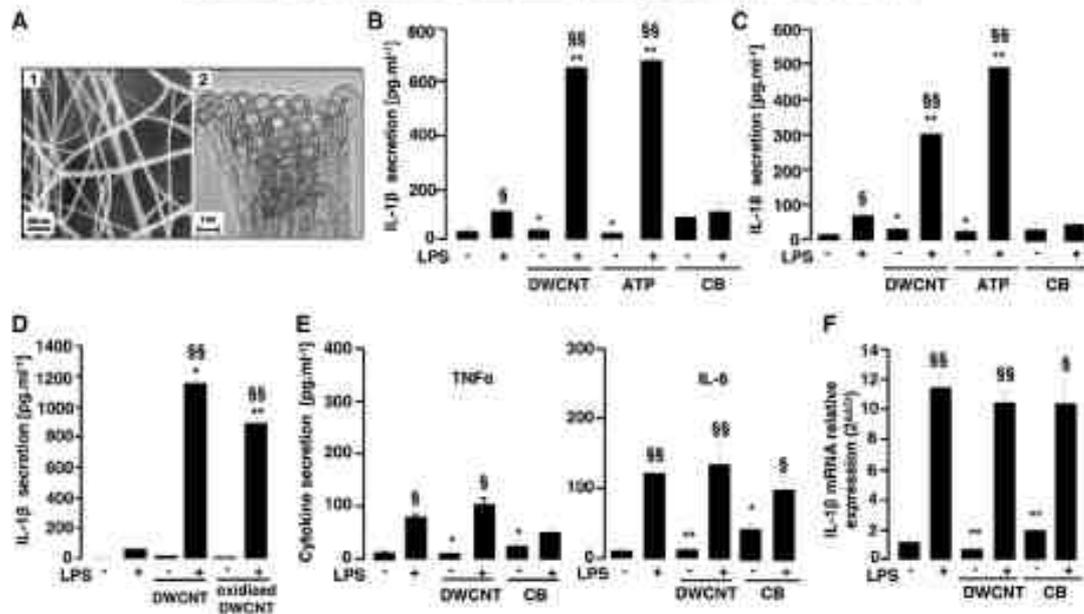


Figure 1. DWCNTs induce IL-1 β and IL-18 but not TNF α and IL-6 secretion in LPS-primed human monocytes. (A) Scanning electronic microscopy (1) and TEM (2) images of bulk DWCNTs before dispersion. (B–E) IL-1 β , IL-18, TNF α and IL-6 release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human monocytes stimulated with raw DWCNTs, oxidized DWCNTs, ATP, or CB. (F) IL-1 β mRNA level in untreated or LPS-primed human monocytes stimulated or not with DWCNTs or CB. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in comparison with the LPS-primed human monocytes. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ in comparison with the respective unprimed human monocytes. Data are means \pm SEM. The data are representative of three independent experiments.

Inflammatory cytokines of the IL-1 family, such as IL-1 α , IL-1 β , and IL-18 are potent mediators of innate immunity.^{7,8} These cytokines are regulated both on transcriptional and post-transcriptional levels. Their production requires two steps: a priming event triggering the transcription of pro-cytokines, such as IL-1 β , the proteolytic processing of proIL-1 β by caspase-1 to generate the “mature” IL-1 β and the release of mature IL-1 β from cells.⁹ Processing of pro-IL-1 β requires assembly and activation of inflammasomes, which are cytoplasmic multiprotein complexes that contain Nod-like receptor (NLR) and caspase-1 proteins.¹⁰ The Nlrp3 inflammasome consists of three main components: the NLR-family protein, Nlrp3, procaspase-1, and the ASC (apoptosis speck-like protein containing a CARD) adapter, which link Nlrp3 to ASC. Following auto-activation through inflammasome assembly, caspase-1 cleaves IL-1 β whose biologically active form is then secreted. Consequently, the production of IL-1 β implies two separate signals to yield the active pro-inflammatory cytokine. First, the stimulation of pattern recognition receptors, such as Toll-like Receptors (TLRs) and cytokine receptors, is required for synthesis of pro-IL-1 β protein in cells. Then, a second signal is needed for Nlrp3 inflammasome activation responsible for proIL-1 β cleavage and IL-1 β secretion.^{7,8} Thus, the signal activating the inflammasome is necessary and sufficient when the cells are naturally primed by environmental antigens. Conversely, the activation of pattern-recognition receptors that control IL-1 family cytokine transcription is necessary but not sufficient. Recently, the activation of the Nlrp3 inflammasome by toxins, ATP, silica, asbestos, SiO₂ and TiO₂ nanoparticles (NPs) has

been characterized in vitro in monocytes, macrophages, and dendritic cells^{11–13} primed with TLR ligands, such as lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycans (PGN) or synthetic triacylated lipoprotein (PAM₃CSK₄). In the study reported here, we investigated the effect of DWCNTs on pro-inflammatory IL-1 family release of human monocytes through inflammasome activation using an in vitro experimental model of LPS-primed human monocytes. We showed that DWCNTs induced the proteolytic processing of pro-IL-1 β through Nlrp3 inflammasome activation in human monocytes. This activation required DWCNTs actin cytoskeletal filament rearrangement, potassium efflux, and lysosomal destabilization.

Methods

Cell preparation

Primary Human Monocytes (PHMs) were obtained from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Toulouse, France) and purified using the Ficoll-Hypaque method as previously described.¹⁴ Written informed consent was obtained from the donors under EFS Contract n°21/PVNT/TOU/UPS04/2010-0025. Following articles L1243-4 and R1243-61 of the French Public Health Code, the contract was approved by the French Ministry of Sciences and Technology (Agreement n°AC 2009-921). Rapidly, peripheral bone marrow (PBM) cells were isolated from blood of healthy donors in accordance with EFS on Ficoll gradient and were seeded in plate for 2 hours. Cells were washed three times in phosphate-buffered saline

(PBS) (without calcium or magnesium) and adherent cells were used for experiments in synthetic freshwater medium (SFM) culture provided by Invitrogen (Gibco, Saint Aubin, France).

DWCNT preparation

Raw DWCNTs were synthesized by Catalytic Chemical Vapor Deposition (CCVD) as described earlier.²³ DWCNTs were produced by CCVD decomposition of CH₄ over Mg_{1-x}Co_xO solid solution containing a small addition of molybdenum. High-resolution transmission electron microscopy (TEM) showed that a typical sample consists of approximately 80% DWCNTs, 15% SWCNTs, and 5% TWCNTs. The Brunauer Emmett Teller (BET) specific surface area was 985 m²·g⁻¹. The diameter distribution of the DWCNTs ranged from 0.5 to 2.5 nm for inner tubes and from 1.2 to 3.2 nm for outer tubes. The length of individual DWCNTs usually ranged between 0.1 and 100 μm (in bundles). For some experiments, oxidized DWCNTs were used. The raw DWCNTs were heated in 3 M HNO₃ for 24 hours in reflux conditions at 130°C. They were then washed with deionized water on a polypropylene filtration membrane (0.45 μm pore size) until neutrality, before being freeze-dried. A typical sample presented 0.3 wt % of Cobalt and 150 ppm of Mo after reflux treatment (Figure S1). Then, a hexane and water extraction procedure was used to separate the water-soluble and insoluble DWCNTs.²⁴

DWCNTs were sonicated in culture medium for 5 minutes and then rapidly centrifuged. The supernatant containing DWCNTs was homogenized and immediately used for experiments.

Stimulation assay

To evaluate IL-1β secretion and caspase-1 activation, human monocytes were primed with ultrapure LPS (2 ng·mL⁻¹) (Invivogen, Toulouse, France), with peptidoglycan (0.5 ng·mL⁻¹) purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin, France) or PAM₂ CSK₄ (5 ng·mL⁻¹) (Sigma-Aldrich) for 8 hours. Then, PHMs were stimulated with DWCNTs (25 μg·mL⁻¹) or carbon black (CB) (25 μg·mL⁻¹) (Degussa, Dusseldorf, Germany) for 18 hours or with ATP (2 mM) (Sigma-Aldrich) for 4 hours. In some experiments, cells were pre-incubated with cathepsin inhibitor (CA-074, 25 μM), cathepsin-B inhibitor (CA-074Me, 25 μM), baflomycin A1 (125 nM) provided by Calbiochem (Merck, Lyon, France), caspase inhibitor (*z*-val, 40 μM), caspase-1 inhibitor (*z*-vyad, 50 μM), caspase-3 inhibitor (*z*-deval, 50 μM) obtained from Biovision (Climasciences) or Itraconazole A (Sigma-Aldrich) (2 mM), 1 hour before DWCNTs, CB, or ATP stimulation.

Cytokine measurement

For cytokine detection, ELISA kits for IL-1β, TNF-α, IL-6 (Becton Dickinson, Grenoble, France) and IL-18 (R & D Systems, Lille, France) human cytokines were used. They were used according to the manufacturers' instructions.

Reverse transcription and real-time PCR

Adherent PHMs were incubated with 25 μg·mL⁻¹ of DWCNTs or CB for 5 hours. The cells were then lysed in RLT buffer supplemented with 1% β-Mercapto-ethanol and mRNAs were obtained with RNeasy Mini Kit columns (Qiagen,

Courmoucel, France) using the manufacturer's protocol. Reverse transcription of cDNA was performed according to the manufacturer's recommendations (Thermo Electron, Saint Herblain, France). Quantitative real-time PCR was performed on a LightCycler system (Roche Diagnostics, Meylan, France) using LightCycler 480 SYBR Green 1 Master (Roche Diagnostics). Ten microliters of reaction mixture were incubated; the amplifications were performed for 50 cycles (10 seconds at 95°C, 10 seconds at 60°C, and 10 seconds at 72°C). The primers (at a final concentration of 2 μM) were designed with the software Primer 3 and listed below. β-actin mRNA was used as the invariant control. The primers used were Nlrp3; (Sense) 5'-GCA-GCA-AAC-TGG-AAA-GGA-AG-3', (Antisense) 5'-CTT-CTC-TGA-TGA-GGC-CCA-AG-3', *IL-1β*; (Sense) 5'-AAG-CAG-AGA-GGG-AAG-GAG-AG-3', (Antisense) 5'-CAG-CCA-ATC-TTC-ATT-GCT-CA-3', *β-actin*; (Sense) 5'-CCT-CAC-CCT-QAA-GTA-CCC-CA-3', (Antisense) 5'-TGC-CAG-ATT-TTC-TCC-ATG-TCG-3'. The results of qRT-PCR data were analyzed as described previously.¹⁷

Western blot

Western blots were performed as previously described.¹⁸ Rabbit anti-caspase-1 antibody (Climasciences, Nanterre, France) was used at 1/400 and goat anti-actin at 1/800 (Climasciences).

siRNA assay

Human Nlrp3 and control siRNA were purchased from Santa Cruz Biotechnologies. PHMs were primed with LPS for 18 hours and then incubated both with 100 nM of control siRNA or Nlrp3 siRNA and with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) for 8 hours according to the manufacturer's instructions. Then, transfection medium was removed. Cells were then stimulated with DWCNTs (50 μg·mL⁻¹) and supernatant was used to determine IL-1β protein level. Cell lysate was used to evaluate IL-1β mRNA level.

Potassium efflux inhibition

For potassium efflux inhibition, PHMs were primed with LPS for 18 hours and then medium was replaced by serum-free buffer containing 150 mM KCl, 5 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 1% BSA, pH 7.4. For control experiment, a buffer containing 150 mM NaCl was used (150 mM NaCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1% BSA, pH 7.4). Cells were then stimulated with DWCNTs for 8 hours.

ROS

The oxygen-dependent respiratory burst of PHMs was measured by chemiluminescence in the presence of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (66 μM, luminol; Sigma-Aldrich) using a thermostatically (37°C) controlled luminometer (Wallac 1420 Victor2). The luminol detects both reactive oxygen and nitrogen intermediates (O₂⁻, ONOO⁻, OH⁻). The generation of chemiluminescence was monitored continuously for 1 hour after 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA, 100 μM; Sigma-Aldrich) or DWCNT challenge. Statistical analysis was performed using the area under the curve expressed in counts × seconds.

TEM

Cells exposed for 2 hours to $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of DWCNTs were analyzed by TEM. Cells were adherent on their plastic surface and fixed *in situ* with a mix of 2% paraformaldehyde – 0.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmic acid and embedded in Epon. Fine (1- μm thick) and ultrafine (60-nm thick) slices were cut, stained with uranyl acetate and lead salt, and observed under Jeol 1010 TEM (60 keV).

Statistical analysis

For each experiment, the data were subjected to one-way analysis of variance followed by the means multiple comparison method of Bonferroni-Dunn. $P < 0.05$ was considered as the level of statistical significance.

Results

DWCNTs induce IL-1 β and IL-18, but not TNF α or IL-6 secretion in LPS-primed PHMs

To determine the inflammatory potential of DWCNTs on PHMs, the protein levels of IL-1 β and IL-18, which belong to the IL-1 family, were evaluated (Figure 1, B and C). Although DWCNTs did not induce IL-1 β and IL-18 secretion in unprimed-PHMs, the treatment of LPS-primed PHMs with DWCNTs resulted in a strong increase of IL-1 β and IL-18 release. In addition, the inert carbon black did not induce IL-1 β and IL-18 secretion (Figure 1, B and C). Altogether these data demonstrate that DWCNT-induced IL-1 β release is not due to a nonspecific effect of any carbon-based molecules on the PHMs. It is interesting to note that the treatment of LPS-primed PHMs with soluble-water oxidized DWCNTs did not alter the IL-1 β release, thus suggesting that their hydrophobic properties are not involved in the DWCNT-induced IL-1 β secretion (Figure 1, D).

In LPS-primed PHMs, the secretion of mature IL-1 β and IL-18 induced by DWCNTs was comparable with the amount observed with ATP, known to be a potent activator of IL-1 β processing (Figure 1, B and C)¹⁹ These data demonstrate that DWCNTs synergize with the TLR4 agonist to enhance IL-1 β and IL-18 release.

An interesting finding is that the treatment of LPS-primed PHMs with DWCNTs did not increase the TNF α or IL-6 secretion in comparison with monocytes treated with LPS alone (Figure 1, E). The IL-1 β and IL-18 assays demonstrate that DWCNTs act specifically on the processing of IL-1 family cytokines independently of other pro-inflammatory cytokine-production signaling pathways.

To determine whether DWCNTs induced IL-1 β maturation independently of its transcription, we evaluated IL-1 β mRNA level in PHMs. No difference was detected between LPS and LPS-associated DWCNT conditions, showing that DWCNTs did not induce IL-1 β gene transcription (Figure 1, F).

In addition, we also evaluated DWCNT-induced-IL1 β secretion in PHMs differentiated into macrophages by M-CSF. We demonstrate that DWCNTs also induced IL-1 β secretion in LPS-primed human macrophages (Figure S2). All together, these

results demonstrated that DWCNTs triggered the processing of pro-IL-1 β both in human monocytes and macrophages.

DWCNT-induced IL-1 β release in human monocytes results from Nlrp3-dependent caspase-1 activation

Caspase-1 is a key protease activated by the Nlrp3 inflammasome complex involved in the maturation of IL-1 β protein. To determine unequivocally whether caspase-1 is involved in the DWCNT-induced IL-1 β secretion by LPS-primed PHMs, we evaluated IL-1 β secretion in the presence of specific caspase inhibitors. The use of z-vad, an inhibitor of proteases that belongs to the caspase family, revealed that IL-1 β secretion by PHMs after DWCNT challenge was dependent on caspase activation because the z-vad inhibits DWCNT-induced IL-1 β secretion by LPS-primed PHMs (Figure 2, A). Moreover, the treatment of PHMs with the specific caspase-1 inhibitor z-vad significantly decreased DWCNT-induced IL-1 β secretion, whereas the specific caspase-3 inhibitor z-leid did not change this secretion (Figure 2, B). This data showed that the IL-1 β secretion induced by DWCNTs was exclusively linked to caspase-1 activation (Figure 2, B).

Caspase-1 activation involves autocatalytic processing of the 45 kDa pro-caspase-1 to generate two subunits, p20 and p10.^{8,20} To further explore whether caspase-1 was activated in DWCNT-stimulated LPS-primed PHMs, we determined the appearance of the p20 cleavage product by western blot (Figure 2, C). We observed an increased p20 subunit level in response to DWCNTs, which is significantly decreased in the presence of caspase-1 inhibitor, confirming that DWCNT-mediated caspase-1 activation to secrete IL-1 β (Figure 2, C). Collectively, these data suggest involvement of the Nlrp3 inflammasome in the DWCNT-induced IL-1 β response.

As Nlrp3 is involved in a specific caspase-1 activation pathway for the processing of pro-inflammatory cytokines by particles, the expression of Nlrp3 receptor was silenced in PHMs using Nlrp3 siRNA (Figure 2, D). Figure 2, E shows that the siRNA-mediated knockdown of Nlrp3 decreased IL-1 β secretion in PHMs treated with DWCNTs. Thus, we demonstrate here for the first time the role of Nlrp3 receptor as the DWCNT responsive mediator of inflammasome assembly in human monocytes.

We next analyzed the requirement of TLR signaling for Nlrp3 inflammasome activation by DWCNTs (Figure 2, F and G). To determine whether DWCNT-induced IL-1 β secretion was specifically TLR4 dependent or not, DWCNTs were associated with peptidoglycan, a TLR2 ligand, or with PAM₂CSK₄, a TLR1/2 activator²¹ (Figure 2, F and G). Importantly, the ability of DWCNTs to promote IL-1 β and IL-18 secretion was not limited to LPS, as these NPs also significantly enhanced IL-1 β and IL-18 secretion in response to a range of TLR agonists (Figure 2, F and G). These data demonstrated that IL-1 β secretion in response to DWCNT treatment requires a first signal dependent on TLRs.

DWCNTs-induced IL-1 β release in human monocytes requires a potassium efflux, phagocytosis, and lysosomal acidification, but not ROS production

Despite the identification and characterization of numerous sterile and microbial activators of the Nlrp3 inflammasome, the precise mechanisms mediating inflammasome activation remains

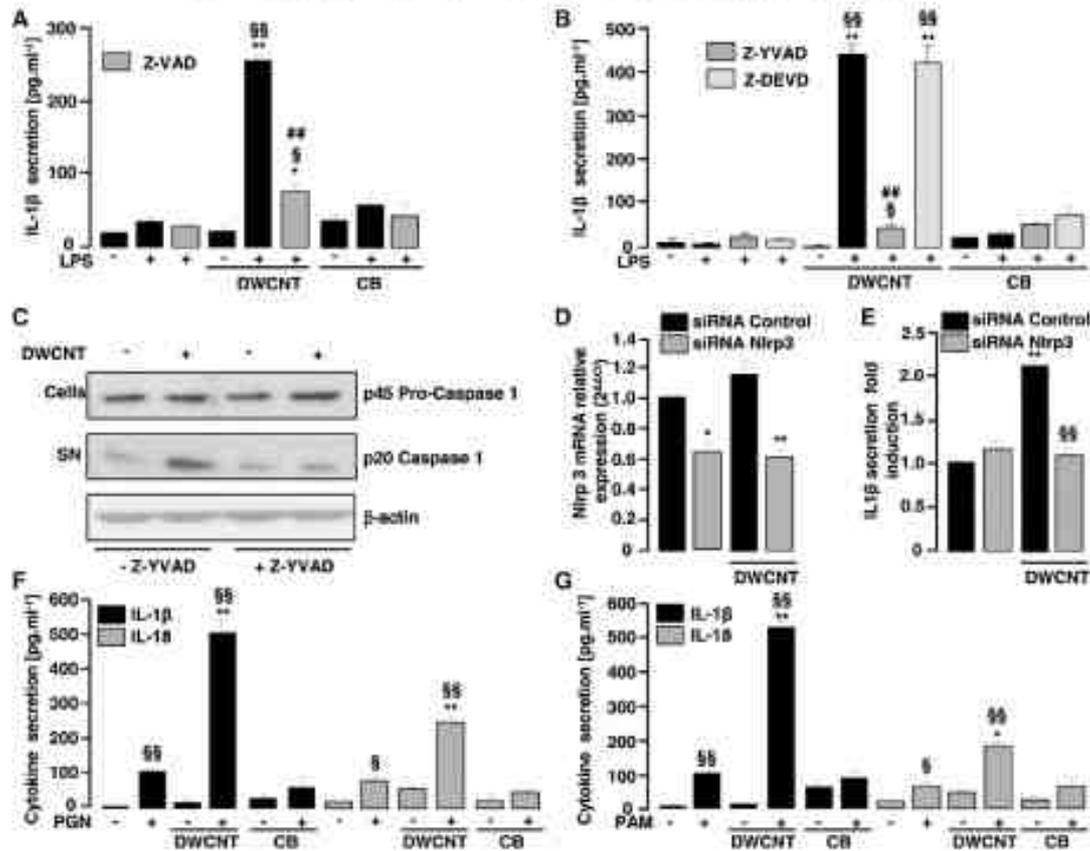


Figure 2. DWCNT-induced IL-1 β release in human monocytes results from Nlrp3-dependent caspase-1 activation. **(A,B)** IL-1 β release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or CB in the presence of *z*-vval caspase inhibitor, *z*-vval caspase-1 inhibitor or *z*-devd-FMK caspase-1 inhibitor. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in comparison with the LPS-primed human monocytes. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ in comparison with the respective unprimed human monocytes. $^{**}P < 0.01$ in comparison with LPS-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or CB. **(C)** Representative immunoblot of mature p39 form and p43 pro-form respectively in supernatant and lysate of LPS-primed human monocytes stimulated or not with DWCNTs in presence or not of *z*-vval. **(D)** Nlrp3 mRNA level in LPS-primed human monocytes transfected with either a control siRNA or a Nlrp3 siRNA and stimulated or not with DWCNTs. * $P < 0.01$ compared to human monocytes transfected with control siRNA. **(E)** IL-1 β release in culture supernatant of LPS-primed human monocytes transfected with either a control siRNA or a Nlrp3 siRNA stimulated or not with DWCNTs. ** $P < 0.01$ compared to human monocytes transfected with control siRNA. $^{**}P < 0.01$ compared to human monocytes transfected with control siRNA and stimulated with DWCNTs. **(F)** IL-1 β and IL-18 release in culture supernatant of untreated or peptidoglycan (PGN) TLR2 activator-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or CB. **(G)** IL-1 β and IL-18 release in culture supernatant of untreated or PAM₂CSK₄ TLR1/2 activator-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or CB. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the PGN- or PAM₂CSK₄-primed human monocytes. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ compared to the respective unprimed human monocytes. Data are means \pm SEM. The data are representative of three independent experiments.

nuclear.^{8,10,28} Several pathways leading to its activation have been described, such as efflux of cellular potassium, cathepsin B and vacuolar acidification, and/or the generation of ROS.^{7,8,11,20,23} To characterize the precise mechanism mediating inflammasome activation by DWCNTs, we evaluated the involvement of the potassium efflux and the phagocytosis process. Preventing the potassium efflux by increasing extracellular potassium abolished DWCNT-induced IL-1 β secretion (Figure 3, A). Moreover, p20 subunit level strongly decreased in the presence of high concentrations of potassium, establishing that caspase-1 cleavage induced by DWCNTs was dependent on potassium efflux (Figure 3, B). In addition, the disruption of actin-mediated phagocytosis by Latrunculin A suppressed DWCNT-induced IL-1 β secretion in

PHMs (Figure 3, C), indicating that DWCNT phagocytosis was required for inflammasome activation. Moreover, using TEM, we demonstrated that some DWCNTs were located in phagosomes, strongly suggesting that PHMs were able to phagocytose these particles (Figure 3, D). These results suggest that the phagocytosis of DWCNTs is required for inflammasome activation.

ROS are potent activators of the Nlrp3 inflammasome. We investigated whether DWCNT phagocytosis was linked to Nlrp3 inflammasome-dependent ROS activation. Although PHMs produced ROS in response to TPA, we demonstrated that DWCNTs did not induce ROS production (Figure 4, A). Moreover, the use of Trolox, a chemical ROS scavenger, did not suppress DWCNT-induced IL-1 β secretion (Figure 4, B).

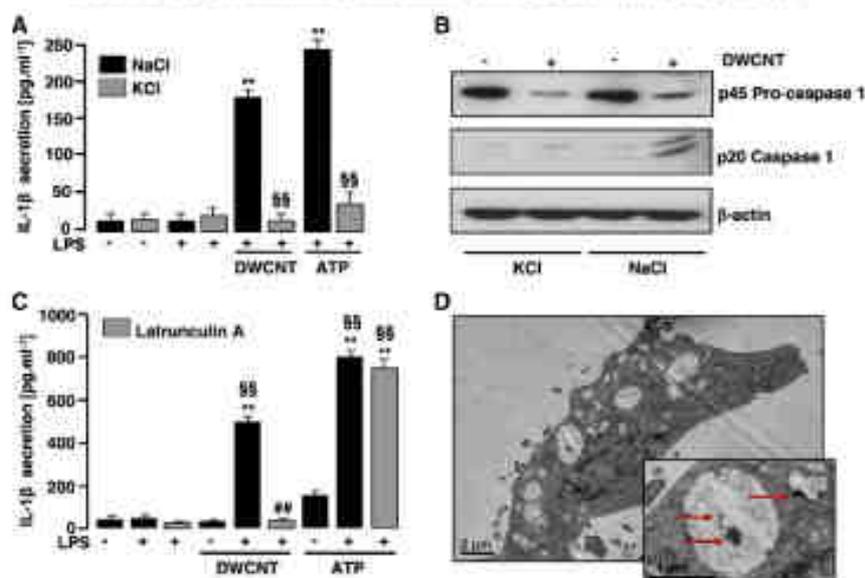


Figure 3. DWCNTs-induced IL-1 β release in human monocytes requires potassium efflux and phagocytosis. **(A)** IL-1 β release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or ATP in the presence of elevated KCl or NaCl concentrations. $^{**}P < 0.01$ in comparison with to LPS-primed human monocytes in the presence of NaCl. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ in comparison with LPS-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or ATP in the presence of NaCl. **(B)** Representative immunoblot of mature p20 form and p45 pro-form in lysate of LPS-primed human monocytes stimulated with DWCNTs in the presence or not of elevated KCl or NaCl concentrations. **(C)** IL-1 β release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or ATP in the presence of Latrunculin A. $^{**}P < 0.01$ in comparison with the LPS-primed human monocytes. $^{*}P < 0.05$ in comparison with the respective unprimed human monocytes. $^{**}P < 0.01$ in comparison with to LPS-primed human monocytes stimulated with DWCNTs or ATP. **(D)** Representative transmission electron microscopy image of primary human monocytes stimulated with DWCNTs. Data are means \pm SEM. The data are representative of three independent experiments.

Together, these data show that ROS production did not play a key role in the mechanism by which phagocytosis is coupled to DWCNT-induced inflammasome activation.

It has been proposed that Nlrp3 inflammasome may be activated by lysosomal damage and the subsequent release of cathepsin-B into the cytoplasm of cells.^{24,26} Inhibition of the activation of all cathepsins by nonspecific inhibitor significantly reduced DWCNT-induced IL-1 β secretion (Figure 4, C) it is interesting to note that the use of specific cathepsin-B inhibitor highlighted cathepsin-B as the main protease involved in IL-1 β release by PHMs in response to DWCNTs (Figure 4, C). In addition, treating PHMs with Bafilomycin A1, an inhibitor of the H⁺ ATPase system required for lysosomal acidification, significantly reduced the IL-1 β response induced by DWCNTs (Figure 4, D). All together, these data suggest that DWCNT treatment of PHMs resulted in intracellular changes, including lysosomal acidification. The release of cathepsin-B lysosomal product into the cytosol may promote the generation of Nlrp3 inflammasome activation signals.

Discussion

Carbon nanotubes have a wide range of applications in various sectors and their use is foreseen to increase in the future. Thus, public concern about their adverse effects on human health

has also risen. Recent studies clearly demonstrated that CNTs induce a strong pro-inflammatory reaction through the secretion of IL-1 β and IL-6 cytokines in mice exposed to these particles.^{4,5} Brown et al showed that MWCNTs induced a strong secretion of IL-1 β only in PMA-primed THP1 monocytic cell line.²⁷ Although the pro-inflammatory potential of CNTs has been suggested, the signaling pathways leading to the increase of pro-inflammatory cytokine secretion remain unknown.

In this study, we investigated the capacity of double-walled CNTs (DWCNTs) to stimulate the release of pro-inflammatory cytokines in PHMs. The cytokines of the IL-1 family (IL-1 α , IL-1 β , IL-18) are particularly potent pro-inflammatory mediators strongly involved in the development of autoimmune disorders, such as silicosis or asbestosis.^{7,8,20} The particularity of these cytokines is that their secretion involves a signaling pathway distinct from that of TNF α and IL-6 inflammatory cytokines.²⁰ Indeed, after induction of their mRNAs by pro-inflammatory mediators (TLR ligands) TNF α and IL-6 proteins are directly secreted, whereas the production of IL-1 family cytokines involves a complex regulation that requires two different signals.²⁰ First, the induction of IL-1 β mRNA through the stimulation of pattern recognition receptors, such as TLRs, is required for synthesis of pro-IL-1 β protein in cells. Then, a second stimulus is necessary for inflammasome activation leading to caspase-1-dependent cleavage and release of the biologically active and mature IL-1 family cytokines.²⁰ Several

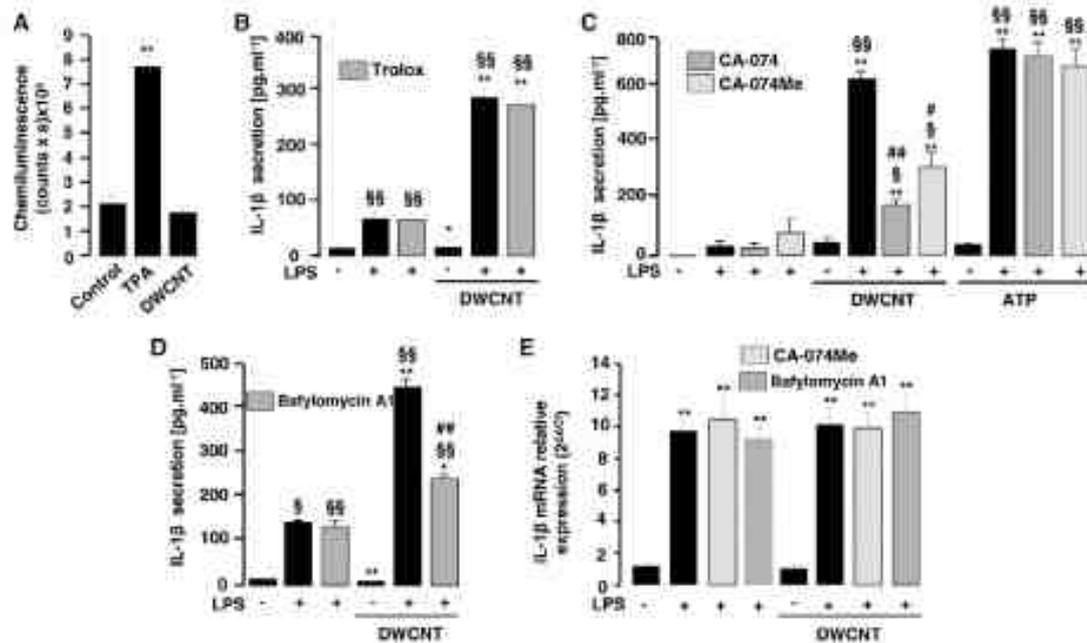


Figure 4. DWCNT-induced IL-1 β release in human macrocytes requires lysosomal acidification but not ROS production. **(A)** ROS production in human macrocytes untreated (control) or primed with DWCNTs or TPA. DWCNTs-induced respiratory burst of human macrocytes was measured by chemiluminescence. Total chemiluminescence emission (area under the curve expressed in counts \times seconds) was observed continuously for 60 minutes in the presence or not of DWCNTs or TPA. $**P < 0.01$ in comparison with untreated human macrocytes (control). **(B)** IL-1 β release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human macrocytes stimulated with DWCNTs in the presence of the ROS scavenger Trolox. $**P < 0.01$ in comparison with the LPS-primed human macrocytes. $^{**}P < 0.01$ in comparison with the respective unprimed human macrocytes. **(C)** IL-1 β release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human macrocytes stimulated with DWCNTs or ATP in the presence of cathepsin inhibitor (CA-074) or cathepsin B inhibitor (CA-074Me). $**P < 0.01$ in comparison with the LPS-primed human macrocytes. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ in comparison with the respective unprimed human macrocytes. $^{**}P < 0.01$ in comparison with LPS-primed human macrocytes stimulated with DWCNTs or ATP. **(D)** IL-1 β release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human macrocytes stimulated with DWCNTs or ATP in the presence of Bafilomycin A1. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ in comparison with the LPS-primed human macrocytes. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ in comparison with the respective unprimed human macrocytes. $^{**}P < 0.01$ in comparison with LPS-primed human macrocytes stimulated with DWCNTs. **(E)** IL-1 β mRNA level in untreated or LPS-primed human macrocytes stimulated or not with DWCNTs in the presence of Bafilomycin A1 or CA-074Me. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ in comparison with the LPS-primed human macrocytes. Data are means \pm SEM. The data are representative of three independent experiments.

particles (asbestos) and NPs (nanosilica) have been found to specifically induce IL-1 β secretion through the activation of inflammasome post-transcriptional mechanisms.^{7,8} In this context, we investigated the impact of DWCNTs on the different steps of the production of IL-1 β by PHMs. We demonstrate in this study that DWCNTs induced a strong secretion of IL-1 β and IL-18 in LPS-primed PHMs but not in unprimed PHMs, supporting the idea that TLR agonists are indispensable to enhance DWCNT-induced IL-1 β and IL-18 release. Consistently, previous studies have shown that only PMA-primed THP1 cells and LPS-primed murine macrocytes secrete IL-1 β when they are challenged with MWCNTs.²⁷ An interesting aspect is that we established that DWCNTs induced only IL-1 β and IL-18 release in LPS-primed PHMs. Indeed, the treatment of LPS-primed PHMs with DWCNTs did not amplify TNF α or IL-6 secretion. These data corroborate the findings of previous studies highlighting the ability of silica and asbestos to specifically increase IL-1 β and IL-18 secretion, but not TNF α or IL-6 in LPS-primed macrophages.^{7,8} In this study, we also demonstrated that

DWCNTs did not induce IL-1 β mRNA gene expression, but they activated the protease caspase-1. This DWCNT-induced caspase-1 activation promoted the maturation of IL-1 β , strongly suggesting involvement of the inflammasome in this process. Although DWCNTs alone did not alter the IL-1 β mRNA levels in PHMs, these particles seem to activate an inflammasome-dependent signaling pathway required for their secretion. Among the numerous inflammasomes identified, the Nlrp3 inflammasome is the best characterized.²⁰ Many particles, such as silica and asbestos, have been shown to specifically trigger activation of the Nlrp3 inflammasome, leading to caspase-1 activation-induced IL-1 β and IL-18 secretion.^{7,8,20} In this study, we show that the silencing of the Nlrp3 gene strongly reduced DWCNT-induced IL-1 β secretion, demonstrating that the Nlrp3 inflammasome senses DWCNT-associated danger signals and contributes to triggering IL-1 β and IL-18 release in PHMs.

Activation of the Nlrp3 inflammasome is subject to several events, such as the efflux of cellular potassium, the phagocytosis of particles, the generation of ROS, cathepsin B activation and/or

the vacuolar acidification.^{7,8,13,20,22} The efflux of cellular potassium appears to be a common step shared by various activators of the Nlrp3 inflammasome.^{7,8,28,22} Thus, it has been suggested that the inflammasome works as a sensor of cellular membrane disruption characterized by a loss of intracellular potassium.²² We showed that prevention of the potassium efflux by increasing extracellular potassium abrogated caspase-1 activation and IL-1 β secretion, revealing that DWCNT-induced potassium efflux triggers Nlrp3 inflammasome activation. These data demonstrate that DWCNT-induced potassium efflux was necessary for Nlrp3 inflammasome activation, suggesting that these particles may affect cell membrane integrity. Moreover, we showed that some DWCNTs are located in vesicles, demonstrating that some DWCNTs are completely phagocytosed. However, due to their great length heterogeneity (0.1 to 100 μ m) and their high potential for aggregation, certain large particles were not completely phagocytosed by monocytes. In these conditions, Brown et al. previously showed the existence of frustrated phagocytosis of CNTs by mononuclear cells.²⁸ Recently, it has also been demonstrated that large particles, such as alum, asbestos, and silica can induce the so-called frustrated phagocytosis at the surface of the cells, provoking the formation of actin cytoskeletal filaments.^{9,29} In addition, the pharmacological inhibition of actin cytoskeleton-dependent phagocytosis with Latrunculin A inhibited DWCNT-induced IL-1 β secretion, suggesting that both phagocytosis and frustrated phagocytosis are involved in Nlrp3 inflammasome activation by DWCNTs. Dostert et al. has previously shown that the inhibition of cytoskeletal filament generation with cytochalasin D or colchicine disrupts the ability of asbestos and silica particles to trigger IL-1 β secretion, demonstrating that the frustrated phagocytosis is involved in the NLRP3 inflammasome activation,⁸ and this is consistent with our findings. It has recently been shown that there is an alternative route for particle penetration into cells that allows the activation of the inflammasome. Indeed, the entry into macrophages and keratinocytes of TiO₂ NPs by passive diffusion induces inflammasome activation independently of actin-cytoskeleton rearrangements.^{13,29,30} In this study, we showed that cytoskeletal filament rearrangement is essential in the activation of the inflammasome by DWCNTs. The difference between CNTs and TiO₂ could be attributed to their physicochemical discrepancies. Indeed, the shorter length of NPs of TiO₂ may allow them to penetrate cells more easily by diffusion.^{13,29,30} An interesting aspect is that although TiO₂ and nano-ZnO used the same route to enter the cells, nano-ZnO did not activate the Nlrp3 inflammasome.¹³ In view of these differences, we suggest that independently of the way in which they penetrate cells, both the NP structure and its chemical properties are essential to trigger Nlrp3 inflammasome activation. In this study, the modification of the physicochemical structure of the DWCNT surface by oxidation with nitric acid did not affect their ability to induce IL-1 β release by PHMs, thus demonstrating that their hydrophobic properties are not involved in the DWCNT-induced IL-1 β secretion.

Recent reports have suggested that ROS produced during phagocytosis may be an important signal for inflammasome activation by several stimuli, such as asbestos, silica, and peptidoglycan particles.^{7,8,31} Here, we demonstrated that ROS

production was not involved in Nlrp3 inflammasome activation by DWCNTs. Consistent with our results, it has been described that CNT-induced ROS production was length dependent in the THP1 monocytic cell line.²⁷ In their study, Brown et al. demonstrated that short CNTs failed to promote ROS production, but they were able to stimulate IL-1 β release in PMA-primed THP1.^{27,30} In line with this, amorphous silica-NP-mediated Nlrp3 inflammasome activation in murine dendritic cells was triggered independently of ROS production,²² suggesting that ROS are not indispensable for Nlrp3 activation by NPs.

Our data also indicated that both cathepsin B activity and lysosomal acidification contributed to DWCNT-mediated activation of the Nlrp3 inflammasome. Indeed, although neither cathepsin B or H⁺-ATPase inhibitors altered the mRNA level of pro IL-1 β , DWCNT-induced IL-1 β secretion was significantly decreased by the presence of these two inhibitors. These data strongly suggested that phagosomal maturation is involved in the DWCNT-induced Nlrp3 inflammasome activation. Phagosomal rupture and cathepsin B activation have previously been shown to be important in Nlrp3 inflammasome activation by silica crystals and aluminum.²¹ The release of lysosomal products, such as cathepsin B, into the cytosol might promote the generation of danger signals sensed by the Nlrp3 inflammasome, resulting in inflammasome assembly.

We demonstrate here, for the first time, that DWCNTs induce IL-1 β and IL-18 pro-inflammatory cytokine secretion by PHMs. Importantly, we identify the Nlrp3 inflammasome as the DWCNT-responsive element in human monocytes. Moreover, the potassium efflux and phagocytosis processes are key molecular pathways involved in the DWCNT-induced Nlrp3 inflammasome activation (see Graphical Abstract). Given the critical role of the Nlrp3 inflammasome in the development of severe chronic inflammation and cancer formation^{7,8} and the impact of the DWCNTs observed on its activation, future decisions will be necessary to prevent the possible health hazards that these particles may represent.

Acknowledgments

We thank Isabelle Fompaux, from Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB), for TEM assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.nano.2011.11.004.

References

- Pekala CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 2008;3:423–8.
- Ryan-Barrmann JP, Cesta MF, Brody AR, Shipley-Phillips JK, Everitt JJ, Tewksbury EW, et al. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nat Nanotechnol* 2009;4:747–51.
- Shvedkova AA, Kisán E, Murray AR, Johnson VJ, González O, Arpaillu S, et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in

- CS7BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagens. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L552–65.
4. Cruzier D, Pallot S, Gentilhomme E, Flahaut E, Amand R, Dabouis V, et al. Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology* 2010;272:39–45.
 5. Inoue K, Takano H, Koike E, Yanagisawa R, Sakumi M, Tanaka S, et al. Effects of pulmonary exposure to carbon nanotubes on lung and systemic inflammation with coagulatory disturbance induced by lipopolysaccharide in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:1583–90.
 6. Heister F, Lamprecht C, Neves V, Titmarius C, Datas L, Flahaut E, et al. Higher dispersion efficacy of functionalized carbon nanotubes in chemical and biological environments. *ACS Nano* 2010;4:2615–20.
 7. Casati SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Fadler JJ, Colegio OR, Tophly LA, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9035–40.
 8. Dostert C, Petráň V, Van Bruggen B, Steele C, Mossmann BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008;320:674–7.
 9. Burns K, Martison F, Tschopp J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Curr Opin Immunol* 2003;15:26–30.
 10. Martison F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004;117:561–74.
 11. Günzel L, Abrami L, Ghisellini S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 2006;126:1135–45.
 12. Maniathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Rosser-Girma M, et al. Cytospectin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228–32.
 13. Yazdi AS, Guarda G, Ritzau N, Dresler SK, Tardif A, Coscollin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:16449–54.
 14. Martin-Bloedel G, Gales A, Bernad J, Curin L, Deloche P, Baumge K, et al. Low interleukin-10 production by monocytes of patients with a self-limiting hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2009;16:485–91.
 15. Flahaut E, Bours R, Prigney A, Laurent C. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)* 2003:1442–3.
 16. Berzina AH, Moskowitz J, Shao H, Deng S, Liao H, Gaskell KJ, et al. Outer wall selectively oxidized, water-soluble double-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* 2010;132:5932–5.
 17. Gales A, Combuché A, Bernad J, Lefevre L, Olganier D, Bernad M, et al. PPARgamma controls dectin-1 expression required for host mucosal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000714.
 18. Lefevre L, Gales A, Olganier D, Bernad J, Perez J, Burelfin B, et al. PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal *Candida* elimination. *PLoS One* 2010;5:e12828.
 19. Neves MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Jonsten LA, Opitz B, van der Meer JB, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324–35.
 20. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009;27:229–65.
 21. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13766–71.
 22. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants. *Nature* 2008;453:1122–6.
 23. Herrung V, Buerenfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9:847–56.
 24. Rajanabi K, Lappalainen J, Corri K, Valimäki E, Matikainen S, Kivvanen PT, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 2010;5:e11765.
 25. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011;469:221–5.
 26. Mi-Niebla EA, Burke A, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, Ferreira D, et al. Bacteriolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001191.
 27. Brown DM, Donaldson K, Stone V. Nuclear translocation of Nrf2 and expression of antioxidant defence genes in THP-1 cells exposed to carbon nanotubes. *J Biomed Nanotechnol* 2010;6:224–33.
 28. Brown D, Knöschel L, Bangert U, Windle A, Walter D, Walker J, et al. An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon* 2007;45:1743–56.
 29. Donaldson K, Murphy F, Schinwald A, Duffin R, Poland CA. Identifying the pulmonary hazard of high aspect ratio nanoparticles to enable their safety-by-design. *Nanomedicine (London, England)* 2011;6:143–56.
 30. Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:5.
 31. Shimada T, Pack BC, Wolf AJ, Briken C, Goodridge HS, Becker CA, et al. *Staphylococcus aureus* evades lysosome-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1beta secretion. *Cell Host Microbe* 2011;7:38–49.
 32. Wietar M, Beer HD, Herrung V, Kramer U, Schina RP, Forster I. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO2 nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* 2011;5:326–40.

Supplemental information

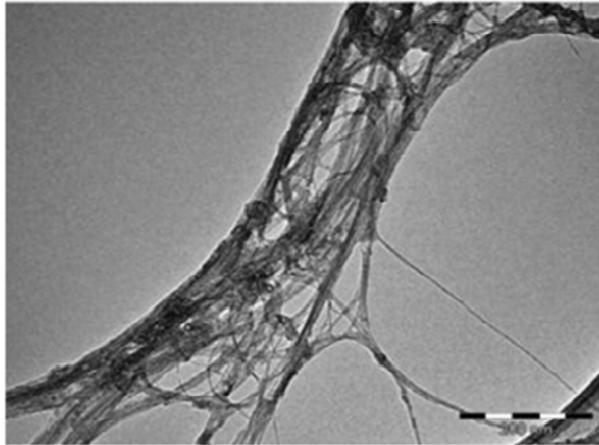


Figure S1. Scanning electronic microscopy images of bulk oxidized DWCNTs before dispersion.

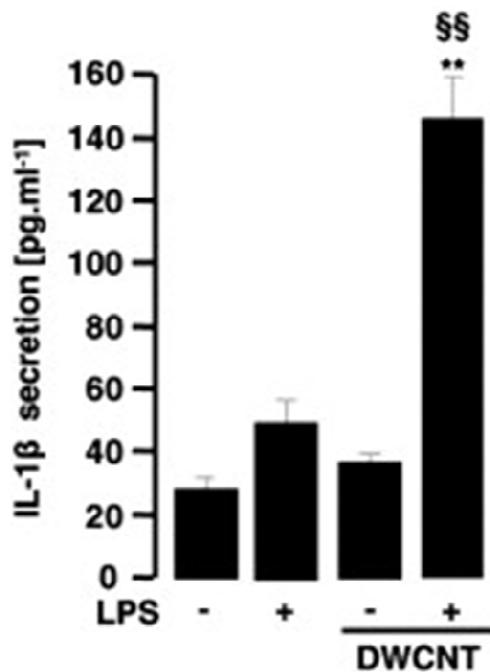


Figure S2. DWCNTs induced the IL-1 β secretion in LPS-primed human macrophages. IL-1 β release in culture supernatant of untreated or LPS-primed human macrophages stimulated with DWCNTs. PHMs were cultured for 7 days in SFM medium supplemented with 50 ng.mL⁻¹ of macrophage colony-stimulating factor. ** $P \leq 0.01$ compared to the LPS-primed human macrophages. §§ $P \leq 0.01$ compared to the respective unprimed human macrophages. Data are means \pm SEM. The data are representative of three independent experiments.

2. Divergent roles for C-type lectin receptors in the modulation of host cell response to *Leishmania infantum*

a. Introduction

La production des cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-1 par les macrophages est un élément crucial dans la défense de l'hôte aux infections.

L'infection à *Leishmania* se manifeste par deux phases. La première inflammatoire qui permet le recrutement de monocytes/macrophages qui constituent le réservoir de prolifération préférentiel de *Leishmania*, et la seconde tolérogène au cours de laquelle le parasite se multiplie à l'intérieur des macrophages en absence de réponse immunitaire. La connaissance des mécanismes inflammatoires activés par *Leishmania* peut permettre leur utilisation ultérieure comme cibles pharmacologiques potentielles. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisations activées par *Leishmania infantum* (*L.i*), l'agent étiologique de la leishmaniose viscérale, lors de la primo-infection. Nous avons isolé l'inflammasome comme complexe activée par *Leishmania* selon un processus dépendant de sa phagocytose *via* l'engagement des récepteurs Dectine-1 et Mannose. L'induction de la pro-IL1 β mais aussi la sécrétion d'IL-1 β mature sont liées à l'activation de la tyrosine kinase Syk par *L.i*. En revanche, l'étude du récepteur SignR3 n'a pas permis de mettre en évidence un rôle dans l'élimination de *Leishmania infantum* malgré son implication dans sa reconnaissance et sa phagocytose.

L'étude des signaux de dangers endogènes au macrophage induisant l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β en réponse à *L.i* montre l'implication de la production de ROS dans l'induction de la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages infectés par *L.i*.

Enfin, l'utilisation de macrophages humains primaires, dont l'expression des différents récepteurs a été mise en silence, a permis de confirmer les résultats obtenus avec des macrophages de souris invalidés pour Dectine-1, Mannose et SignR3.

Ce travail permet de mettre en évidence le rôle de *L.i* dans l'activation de l'inflammasome *via* la production cellulaire de différents signaux. La similitude de ces signaux avec ceux induits par les DWCNTs met en évidence que l'activation de la caspase-1 et la sécrétion de l'IL-1 β sont étroitement liées à la reconnaissance par

l'inflammasome du stress cellulaire. Néanmoins de plus amples explorations de la modulation de l'activation de l'inflammasome par *L.i* lors de son interaction avec d'autres récepteurs de phagocytose sont nécessaires afin de déterminer si la modulation de l'activation de l'inflammasome est une cible de ce parasite. A terme, la mise en évidence de l'inflammasome comme voie de signalisation activée par *L.i*, permettra d'ouvrir un nouveau champ d'investigations quant à l'isolement de cibles thérapeutiques potentiellement utilisables au cours de l'étape de prolifération de ce parasite.

Ces résultats sont intégrés au sein d'un article évaluant la contribution des récepteurs Dectine-1, Mannose et DC-Sign dans la réponse anti-*Leishmania* des macrophages actuellement soumis pour publication.

b. Article

**Divergent roles for C-type lectin
receptors in the modulation of host
cell response to *Leishmania infantum***

Lise Lefèvre^{1,2,#}, Etienne Meunier^{1,2,#}, Geanncarlo Lugo-Villarino^{3,4,#}, Alexis Valentin²,
David Oलगnier^{1,2}, Hélène Authier^{1,2}, Carine Duval^{3,4}, Christophe Dardenne^{1,2}, José
Bernad^{1,2}, Jean Loup Lemesre⁵, Martin K. Wild⁶, Johan Auwerx⁷, Olivier Neyrolles^{3,4},
Bernard Pipy^{1,2,¶} and Agnès Coste^{1,2,¶,*}

¹UMR MD3, EA2405 Polarisation des Macrophages et Récepteurs Nucléaires dans les
Pathologies Inflammatoires et Infectieuses, UPS, Toulouse, 31400, France

²Université de Toulouse, UMR 152, UPS, Toulouse, 31400, France

³CNRS, IPBS, Toulouse, 31077, France

⁴Université de Toulouse, UPS, IPBS, Toulouse, 31077, France

⁵Unité Mixte de Recherche IRD - Centre de CIRAD 177, Montpellier, 34394, France

⁶Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Germany, and Institute of Cell
Biology, ZMBE, University of Münster, Münster, Germany

⁷Laboratory for Integrative and Systems Physiology, Ecole Polytechnique Fédérale de
Lausanne, Lausanne, 1015, Switzerland

¶ A. Coste and B. Pipy are co-senior authors

Lise Lefèvre, Etienne Meunier and Geanncarlo Lugo-Villarino are co-first authors

* Correspondence: agnes.coste@univ-tlse3.fr (Tel. +33 5 61 32 29 67; FAX: +33 5 61 32
22 93)

Running Title: Diverging roles for CLRs in *Leishmania* infection

SUMMARY

Although C-type lectin receptors (CLRs) play important roles in multiple pathogenic contexts, and are prominently expressed in alternative (M2) activated macrophages (MΦs), their contribution to the *Leishmania*-MΦ interaction is poorly understood. Here, we report the MΦ response *in vivo* against *Leishmania infantum* is characterized by M2b phenotype accompanied by a CLR signature composed of Dectin-1, mannose receptor (MR) and SIGNR3. Dectin-1 and MR are crucial for the MΦ microbicidal response as they respectively activate Syk/p47^{phox} and arachidonic acid/NADPH oxidase signaling pathways for ROS production, and they both trigger Syk-coupled signaling for caspase-1-induced IL-1β secretion. By contrast, SIGNR3 expression in MΦs favors parasite resilience. Confirmation of these results in primary human MΦs highlights the divergent role for each CLR to the pathogenesis of *Leishmania infantum* in humans. Given this parasite circulates worldwide causing devastating disease, our study promotes these CLRs as potential targets for treatment, diagnoses, and prevention of visceral leishmaniasis.

HIGHLIGHTS

- **M2b MΦs express Dectin-1, MR and SIGNR3 upon *Leishmania* challenge**
- **Dectin-1 and MR favor the host response while SIGNR3 boosts *Leishmania*'s resilience**
- **Dectin-1 and MR respectively trigger Syk/p47^{phox} and AA/NADPH oxidase for ROS release**
- **Dectin-1 and MR trigger caspase-1-induced IL-1β secretion in response to *Leishmania***

INTRODUCTION

The world health organization reports that Leishmaniasis is one of the world's most neglected diseases, affecting about 12 million people worldwide, with a range between 1.5-2 million new cases each year (WHO Global Leishmaniases Control Report 2010). *Leishmania* species are, in vertebrates, exclusively intracellular protozoan parasites that cause multiple diseases ranging from nonlethal cutaneous leishmaniasis to visceral disease (VL) leading to death in the absence of treatment. Monocyte/macrophage (MΦ) plays a dual role during the process of *Leishmania* infection. They are the primary host cells for parasite replication and the major effector cells to combat this obligate intracellular pathogen (Van Assche et al., 2011). Among the different microbial strategies employed by activated MΦs is the timely production of both reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokines (Liese et al., 2008). Indeed, ROS production through NADPH oxidase by MΦs is reported to affect the survival of *Leishmania in vitro*, and subsequent inhibition of this microbicidal factor prevents murine and human MΦs from killing *Leishmania donovani* (Liese et al., 2008). Furthermore, an *in vivo* study showed that respiratory burst-deficient ($gp91^{phox^{-/-}}$) mice displayed increased susceptibility to VL after two weeks *p.i.* (Murray and Nathan, 1999). Likewise, amid the vast cytokine production characteristic of the MΦ response to leishmania, several studies underscore the key role of IL-1 in controlling inflammatory and immune manifestations in leishmaniasis, as well as influencing the clinical course of the disease. Its production and activation requires two distinct signals. Signal 1 is represented by the initial microbial stimulus through innate pattern recognition receptors (PPRs), which result in accumulation of intracellular stores of pro-IL β ; signal 2 is necessary for the assembly and activation of a multiprotein complex called the inflammasome, leading to an enzymatic cleavage by caspase-1 of the pro-IL β and resulting in release of the active mature IL-1 β (Martinon et al., 2009). Of note, the mechanisms upstream of inflammasome activation responsible for the production of IL-1 β

by *Leishmania* are still unknown. Taken together, these observations point out that ROS and protective inflammatory cytokines, like IL-1 β , act together to control visceral infection and hence are key anti-leishmanial effector molecules of the innate immune response to the parasite.

The induction of these microbicidal molecules involves signalling pathways regulated by the *Leishmania*-M Φ interaction. Indeed, several M Φ surface receptors, such as PPRs, recognize and phagocytose *Leishmania*, and ultimately trigger intracellular signaling that shapes the microbicidal M Φ response (Stafford et al., 2002). *Leishmania* parasite recognition has been shown to engage different PRRs (Akilov et al., 2007; Liese et al., 2008). However, only the Toll-like receptors (TLRs) and the C-type lectin receptors (CLRs) have been identified to participate in the signaling pathways involved in M Φ killing mechanisms. Among CLRs, Mannose receptor (MR), the murine DC-SIGN homologue SIGNR3 and Dectin-1, are ideal candidates due to their ligand binding-patterns expression profile in M Φ subsets, signal transduction capabilities and proven biological roles in different pathogenic contexts (Osorio and Reis e Sousa, 2011). The MR is a type-I transmembrane receptor with a N-terminal cysteine-rich domain, a single fibronectin type-II domain, 8 CRDs and a short cytoplasmic tail containing a tyrosine-based motif important for ligand-receptor internalization. Only one of its CRDs recognizes terminal glycosylated motifs, such as D-mannose, L-fucose and N-acetyl-D-glucosamine. While the importance of MR to the *Leishmania*- M Φ interaction was already demonstrated in terms of recognition (mannose-residues in lipophosphoglycan (LPG)), phagocytosis and M Φ -killing mechanisms, its *in vivo* role remains an open question given that MR-deficient mice display similar levels of cytokine production, infection rates and clinical scores compared to their wild-type (WT) counterparts during *Leishmania* infection (Akilov et al., 2007; Wilson and Pearson, 1988). In terms of SIGNR3, also known as CD209d, it is a type-II transmembrane receptor that displays a unique CRD in its C-terminus capable of

recognizing mannose-residues in various pathogens (*e.g. Mycobacterium tuberculosis*) and signalling through an hemITAM-Syk pathway that induces a pro-inflammatory cytokine response in mouse MΦs (Tanne et al., 2009). Based on phylogeny and ligand specificity, SIGNR3 is arguably the closest functional murine homolog of human DC-SIGN (CD209), which is reported to recognize mannose-residues for *Leishmania* interaction with dendritic cells (Caparros et al., 2005). Alternatively, *Leishmania* presents also β -1,3 glucose residues that branch off the LPG, the major cell surface glycoconjugate of all *Leishmania* parasites (Coelho-Finamore et al., 2011). Thus, it is tempting to speculate that Dectin-1, the major MΦ receptor for β -1,3 and β -1,6 glucans could interact with these parasites (Brown et al., 2003). Like SIGNR3, Dectin-1 is a type-II transmembrane receptor composed of a single extracellular carbohydrate recognition-domain (CRD) and an intracellular domain with an ITAM motif capable to recruit Syk family kinases and transduce signals (Osorio and Reis e Sousa, 2011). Interestingly, it was recently shown that beta-glucan-induced inflammasome activation is dependent on the dectin-1/Syk signaling pathway (Cheng et al., 2011 ; Hise et al., 2009). Moreover, Dectin-1 was also reported to induce ROS production in response to β -glucan particles through a signaling cascade requiring Syk (Underhill et al., 2005). Thus, Syk-coupled Dectin-1 receptor is emerging as an important activator of inflammatory responses during host defense against pathogens, such as fungi (Cheng et al., 2011; Hise et al., 2009). Because of its anti-microbial capacities, Dectin-1 could also participate in *Leishmania* elimination by MΦs. Although these data strongly suggest that SIGNR3 and Dectin-1 may be involved in the control of *Leishmania* infection, no direct involvement of these two receptors in *Leishmania* recognition and microbicidal associated functions has been reported.

One common aspect among CLRs is that they are prominently and selectively expressed according to the polarization state of MΦs. Indeed, MΦ polarization is a dynamic process that dictates tissue distribution and functional capacities. Two programs broadly classify

polarized MΦs: classical (M1) and alternative (M2). The M1 program is considered to arise from type-1 inflammatory conditions (e.g. IFN γ) and pathogenic challenge. M1 MΦs typically express high levels of opsonic receptors such as complement receptors and Fc γ receptors. They are also characterized by high production of pro-inflammatory signals and microbicidal molecules such as ROS, contribution to Th1 differentiation, and participation in the resistance to intracellular pathogens and tumor eradication. By contrast, the M2 program is a diverse response to type-2 immune signals such as IL-4/IL-13 (M2a MΦs); immune complexes, TLR agonists or IL-1 receptors (M2b MΦs); and immunosuppressants (e.g. IL-10, TGF β) or glucocorticoids (M2c MΦs). All these M2 MΦs subsets are characterized by abundant levels of non-opsonic receptors such as CLR. M2 MΦ activity includes the suppression of inflammation, enhancement of phagocytosis, tissue remodeling and repair, and elimination of extracellular parasites (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Interestingly, a recent study implicated the state of MΦ polarization as a determinant factor for the susceptibility of mice to cutaneous leishmaniasis, thus alluding to potential insights into visceral leishmaniasis and host defenses to be gained from this emerging concept of MΦ polarization (Holscher et al., 2006).

In the present study, we undertook the endeavor to examine visceral leishmaniasis within the context of MΦ polarization. The MΦ response of B6 mice against *Leishmania infantum* (*L.i.*) is surprisingly characterized by an alternative M2b phenotype accompanied by CLR-signature composed of Dectin-1, MR and SIGNR3 expression. Beyond serving as biological markers of M2 MΦs, both Syk-coupled Dectin-1 and MR are crucial for the MΦ microbicidal response as they activate novel signaling pathways for ROS production and IL-1 β secretion. By contrast, SIGNR3 expression in MΦs favors the parasite's resilience. Finally, we demonstrate human homologs for each CLR display similar contributions to the

Leishmania-M Φ interaction as their murine counterparts, highlighting the relevant but divergent role for each CLR to the pathogenesis of *Leishmania infantum*.

RESULTS

The macrophage response to *L.i* challenge is characterized by the activation of the M2b program along with a CLR-signature

Microbicidal activities are tightly dependent of M Φ polarization state. There are biological markers to help distinguish between M1 and M2 programs of M Φ polarization in both humans and mice. Based on these criteria, we established precisely the phenotype of the M Φ polarization in response to *L.i* infection in the B6 genetic background. Upon parasitic challenge, M Φ s displayed a down-regulation of Fc γ -receptors (CD16, CD32 and CD64) that serve as M1 markers, which was mirrored by the up-regulation of M2 markers (YM1, Arginase, CD36), alluding to the activation of the M2 polarization program (Figure 1A). As previously described, CLR expression is well known in leukocytes from the myeloid lineage, and within the context of M Φ polarization, they serve as irrefutable markers of M2 M Φ s (Mantovani et al., 2004). Since their gene expression profile is unknown during *L.i* infection, we then decided to monitor their expression in M Φ s from the B6 genetic background. As illustrated in figure 1B, *L.i* infection strongly up-regulated Dectin-1, MR and SIGNR3 transcription in M Φ s from B6 mice compared to that of uninfected cells. Likewise, their cell-surface protein levels were also up-regulated in M Φ s upon *L.i* infection (Figure 1C).

In terms of the pro-inflammatory signal response to *L.i* infection, we observed an induction of cytokines such as TNF α , IL-1 β and IL-6 in M Φ s from the B6 background after *L.i* infection (Figure 1D). Surprisingly, however, this pro-inflammatory signature in M Φ s from

B6 mice was also accompanied by high expression of the anti-inflammatory molecules IL-10 and IL-1ra (Figure 1D). Given that M1 program of M Φ polarization is classically associated with high production of pro-inflammatory cytokines, our results alluded to the activation of M1 M Φ s in response to *L.i* challenge. Yet, the presence of IL-10 suggested instead the activation of the M2 program of polarization in the form of M2b M Φ s. Unlike any other M Φ subset, M2b M Φ s are characterized by simultaneous production of pro-inflammatory cytokines along with IL-10 and CCL1, an anti-inflammatory chemokine (Mantovani et al., 2004). As predicted, we observed the high expression of CCL1 and CCL17 (another M2 chemokine) in M Φ s from B6 mice in response to *L.i* (Figure 1D), evidencing the polarization of M2b M Φ s in response to *L.i*. Equally important, these observations were also confirmed in freshly isolated M Φ s from mice infected with *L.i* after two weeks, suggesting that the activation of the M2b M Φ program, along with the establishment of a CLR signature, are sustained well after the initial encounter with the parasite (Figure S1).

CLRs have distinct contributions to the *Leishmania* infection outcome and the functional M Φ response

We became interested to explore whether the timely expression of Dectin-1, MR and SIGNR3 during the activation of the M2b M Φ s has any functional consequence to *L.i* infection, or they simply serve as default markers of the M2 M Φ polarization. As aforementioned, while these CLRs recognize a variety of glycans, notably mannose and glucose residues similar to those present in LPG of *Leishmania*, their *in vivo* contribution to immunity against this parasite is relatively unknown. Therefore, we dissected the individual contribution of Dectin-1, MR and SIGNR3 in the host response to *L.i* infection through the use of mouse models with single deficiencies for each CLR. As described in materials and

methods, and illustrated in supplemental figure 2, we generated MR-conditional knockout (MΦMRKO) mice in which the MR gene was selectively disrupted in MΦs. Recently, this conditional gene knockout-strategy was successfully employed and validated by our laboratory to generate the MΦ-specific deletion of *Dectin-1* in (MΦ*Dectin-1*KO) mice to demonstrate its role in the elimination of *C. albicans* (Gales et al., 2010). As for SIGNR3, given its expression is confined to myeloid mononuclear cells including different MΦ subsets (Nagaoka et al., 2010), we used SIGNR3 knockout (SIGNR3 KO) mice that were instrumental to demonstrate its crucial role to early host defense against *M. tuberculosis* (Tanne et al., 2009). As depicted in figure 2A, targeted-deficiencies for Dectin-1 or MR in the MΦ compartment led to a higher splenic parasite burden. Moreover, the number of mice that present parasite in the blood is robustly increased in MΦ*Dectin-1*KO and MΦMRKO mice (Figure 2B). Surprisingly, however, SIGNR3 KO mice displayed no difference of parasitemia neither in blood nor spleen compared to WT littermates (Figure 2A-B). Similarly, peritoneal MΦs lacking either Dectin-1 or MR became significantly permissive to *L.i* proliferation compared to the WT counterparts (Figure 2C). By contrast, those MΦs lacking SIGNR3 displayed a non-permissive nature to *L.i* proliferation (Figure 2C). In terms of recognition and phagocytosis of *L.i*, deficiencies for each CLR resulted in a small but significant diminished capacity for MΦs to interact with this pathogen compared to WT counterparts, indicating the CLR importance to these MΦ functions (Figure 2D). Moreover, ROS production in response to *L.i* challenge became significantly affected in MΦs lacking either Dectin-1 or MR compared to their WT counterparts, while that of MΦs lacking SIGNR3 remained intact (Figure 2E). Taking into account that our *in vitro* contribution assessment reflects the *in vivo* outcome of pathogen burden for each CLR-knockout mouse model, we deduce that Dectin-1 and MR are involved in the overall control of *L.i* growth while SIGNR3 favors its resilience inside MΦs.

Dectin-1/Syk/p47^{phox} and MR/AA/NADPH oxidase signaling pathways induce the respiratory burst in response to *Leishmania*

Deficiencies for Dectin-1 or MR rendered peritoneal MΦs permissive to *L.i* proliferation and less capable to produce ROS (Figure 2). Since ROS are essential *Leishmania*-killing components, we decided then to investigate the signaling pathways involved in their production. Recently, Dectin-1 was reported to induce ROS production in response to β-glucan particles through a signaling cascade requiring Syk, a protein kinase that regulates NADPH oxidase activity in MΦs (Underhill et al., 2005). To evaluate whether the release of ROS in response to *L.i* is dependent on Syk-coupled signaling, we measured ROS production in MΦs pretreated with the selective Syk inhibitor Bay 61 36-06 (Bay) (Yamamoto et al., 2003). The inhibition of Syk-coupled signaling completely abolished the ROS production in the MΦ response to *L.i* challenge, demonstrating its production is exclusively dependent on this kinase activity (Figure 2D). Moreover, pretreatment with Bay led to uncontrolled *L.i* proliferation in all MΦs, further accentuating the importance to Syk-couple signaling pathways to the protective response against this pathogen (Figure 2B). Next, we evaluated the level of phosphorylation of p47^{phox}, a cytosolic subunit of the NADPH oxidase complex, and whose activation is essential to this process. Immunoblot analysis revealed that following *L.i* infection, the level of phosphorylated p47^{phox} is significantly decreased in Dectin-1-deficient MΦs compared to that of the WT counterparts, while the total protein level remained unchanged (Figure 3A). By contrast, the level of phosphorylated p47^{phox} in MΦs deficient for MR or SIGNR3 was not affected (Figure 3A). Furthermore, the pretreatment of all MΦs with Bay inhibited the phosphorylation of p47, demonstrating that Syk-coupled signaling is essential in the activation of p47 in response to *L.i* (Figure 3A).

While the results discussed above pointed out the Dectin-1/Syk/p47^{phox} signaling pathway for ROS production in the MΦ response to *L.i* infection, they also alluded to an alternative

signaling pathway through MR. For this reason, we investigated the assembly of cytosolic p47^{phox} subunits of NADPH oxidase, another crucial event for ROS production. This stage is under the control of arachidonic acid (AA) that, once generated from membrane phospholipids cleavage by cPLA₂ enzyme, promotes the interaction between the cytosolic p47^{phox} and p67^{phox} and the membrane-bound flavocytochrome-b (Dana et al., 1998). Through pretreatment of MΦs with MAFP, an irreversible inhibitor of cPLA₂ enzymatic activity, we demonstrated that it inhibits both the AA-release and ROS production, evidencing that the AA/NADPH oxidase pathway is involved in ROS release upon *L.i* challenge (figure 3 B-C). Furthermore, while *L.i* infection resulted in the induction of AA-release in Dectin-1 or SIGNR3 deficient MΦs, it failed to do so in MΦs lacking MR, thus establishing a direct link between the MR and AA signaling pathways (Figure 3D). Taken together, these results demonstrate that both Dectin-1/Syk/p47^{phox} phosphorylation and MR/AA/NADPH oxidase membrane translocation axis are essential in the induction of the respiratory burst in response to *L.i*.

Dectin-1 and MR partly induce the production of IL-1β via a caspase-1-dependent inflammasome in response to *L.i*

As previously discussed, another MΦ defense mechanism against pathogens is the inflammatory cytokine response. Our data suggest Dectin-1, MR and SIGNR3 contribute differently to the overall MΦ response after challenge to *L.i*. In order to verify if this holds true for the cytokine response, we measured the induction of IL-1β and TNFα secretion in peritoneal MΦs from mice lacking each CLR upon *L.i* infection. ELISA analysis indicated that the release of both cytokines is diminished in the absence of Dectin-1 or MR, while SIGNR3-deficient MΦs displayed slightly elevated and unchanged levels for IL-1β and TNFα, respectively (Figure 4A and S3). Thus, these results demonstrate the involvement

of Dectin-1 and MR in the secretion of pro-inflammatory cytokines in response to *L.i* infection while excluding that of SIGNR3.

Given IL-1 β plays an important role in anti-leishmanial host defense, and that the mechanism by which the M Φ s regulate its production after *Leishmania* recognition is unknown, we thus investigated if the deficiency of IL-1 β secretion was due to a defective production step. As shown in figure 4B, while *L.i* induced the IL-1 β mRNA production in WT M Φ s, it partially failed to do so in Dectin-1- and MR-deficient M Φ s, demonstrating the importance of these CLRs in the transcriptional induction of IL-1 β . Interestingly, SIGNR3-deficient M Φ s displayed a slightly elevated level of IL-1 β mRNA production compared to its WT counterpart upon *L.i* challenge (Figure 4B). Next, we examined whether these CLRs were also required for the processing of pro-IL-1 β into mature, active IL-1 β . With regards to Dectin-1, a role for the canonical caspase-1-dependent NLRP3 inflammasome has been suggested for the processing of *C. albicans*-induced pro-IL1 β (Gross et al., 2009; Osorio and Reis e Sousa, 2011). For this reason, we evaluated IL-1 β secretion in the presence of z-vad, an inhibitor of proteases that belongs to the caspase family. In figure 4C, the use of z-vad revealed that IL-1 β maturation by M Φ s after *L.i* challenge was dependent on caspase activation since its secretion was abrogated regardless of the mouse strain of origin. To further explore whether caspase-1-dependent inflammasome was activated in *L.i*-stimulated M Φ s, we determined the cleavage status of this enzyme by monitoring the appearance of the p20 cleavage product by immunoblot analysis (Figure 4D). We observed an increased of the p20 active subunit level in response to *L.i* in all WT M Φ s, which is partially decreased in M Φ s from Dectin-1 and MR deficient mice. By contrast, the SIGNR3-deficient M Φ s again displayed an increase of the p20 subunit level compared to M Φ s from WT littermates. Collectively, these data demonstrate that *L.i* elicited the processing of pro-IL-1 β into its mature form via caspase-1 activation, and hence suggest a

role for the canonical caspase-1-dependent inflammasome complex during the M Φ response to this parasite.

Considering the implications of identifying Dectin-1 and MR as extracellular sensors for *Leishmania* PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) that control pro-IL1 β processing by the activation of caspase-1-dependent inflammasome, we next evaluated the upstream mechanisms associated with the secretion of this important cytokine. We first assessed whether parasite internalization was a prerequisite for IL-1 β secretion. Treatment of peritoneal M Φ s isolated from the different mouse strains with Latrunculin A, which interferes with the internalization but not the binding of *Leishmania*, completely inhibited IL-1 β secretion upon challenge with *L.i* (Figure 4E, left). Having thus observed the internalization of the parasite as an absolute requirement, we asked if signalling through Syk was involved in the production of IL-1 β . Indeed, along with TLR2 and Dectin-1, this signalling molecule has been shown to be required for the priming step of the NLRP3 inflammasome in response to *C. albicans* (Gross et al., 2009; Osorio and Reis e Sousa, 2011). To test the role of Syk, we pretreated peritoneal M Φ s isolated from the different mouse strains with the Bay inhibitor before *L.i* infection, and we noticed that it abolishes the IL-1 β secretion, evidencing its importance for this process (Figure 4E, center). Finally, we became interested to examine whether ROS production is also an upstream mechanism of the inflammasome activation responsible for the IL-1 β induction by *Leishmania*. The production of ROS has been suggested to act as a common cellular signal upstream of the NLRP3 inflammasome complex since its activation is blocked by ROS scavengers and NAPDH-oxidase inhibitors (Gross et al., 2009). In line with those findings, the use of N-acetyl cysteine (NAC), a strong anti-oxidant amino-acid, partly suppresses *Leishmania*-induced IL-1 β secretion by M Φ s from mice lacking each CLR (Figure 4E, right). Given Syk is important to the *Leishmania*-induced ROS production (Figure 3D), and that ROS production is diminished in the absence of either Dectin-1 or

MR (Figure 3D), we conclude that the IL-1 β response to *L.i* relies on its internalization by these CLRs, coupled to Syk-dependent signalling pathways leading to ROS production and subsequent activation of a caspase-1-dependent inflammasome complex.

Dectin-1, MR and DC-SIGN contribute to the modulation of parasite proliferation in human monocyte-derived M Φ s

Our findings in the murine model suggest that in response to *Leishmania* infection, M Φ s from B6 mice undergo the activation of the M2b program that is less permissive to this pathogen's proliferation, accompanied by the expression of CLRs that contribute in shaping its hostile intra- and extra-cellular environment. In an attempt to bring these results into a human context, we used human monocyte-derived macrophages (MDMs) in order to investigate the role of Dectin-1, MRC1 (human mannose receptor) and CD209 (human DC-SIGN) in response to *L.i* infection. First, as described in material and methods, we assessed the expression of these CLRs in the context of M1 and M2 programs of M Φ polarization. Similar to murine M Φ polarization, we observed the unique up-regulation of CLR cell-surface expression in M2 MDMs only (Figure 5A). Next, we developed and optimized a protocol to perform gene silencing in human MDMs, as primary human M Φ s still represent a difficult challenge in this endeavor. As demonstrated by flow cytometry analysis, we were able to significantly decrease the protein expression for each CLR in M2 MDMs, displaying both a high efficiency and low rate of cell death (Figure 5B and Supplemental Table 1). Similar to our findings in the murine model, we report that silencing of either Dectin-1 or MRC1 led M2 MDMs to become highly permissive to *L.i* growth (Figure 5C). By contrast, the M2 MDMs deficient for DC-SIGN became extraordinarily resistant to *L.i* to proliferation even better than the mock control (Figure 5C). Equally important, the induction of ROS production and IL-1 β secretion upon *L.i* challenge was inhibited in MDMs silenced for Dectin-1 or MRC1, while that of cells lacking DC-SIGN was

unaffected (Figure 5 D-E). Altogether, the gene silencing for Dectin-1, MRC1 and DC-SIGN in primary human MΦs confirms their distinct contributions to the functional response of these phagocytes against *Li* and suggests that these CLRs can contribute to the pathogenesis of leishmaniasis in humans.

DISCUSSION

Beyond the seminal breakthroughs emanating from Th1/Th2 model in the understanding of the adaptive immune response to *Leishmania*, its success also eclipsed the need to understand the *Leishmania*-MΦ interaction in the control of parasite growth. However, the process of MΦ polarization is one emerging concept to consider in the *Leishmania*-MΦ interaction, as it plays an essential role in the immune response to, and pathogenesis of, multiple elusive microbes (Benoit et al., 2008). Indeed, Holscher *et al.* elegantly demonstrated that the MΦ alternative activation is partly responsible for the susceptibility of BALB/c mice to cutaneous *Leishmania*, and that impairment of this alternative program results in a delayed of disease progression, suggesting that this parasite has evolved evasion mechanisms to thrive in alternatively activated MΦ (Holscher et al., 2006). For these reasons, we decided to assess the contribution of functional and phenotypical responses of MΦs during challenge with *Leishmania*, in order to search for factors that influence disease outcome within the context of MΦ polarization. Taken all our observations together, we believe this study makes four major contributions to this emerging field.

The first major contribution is the identification of the M2b program of MΦ polarization upon challenge with visceral *Li*. We are confident in the designation of these cells as M2b MΦs based on their high expression of pro-inflammatory cytokines that differentiates them from other M2 subsets; the simultaneous expression of IL-10 and other M2 biological markers that separate them from M1 MΦs; and the unique upregulation of CCL1 that

15

distinguish them from all polarized M Φ states (Mantovani et al., 2004). Furthermore, our *in vivo* results showed that M Φ s from B6 mice infected by *L.i* present also high expression of markers of M2b program, alluding that this phenotype is well sustained beyond the initial *Leishmania*-M Φ interaction as recapitulated in our *in vitro* experiments (Figure S1). While the activation of the M2b program upon *L.i* challenge is both novel and fascinating from the point of view that these rare M Φ s have been implicated in various pathological contexts characterized by excessive inflammation (Lefevre et al., 2010 ; Mantovani et al., 2004; Zhang et al., 2010), it also provides a biological context for direct functional comparison between M2 subsets in light that M2a M Φ s favor cutaneous *Leishmaniasis* (Holscher et al., 2006).

The second major contribution is the identification of the CLR signature in M2b M Φ s during *L.i* infection and the characterization of CLR divergent roles either in the microbicidal M Φ response to *L.i* or microbial persistence. Among the M2 markers that became accentuated in M2b M Φ s upon *L.i* challenge, the induction of Dectin-1, MR and SIGNR3 expression captivated our interest. Since the role for these CLRs is virtually unknown in either *L.i* infection or M2b M Φ biology, we dissected their function through the use of mouse models deficient for each CLR. In the case of Dectin-1, its role to the M Φ microbicidal response is unequivocally essential given M Φ Dectin-1KO mice are unable to control *L.i* infection, and that the silencing of its human counterpart renders MDMs highly permissive to this parasite's growth. Indeed, we show both in mice and human additional contributions by Dectin-1 to *L.i* recognition, phagocytosis, and production of pro-inflammatory factors. To our knowledge, this is the first time that mice deficient in a Syk-coupled CLR display a systematic impairment in immunity to a nonfungal organism (Osorio and Reis e Sousa, 2011). In fact, we confirmed the dependence of Syk-coupled signaling in the *Leishmania*-M Φ interaction, as M Φ s pretreated *in vitro* with a Syk inhibitor are unable to control the

parasite's growth, produce ROS or secrete optimal levels of pro-inflammatory cytokines. Similarly to M Φ Dectin-1KO mice, M Φ MRKO mice are permissive to *L.i* infection as parasitemia becomes higher in blood and spleen. The absence of MR in murine M Φ s leads to a decrease of pro-inflammatory cytokine production and ROS release. This is a striking result given that mice with a systematic deletion of MR display no impairment of host responses to *Leishmania* or other pathogenic infection (Akilov et al., 2007; Lee et al., 2003). One possible explanation for this discrepancy is that MR expression in different cells may play opposite biological roles that either becomes neutralized upon systemic deletion or accentuated upon single cell-targeted deletion, as demonstrated for the case of the MyD88 adaptor protein and its antagonistic roles between myeloid and B cells (Neves et al., 2010). Nevertheless, the concept that MR plays an important microbicidal role in human and murine M Φ s during *Leishmania* infection is supported by indirect evidence involving blocking parasite attachment and ingestion *in vitro* with specific MR ligands (Channon et al., 1984; Wilson and Pearson, 1988). In line with those findings, we showed that silencing of MRC1 in human MDMs diminished ROS production, IL-1 β secretion, and capacity to control parasite growth, ultimately demonstrating a crucial role for this CLR in host microbicidal responses to *L.i*. In the case for SIGNR3, SIGNR3 KO mice displayed no defect in the host immune response to *L.i*. This was unexpected given that SIGNR3 KO mice are susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* during the early stages of infection (Tanne et al., 2009). Here, we showed that while SIGNR3/DC-SIGN participates in parasite recognition and internalization, it is not implicated in ROS or cytokine production in response to *L.i*. Further examination of murine and human M Φ s deficient for this CLR revealed that *Leishmania*'s ability to thrive inside of these cells was significantly diminished. It may be that in the absence of this CLR, *L.i* faces a much more hostile environment as reflected by the higher levels of IL-1 β production and caspase-1-

dependent activity in murine MΦs, and therefore, insinuating an anti-inflammatory role for this CLR that ultimately favors the parasite's persistence.

The third major contribution is the inference of Dectin-1/Syk/p47^{phox} and MR/AA/NADPH oxidase signaling pathways to the respiratory burst during *L.i* infection. Beyond the overall negative effect observed *in vitro* for human and murine MΦs lacking Dectin-1 or MR, the identification of these signaling pathways during the *Leishmania*-MΦ interaction gives rise to a couple of aspects worth mentioning. The first is the identification of the Syk-dependent ROS production *via* a Dectin-1 receptor in *L.i* infection, one of the few pathogenic contexts aside from fungal infection (Osorio and Reis e Sousa, 2011). The second is the novel description of MR/AA/NADPH oxidase signaling pathway. While MR was one of the first CLRs shown to bind different pathogens, there is limited evidence to date that MR is sufficient to provoke microbicidal effector functions in myeloid cells (Osorio and Reis e Sousa, 2011). Here, we provide compelling evidence that MR might promote the assembly of cytosolic phox subunits of NADPH oxidase to the membrane, as MΦs lacking MR displayed reduced levels of AA. Since NADPH activation is involved in the production of ROS, reduced levels of AA might therefore explain the deficiency in ROS production observed for MR-deficient murine and human MΦs and perhaps, the impairment of the host response to *Leishmania* infection in MΦMR KO mice.

The fourth major contribution is the identification of the signaling pathways leading to IL-1β release during *L.i* infection. We showed for the first time that *L.i* provokes the IL-1β response both at the production (mRNA levels) and maturation (protein secretion) steps. The fact that this parasite activates a caspase-1-dependent IL-1β secretion, suggests the involvement of an inflammasome complex as a general but powerful antimicrobial strategy in innate immunity, as corroborated recently for fungal pathogens (Hise et al., 2009). Moreover, we identified both Dectin-1 and MR as extracellular sensors for *Leishmania* PAMPs that control pro-IL-1β processing via caspase-1-dependent activity, a finding that is

18

strongly supported by a recent study implicating Dectin-1 in the inflammasome complex activation by fungal pathogens (Cheng et al., 2011). Beyond the absolute requirement of *Leishmania* internalization for the IL-1 β response in M Φ s, we also provided evidence for additional requirement for Syk-coupled signaling. These observations are not only consistent with the role of Syk in both the activation of the pro-IL-1 β synthesis (via CARD9) and in the control of its proteolytic processing (Gross et al., 2009; Osorio and Reis e Sousa, 2011), but they also promote Syk-coupled CLR as important activators of anti-microbial response. Finally, we provided evidence for the partial contribution of ROS production to IL-1 β secretion, an observation that highlights the potential of *L.i* to act on additional signals (e.g. potassium efflux, ATP release, lysosomal damage and cathepsin activation) to induce the activation of inflammasome complexes (Martinon et al., 2009). Indeed, a recent study showed that infection of M Φ s with *L. amazonensis* induces the release in the extracellular milieu of high levels of ATP (Chaves et al., 2009). Thus, it will be interesting to identify and characterize the additional signals responsible for IL-1 β processing in response to *L.i*.

In conclusion, we have shown that the *Leishmania*-M Φ interaction can be influenced by the state of M Φ polarization at the cellular level and by members of the CLR family at the molecular level. Our findings suggest that effective modulation of these cellular and molecular factors might shift the *Leishmania*-M Φ interaction for the benefit of the patient. Indeed, more studies need to furnish and address this possibility. Nevertheless, we are confident that research endeavors in these areas might result in future breakthroughs in terms of diagnoses, vaccine and therapy for Leishmaniasis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

All the mice were bred and used under protocols approved by the Conseil Scientifique du Centre de Formation et de Recherche Experimental Médico Chirurgical and the ethics board of the Midi-Pyrénées ethic committee for animal experimentation (Experimentation permit number 31-067, approval n° B3155503). C57BL/6 mice were purchased from Janvier (France). *MΦDectin-1KO* and *SIGNR3 KO* mice have been described earlier (Gales et al., 2010; Wethmar et al., 2006). *MΦMRKO* mice are described in supplemental experimental procedures. For *MΦDectin-1KO* and *MΦMRKO* mice, the appropriate floxed controls are used for all the experiments.

For the *in vivo* experiments, a visceral infection with the *L.i* strain was established by inoculating i.p. 5.0×10^6 stationary phase promastigotes/mouse. Two weeks after infection, blood samples were collected and mice euthanized. The spleens and peritoneal MΦs were removed aseptically for the experiments.

Leishmania infantum culture

The cloned line of *L.i* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) and the axenic amastigotes expressing luciferase activity (*L.i-luc*) have been described earlier (Sereno et al., 2001). For animal and MΦ infection, the parasites were transformed in promastigotes by changes in culture conditions (25°C and RPMI 10% FCS).

Proliferation, phagocytosis, binding assays, ROS production and ELISA cytokine titration

Adherent murine peritoneal MΦs were prepared as previously described (Lefevre et al.) and incubated or not with Bay 61 36-06 (Sigma, 10 μM) or MAFP (Sigma, 10μM) for proliferation and ROS production assays. For cytokine titration, the MΦs were pre-incubated with either Z-vad (50 μM, Calbiochem), Bay 61 36-06 (10 μM, Sigma),

Latrunculin A (0.5 µg/mL, Invitrogen) or N-Acetyl-Cysteine (10 mM, Sigma). To evaluate the binding and the phagocytosis of *L.i*, the MΦs were challenged with *L.i-luc* (ratio parasite-to-MΦ: 5:1) for 30 min at 4°C or 37°C respectively. MΦ monolayers were then lysed and the luciferase substrate (Promega) was added. For proliferation experiment, the MΦs were challenged for 2 days at 37°C with *L.i-luc* (ratio parasite-to-MΦ: 5:1). Light emission was measured using a luminometer (Wallac). To evaluate MΦ oxidizing agent production, the MΦ were challenged with *L.i* (ratio parasite-to-MΦ: 5:1) and the generation of chemiluminescence was monitored for 1 h as described previously (Lefevre et al., 2010). For IL1β and TNFα quantification by Elisa, the MΦs were stimulated with *L.i* for 6 h (ratio parasite-to-MΦ: 5:1). Supernatants were analyzed according to the manufacturer's instructions (OptiEIA kits, BD Biosciences).

Preparation of human monocyte-derived MΦs (MDMs) and siRNA gene silencing

Monocytes were obtained from healthy blood donors (Etablissement Français de Sang, EFS, Toulouse). Written informed consents were obtained from the donors under EFS contract n°21/PVNT/TOU/IPBS01/2009-0052. Following articles L1243-4 and R1243-61 of the French Public Health Code, the contract was approved by the French Ministry of Science and Technology (agreement n°AC 2009-921). Monocytes were differentiated into MDMs as previously described (Tailleux et al., 2003) and transfected as detailed in Supplemental Experimental Procedures.

Statistical analysis

For each experiment, the data were subjected to one-way analysis of variance followed by the means multiple comparison method of Bonferroni-Dunnnett. For the evaluation of the number of mice positive for *L.i* in the blood the statistical χ^2 test was used. $p < 0.05$ was considered as the level of statistical significance.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes three figures, one table, and Supplemental Experimental Procedures.

REFERENCES

- Akilov, O.E., Kasuboski, R.E., Carter, C.R., and McDowell, M.A. (2007). The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. *J Leukoc Biol* 81, 1188-1196.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181, 3733-3739.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197, 1119-1124.
- Caparros, E., Serrano, D., Puig-Kroger, A., Riol, L., Lasala, F., Martinez, I., Vidal-Vanaclocha, F., Delgado, R., Rodriguez-Fernandez, J.L., Rivas, L., *et al.* (2005). Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology* 210, 185-193.
- Channon, J.Y., Roberts, M.B., and Blackwell, J.M. (1984). A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology* 53, 345-355.
- Chaves, S.P., Torres-Santos, E.C., Marques, C., Figliuolo, V.R., Persechini, P.M., Coutinho-Silva, R., and Rossi-Bergmann, B. (2009). Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect* 11, 842-849.
- Cheng, S.C., van de Veerdonk, F.L., Lenardon, M., Stoffels, M., Plantinga, T., Smeekens, S., Rizzetto, L., Mukaremera, L., Preechasuth, K., Cavalieri, D., *et al.* (2011). The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17

responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 90, 357-366.

Coelho-Finamore, J.M., Freitas, V.C., Assis, R.R., Melo, M.N., Novozhilova, N., Secundino, N.F., Pimenta, P.F., Turco, S.J., and Soares, R.P. (2011). *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol* 41, 333-342.

Dana, R., Leto, T.L., Malech, H.L., and Levy, R. (1998). Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 273, 441-445.

Gales, A., Conduche, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olagnier, D., Beraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M.D., Auwerx, J., Coste, A., and Pipy, B. (2010). PPARgamma controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 6, e1000714.

Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., *et al.* (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459, 433-436.

Hise, A.G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B.A., Brown, G.D., and Fitzgerald, K.A. (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 5, 487-497.

Holscher, C., Arendse, B., Schwegmann, A., Myburgh, E., and Brombacher, F. (2006). Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol* 176, 1115-1121.

Lee, S.J., Zheng, N.Y., Clavijo, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun* 71, 437-445.

- Lefevre, L., Gales, A., Olganier, D., Bernad, J., Perez, L., Burcelin, R., Valentin, A., Auwerx, J., Pipy, B., and Coste, A. (2010). PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal *Candida* elimination. *PLoS One* 5, e12828.
- Liese, J., Schleicher, U., and Bogdan, C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213, 377-387.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453-461.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27, 229-265.
- Murray, H.W., and Nathan, C.F. (1999). Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 189, 741-746.
- Nagaoka, K., Takahara, K., Minamino, K., Takeda, T., Yoshida, Y., and Inaba, K. (2010). Expression of C-type lectin, SIGNR3, on subsets of dendritic cells, macrophages, and monocytes. *J Leukoc Biol* 88, 913-924.
- Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., Kuhl, A.A., Loddenkemper, C., Haury, M., Nedospasov, S.A., *et al.* (2010). Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 33, 777-790.
- Osorio, F., and Reis e Sousa, C. (2011). Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity* 34, 651-664.

- Sereno, D., Roy, G., Lemesre, J.L., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2001). DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1168-1173.
- Stafford, J.L., Neumann, N.F., and Belosevic, M. (2002). Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 28, 187-248.
- Tailleux, L., Neyrolles, O., Honore-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.P., Lagrange, P.H., Gluckman, J.C., Rosenzweig, M., and Hermann, J.L. (2003). Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol* 170, 1939-1948.
- Tanne, A., Ma, B., Boudou, F., Tailleux, L., Botella, H., Badell, E., Levillain, F., Taylor, M.E., Drickamer, K., Nigou, J., *et al.* (2009). A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 206, 2205-2220.
- Underhill, D.M., Rosnagle, E., Lowell, C.A., and Simmons, R.M. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106, 2543-2550.
- Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R.A., Maes, L., and Cos, P. (2011). *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51, 337-351.
- Wethmar, K., Helmus, Y., Luhn, K., Jones, C., Laskowska, A., Varga, G., Grabbe, S., Lyck, R., Engelhardt, B., Bixel, M.G., *et al.* (2006). Migration of immature mouse DC across resting endothelium is mediated by ICAM-2 but independent of beta2-integrins and murine DC-SIGN homologues. *Eur J Immunol* 36, 2781-2794.
- Wilson, M.E., and Pearson, R.D. (1988). Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 56, 363-369.

Yamamoto, N. Takeshita, K. Shichijo, M. Kokubo, T. Sato, M. Nakashima, K. Ishimori, M. Nagai, H. Li, Y. F. Yura, T. et al. (2003). The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 1174-1181.

Zhang, W., Xu, W., and Xiong, S. (2010). Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization. *J Immunol* 184, 6465-6478.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Batigne for technical assistance and Dr. A. Tanne for technical expertise provided for gene silencing in primary human cells. We also wish to acknowledge the Consortium for Functional Glycomics grant number GM62116 for providing the *SIGNR3* KO mice, and Drs. K. Inaba and K. Takahara for their kind gift of the anti-SIGNR3 (4A4) and technical advice concerning its use. This work was supported by the *Ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur*, fellowship to L.L. G.L.V. acknowledges funding from the *Fondation pour la Recherche Médicale*. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. M2b MΦs express Dectin-1, MR and SIGNR3 during *L.i* infection in B6 genetic background

(A, D) RT-qPCR analysis of biological markers for M1 and M2 polarization programs in peritoneal MΦs from B6 mice in response to *L.i* stimulation.

(B, C) Dectin-1, Mannose Receptor and SIGNR3 mRNA and cell-surface protein levels on peritoneal MΦs quantified respectively by RT-qPCR (B) and flow cytometry (C) after challenge with *L.i*.

For RT-qPCR analysis, infection with *L.i* is denoted by black bars (+*L.i*) while the mock control by white bars (-*L.i*). For flow cytometry profiles, MΦs challenged with *L.i* are denoted by unfilled black overlay (+*L.i*) while the mock control by filled gray overlay (-*L.i*). Results correspond to mean ± SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared to the mock control (-*L.i*). The mRNA levels were represented in fold induction relative to the mRNA levels observed for the mock control samples.

Figure 2. Dectin-1, MR and SIGNR3 have distinct contributions to the *L.i* infection outcome and the functional MΦ response

(A-B) MΦ*Dectin-1*KO, MΦ*MR*KO, and *SIGNR3* KO mouse models (black), and their appropriate WT counterparts (grey), were infected i.p. with $50 \cdot 10^6$ *L.i*. Quantification of *L.i* parasite number in the spleen for each CLR-deficient mouse model was measured by RT-qPCR analysis (A). The number of mice that tested positive for *L.i* in the blood following two weeks of infection was determined by RT-qPCR analysis (B). Data are represented as mean ± SEM * $p < 0.05$ compared to WT mice.

(C-E) Proliferation (C), binding and phagocytosis (D), and ROS induction (E) of *L.i-luciferase* were measured in peritoneal MΦs from each CLR-deficient mouse model (black bars), compared to its appropriate WT counterpart (grey bars). For indicated

27

measurements, pre-treatment with Bay 61 36-06 was performed before the challenge with *L.i.* Data are expressed as fold induction relative to the luminescence or chemiluminescence observed for WT without treatment. Results correspond to mean \pm SEM of triplicates and are representative of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared to untreated WT and # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ compared to untreated KO.

Figure 3. Dectin-1/Syk/p47phox and MR/AA/NADPHox signaling pathways induce the respiratory burst in response to *Leishmania*

(A) Phosphorylated p47^{phox} immunoblot following *L.i.* infection (3h) in peritoneal MΦs from each CLR-deficient mouse model (KO) and its appropriate WT counterpart. C denotes non-treated control samples. Pre-treatment with Bay 61 36-06 was performed before the challenge with *L.i.* Band intensity was quantified with Image J software.

(B-C) AA release (B) and ROS production (C) by peritoneal MΦs from B6 mice treated or not with MAFP in response to *L.i.* challenge. Data are expressed as fold induction relative to untreated MΦs.

(D) AA release was measured for peritoneal MΦs from each CLR-deficient mouse model in response to *L.i.* challenge and expressed as the percentage of AA released relative to that of WT MΦs (set arbitrarily at 0%).

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates and are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared to untreated WT.

Figure 4. Protective inflammatory cytokine secretion in response to *L.i.* is partly dependent on Dectin-1, MR and Syk-coupled signaling

(A-B) IL-1 β protein (A) and mRNA levels (B) in peritoneal MΦs from each of the CLR-deficient mouse models (black bar) and its appropriate WT counterpart (grey bar) after *L.i.* challenge measured by ELISA (A) and RT-qPCR (B).

(C) The percentage of inhibition of IL-1 β release by peritoneal M Φ from each of the CLR-deficient mouse models (black bar) and its appropriate WT counterpart (grey bar), pre-treated with Z-vad and challenged with *L.i* and quantified by ELISA. Results are expressed as the percentage of inhibition of IL-1 β secretion relative to the appropriate untreated control (WT or KO respectively) incubated with *L.i*.

(D) Immunoblot blot analysis of caspase 1-p20 fragment cleavage in peritoneal M Φ from each of the CLR-deficient mouse models (KO) and its appropriate WT counterpart (WT) challenged for 6 h with *L.i* (+*L.i*). C indicates uninfected control sample. Band intensity was quantified with Image J software.

(E) The percentage of inhibition of IL-1 β release by peritoneal M Φ from each of the CLR-deficient mouse models (black bar) and its appropriate WT counterpart (grey bar), pre-treated with either Latrunculin A, Bay or N-acetyl-cysteine and then challenged with *L.i*. Results are expressed as the percentage of IL-1 β secretion inhibition relative to the appropriate untreated control (WT or KO respectively) incubated with *L.i*.

Data are shown as mean \pm SEM of triplicates and are representative of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.001.

Figure 5. Dectin-1, MRC1 and DC-SIGN contribute to the modulation of parasite proliferation in human monocyte-derived M Φ s

(A) Cell-surface expression profile of Dectin-1, MRC1 (mannose receptor) and DC-SIGN in M1 and M2 MDMs. As described in the materials and methods section, human MDMs were polarized towards M1 and M2 programs. The expression for each CLR in these cells was then assessed by flow cytometry analysis. Data is displayed as the percentage of positive cells relative to isotype control.

(B) CLR-silencing in human M2 MDMs. Genes encoding for the indicated CLRs were silenced using specific siRNAs as described in the materials and methods section.

Silencing was then confirmed by flow cytometry analysis. Data is displayed as the median of fluorescence difference. * $p < 0.05$, ** $p < 0.003$ of siRNA target compared to siRNA control. (C-E) *L.i-luciferase* proliferation (C), ROS production (D) and IL-1 β release (E) in MDMs transfected with siRNAs either targeting each CLR (Dectin-1, MRC1, DC-SIGN) or non-targeting (control). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ of infected cells (black) compared to that non-infected (white).

Data are shown as mean \pm SEM of triplicates and are representative of three independent experiments.

(F) Proposed model explaining the distinct contribution of Dectin-1, MR and SIGNR3 to the M Φ response against *L.i* challenge.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

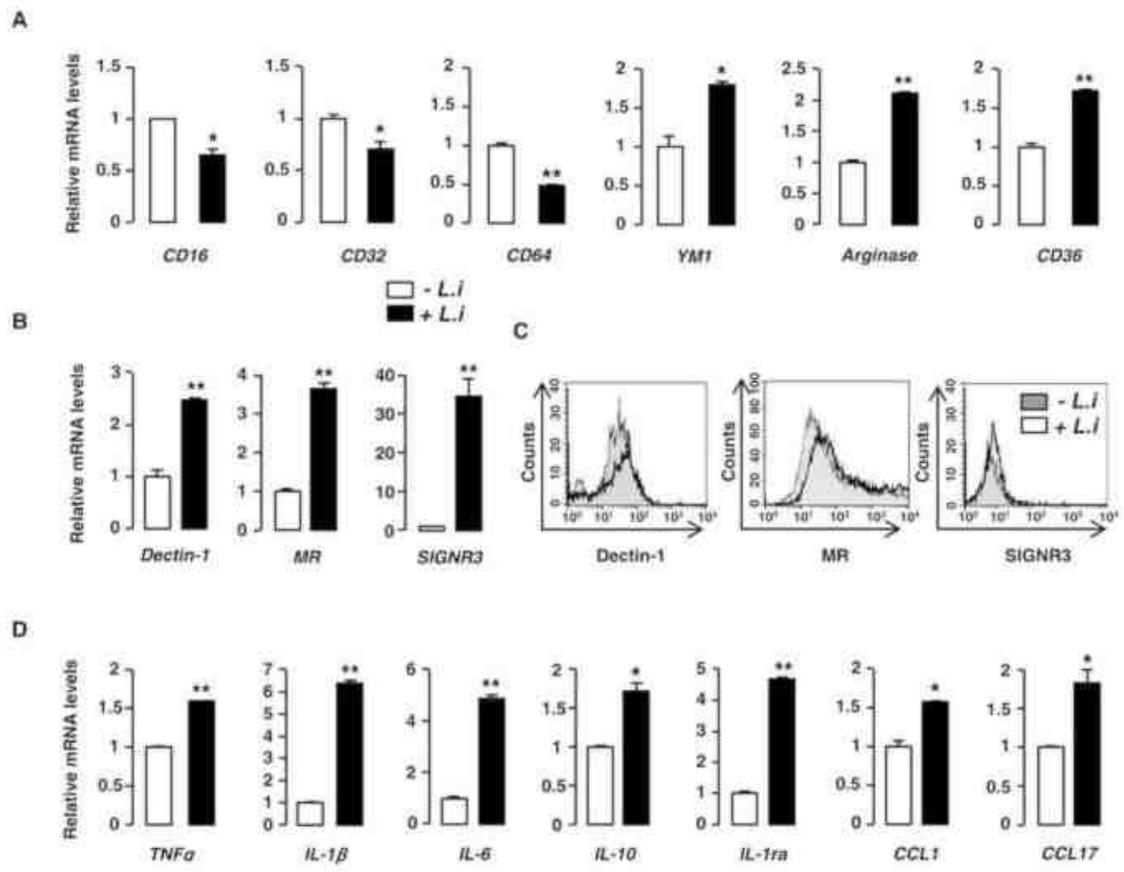


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

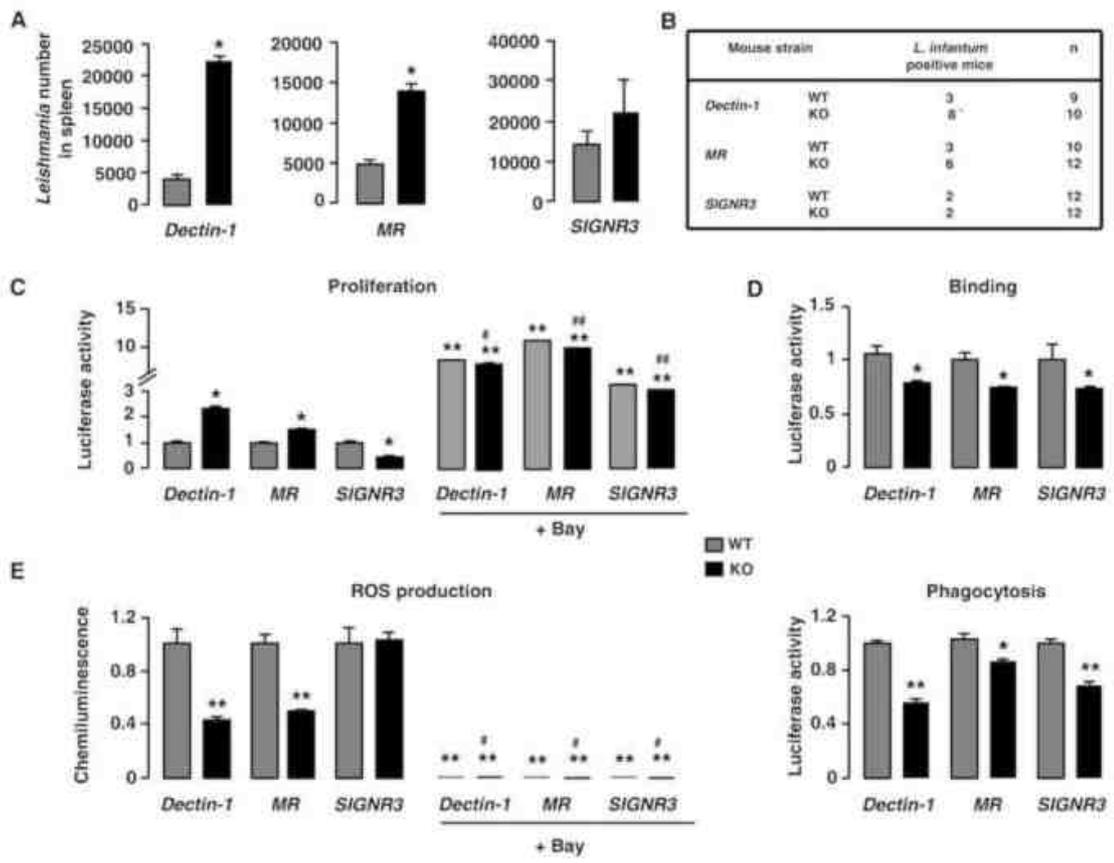


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

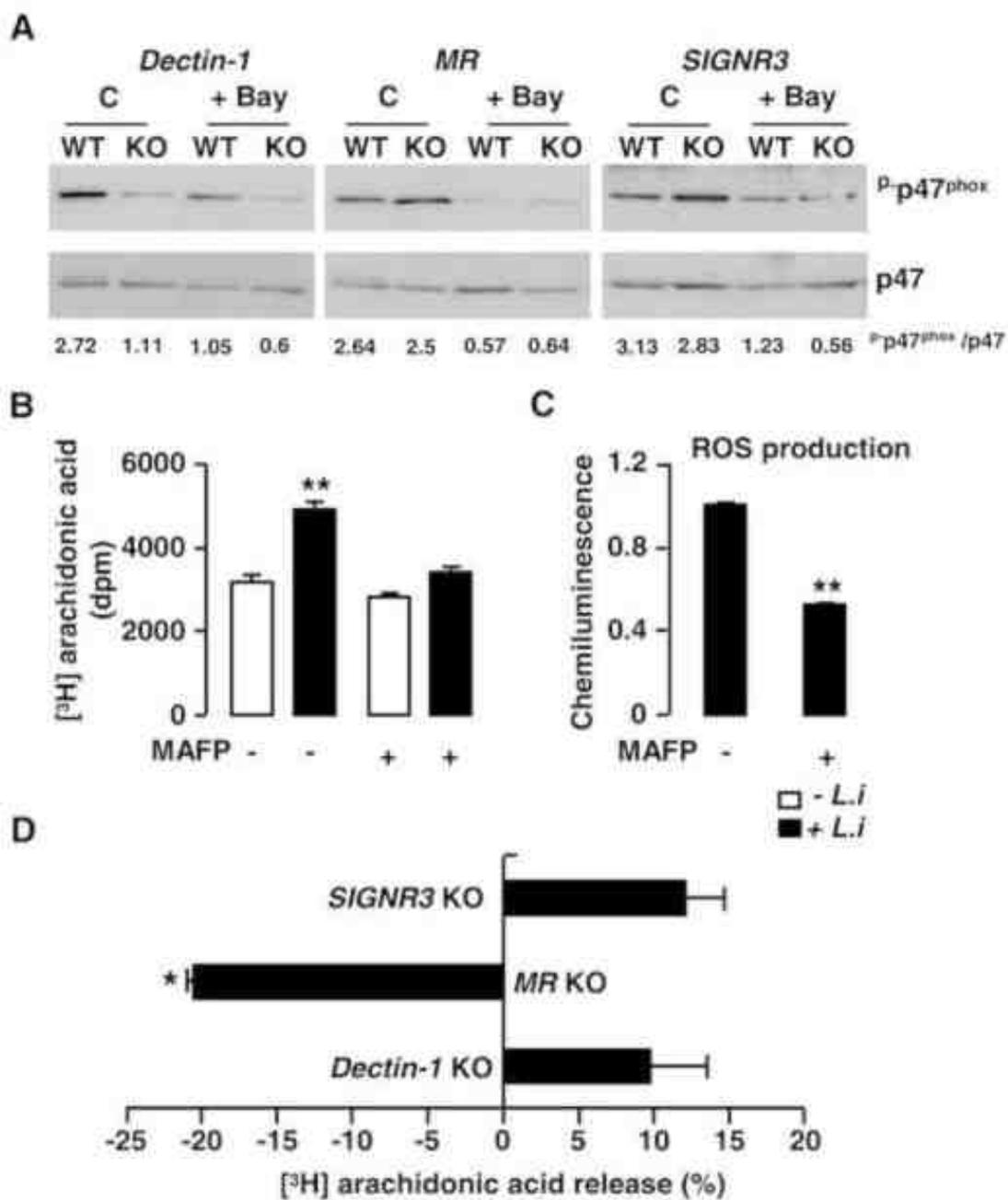


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

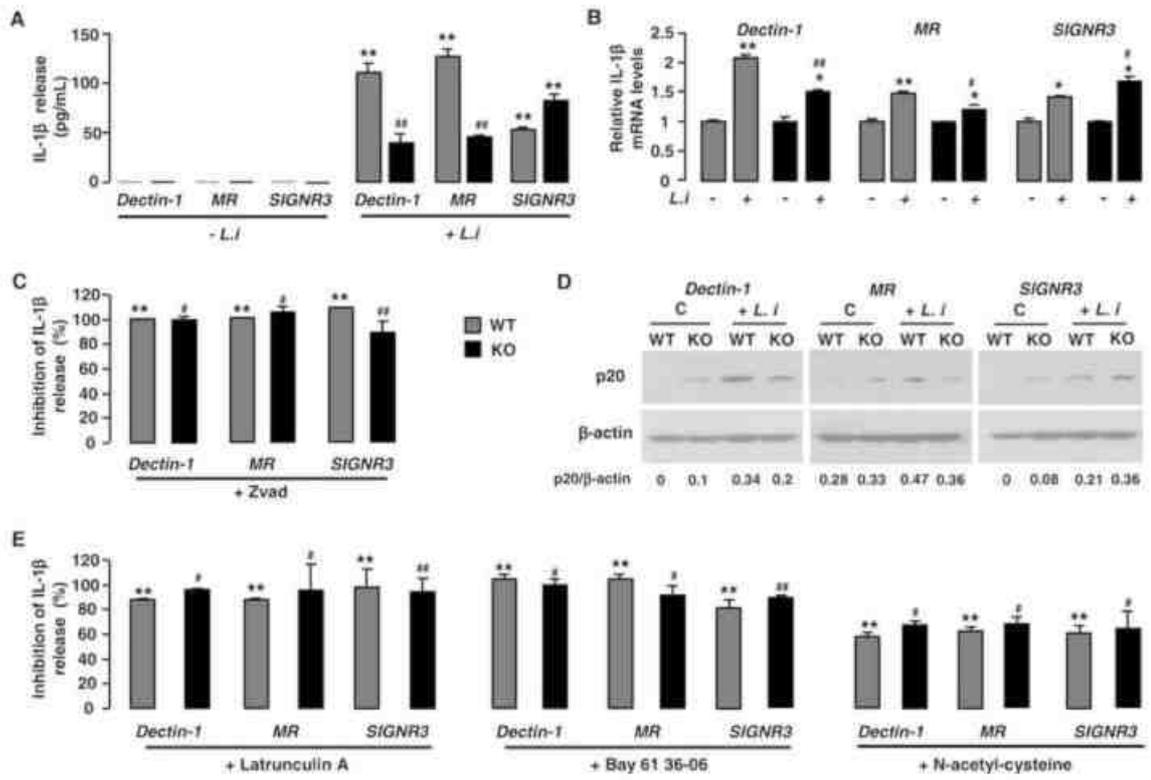
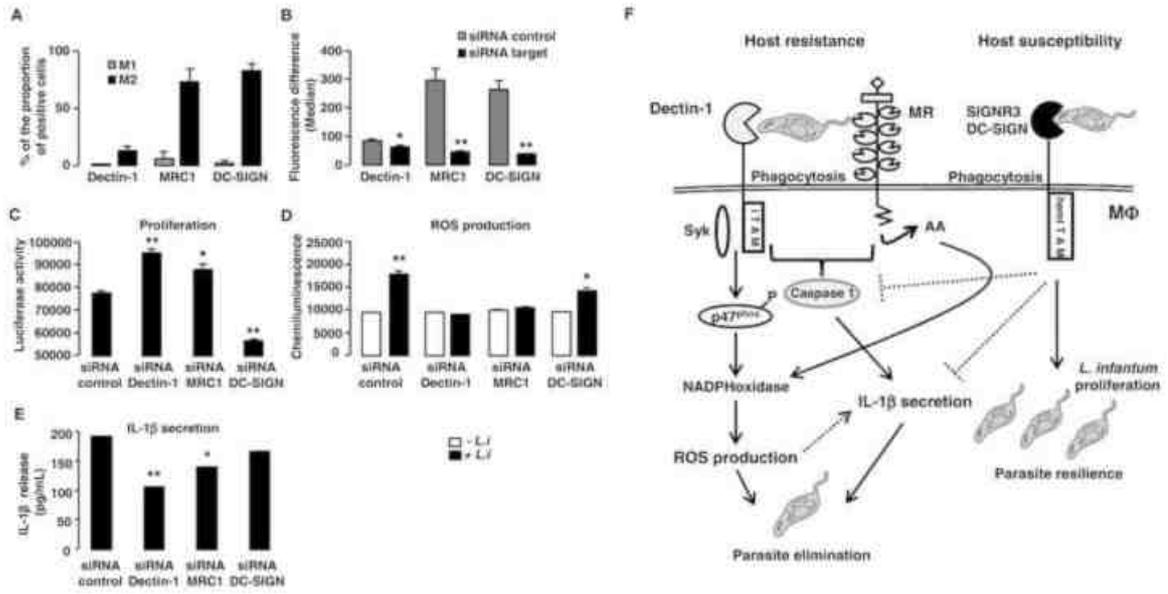


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)



PARTIE3 : DISCUSSION

1. Importance des signaux de stress intracellulaires dans la réponse inflammatoire de l'inflammasome dans les monocytes/macrophages aux DWCNTs.

L'inflammation est une réponse physiologique, mise en place à la suite d'une agression. Elle est généralement localisée, tendant à maintenir l'homéostasie. La réponse inflammatoire prend fin après l'élimination d'éventuels signaux de dangers et la réparation du tissu lésé. La capacité initiale à induire une réaction immunitaire réside dans l'expression d'un ensemble de récepteurs reconnaissant les motifs dits de « danger », les PRRs. Ces récepteurs identifient les signaux de dangers libérés par les cellules des tissus altérés (DAMPs) et d'origine pathogéniques (PAMPs). Les macrophages et cellules dendritique, résidents des tissus et garants de l'homéostasie, expriment un grand nombre de ces PRRs.

Les particules d'amiante et de silice provoquent des dommages de l'intégrité des cellules, un stress oxydant et un efflux de potassium. Ces signaux activent le PRR cytoplasmique Nlrp3 formateur de l'inflammasome et responsable de la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-18 et d'IL-1 α . Il est maintenant clair que la voie de l'inflammasome joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'inflammation chronique à bas bruit chez les personnes exposées de façon continue à l'amiante et la silice. La liste non exhaustive des éléments causant une activation de Nlrp3 et leurs signaux associés est présenté table 3. Dans ce contexte, en raison du lourd passif existant entre l'amiante et l'inflammation chronique, l'étude de l'impact des nouvelles particules sur l'immunité s'avère être un pré-requis à leur utilisation intensive.

DWCNTs et IL-1

Ainsi, nous avons choisi d'étudier l'effet des Nanotubes de Carbone bi-paroi (DWCNTs) sur un modèle cellulaire de monocytes/macrophages. Cela nous a permis d'aborder la réponse inflammatoire de manière simplifiée en étudiant les différents signaux conduisant à la production de médiateurs immuns après exposition aux DWCNTs. Dans un premier temps nous avons évalué la capacité des DWCNTs à activer l'inflammasome dans les monocytes humains. Nous avons ainsi mis en évidence que le traitement des monocytes par les DWCNTs provoque l'activation de la caspase-1. De nombreuses études ont déjà montré que l'inflammasome Nlrp3 était impliqué dans la réponse à de nombreux matériaux particuliers conduisant à

l'activation de la caspase-1 et à la sécrétion d'IL-1 β . Le traitement seul des monocytes avec les DWCNTs ne s'accompagne pas d'une sécrétion d'IL-1 β , d'IL-18 ou même de TNF α dont la régulation est indépendante de l'activité de la caspase-1. En effet, malgré leur impact sur l'activation de la caspase-1, les DWCNTs n'ont pas d'effet inducteur de la transcription des gènes codant pour les pro-IL-1 β et autres cytokines inflammatoires. Les travaux de Dostert et Hornung ont démontré que l'exposition de monocytes ou de macrophages à des particules d'amiante et de silice seules ne suffit pas à promouvoir l'expression de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18. Les auteurs expliquent que l'activation spécifique de la caspase-1 par certaines particules ne suffit pas à promouvoir la sécrétion d'IL-1 β dans un système *in vitro* unicellulaire^{39,40,80}. Ils proposent d'avoir recours à un priming cellulaire avec un ligand TLR (LPS, PGN...) ou des cytokines inflammatoires (TNF- α) permettant d'induire l'expression des pro-cytokines de la famille de l'IL-1 sans activer l'inflammasome et la caspase-1. Le traitement des monocytes avec un ligand TLR et les DWCNTs entraîne une amplification de la sécrétion d'IL-1 β mature et d'IL-18. Par contre, la production de TNF α et d'IL-6 n'est pas modifiée avec l'association d'un ligand TLR/DWCNTs par rapport à la seule stimulation du TLR. Cela confirme ainsi que les DWCNTs ont une capacité spécifique à activer la sécrétion d'IL-1 β indépendamment de la production des autres cytokines. Cela montre également que le premier signal nécessaire et inducteur de la pro-IL1 β ne provient pas directement des monocytes/macrophages en réponse aux DWCNTs. Nous reviendrons plus tard sur l'origine potentielle du premier signal inducteur de la pro-IL1 β .

Enfin, sur les bases de ces résultats et des données bibliographiques, nous avons mis en évidence l'inflammasome Nlrp3 comme le complexe responsable de la sécrétion d'IL-1 β provoquée par les DWCNTs dans les monocytes humains primés. Ces résultats ont été dans le même temps partiellement confirmés par Palomäki et al., qui ont mis en évidence que les nano-fibres de carbone induisaient l'activation de l'inflammasome Nlrp3 et la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages humains et que cela nécessitait au préalable un priming de ces cellules avec du LPS¹⁸¹.

DWCNTs et signaux de stress endogènes

Parmi l'ensemble des éléments induisant l'activation de l'inflammasome Nlrp3, aucun n'a été caractérisé pour être directement reconnu par ce complexe. En effet, Dostert

et al., ont démontré que l'activation de l'inflammasome par les fibres d'amiante passait par la production de ROS et une déstabilisation lysosomale. Cela n'est pas restreint aux activateurs particuliers de l'inflammasome mais également pathogéniques et endogènes. Par exemple, il est démontré que l'ATP extracellulaire, *via* son interaction avec le récepteur membranaire P2X7, induit un efflux de potassium et une production mitochondriale de ROS responsables de l'activation de l'inflammasome Nlrp3^{75,182,183}. En accord avec cela, nous montrons que la sécrétion d'IL-1 β induite par les DWCNTs est dépendante de signaux intracellulaires comme l'efflux de potassium, la phagocytose et la maturation phagosomale. Par contre, dans notre modèle, nous n'avons pas observé de production de ROS des monocytes humains en réponse aux DWCNTs. Une explication avancée est que les NTCs ont la capacité à piéger les ROS au sein de leurs structures tubulaires empêchant leur détection. Néanmoins, l'utilisation du trolox ou du NAC, deux puissants antioxydants, n'a pas permis de mettre en évidence un lien entre ROS et sécrétion d'IL-1 β . En présence du DPI, nous avons observé une inhibition de la sécrétion d'IL-1 β mais corrélée à l'effet inhibiteur non spécifique de cette molécule sur la transcription du gène codant la pro-IL-1 β . En accord avec cela, l'équipe de Netea et al., a montré que le manque de spécificité du DPI pouvait induire des erreurs d'appréciation dans l'interprétation des phénomènes régulant strictement l'activation de Nlrp3¹⁸⁴. De plus, des études contradictoires montrent que les particules de nano-SiO₂ et de nano-TiO₂ induisent une activation de l'inflammasome Nlrp3 indépendamment de la production de ROS^{85,86}. Il est probable que les ROS, bien qu'essentiels dans certains cas, ne constituent pas le mécanisme canonique conduisant à la formation de l'inflammasome Nlrp3.

Malgré l'importance de ces signaux activant Nlrp3, on ne sait toujours pas comment, biochimiquement ceux-ci agissent sur la formation de l'inflammasome. De nombreuses suppositions sont avancées. Par exemple, il est proposé que des protéines chaperonnes sensibles à différents stress cellulaires se lient à Nlrp3 lui permettant un dépliement structural et la formation de l'inflammasome. Ainsi, en 2010 l'équipe de Jürg Tschopp met en évidence une liaison physique TXNIP/Nlrp3 en réponse à des agonistes particuliers (MSU) ou soluble (R-837)¹⁸⁵. La protéine TXNIP possède la capacité de se fixer sur les domaines NACHT et LRR de Nlrp3. Elle ne se lie pas aux autres NLRs ni aux autres protéines contenant des LRRs testés, suggérant son interaction spécifique avec Nlrp3¹⁸⁵. L'utilisation de cellules

déficientes en TXNIP ou la diminution de sa production conduit à la diminution de la quantité d'IL-1 β produite en réponse aux activateurs Nlrp3 ATP, MSU, silice. Il n'y a pas de différence avec des activateurs de Nlrc4 ou AIM2. Au vu des différents mécanismes d'activation de l'inflammasome Nlrp3, il est cependant probable qu'il existe de nombreuses autres protéines chaperonnes capables de se lier et d'activer Nlrp3 en réponse aux signaux de stress cellulaire.

Propriétés intrinsèques des DWCNTs et inflammasome

L'ensemble des résultats obtenus sur l'impact des DWCNTs sur l'activation de l'inflammasome Nlrp3 dans les monocytes humains pose une question essentielle : Quelle sont les propriétés intrinsèque à ces particules capables de promouvoir la libération de signaux activant Nlrp3 ? En abordant les données de la littérature, certaines des propriétés qui ressortent pour être potentiellement impliquée dans l'activation du stress cellulaire sont le caractère hydrophobe, la taille, l'état d'agglomération (lié à leur forme et à leur caractère hydrophobe) et la composition chimique des particules. Le caractère hydrophobe d'un élément est décrit pour être déclencheur d'altérations cellulaires et physiologiques ¹⁸⁶. Puisque les NTCs sont insolubles et hydrophobes, nous avons modifié chimiquement leur paroi en les oxydant. Cela a pour effet de les rendre plus hydrophile. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que leur caractère hydrophobe joue un rôle partiel dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3. La voie de signalisation impliquée dans ce mécanisme reste néanmoins à déterminer. Plusieurs hypothèses sont abordées comme la mort cellulaire ou la déstabilisation lysosomale qui pourraient, selon certaines données, être causées par un phénomène d'insertion des particules fortement hydrophobes dans les membranes, cela se traduisant par la libération du contenu cellulaire (ATP) et/ou lysosomal (cathepsine B, protéases) reconnu comme signal de danger par l'inflammasome Nlrp3 ¹²¹.

L'équipe de Donaldson démontre que la longueur d'une fibre ou nano-fibre de carbone, d'amiante ou d'argent d'au moins 4 μ m de longueur suffit à déclencher *in vivo* une inflammation ¹⁸⁷. Ils établissent également le « seuil » de longueur (à peu près 10 μ m) à partir duquel une particule tubulaire ou fibreuse peut être directement inflammatoire pour les macrophages. Des expériences complémentaires ont également mis en lumière que ce seuil est le minimum pour que les macrophages puissent phagocyter entièrement les particules. Par exemple dans le cas des fibres

d'amiante, au-delà de cette longueur on assiste au phénomène de phagocytose frustrée qui se caractérise par une incapacité du macrophage à ingérer la particule, ce qui se traduit par la libération des enzymes lysosomales dans le milieu externe et à des dommages membranaires et intracellulaires activant l'inflammasome Nlrp3. Dans notre cas, il est difficile de conclure quant au rôle de la phagocytose frustrée des DWCNTs en raison de leur état d'agglomération. Il est certains que les macrophages se regroupent autour des gros agglomérats de NTCs et que l'inhibition du processus de phagocytose abroge la sécrétion d'IL-1 β . Néanmoins, en absence de preuves directes, nous ne pouvons pas conclure quant au rôle de la phagocytose frustrée dans la sécrétion d'IL-1 β induite par les DWCNTs dans les monocytes humains. Une des pistes envisagées serait d'utiliser des dispersants tels que la BSA ou le pluronic® afin d'éviter au maximum la formation d'agrégats de NTCs ¹⁸⁸. Néanmoins, l'utilisation de ces dispersants modifie également l'impact des NTCs sur le système immunitaire. Concernant l'état d'agglomération des particules, il s'agit d'une difficulté extrêmement importante rencontrée lorsque l'on étudie les effets des particules en conditions biologiques et qui perturbe grandement l'appréhension et l'interprétation des résultats obtenus. Cet état d'agglomération est une conséquence entre autre des propriétés hydrophobes des NTCs qui influe finalement sur leur taille. Par exemple, Palmomäki et al., ne détectent pas de sécrétion d'IL-1 β fortement amplifiée par des macrophages primés au LPS en utilisant des NTCs multi-parois (MWCNTs) ¹⁸¹. On peut entrevoir deux raisons principales pour expliquer les différences entre leurs résultats et les nôtres. La première concerne le type de NTC utilisé, multi-parois contre bi-parois, qui vont leur conférer des propriétés structurales et comportementales différentes dans les fluides biologiques. D'autre part, la préparation des échantillons n'est pas la même. Palomäki et al., utilisent de la BSA pour mieux solubiliser les MWCNTs alors que nos expériences se sont faites sans ajout de molécules annexes que celles déjà présentes dans le milieu de culture ¹⁸¹. Il est probable que la BSA joue un rôle dans la reconnaissance par certains récepteurs des NTCs mais également dans l'individualisation de ces particules modifiant ainsi la réponse des macrophages. Ce système a un avantage au notre car il permet de mieux individualiser les NTCs en fluide biologique et d'observer l'effet strict des NTCs non agrégés. Néanmoins, on peut lui opposer une mesure d'un effet lié à la BSA adsorbée sur les NTCs difficilement quantifiable et caractérisable.

Pour résumer, la comparaison des études sur les effets des NTCs sur la réponse immune permet de poser une question : Comment peut on juger de l'impact d'un élément si ses propriétés physico-chimiques ne sont plus les mêmes en solution et induisent une variation dans la production des signaux de dangers ? Il faut admettre que les particules carbonées ont une large tendance à s'agréger et que leur contact avec les cellules dans un fluide biologique ne se fera que sous cette forme. Auquel cas, en solution nous ne pouvons parler de nanotubes de carbone mais de faisceaux de carbone voire de particules micro- et macrométriques de carbone. Ainsi, il est probable qu'il y ait autant d'effets biologiques différents qu'il existe de NTCs.

Confirmation du modèle et coopération cellulaire

Enfin, l'identification de l'inflammasome Nlrp3 dans les monocytes humains comme complexe induisant la réponse inflammatoire *in vitro* aux DWCNTs nécessite d'être confirmée dans un modèle *in vivo*. Nos résultats obtenus *in vivo* dans un modèle murin de péritonite aux DWCNTs montrent une augmentation de la concentration en IL-1 β 8H et 12H après injection et une diminution après 24H, suggérant ainsi une réponse inflammatoire aigue aux DWCNTs résolue rapidement. Bien que non physiologique, le modèle de péritonite a le mérite de rendre compte, de façon simplifiée, de la situation immune globale en réponse à un stimulus au sein d'un organisme pluricellulaire. De plus, cela nous apporte également une donnée supplémentaire qui est que les DWCNTs peuvent induire *in vivo* la transcription de la pro-IL1 β , suggérant que les macrophages ne sont pas la seule cible cellulaire des DWCNTs. Des études seront nécessaires afin de déterminer quels types cellulaires sont concernés et les signaux de dangers qu'ils libèrent afin d'induire la transcription de la pro-IL1 β dans les macrophages. Des travaux ont mis en évidence que les pneumocytes pouvaient produire certains facteurs inflammatoire (ROS, IL-8...) en réponse aux NTCs ¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Des expériences de co-culture peuvent apporter des éléments supplémentaires permettant d'améliorer notre compréhension des processus conduisant à l'activation de l'inflammasome Nlrp3 et au déclenchement de la réaction inflammatoire.

Enfin, toujours en lien avec les signaux de dangers libérés par les cellules en réponse aux NTCs, il est établi que l'inflammasome Nlrp3 participe activement au recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire *via* la sécrétion d'IL-1 β en réponse à certains de ses activateurs particuliers. L'IL-1 β agit également sur la

production des chimiokines murines, CXCL1/2 et humaine IL-8, essentielles dans le recrutement chimiotactique des neutrophiles sur le foyer inflammatoire¹⁹². Outre ces chimiokines, le lipide bioactif Leukotriene B4 (LTB4) joue aussi un rôle primordial dans le recrutement précoce des neutrophiles^{192,193}. Bien que sa fonction exacte soit encore peu connue, des études suggèrent que sa production précoce (30 minutes à 1H) joue un rôle dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3 et le recrutement des neutrophiles. Ainsi, en réponse au MSU, les cristaux d'urate activent la production de LTB4 *via* la *5-lipoxygénase* à partir de l'acide arachidonique dans les macrophages et que l'effet autocrine de ce lipide potentialise l'activation de l'inflammasome Nlrp3 par les cristaux de MSU conduisant au recrutement neutrophilique¹⁹². Les auteurs soulignent également que les souris KO pour la *5-lipoxygénase* présentent une production réduite d'IL-1 β mature en réponse au MSU, démontrant ainsi le rôle essentiel et indirect du LTB4 dans le processus de recrutement des neutrophiles *via* l'activation de la sécrétion d'IL-1 β . De manière intéressante, l'ATP extracellulaire ou les flux calciques sont des activateurs puissants de la 5-lipoxygénase mais également de Nlrp3^{193,194}. Une étude récente montre que la production d'écosanoïdes (LTB4, PGE2...) en réponse à la flagelline nécessite l'inflammasome NLRC4. En effet, l'activation de la caspase-1 par la flagelline permet la production de flux calciques et l'activation de la *phospholipase A2* nécessaires à la production de ces lipides¹⁹³. Néanmoins, il est probable, comme suggéré dans cette étude, que le LTB4 ait également une fonction paracrine indépendante de l'inflammasome. En effet, des données relatent que ce lipide agit positivement sur l'expression des molécules d'adhésion (ICAM, VCAM) des cellules endothéliales favorisant ainsi le recrutement des neutrophiles^{195,196}. Des travaux sur les effets toxiques des NTCs sur le tissu pulmonaire *in vivo* montrent un recrutement de neutrophiles et une sécrétion d'IL-1 β mesurée un jour après instillation de NTCs^{197,198}. Bien que le LTB4 puisse avoir d'autres rôles distincts de l'inflammasome Nlrp3 dans la mise en place de la réaction inflammatoire, il sera intéressant de déterminer par quels mécanismes Nlrp3 intervient dans le recrutement des neutrophiles et de mesurer l'implication du LTB4 ou d'autres médiateurs lipidiques (PGE2, LTA4) dans ce processus.

Activateurs	Nature				Voie canonique d'activation de Nlrp3			
	Particules	PAMPs	DAMPs	Autres	Phago	DL	ROS	K+
Amiante ⁴⁰	Microns				oui	oui	oui	oui
Aluminium ⁸⁰	Microns				oui	oui	oui	oui
ATP ³⁶			Métabo				oui	oui
Cellules mortes par autophagie ¹⁹⁹			Mort		oui			oui
Peptide β -amyloïde ⁸¹	Micron		Métabo		oui	oui		oui
B-1,3 Glucan ²⁰⁰		Levures			oui	?	oui	oui
Calcium phosphate dihydrate (CPD) ⁸³	Microns		Métabo		oui			
Cristaux de Cholesterol ²⁰¹	Microns		Métabo		oui	oui		oui
dA :dT ³⁷					oui			oui
H ₂ O ₂ ¹⁸²							oui	
Nano-SiO ₂ ^{85,86}	Nano				oui		?	oui
Nano-TiO ₂ ^{85,86}	Nano				oui		?	oui
Hemozoin ⁶¹		Parasite			oui		oui	oui
3-Methyl adenine ¹⁸²				Inhibiteur autophagie			oui	
Nigericine ²⁰²		Toxine bactérie					oui	oui
Ricin ²⁰³		Toxine bactérie					oui	oui
Rotenone ¹⁸²				Inhibiteur chaîne resp			oui	
TNCB ²⁰⁴				Irritant de la peau				
Cristaux d'urate (MSU) ⁷⁹	Micron		Métabo		oui	oui	oui	oui
Silice ⁴⁰	Micron				oui	?	?	oui
UV-B ²⁰⁵				Physique				
Wortmannin ¹⁸²				Inhibiteur autophagie			oui	
<i>Candida albicans</i> ²⁰⁶					oui		oui	
<i>A.fumigatus</i> ²⁰⁷		levure			oui		oui	oui
<i>M.tuberculosis</i> ^{208,209}		bactérie			oui			
<i>S.aureus</i> ²¹⁰		bactérie					oui	
Carbon Black ²¹¹	Nano				oui			oui

Tableau 3: Liste non exhaustive des activateurs de l'inflammasome Nlrp3 ainsi que des mécanismes connus. DL : Déstabilisation lysosomale. Vert, mécanisme consensuel. Rouge, contradiction entre les données de la littérature. Rien, mécanisme pas encore étudié ou réfuté.

2. Importance des signaux de dangers d'origine pathogénique dans l'élimination de *Leishmania infantum* : rôle primordial des récepteurs Lectine de type-C

Par la suite, nous nous sommes alors intéressés aux signaux d'origine pathogéniques susceptibles d'être reconnus par l'inflammasome à travers l'utilisation du parasite *Leishmania infantum* (*L.i.*). Ce parasite possède une capacité répliquative intracellulaire et son réservoir cellulaire cible est le macrophage. En plus de sa capacité à promouvoir la production de cytokines inflammatoires lors de la primo-infection, nous avons également mis en évidence que les récepteurs lectines de type C Dectine-1, Mannose et SignR3 étaient surexprimés par les macrophages murins péritonéaux traités avec *L.i.* Ainsi nous avons exploré la fonction de ces récepteurs dans la réponse anti-*Leishmania*, de même que les signaux intracellulaires qui leurs sont associés, en utilisant des macrophages murins de souris KO pour les récepteurs Dectine-1, Mannose et SignR3. Ce travail collaboratif nous a permis d'isoler le rôle fondamental des récepteurs Dectine-1, Mannose et SignR3 dans la reconnaissance et la phagocytose de *L.i.* L'exploration des voies de signalisation nous a conduit à isoler Dectine-1 et Mannose comme deux récepteurs impliqués dans la réponse microbicide vis-à-vis de *Leishmania* alors que le récepteur SignR3 ne semble pas favoriser l'élimination de ce parasite. Nous nous sommes alors demandé si la reconnaissance de *L.i.* par ces différents récepteurs pouvait être associée à la production de signaux de stress intracellulaires favorisant son élimination et quelle était la part de chacun de ces trois PRRs dans ce processus.

Récepteurs et IL-1

Il est bien établi que Dectine-1 joue un rôle essentiel dans l'activation de l'inflammasome suite à la reconnaissance de *Candida albicans*^{158,212}. De même, la reconnaissance de *Mycobacterium abscessus* par ce récepteur est associée à une activation de l'inflammasome Nlrp3 favorable à l'élimination de ce pathogène²¹³. Nous avons mis en évidence que *L.i.* induisait la production de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) mais également de ROS dans les macrophages murins. Cette réponse est fortement diminuée dans les macrophages issus de souris déplétées pour les récepteurs Dectine-1 mais aussi Mannose, démontrant pour la première fois leur implication dans la réaction inflammatoire en réponse à *L.i.* Ces

résultats suggèrent fortement la présence de PAMPs (à caractériser) à la surface de *L.i* reconnus par Dectine-1, capables d'induire la réaction inflammatoire. Les travaux de Murray et al., relatent que l'IL-18, de la famille de l'IL-1, interviendrait dans les étapes précoces de l'élimination de *L.donovani*, un autre agent responsable de leishmaniose viscérale¹⁶⁹. Ces auteurs suggèrent que cette cytokine de la famille de l'IL-1 en association avec l'IL-12 stimule *in vivo* la production d'INF- γ par les NKs ; l'INF- γ ayant un effet activateur de la production de RNs et de ROS, toxiques pour *L.donovani*^{168,169}. Le rôle de l'IL-1 β dans ce processus est moins connu. Cependant, les données sur la leishmaniose viscérale suggèrent plutôt un impact positif de l'IL-1 β sur l'expression de la iNOs et la production de RNs. Dans notre cas, nous observons une diminution de la transcription du gène codant pour la iNOs associée à la sécrétion d'IL-1 β . Parallèlement, nous montrons une augmentation de la transcription du récepteur IL-1Ra en réponse à *L.i*. La balance d'expression entre l'expression de l'IL-1Ra et le récepteur IL-R pourrait moduler les effets de l'IL-1 β sur l'induction de la iNOs. En effet, Gorth et al., montrent que l'induction de l'expression de la iNOs par l'IL-1 β est inhibée par la présence du récepteur soluble IL-1Ra ou de l'anakinra²¹⁴. Cela devra être déterminé afin d'établir si la seule sécrétion d'IL-1 β n'est pas suffisante pour promouvoir une inflammation optimale; ce qui, paradoxalement, pourrait contribuer à promouvoir l'établissement de *L.i* dans les macrophages. Des travaux sont en cours afin de caractériser le rôle précis de cette cytokine et de ces récepteurs associés sur la physiopathologie à *L.i*.

Récepteurs et inflammasome

L'IL-1 β nécessite à la fois sa transcription et l'activation de la caspase-1 pour être sécrétée⁵⁷. Ainsi, nous mettons en évidence que *L.i* est impliqué dans l'activation de la caspase-1 mais également dans la transcription de l'IL-1 β . L'engagement des récepteurs Dectine-1 et Mannose est requis pour ces deux processus. De plus, l'augmentation sensible de sécrétion d'IL-1 β mais également le maintien d'une production de ROS dans les macrophages SignR3 KO est étroitement corrélé à une diminution de la prolifération de *L.i*. Cela suggère que ce récepteur est susceptible d'induire un signal inhibiteur de la réaction inflammatoire microbicide des macrophages en réponse à *L.i*. De façon intéressante, d'autres études suggèrent que DC-Sign, l'homologue humain de SignR3, favoriserait l'établissement de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* en induisant la production d'IL-10 et en

bloquant la production optimale de l'IL-1 β , l'IL-12 et le TNF- α ^{153,215}. En parallèle, il est également démontré que l'entrée du VIH dans les cellules dendritiques passe par DC-Sign et que la phagocytose induite conduit à une absence maturation du phagosome et un stockage du virus dans les cellules sans réponse microbicide ²¹⁶.

Récepteurs et signaux de stress activant l'inflammasome

L'observation de la dichotomie entre les réponses Lectines induites par ces différents récepteurs a été confirmée par la mise en évidence des différents signaux intracellulaires de stress responsables de la production d'IL-1 β en réponse à *L.i.* Ainsi, le processus de phagocytose, l'activation de la tyrosine kinase Syk mais également la production de ROS interviennent dans la production d'IL-1 β . De façon originale, la phagocytose de *L.i.* par Dectine-1 et Mannose est associée à la sécrétion d'IL-1 β mais pas celle induite par SignR3. Cela suggère que le processus de phagocytose par un récepteur n'est pas suffisant pour activer l'inflammasome. Nous démontrons dans l'article 2, une mobilisation de l'acide arachidonique augmentée dans les macrophages de souris Dectine-1 et SignR3 KO en réponse à *L.i.* De plus, l'expression du gène codant pour la Leukotriene A4 hydrolase (*LTA4H*), impliquée dans la formation du LTB4 est plus fortement exprimée dans les macrophages SignR3 KO que dans les WT. Comme dit plus haut, le LTB4 est un potentialisateur de la sécrétion d'IL-1 β . Une des hypothèses actuellement en cours d'étude au laboratoire est que la balance de production du LTB4 serait modulée par l'engagement du récepteur SignR3, compromettant sensiblement la production d'IL-1 β et donc la réaction inflammatoire. Ainsi, il est probable que l'association du processus de phagocytose avec une voie de signalisation spécifique ou un processus de stress soit requis pour une activation optimale de l'inflammasome. Par exemple, Fatima et al., démontrent que *L.amazonensis* promeut la formation de pores à la membrane plasmique via la protéine cytolysin ²¹⁷. La formation de pores dans la membrane des phagosomes permet l'évasion du contenu endo-lysosomal dans le cytoplasme, reconnu comme signal de danger par l'inflammasome dans le cas de l'infection à *Mycobacterium kansasii* ²¹⁸.

En parallèle, nous identifions également la tyrosine kinase Syk comme le socle de la signalisation inflammatoire induite par Dectine-1 en réponse à *L.i.* L'inhibition pharmacologique de l'activation de Syk se traduit par une réduction de la transcription et une abrogation de la sécrétion d'IL-1 β en réponse à *L.i.* D'une part, la

voie Syk/CARD9 conduit à la transcription d'IL-1 β en activant Nf-kB et d'autre part, Syk est impliquée dans l'activation de la caspase-1 en stimulant la production de ROS notamment. Cela démontre son rôle essentiel dans l'activation de l'inflammasome en réponse à *L.i.* L'importance du récepteur Dectine-1 dans l'élimination de nombreux pathogènes *via* l'induction d'une réponse inflammatoire dépendante de l'inflammasome mais également de la polarisation Th1/Th17 de la réponse immune a été caractérisée dans le cadre de *Candida albicans* mais aussi de différentes espèces de mycobactéries. Le rôle du récepteur Mannose dans ce processus est plus subtil du fait de son incapacité à signaler par Syk. Il joue un rôle essentiel dans l'activation de la NADPH oxydase *via* le recrutement de la sous unité p47phox phosphorylée à la membrane. De plus, la coopération Dectine-1 avec le récepteur Mannose est aujourd'hui reconnue pour favoriser l'élimination de *Candida albicans* par une production accrue de ROS dépendants de la NADPH oxydase des macrophages. Ainsi, nous montrons ici que le récepteur Mannose est directement impliqué dans la production des ROS. Il reste à établir si la production de ROS induite par le récepteur Mannose est liée à la signalisation Syk dépendante induite par Dectine-1. L'inhibition complète de la production de ces intermédiaires de l'oxygène en présence d'un inhibiteur de Syk suggère cette hypothèse. Enfin, de récents résultats obtenus au laboratoire non montré ici, mettent en évidence que *L.i.* est capable de promouvoir la production d'IL-1 β *via* l'induction d'un efflux de potassium mais également la libération d'ATP par les cellules. A la vue de l'importance du récepteur plurinergique P2X7 dans la reconnaissance de l'ATP extracellulaire comme signal de danger activant l'inflammasome Nlrp3 et plus généralement la réponse inflammatoire, il sera intéressant de mesurer la part que semble jouer cette molécule. Toutefois, afin de permettre son établissement durable dans les macrophages, *L.i.* pourrait également antagoniser le rôle essentiel de l'ATP dans le développement de la réaction inflammatoire. En effet, il est évident aujourd'hui que les différentes espèces de *Leishmania* expriment des nucléotidases capables d'hydrolyser les nucléotides empêchant le développement optimal d'une réponse inflammatoire au profit d'une réponse anti-inflammatoire. Ainsi, Kostal et al., démontrent que *L.amazonensis* inhibe la cytolyse des macrophages par l'ATP. Ils mettent en évidence la nucleoside diphosphate kinase sécrétée par *L.amazonensis* comme capable d'hydrolyser l'ATP extracellulaire ²¹⁹.

PARTIE 4: REFERENCES

1. Barton, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation* **118**, 413–20 (2008).
2. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–35 (2008).
3. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–52 (2002).
4. The classic: first published in 1794 by G. Nicol, London. A treatise on the blood, inflammation, and gun-shot wounds. *Clinical orthopaedics and related research* **28**, 3–13 (1963).
5. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–7 (1997).
6. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science (New York, N.Y)* **296**, 301–5 (2002).
7. Agostini, L. *et al.* NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319–25 (2004).
8. Klebanoff, S. J. *et al.* Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* **136**, 4220–5 (1986).
9. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews* **6**, 173–82 (2006).
10. Parham, P. *Le système immunitaire*. (De Boeck Supérieur: 2003).
11. Kinchen, J. M. & Ravichandran, K. S. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews* **9**, 781–95 (2008).
12. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *The Journal of cell biology* **189**, 1059–70
13. Fialkow, L., Wang, Y. & Downey, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free radical biology & medicine* **42**, 153–64 (2007).
14. Bilitewski, U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. *Analytical and bioanalytical chemistry* **391**, 1545–54 (2008).
15. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews* **8**, 958–69 (2008).
16. Galli, S. J., Borregaard, N. & Wynn, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology* **12**, 1035–44
17. Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt. Sinai J. Med.* **68**, 160–166 (2001).
18. Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K. & Serhan, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology* **2**, 612–9 (2001).
19. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **6**, 1191–7 (2005).
20. Serhan, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual review of immunology* **25**, 101–37 (2007).
21. Ashcroft, G. S. *et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nature medicine* **6**, 1147–53 (2000).
22. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* **27**, 669–92 (2009).
23. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews* **5**, 953–64 (2005).
24. Martinez, F. O., Helming, L. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology* **27**, 451–83 (2009).
25. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
26. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**, 453–461 (2008).
27. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1–5 (2007).
28. Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J. & Lotze, M. T. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews* **249**, 158–175 (2012).

29. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* **12**, 991–1045 (1994).
30. Fadok, V. A. *et al.* A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85–90 (2000).
31. Flannagan, R. S., Jaumouillé, V. & Grinstein, S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* **7**, 61–98 (2012).
32. Mantovani, A. *et al.* Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Seminars in cancer biology* **14**, 155–60 (2004).
33. Barksby, H. E., Lea, S. R., Preshaw, P. M. & Taylor, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and experimental immunology* **149**, 217–25 (2007).
34. Mukhopadhyay, S., Hoidal, J. R. & Mukherjee, T. K. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respiratory research* **7**, 125 (2006).
35. Ciraci, C., Janczy, J. R., Sutterwala, F. S. & Cassel, S. L. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Microbes and infection / Institut Pasteur at* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22841804
36. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* **27**, 229–65 (2009).
37. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–61
38. Perregaux, D. & Gabel, C. A. Interleukin-1 β 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**, 15195–203 (1994).
39. Cassel, S. L. *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9035–40 (2008).
40. Dostert, C. *et al.* Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, N.Y)* **320**, 674–7 (2008).
41. Zuany-Amorim, C., Vargaftig, B. B. & Pretolani, M. Modulation by IL-10 of antigen-induced allergic responses in mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **92 Suppl 2**, 141–6 (1997).
42. Willingham, S. B. *et al.* NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* **183**, 2008–15 (2009).
43. Agresti, A., Lupo, R., Bianchi, M. E. & Muller, S. HMGB1 interacts differentially with members of the Rel family of transcription factors. *Biochemical and biophysical research communications* **302**, 421–6 (2003).
44. Newton, K. & Dixit, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**,
45. Areschoug, T. & Gordon, S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contributions to microbiology* **15**, 45–60 (2008).
46. Jouault, T. *et al.* Candida Albicans phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *The Journal of infectious diseases* **188**, 165–72 (2003).
47. Gil, M. L. & Gozalbo, D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to Candida Albicans yeasts and hyphae. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **8**, 2299–304 (2006).
48. Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G. & Choi, S. Toll-like receptor signal transduction. *Experimental & molecular medicine* **39**, 421–38 (2007).
49. Willment, J. A. & Brown, G. D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends in microbiology* **16**, 27–32 (2008).
50. Guarda, G. *et al.* Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol* **186**, 2529–34
51. McGonagle, D., Savic, S. & McDermott, M. F. The NLR network and the immunological disease continuum of adaptive and innate immune-mediated inflammation against self. *Semin Immunopathol* **29**, 303–313 (2007).

52. Hoffman, H. M. & Wanderer, A. A. Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders. *Current allergy and asthma reports* **10**, 229–35
53. Hoffman, H. M., Wright, F. A., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D. Identification of a locus on chromosome 1q44 for familial cold urticaria. *American journal of human genetics* **66**, 1693–8 (2000).
54. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* **10**, 417–26 (2002).
55. Davis, B. K., Wen, H. & Ting, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* **29**, 707–35
56. Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Petrilli, V. & Tschopp, J. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nature immunology* **8**, 497–503 (2007).
57. Stutz, A., Golenbock, D. T. & Latz, E. Inflammasomes: too big to miss. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3502–11 (2009).
58. McNeela, E. A. *et al.* Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS pathogens* **6**, e1001191
59. Meixenberger, K. *et al.* Listeria monocytogenes-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol* **184**, 922–30
60. Miller, L. S. *et al.* Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo. *J Immunol* **179**, 6933–42 (2007).
61. Shio, M. T. *et al.* Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS pathogens* **5**, e1000559 (2009).
62. Boyden, E. D. & Dietrich, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature genetics* **38**, 240–4 (2006).
63. Burckstummer, T. *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nature immunology* **10**, 266–72 (2009).
64. Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–8 (2009).
65. Saiga, H. *et al.* Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int. Immunol.* **24**, 637–644 (2012).
66. Miao, E. A. & Warren, S. E. Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *Journal of clinical immunology* **30**, 502–6
67. Miao, E. A. *et al.* Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3076–80
68. Mariathasan, S. *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213–218 (2004).
69. Chen, G. Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J. & Nunez, G. A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J Immunol* **186**, 7187–94
70. Elinav, E. *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* **145**, 745–57
71. Bruey, J. M. *et al.* Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* **129**, 45–56 (2007).
72. Kanneganti, T. D. *et al.* Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* **26**, 433–43 (2007).
73. Marina-García, N. *et al.* Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J. Immunol.* **180**, 4050–4057 (2008).
74. Babolin, C. *et al.* Tpf1 from Treponema pallidum Activates Inflammasome and Promotes the Development of Regulatory T Cells. *J Immunol* **187**, 1377–1384 (2011).
75. Lee, B. H. *et al.* Activation of P2X7 Receptor by ATP Plays an Important Role in Regulating Inflammatory Responses during Acute Viral Infection. *PLoS ONE* **7**, e35812 (2012).
76. He, X. *et al.* Inflammation and Fibrosis during Chlamydia pneumoniae Infection Is Regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC Inflammasome. *J Immunol* **184**, 5743–5754 (2010).
77. Couillin, I., Pétrilli, V. & Martinon, F. *The Inflammasomes.* (Springer: 2011).

78. Manning, C. B., Vallyathan, V. & Mossman, B. T. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *International immunopharmacology* **2**, 191–200 (2002).
79. Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–41 (2006).
80. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* **9**, 847–56 (2008).
81. Masters, S. L. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nature immunology* **11**, 897–904 (2010).
82. Rajamaki, K. *et al.* Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PloS one* **5**, e11765 (2010).
83. Ea, H.-K., So, A., Lioté, F. & Busso, N. Basic calcium phosphate crystals induce NLRP3 inflammasome activation: The in vitro and in vivo face to face. *PNAS* **108**, E1361–E1361 (2011).
84. Jin, C. *et al.* NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 14867–14872 (2011).
85. Winter, M. *et al.* Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* **5**, 326–40 (2011).
86. Yazdi, A. S. *et al.* Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19449–54 (2010).
87. Zheng, Y., Lilo, S., Mena, P. & Bliska, J. B. YopJ-induced caspase-1 activation in Yersinia-infected macrophages: independent of apoptosis, linked to necrosis, dispensable for innate host defense. *PloS one* **7**, e36019 (2012).
88. Kepp, O., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome. *Nature immunology* **12**, 199–200 (2011).
89. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–5 (2011).
90. Petrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation* **14**, 1583–9 (2007).
91. Schilling, T. & Eder, C. Sodium dependence of lysophosphatidylcholine-induced caspase-1 activity and reactive oxygen species generation. *Immunobiology* **216**, 118–125 (2011).
92. Schorn, C. *et al.* Sodium Overload and Water Influx Activate the NALP3 Inflammasome. *J. Biol. Chem.* **286**, 35–41 (2011).
93. Schorn, C. *et al.* MSU, the adjuvans of dying cells activates the NALP3 inflammasome by sodium overload. *Annals of the Rheumatic Diseases* **70**, A8–A9 (2011).
94. Schroder, K. *et al.* Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology* doi:10.1016/j.imbio.2012.07.020 (2012).
95. Netea, M. G. *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* **113**, 2324–35 (2009).
96. Guarda, G. *et al.* T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature* **460**, 269–73 (2009).
97. Guarda, G. *et al.* Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* **34**, 213–23 (2011).
98. Masters, S. L. *et al.* Regulation of interleukin-1beta by interferon-gamma is species specific, limited by suppressor of cytokine signalling 1 and influences interleukin-17 production. *EMBO reports* **11**, 640–6 (2010).
99. Harris, J. *et al.* Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 9587–97 (2011).
100. Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* **456**, 264–8 (2008).
101. Rathinam, V. A., Vanaja, S. K. & Fitzgerald, K. A. Regulation of inflammasome signaling. *Nature immunology* **13**, 333–2 (2012).
102. Saleh, M. *et al.* Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* **440**, 1064–8 (2006).
103. Bedoya, F., Sandler, L. L. & Harton, J. A. Pyrin-only protein 2 modulates NF-kappaB and disrupts ASC:CLR interactions. *J Immunol* **178**, 3837–45 (2007).

104. da Cunha, J. P., Galante, P. A. & de Souza, S. J. Different evolutionary strategies for the origin of caspase-1 inhibitors. *Journal of molecular evolution* **66**, 591–7 (2008).
105. EU hails ground-breaking nano definition. *FoodProductionDaily.com* at <<http://www.foodproductiondaily.com/Quality-Safety/EU-hails-ground-breaking-nano-definition>>
106. Wikipedia contributors Nanoparticule. *Wikipédia* (2012).at <<http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Nanoparticule&oldid=82598730>>
107. Buzea, C., Pacheco, I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17–71 (2007).
108. Teow, Y., Asharani, P. V., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Health impact and safety of engineered nanomaterials. *Chemical communications (Cambridge, England)* **47**, 7025–38
109. Theodore, L. & Kunz, R. G. Nanotechnology: Turning Basic Science into Reality. *Nanotechnology: Environmental Implications and Solutions* 61–107 (2005).at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471711705.ch2/summary>>
110. Cho, W.-S. *et al.* Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1699–1706 (2010).
111. Zolnik, B. S., Gonzalez-Fernandez, A., Sadrieh, N. & Dobrovolskaia, M. A. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* **151**, 458–65
112. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. , *Published online: 07 November 1991; | doi:10.1038/354056a0* **354**, 56–58 (1991).
113. Poland, C. A. *et al.* Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology* **3**, 423–8 (2008).
114. Landois, P. Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone. (2008).at <<http://thesesups.ups-tlse.fr/360/>>
115. Wikipedia contributors Combustion chemical vapor deposition. *Wikipedia, the free encyclopedia* (2012).at <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Combustion_chemical_vapor_deposition&oldid=508640373>
116. Nagai, H. & Toyokuni, S. Biopersistent fiber-induced inflammation and carcinogenesis: lessons learned from asbestos toward safety of fibrous nanomaterials. *Archives of biochemistry and biophysics* **502**, 1–7
117. Lamprecht, C. *et al.* AFM imaging of functionalized double-walled carbon nanotubes. *Ultramicroscopy* **109**, 899–906 (2009).
118. Haiyu Nie, W. G. PEGylation of double-walled carbon nanotubes for increasing their solubility in water. **3**, 103–109 (2012).
119. Ma-Hock, L. *et al.* Inhalation Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes in Rats Exposed for 3 Months. *Toxicol. Sci.* **112**, 468–481 (2009).
120. Ryman-Rasmussen, J. P. *et al.* Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nature nanotechnology* **4**, 747–51 (2009).
121. Porter, A. E. *et al.* Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nature nanotechnology* **2**, 713–7 (2007).
122. Murphy, F. A., Schinwald, A., Poland, C. A. & Donaldson, K. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol* **9**, 8 (2012).
123. Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A. & Laurent, C. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun. (Camb.)* 1442–1443 (2003).
124. Hertel, T. *et al.* Spectroscopy of single- and double-wall carbon nanotubes in different environments. *Nano Lett.* **5**, 511–514 (2005).
125. Salvador-Morales, C. *et al.* Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol. Immunol.* **43**, 193–201 (2006).
126. Debouzy, J. C., Cruzier, D. & Flahaut, E. Hydrophobic double walled carbon nanotubes interaction with phospholipidic model membranes: (1)H-, (2)H-, (31)P NMR and ESR study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 147–152 (2010).
127. Sanz, V. *et al.* Optimising DNA binding to carbon nanotubes by non-covalent methods. *Carbon* **49**, 1775–1781 (2011).

128. Thalhoffer, C. *Leishmania infantum* chagasi induces a dynamic cellular inflammatory response. *Theses and Dissertations* (2011).at <<http://ir.uiowa.edu/etd/1091>>
129. Olivier, M., Gregory, D. J. & Forget, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 293–305 (2005).
130. van Griensven, J. & Diro, E. Visceral leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **26**, 309–322 (2012).
131. Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M. & Barral, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* **22**, 32–40 (2006).
132. Harrison, L. H., Naidu, T. G., Drew, J. S., de Alencar, J. E. & Pearson, R. D. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 447–453 (1986).
133. Blackwell, J. M. *et al.* Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **352**, 1331–1345 (1997).
134. Bates, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.* **79**, 215–218 (1994).
135. Mosser, D. M. & Brittingham, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* **115 Suppl**, S9–23 (1997).
136. Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K. A. & Olivier, M. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology* **29**, 3737–3744 (1999).
137. da Silva, R. & Sacks, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect. Immun.* **55**, 2802–2806 (1987).
138. Prina, E. *et al.* Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell. Sci.* **117**, 315–325 (2004).
139. Ueno, N. & Wilson, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology* **28**, 335–344 (2012).
140. Bogdan, C. *et al.* Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J. Exp. Med.* **191**, 2121–2130 (2000).
141. Ueno, N. & Wilson, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology* **28**, 335–344 (2012).
142. Mosser, D. M. & Edelson, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.* **135**, 2785–2789 (1985).
143. Brittingham, A. *et al.* Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* **155**, 3102–3111 (1995).
144. Wright, S. D. & Silverstein, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 2016–2023 (1983).
145. Marth, T. & Kelsall, B. L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J. Exp. Med.* **185**, 1987–1995 (1997).
146. Coste, A. *et al.* PPAR γ promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* **19**, 329–339 (2003).
147. Allavena, P., Chieppa, M., Monti, P. & Piemonti, L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit. Rev. Immunol.* **24**, 179–192 (2004).
148. Blackwell, J. M. *et al.* Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.* **162**, 324–331 (1985).
149. Akilov, O. E., Kasuboski, R. E., Carter, C. R. & McDowell, M. A. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1188–1196 (2007).
150. Ueno, N., Bratt, C. L., Rodriguez, N. E. & Wilson, M. E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes. *Cell. Microbiol.* **11**, 1827–1841 (2009).
151. Caparrós, E. *et al.* Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology* **210**, 185–193 (2005).

152. Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M. & Geijtenbeek, T. B. H. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. *Nat. Immunol.* **10**, 1081–1088 (2009).
153. Gringhuis, S. I. *et al.* C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **26**, 605–616 (2007).
154. van den Berg, L. M., Gringhuis, S. I. & Geijtenbeek, T. B. H. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1253**, 149–158 (2012).
155. Bhardwaj, S., Srivastava, N., Sudan, R. & Saha, B. Leishmania Interferes with Host Cell Signaling to Devise a Survival Strategy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 1–14 (2010).
156. Savoia, D. *et al.* Activity of an engineered synthetic killer peptide on Leishmania major and Leishmania infantum promastigotes. *Exp. Parasitol.* **113**, 186–192 (2006).
157. Drummond, R. A. & Brown, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 392–399 (2011).
158. Cheng, S.-C. *et al.* The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of Candida Albicans. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 357–366 (2011).
159. Tomalka, J. *et al.* A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen Candida Albicans. *PLoS Pathog.* **7**, e1002379 (2011).
160. van de Veerdonk, F. L. *et al.* Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1beta production by the fungal pathogen Candida Albicans. *J. Infect. Dis.* **199**, 1087–1096 (2009).
161. Netea, M. G. *et al.* Immune sensing of Candida Albicans requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**, 1642–1650 (2006).
162. Yatawara, L. *et al.* Aureobasidium-derived soluble branched (1,3-1,6) beta-glucan (Sophy beta-glucan) enhances natural killer activity in Leishmania amazonensis-infected mice. *Korean J. Parasitol.* **47**, 345–351 (2009).
163. Sacks, D. & Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 845–858 (2002).
164. Roberts, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin* **75-76**, 115–130 (2006).
165. Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. & Moncada, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**, 4794–4797 (1990).
166. Murray, H. W. & Nathan, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani. *J. Exp. Med.* **189**, 741–746 (1999).
167. Wei, X. Q. *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**, 408–411 (1995).
168. Haeberlein, S., Sebald, H., Bogdan, C. & Schleicher, U. IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by Leishmania infantum in vivo. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1708–1717 (2010).
169. Murray, H. W., Tsai, C. W., Liu, J. & Ma, X. Responses to Leishmania donovani in Mice Deficient in Interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infect Immun* **74**, 4370–4374 (2006).
170. Carvalho, E. M. *et al.* Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* **152**, 5949–5956 (1994).
171. Stebut, E. von *et al.* Interleukin 1 α Promotes Th1 Differentiation and Inhibits Disease Progression in Leishmania major-susceptible BALB/c Mice. *J Exp Med* **198**, 191–199 (2003).
172. Mullen, A. B., Lawrence, C. E., McFarlane, E., Wei, X.-Q. & Carter, K. C. Endogenous interleukin-18 is involved in immunity to Leishmania donovani but its absence does not adversely influence the therapeutic activity of sodium stibogluconate. *Immunology* **119**, 348–354 (2006).
173. Reiner, N. E., Ng, W., Wilson, C. B., McMaster, W. R. & Burchett, S. K. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to Leishmania donovani. Interferon-gamma prevents parasite-induced

- inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to Leishmania by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J. Clin. Invest.* **85**, 1914–1924 (1990).
174. Reiner, S. L., Zheng, S., Wang, Z. E., Stowring, L. & Locksley, R. M. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* **179**, 447–456 (1994).
175. Frankenburg, S., Leibovici, V., Mansbach, N., Turco, S. J. & Rosen, G. Effect of glycolipids of Leishmania parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J. Immunol.* **145**, 4284–4289 (1990).
176. Hatzigeorgiou, D. E. *et al.* Lipophosphoglycan from Leishmania suppresses agonist-induced interleukin 1 beta gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 14708–14713 (1996).
177. Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Jhonson, P. L., Bhattacharya, S. K. & Majumdar, S. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect. Immun.* **69**, 1499–1507 (2001).
178. Rodrigues, O. R., Marques, C., Soares-Clemente, M., Ferronha, M. H. & Santos-Gomes, G. M. Identification of regulatory T cells during experimental Leishmania infantum infection. *Immunobiology* **214**, 101–111 (2009).
179. Rai, A. K. *et al.* Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *PLoS ONE* **7**, e31551 (2012).
180. Rolão, N., Cortes, S., Gomes-Pereira, S. & Campino, L. Leishmania infantum: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* **115**, 270–276 (2007).
181. Palomäki, J. *et al.* Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism. *ACS Nano* **5**, 6861–6870 (2011).
182. Martinon, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *European Journal of Immunology* **40**, 616–619 (2010).
183. Dagenais, M., Skeldon, A. & Saleh, M. The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death & Differentiation* **19**, 5–12 (2012).
184. Veerdonk, F. L. van de *et al.* Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1 β inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. *PNAS* **107**, 3030–3033 (2010).
185. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* **11**, 136–140 (2010).
186. Seong, S.-Y. & Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology* **4**, 469–478 (2004).
187. Schinwald, A. *et al.* The threshold length for fiber-induced acute pleural inflammation: shedding light on the early events in asbestos-induced mesothelioma. *Toxicol. Sci.* **128**, 461–470 (2012).
188. Ciofani, G., Raffa, V., Pensabene, V., Menciaci, A. & Dario, P. Dispersion of Multi-walled Carbon Nanotubes in Aqueous Pluronic F127 Solutions for Biological Applications. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **17**, 11–25 (2009).
189. Simon-Deckers, A. *et al.* In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* **253**, 137–146 (2008).
190. Ye, S.-F., Wu, Y.-H., Hou, Z.-Q. & Zhang, Q.-Q. ROS and NF- κ B are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **379**, 643–648 (2009).
191. Cavallo, D. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial cells. *J Appl Toxicol* **32**, 454–464 (2012).
192. Flávio A. Amaral, V. V. C. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout. *Arthritis & Rheumatism* **64**, 474 – 484 (2012).
193. von Moltke, J. *et al.* Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature* (2012).doi:10.1038/nature11351
194. Barberà-Cremades, M. *et al.* P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release. *FASEB J.* **26**, 2951–2962 (2012).

195. Davies, D. *et al.* VCAM-1 contributes to rapid eosinophil accumulation induced by the chemoattractants PAF and LTB₄: evidence for basal expression of functional VCAM-1 in rat skin. *Immunology* **97**, 150–158 (1999).
196. Albelda, S. M., Smith, C. W. & Ward, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* **8**, 504–512 (1994).
197. Shvedova, A. A. *et al.* Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**, L698–L708 (2005).
198. Chou, C.-C. *et al.* Single-Walled Carbon Nanotubes Can Induce Pulmonary Injury in Mouse Model. *Nano Lett.* **8**, 437–445 (2008).
199. Petrovski, G. *et al.* Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation and IL-1 β release in human macrophages. *Autophagy* **7**, 321–330 (2011).
200. Kankkunen, P. *et al.* (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J. Immunol.* **184**, 6335–6342 (2010).
201. Rajamäki, K. *et al.* Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS ONE* **5**, e11765 (2010).
202. Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228–232 (2006).
203. Lindauer, M., Wong, J. & Magun, B. Ricin Toxin Activates the NALP3 Inflammasome. *Toxins* **2**, 1500–1514 (2010).
204. Watanabe, H. *et al.* Activation of the IL-1 β -Processing Inflammasome Is Involved in Contact Hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 1956–1963 (2007).
205. Feldmeyer, L. *et al.* The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1 β by keratinocytes. *Curr. Biol.* **17**, 1140–1145 (2007).
206. Joly, S. *et al.* Candida Albicans hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* **183**, 3578–3581 (2009).
207. Saïd-Sadier, N., Padilla, E., Langsley, G. & Ojcius, D. M. Aspergillus fumigatus Stimulates the NLRP3 Inflammasome through a Pathway Requiring ROS Production and the Syk Tyrosine Kinase. *PLoS ONE* **5**, e10008 (2010).
208. Master, S. S. *et al.* Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* **3**, 224–232 (2008).
209. Dorhoi, A. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome by Mycobacterium tuberculosis is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* **42**, 374–384 (2012).
210. Craven, R. R. *et al.* Staphylococcus aureus α -Hemolysin Activates the NLRP3-Inflammasome in Human and Mouse Monocytic Cells. *PLoS ONE* **4**, e7446 (2009).
211. Reisetter, A. C. *et al.* Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *J. Biol. Chem.* **286**, 21844–21852 (2011).
212. Gringhuis, S. I. *et al.* Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature Immunology* (2012).doi:10.1038/ni.2222
213. Lee, H.-M. *et al.* Mycobacterium abscessus activates the NLRP3 inflammasome via Dectin-1-Syk and p62/SQSTM1. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 601–610 (2012).
214. Gorth, D. J. *et al.* IL-1ra delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres attenuates IL-1 β -mediated degradation of nucleus pulposus in vitro. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R179 (2012).
215. Zenaro, E., Donini, M. & Dusi, S. Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, mannose receptor, and DC-SIGN. at <<http://www.jleukbio.org>>
216. Hodges, A. *et al.* Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nature Immunology* **8**, 569–577 (2007).
217. Noronha, F. S. M., Cruz, J. S., Beirão, P. S. L. & Horta, M. F. Macrophage Damage by Leishmania amazonensis Cytolysin: Evidence of Pore Formation on Cell Membrane. *Infect. Immun.* **68**, 4578–4584 (2000).
218. Chen, C.-C. *et al.* Activation of an NLRP3 Inflammasome Restricts Mycobacterium kansasii Infection. *PLoS One* **7**, (2012).

219. Kolli, B. K., Kostal, J., Zaborina, O., Chakrabarty, A. M. & Chang, K.-P. Leishmania-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. *Molecular and Biochemical Parasitology* **158**, 163–175 (2008).

Abstract

The vision of the immunity as whole discriminating elements of the self to protect and non-self to fight has evolved the last years with the discovery of endogenous danger signals. Thus, any condition that may be deleterious to the host, associated with an endogenous danger signal emission, is likely to produce an immune response able to mobilizing actors to promote homeostasis. The inflammatory response is initiated by the innate immune system following the recognition of exogenous and endogenous danger signals. Macrophages, due to the expression of a broad spectrum of receptors and their strategic position in the tissues play a key role in the development of this response. Repeated exposure to environmental particles such as asbestos results in the establishment of a sterile and chronic inflammatory response known to be extremely harmful to the body.

The study of the impact of nanoparticles, the DWCNTs, on the inflammatory response of macrophages led us to isolate a cytoplasmic complex, Nlrp3 inflammasome. Formation of Nlrp3 inflammasome results in the activation of the protease caspase-1 and leads to the specific release of IL-1 β and IL-18, both highly inflammatory cytokines. We have isolated the efflux of potassium, the process of phagocytosis, phagosome maturation and cathepsin B as endogenous dangers signals responsible for the activation of Nlrp3 inflammasome.

In the second part of this work, we investigated the molecular mechanisms of activation of the inflammasome by a pathogenic agent, the parasite *Leishmania infantum* (*L.i*) responsible of visceral leishmaniasis. Our results showed that *L.i* is able to promote the secretion of IL- β in a process requiring C-type lectin receptor Dectin-1 engagement and protease caspase-1 activation. Thus, we isolated the tyrosine kinase Syk, phagocytosis process and ROS as cellular dangers signals involved in the caspase-1 activation and IL-1 β release.

To conclude, all these data show the original and unique capacity of the inflammasome to recognize cellular stress signals induced by features different by their chemical and structural structures. This results in the release of IL-1 β by monocytes/macrophages and the development of an inflammatory response.

Key words: Macrophages, innate immunity, danger signals, inflammasome, Carbon Nanotubes, *Leishmania infantum*

Résumé

La vision de l'immunité en tant qu'entité discriminant les éléments du soi à protéger et du non soi à combattre a évolué ces dernières années avec la découverte des signaux de dangers endogènes et certains de leurs récepteurs associés. Ainsi, toute condition pouvant être délétère pour l'hôte, associée à une émission de signaux de dangers endogènes, est susceptible de produire une réaction immunitaire mobilisant les acteurs capable de promouvoir un retour à l'homéostasie. La réponse inflammatoire est initiée par le système immunitaire inné suite à la reconnaissance de signaux de danger d'origines exogènes et endogènes. Les macrophages, de part l'expression d'un large spectre de récepteurs et leur position stratégique dans les tissus jouent un rôle prépondérant dans la mise en place de cette réponse.

L'exposition répétée à des particules environnementales comme l'amiante se traduit par la mise en place d'une réaction inflammatoire stérile et chronique qui s'avère être extrêmement délétère pour l'organisme et dans laquelle les macrophages jouent un rôle à la fois d'initiation et d'entretiens. L'étude de l'impact de nanoparticules manufacturées, les DWCNTs, sur la réponse inflammatoire des macrophages nous a conduits à isoler un complexe cytoplasmique, l'inflammasome Nlrp3. L'activation de l'inflammasome Nlrp3 se traduit par l'activation de la protéase caspase-1 et conduit à la libération spécifique d'IL-1 β et d'IL-18, cytokines hautement inflammatoires. Nous avons ainsi isolé l'efflux de potassium, le processus de phagocytose, la maturation de phagosome et la cathepsine-B comme des signaux de dangers cellulaires responsables de l'activation de l'inflammasome Nlrp3 en réponse à ces nanoparticules. Ce travail est publié dans le journal Nanomedicine.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires d'activation de l'inflammasome par un agent pathogénique, le parasite *Leishmania infantum* (*L.i*) responsable de la Leishmaniose viscérale. Nos résultats démontrent que *L.i* est capable d'induire la sécrétion d'IL- β selon un processus nécessitant la protéase caspase-1 *via* l'engagement du récepteur membranaire Lectine de type C, Dectine-1. Nous isolons ainsi la tyrosine kinase Syk, le processus de phagocytose et les ROS comme signaux de dangers capables d'induire l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β . Ce travail est actuellement soumis pour publication.

Au final, l'ensemble des données de ce manuscrit témoignent de la capacité originale de l'inflammasome à reconnaître des signaux de stress cellulaire induits par des éléments d'origine et de propriétés différentes. Cela se traduit par la libération d'IL-1 β dans les macrophages et le développement d'une réponse inflammatoire.

Mots clés: Macrophages, immunité innée, signaux de dangers, inflammasome, Nanotubes de Carbone, *Leishmania infantum*