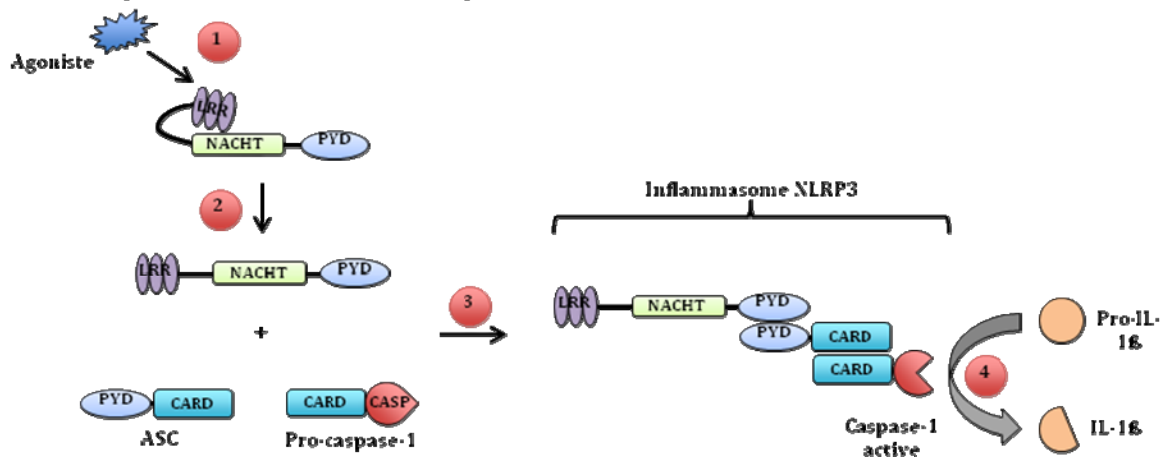


Prix de Thèse GREMI 2013 ex-aequo : Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les micro- et les nano-particules dans un modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris

Ludivine Baron

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Dr Isabelle Couillin à l'unité UMR-INEM 7355, Orléans

L'inflammation est un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à une agression subie. Celle-ci peut être provoquée par des pathogènes détectés via des motifs particuliers (PAMP pour Pathogen-Associated Molecular Patterns) comme les lipopolysaccharides (LPS) mais aussi par des stress ou des endommagements cellulaires en l'absence de ses pathogènes. On parle alors d'inflammation stérile, déclenchée par la libération ou la production de signaux de danger ou DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) comme l'ATP, l'acide urique et le cholestérol. La détection des PAMP et DAMP par les cellules (immunitaires ou non) nécessite leur reconnaissance par des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors) qui activent l'immunité innée. Les plus connus sont les TLR (Toll-Like Receptors), insérés dans la membrane plasmique ou dans celle des endosomes, mais il existe une autre famille tout aussi importante : les NLR (Nod-Like Receptors) qui sont cytoplasmiques. L'activation de certains de ces récepteurs NLR permet la formation d'un complexe multiprotéique intracellulaire appelé inflammasome. Le mieux étudié est l'inflammasome NLRP3 qui se caractérise par une très grande variabilité d'activateurs ce qui lui confère un rôle clé dans la détection de pathogènes invasifs mais aussi des agressions non microbiennes, et en particulier par des particules. L'inflammasome NLRP3 a aussi été récemment mis en cause dans plusieurs désordres métaboliques et dans des maladies auto-immunes.



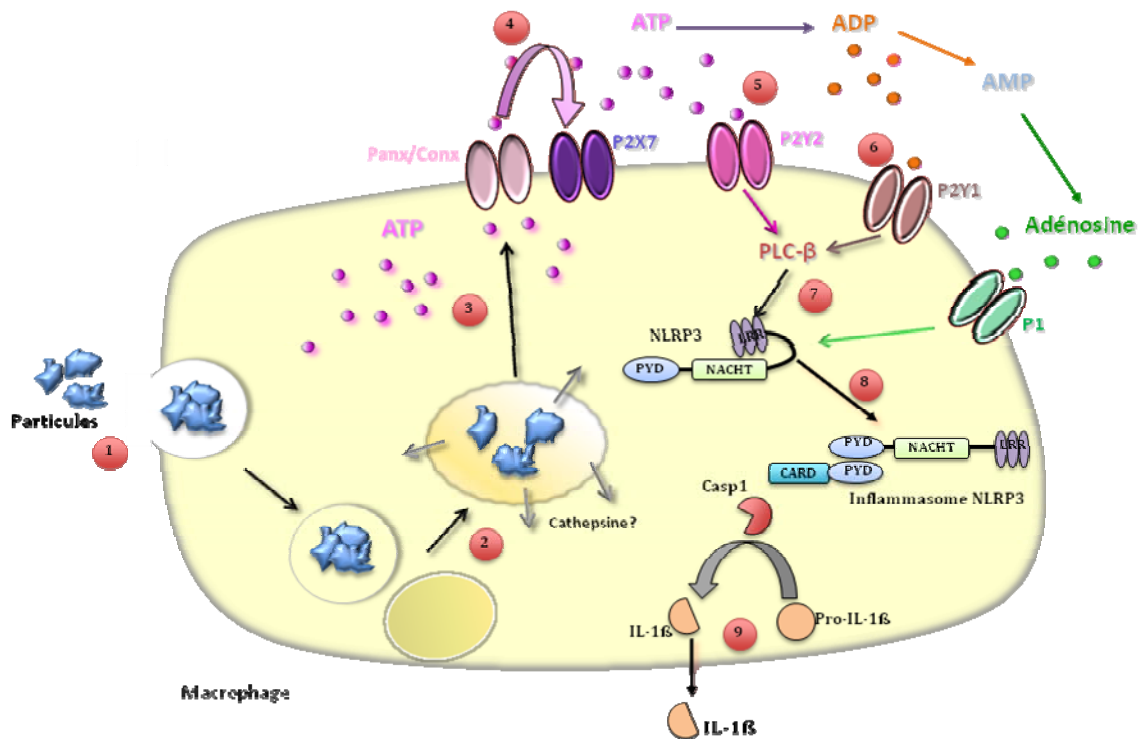
Activation de l'inflammasome NLRP3

L'activation du récepteur cytoplasmique NLRP3 par un de ses agonistes (1) lui permet de changer de conformation (2) ce qui le rend apte à recruter la protéine adaptatrice ASC via des interactions domaine-domaine. ASC recrute ensuite la protéine effectrice caspase 1. L'ensemble de ce complexe est appelé inflammasome NLRP3 (3). Il permet l'activation de la pro-caspase-1 qui va cliver la pro-interleukine-1β (pro-IL-1β) en une cytokine mature et inflammatoire, l'IL-1β.

Au cours de ma thèse je me suis intéressée aux mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par des particules nanométriques et micrométriques dans un modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris. L'agression répétée de l'épithélium pulmonaire par des particules serait impliquée dans l'exacerbation de maladies inflammatoires comme l'asthme et certaines particules sont responsables de maladies irréversibles comme la fibrose. Ces maladies, dans un contexte où l'Homme est exposé de plus en plus à la pollution, constituent un problème majeur de santé publique.

Nous avons tout d'abord pu démontrer *in vitro* que des cellules stimulées avec des microparticules de silice, d'alum (utilisé comme adjuvant dans les vaccins) ou d'acide urique libèrent activement de l'ATP via des hémicanaux. Cet ATP extracellulaire (ATPe), plus que les particules elles-mêmes, est responsable de

l'activation de l'inflammasome NLRP3 puisque la dégradation complète de l'ATPe abolie la production d'IL-1 β par les cellules (Riteau, Baron et al., 2012). Nous nous sommes ensuite intéressés aux nanoparticules de silice et de titane qui constituent de bons candidats d'étude du fait de leur incorporation dans des domaines aussi variés que le bâtiment, l'alimentaire et les cosmétiques. *In vivo*, l'inhalation de ces nanoparticules à forte dose est responsable chez la souris d'inflammations pulmonaires aiguës avec un recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires et de la production de molécules inflammatoires comme les cytokines (dont l'IL-1 β) et les chimiokines dans les poumons. Cette inflammation est, de modérément à fortement, diminuée chez des souris déficientes pour des composants de l'inflammasome NLRP3 ou pour le récepteur de l'IL-1 β ce qui démontre bien l'importance de l'inflammasome NLRP3 et de cette cytokine dans ce modèle inflammatoire. Tout comme pour les microparticules citées ci-dessus, les nanoparticules de silice et de titane induisent la libération active d'ATP par plusieurs lignées de cellules. Mais de façon surprenante, la dégradation de cet ATP exacerbe l'inflammation pulmonaire induite par les nanoparticules. Nous démontrons dans ce modèle que des métabolites de l'ATP, en particulier l'ADP et l'adénosine, sont hautement inflammatoires via l'activation de plusieurs récepteurs purinergiques (manuscrit en rédaction).



Modèle du mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les particules dans les macrophages

Les particules sont internalisées par phagocytose (1). Après fusion au lysosome, la membrane du phagolysosome est déstabilisée ce qui induit un libération de cathepsine dans le cytosol (2) qui précède celle d'ATP extracellulaire (ATPe) via des hémicanaux de pannexine/connexines (3). L'ATPe à de fortes concentrations peut activer le récepteur purinergique P2X7 afin d'amplifier la sortie d'ATP (4). L'ATP mais également son métabolite, l'ADP, peuvent se fixer sur le récepteur purinergique P2Y2 (5). L'ADP constitue aussi un ligand pour le récepteur P2Y1 (6). De même, l'ADP est ensuite dégradé par des ectoenzymes en AMP puis en adénosine qui est le ligand de récepteurs purinergiques P1. Les récepteurs P2Y1, P2Y2 et P1 permettent d'activer en aval le récepteur NLRP3 via un mécanisme qui reste à élucider (7). La mise en place de l'inflammasome NLRP3 (8) active la caspase-1 qui mature l'IL-1 β (9).

Les particules, par l'agression de l'épithélium pulmonaire, sont responsables de réactions inflammatoires. Nos études montrent que l'inflammation induite par ces particules peut être schématisée sous la forme d'un modèle à deux étapes :

- la libération d'un signal de danger, l'ATP, qui, directement ou indirectement par ses métabolites comme l'ADP et l'adénosine, active plusieurs récepteurs purinergiques et ensuite l'inflammasome NLRP3
- l'activation de l'inflammasome NLRP3, responsable de la maturation de l'IL-1 β .