

**L'activation de l'inflammasome, première étape essentielle de la réponse immunitaire**

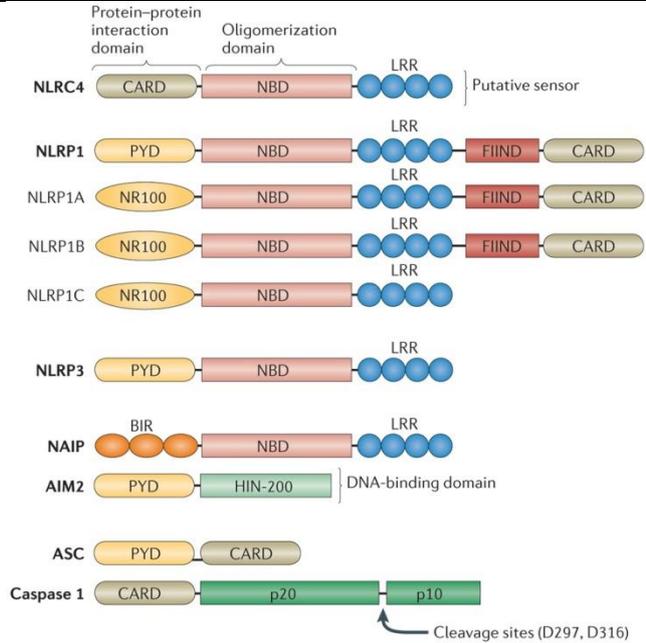
Etude d'un article scientifique : « In vivo imaging of inflammasome activation reveals a subcapsular macrophage burst response that mobilizes innate and adaptive immunity » Sagoo et al 2016 Nature Medicine 22 (1), 64-71.

Il s'agit d'une publication issue de la collaboration de plusieurs laboratoires français, de l'Institut Pasteur (Paris), de l'INSERM (Paris et Créteil), et de l'Hôpital H. Mondor-A. Chenevier (Créteil). Lorsque cela a été nécessaire pour compléter le propos, des documents ont été pris dans d'autres publications scientifiques.

L'**inflammasome** est un complexe macromoléculaire résultant de l'activation de **récepteurs de reconnaissance de motifs\*cytoplasmiques** appartenant à la famille des NOD ou à la famille de AIM2 (schématisés ci-contre). Une fois activés, ces récepteurs s'associent à la protéine adaptatrice ASC qui polymérise et permet la formation de l'inflammasome.

Une propriété essentielle de ce complexe est de recruter (grâce au domaine CARD) la protéine **Caspase-1** (plus précisément son précurseur, la pro-enzyme).

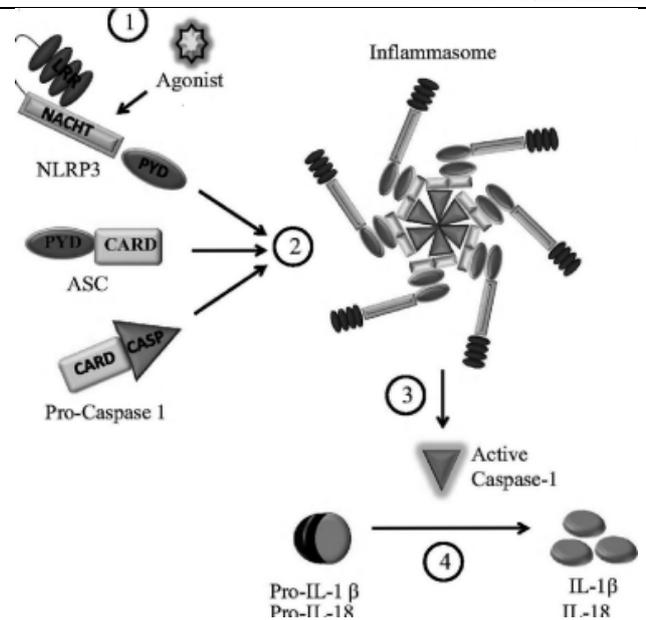
\*PRR, *pattern recognition receptors*



Nature Reviews | Neuroscience

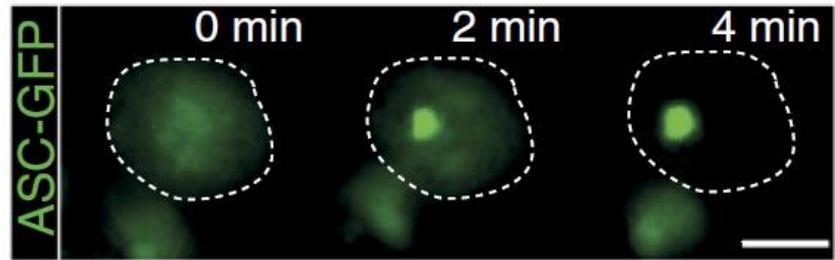
Avec sa polymérisation, le complexe ASC acquiert la capacité de lier le précurseur de la protéase Caspase-1 laquelle, après maturation, va permettre de cliver les précurseurs des interleukines 1β et 18, libérant les **deux cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18**.

Au bilan, on voit donc une chaîne (une « cascade ») d'interactions moléculaires initiée par les déterminants moléculaires de l'agent infectieux (les PAMP, notés « agonistes » ci-contre) et aboutissant à la libération des cytokines pro-inflammatoires.



Dans l'étude de Sagoo et al, les auteurs utilisent d'abord des cellules BMDM (*bone marrow-derived macrophages*) de souris, c'est-à-dire des macrophages issus de la moelle osseuse mis en culture. Ils y introduisent la construction ASC-GFP (on parle de gène rapporteur) formant la protéine de fusion dont on peut détecter et mesurer la fluorescence. Il est ainsi possible de suivre en microscopie (voire en vidéomicroscopie) les événements précoces qui accompagnent leur stimulation, ici par une souche vaccinale de la variole.

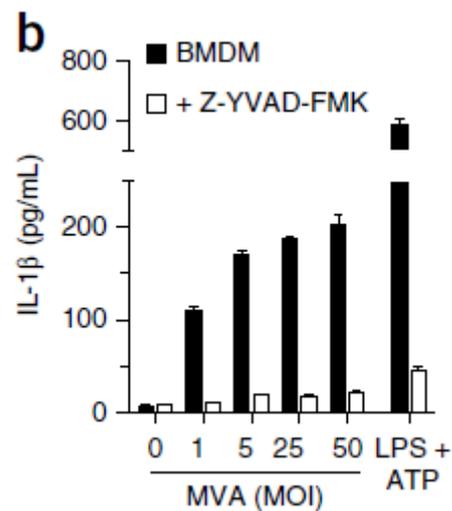
Notons qu'une approche équivalente qui se prête toutefois moins à des études cinétiques est l'immunodétection, c'est-à-dire l'exploitation de la capacité des anticorps à se fixer spécifiquement sur l'antigène qu'ils reconnaissent pour marquer les cellules et les tissus.



Le contour du macrophage est précisé en pointillés. En l'absence de stimulation, la protéine ASC présente une localisation diffuse dans le cytoplasme (0 min). Sous cette forme, l'inflammasome est inactif. Suite à une stimulation (infection par la souche vaccinale), l'inflammasome se forme (2 min et 4 min).

Les auteurs montrent ensuite que la stimulation par le virus (noté ici MVA) induit la production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages.

Rmq. On peut par des arguments génétiques apporter le même résultat puisqu'une lignée de souris *Casp1*<sup>-/-</sup> chez laquelle la protéine Caspase-1 est absente donne le même résultat que l'inhibiteur.

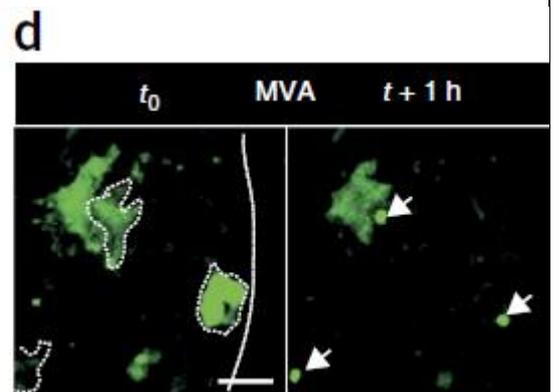
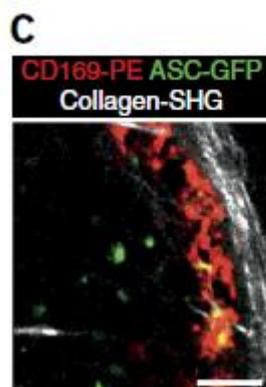


La quantité d'IL-1 $\beta$  produite dépend de la quantité de virus (on parle de multiplicité d'infection, MOI *multiplicity of infection*).

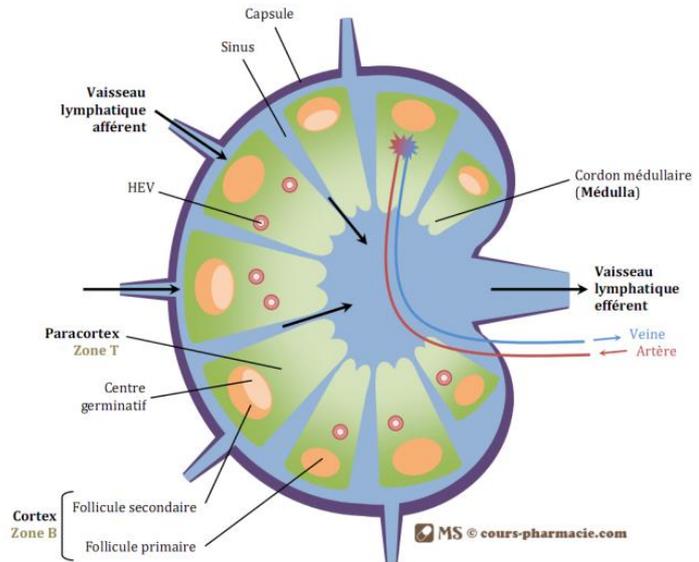
En présence d'un inhibiteur de la Caspase-1 (Z-YVAD-FMK), la quantité d'IL-1 $\beta$  est négligeable, ce qui démontre l'implication de cette enzyme dans le mécanisme étudié.

Dans une étape suivante les auteurs génèrent des souris exprimant la protéine ASC-GFP dans les macrophages. Ils montrent la colocalisation (en c) de la protéine ASC-GFP (détectée par sa fluorescence verte) et des macrophages (détectés par un anticorps anti-CD169 lié à la phycoérythrine PE qui donne une fluorescence rouge) dans les ganglions lymphatiques. Le collagène permet de visualiser la capsule qui marque la bordure du ganglion.

Un suivi cinétique *in vivo* (par microscopie bi-photon, en d) montre la formation des complexes inflammasome 1h après l'infection par la souche vaccinale MVA (voir les flèches blanches).



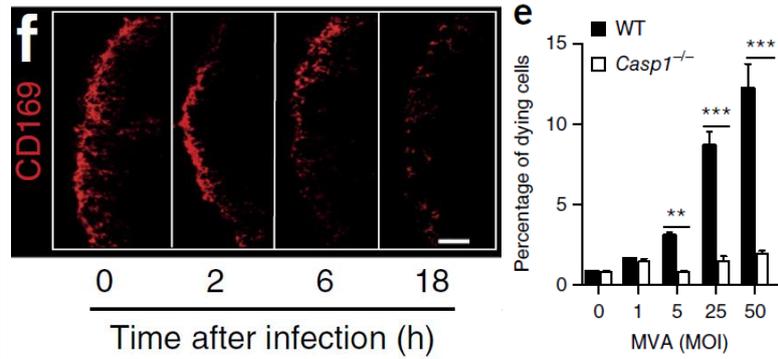
Les auteurs montrent alors que c'est dans les **macrophages des sinus sous-capsulaires (SCS)** que se forment les complexes inflammasome. Ces macrophages forment une barrière face aux agents infectieux qui parviennent au ganglion par les vaisseaux afférents.



Les auteurs établissent également qu'il y a mort des macrophages SCS en réponse à la vaccination (en f).

La mort cellulaire des macrophages peut surprendre puisqu'il s'agit de la destruction de cellules immunitaires qui certes, vont en mourant piéger et détruire l'agent infectieux, mais en privant peut-être l'organisme d'interactions que ces cellules pourraient avoir avec d'autres acteurs de l'immunité !

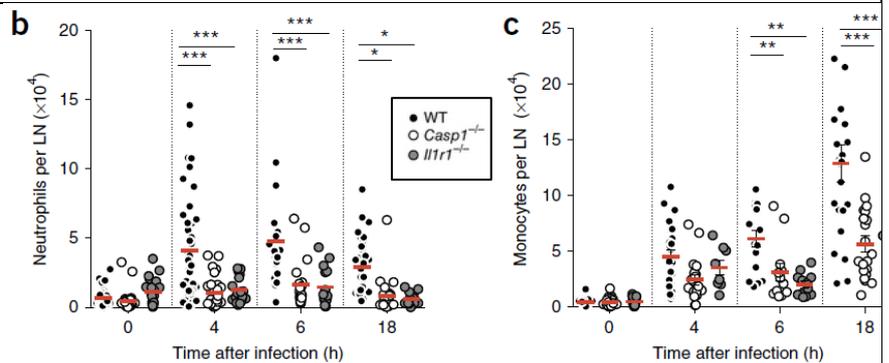
Cette observation troublante a motivé un examen complémentaire par les auteurs au terme duquel il est montré qu'au cours de l'infection, la formation de l'inflammasome précède la mort cellulaire. Les complexes inflammasome persistent alors avec une localisation extracellulaire.



Cette mort cellulaire n'a pas lieu en contexte *Casp1*<sup>-/-</sup> (en e), montrant qu'elle est bien liée à l'activation de l'inflammasome. Cette mort cellulaire s'observe pour les seuls macrophages SCS, dans le ganglion lymphatique drainant le lieu de l'infection.

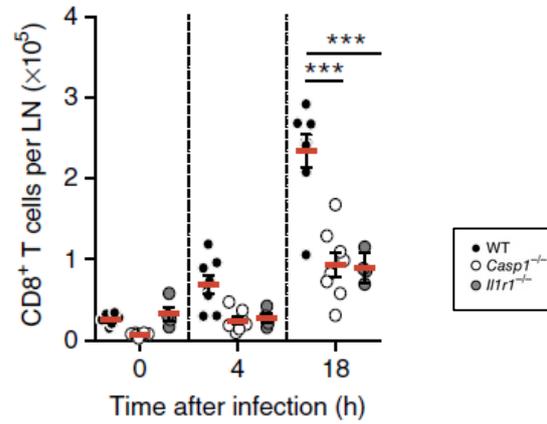
Constatant un afflux et un regroupement important de cellules myéloïdes autour des inflammasomes extracellulaires, les auteurs ont analysé deux paramètres: 1) la nature **des cellules myéloïdes recrutées** (des cellules de l'immunité innée comme les neutrophiles [en b] et les monocytes [en c], mais également des cellules NK non présentées ici) ; 2) en relation avec la libération de **nombreuses chimiokines** (par exemple, CCL11, CCL22, CXCL2, CXCL10 et CCL19).

Les différentes populations cellulaires sont identifiées à l'aide d'anticorps spécifiques des marqueurs moléculaires qu'elles portent.



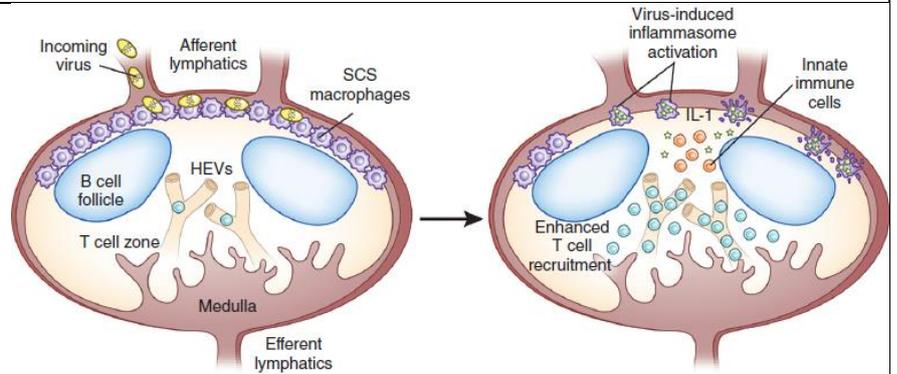
Deux lignées de souris sont utilisées en témoin : les souris *Casp1*<sup>-/-</sup> chez lesquelles la protéine Caspase-1 est absente et les souris *Il1r1*<sup>-/-</sup> chez lesquelles le récepteur à l'IL-1β est absent. Le recrutement moins efficace des cellules immunes chez ces souris montre que c'est bien l'activation de l'inflammasome qui est l'initiateur de cette réponse inflammatoire.

Outre une stimulation de l'immunité innée à travers le recrutement de nombreuses cellules, les auteurs ont aussi montré le **recrutement de cellules de l'immunité adaptative** dans le ganglion lymphatique drainant le lieu de l'infection, en particulier des cellules de LT CD8+.



On trouve significativement davantage de ces cellules dans le ganglion lymphatique proche du lieu d'infection chez les souris normales (WT, wild-type) et beaucoup moins chez les souris déficientes pour la Caspase-1 ou pour celles déficientes pour le récepteur de l'IL-1 $\beta$ . Les auteurs montrent ainsi que l'activation de l'inflammasome contribue à accroître la réponse des lymphocytes T lors de l'infection en les recrutant sur le lieu où l'agent infectieux est initialement détecté.

Dans sa présentation de l'article de Sagoo et al, HD Hickman propose le schéma ci-contre pour résumer le travail effectué.



Les macrophages SCS interceptent les particules virales entrant dans le ganglion lymphatique (*incoming virus*). Avec l'activation de l'inflammasome, les macrophages s'engagent dans la mort cellulaire (par pyroptose), ce qui libère les inflammasomes extracellulaires (étoiles vertes) et mobilise des effecteurs de l'immunité innée (en orange). La production de chimiokines et de cytokines inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$  contribuent également à accroître la réponse immunitaire adaptative : un nombre accru de LT-CD8+ (en bleu) est recruté dans le ganglion lymphatique via les veinules endothéliales hautes (HEV).