



Récepteurs purinergiques : nouvelles cibles de médicaments anti-inflammatoires dans les pathologies liées à l'éthanol ?

Brendan Le Daré

► To cite this version:

Brendan Le Daré. Récepteurs purinergiques : nouvelles cibles de médicaments anti-inflammatoires dans les pathologies liées à l'éthanol ?. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-02570656

HAL Id: dumas-02570656

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02570656>

Submitted on 7 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du

DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée sous forme de

**MÉMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME D'ETUDES SPÉCIALISÉES
EN PHARMACIE HOSPITALIERE**

présentée par

Brendan LE DARÉ

**Récepteurs
purinergiques :
nouvelles cibles de
médicaments anti-
inflammatoires dans
les pathologies liées
à l'éthanol ?**

**Thèse soutenue à Rennes
le 16 Novembre 2018**

devant le jury composé de :

Docteur Pierre-Nicolas BOIVIN

Pharmacien hospitalier, CHU de Rennes

**Docteur Stanislas GRASSIN DE
LYLE**

MCU-PH, Université Versailles Saint Quentin en
Yvelines

Professeur Vincent LAGENTE

PU, Université de Rennes 1

Docteur Thomas GICQUEL

MCU-PH, université de Rennes 1

Directeur de thèse

Professeur Isabelle MOREL

PU-PH, Université de Rennes 1

Président de thèse

**LISTE DES ENSEIGNANTS
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
ANNEE 2017-2018**

PROFESSEURS

BOUSTIE Joël
BURGOT Gwenola
DONNIO Pierre Yves
FAILI Ahmad
FARDEL Olivier
FELDEN Brice
GAMBAROTA Giulio
GOUGEON Anne
LAGENTE Vincent
LE CORRE Pascal
LORANT (BOICHOT) Elisabeth
MOREL Isabelle
SERGENT Odile
SPARFEL-BERLIVET Lydie
TOMASI Sophie
URIAC Philippe
VAN DE WEGHE Pierre
VERNHET Laurent

PROFESSEURS ASSOCIES

BUREAU Loïc
DAVOUST Noëlle

PROFESSEURS EMERITES

CILLARD Josiane
GUILLOUZO André

MAITRES DE CONFERENCES

ABASQ-PAOFAI Marie-Laurence

ANINAT Caroline

AUGAGNEUR Yoann

BEGRICHE Karima

BOUSARGHIN Latifa

BRANDHONNEUR Nolwenn

BRUYERE Arnaud

BUNETEL Laurence

CHOLLET-KRUGLER Marylène

COLLIN Xavier

CORBEL Jean-Charles

DAVID Michèle

DELALANDE Olivier

DELMAIL David

DION Sarah

DOLLO Gilles

GICQUEL Thomas

GILOT David

GOUAULT Nicolas

HITTI Eric

JEAN Mickaël

JOANNES Audrey

LECUREUR Valérie

LE FERREC Eric

LE GALL-DAVID Sandrine

LE PABIC Hélène

LEGOUIN-GARGADENNEC Béatrice

LOHEZIC-LE DEVEHAT Françoise

MARTIN-CHOULY Corinne

MINET Jacques

NOURY Fanny

PINEL-MARIE Marie-Laure

PODECHARD Normand

POTIN Sophie

RENAULT Jacques

ROUILLON Astrid

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

BACLE Astrid

BOUVRY Christelle

ATER

PALAZZO Claudio

VICTONI Tatiana

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Docteur Thomas GICQUEL

Qui me fait le plaisir de diriger cette thèse. Merci pour tes conseils, ton encadrement, ta disponibilité imperturbable, ton dynamisme, ta curiosité stimulante et ton humour caustique.

A Madame le Professeur Isabelle MOREL

Qui me fait l'honneur de présider cette thèse.

Merci pour votre gentillesse, vos conseils, et votre disponibilité.

A Monsieur le Professeur Vincent LAGENTE

Qui me fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Merci pour ta disponibilité, tes conseils et tes idées.

Merci également pour l'encadrement de mon master 2.

A Monsieur de le Docteur Pierre-Nicolas BOIVIN,

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci pour tes enseignements, tes conseils, et ta passion pour le métier de pharmacien.

A Monsieur le Docteur Stanislas GRASSIN DELYLE,

Qui me fait l'honneur de venir de l'UFR de Versailles pour juger ce travail

Merci pour votre disponibilité.

A Monsieur le Docteur Bruno CLEMENT,

De m'avoir accueilli dans son institut de recherche

A Monsieur le Docteur Bernard FROMENTY,

De m'avoir accueilli dans son unité de recherche

A l'ensemble des membres de l'UMR1241, et plus particulièrement Simon, Dounia, Julien, Aude, et Catherine, pour les nombreux très (très) bons moments passés au laboratoire, votre gentillesse, votre disponibilité, et votre pédagogie dans l'apprentissage des techniques laborantines.

A l'ensemble des pharmaciens qui ont contribué à ma formation au cours de mon internat, en particulier mes maîtres de stage Fabienne AUBIN, Marie-Antoinette LESTER, Elodie PEGUET, Thomas GICQUEL, Béatrice MARIE DIT DINARD, Pierre-Yves BERTHIER, Anne-Yvonne ABAULT, et Laurence GUENERET. Merci pour votre transmission des connaissances.

A l'ensemble des personnes avec qui j'ai pu travailler au cours de mon internat,

A mes parents, la pap et la mam, merci d'être aussi parfaits, merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans tous mes choix. Merci pour tous les conseils et « il n'y a rien de tel qu'un fainéant qui se met au boulot ! ».

A guilvic et lorine, mon frère et ma sœur exceptionnels. Merci pour le fait d'être vous, ne changez surtout pas !

A toute ma famille, merci d'être aussi géniale, les réunions de famille sont à chaque fois un plaisir infini.

A Gaëlle, Dame LE GUILLOUX, merci d'avoir choisi Saint Brieuc pour ton deuxième semestre, de sourire en permanence, et de ne pas connaître tes expressions françaises. Merci aussi pour me partager tes connaissances médicales, et de m'en apprendre tous les jours en clinique. Ne change pas !

A mes amis de la fac de pharma de rennes, merci à Fifou, mon incroyable binôme de 2^{ème} année. Tu es tellement génial que « tu passes en 3^{ème} année ! » d'une aisance peu commune. Merci à Mimine, que j'ai tout d'abord dérangé sur les bancs de P1 par quelques bavardages... Et oui je suis passé en 2^{ème} année ! Merci pour ta bonne humeur, ton franc parlé et ta joie de vivre : que du bonheur ! Merci à Mawen, l'intrépide australienne et Fanny et « sa pâte cassée ». Merci au Faisant et Coco, pour leurs calembours inépuisables, que dire d'autre à part « CCCMG ! ». Ces années à la fac étaient un vrai régal !

A tous mes co-internes, merci pour la bonne humeur au travail, rien de tel pour un dynamisme d'équipe !

Aux pictaviens : Vivien, JB, Julie, L3D cacahouète, Astrid, Steve, Guillaume...

Aux rennais : Camille BBZ, Romain, Amandine, Jérémy et Jérémy, Charles Patrick, Adrien, Pauline Rault et pauline Legendre, Anne-Claire... et les autres à venir.

A la collocation « Odorico »,

Merci au Professeur De Golmard, Dame Jeanne, Bichon, Dame Morin, et Dr Schrub. La merveilleuse ambiance de vivre avec vous a été génialissime pendant 1 an presque et demi.

SERMENT DE GALIEN

En présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	15
Chapitre 1 : Ethanol.....	17
I. De la genèse d'un breuvage	18
I.1. Définition	18
I.2. Production	18
I.3. Historique.....	19
II. Métabolisme	24
III. Toxicité de l'éthanol	26
III.1. Toxicité aiguë.....	26
III.2. Toxicité chronique.....	28
III.3. Effets cancérogènes.....	34
III.4. Effets sur la reproduction	37
IV. Utilisation de l'éthanol en thérapeutique	38
V. Effets bénéfiques de l'éthanol.....	40
Chapitre 2 : Senseurs de l'immunité innée, l'inflammasome NLRP3.....	43
et les récepteurs purinergiques	43
I. Immunité innée et inflammation	44
I.1. Acteurs de l'immunité innée	44
I.2. Cytokines pro-inflammatoires	45
II. Les inflammasomes	47
II.1. Définition et classification	47
II.2. L'inflammasome NLRP3	49
III. Récepteurs purinergiques	56
III.1. Classification.....	56
III.2. Les récepteurs P2	57
Chapitre 3 : Partie expérimentale.....	64
I. Introduction	65
II. Matériel et méthodes	65
II.1. Préparation des cristaux d'acide urique	65
II.2. Isolement de cellules mononucléées du sang périphérique.....	66
II.3. Sélection d'une population monocyttaire : Enrichissement en monocytes humains	67
II.4. Culture cellulaire	67

II.5.	Analyse cellulaire	69
II.6.	Dosage immuno-enzymatique dans les surnageants de culture cellulaire	71
II.7.	Détection des récepteurs P2X4 et P2X7 sur les MdMs en cytométrie de flux ..	72
II.8.	Analyse statistique.....	73
III.	Résultats	74
III.1.	Effets de l'exposition de 7 heures d'éthanol sur les macrophages humains	74
III.2.	Effets de l'exposition de 48 heures d'éthanol sur les macrophages humains	76
III.3.	Effets de l'exposition de 7 heures d'éthanol sur les gènes des interleukines pro-inflammatoires et des composants de l'inflammasome NLRP3	78
III.4.	Effets de l'exposition de sept heures d'éthanol sur l'expression des gènes des récepteurs purinergiques	79
III.5.	Effets de l'exposition aigue d'éthanol sur l'expression protéique des récepteurs purinergiques	80
IV.	Discussion et perspectives	81
CONCLUSION GENERALE		86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		87

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formule développée de l'éthanol	18
Figure 2 : Tablette évoquant l'attribution de la bière découverte en Mésopotamie (22).....	20
Figure 3 : Représentations de Dionysos et Bacchus.	21
Figure 4 : Brasserie pendant la révolution industrielle (22).....	23
Figure 5 : De gauche à droite : Affiche de 1900 ; Affiche de 1910; Affiche de 1960	23
Figure 6 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol (22).	24
Figure 7 : Régulation des récepteurs GABA-A par différents xénobiotiques (36).....	27
Figure 8 : Evolution des hépatopathies alcooliques (41)	29
Figure 9 : Imagerie cérébrale d'un patient sain témoin de 61 ans (control man) comparé à un patient alcoolique chronique de 60 ans (alcoholic man) par MRI (imagerie par résonance magnétique) et DTI (imagerie du tenseur de diffusion) (50)	31
Figure 10 : Circuit de la récompense : schématisation de la voie dopaminergique	32
Figure 11 : Mécanismes potentiels reliant la consommation d'alcool avec les pathologies cardiovasculaires (58)	33
Figure 12 : Rôle du métabolisme de l'éthanol dans la carcinogenèse (63)	35
Figure 13 : Affiche du « Cancer Research UK » (http://www.alcoholpolicy.net).....	36
Figure 14 : Caractéristiques faciales du syndrome d'alcoolisation fœtale présentées sur des enfants de différentes nationalités (70)	37
Figure 15 : Présentation de la spécialité CURETHYL 26%®	39
Figure 16 : Administration de DISCOGEL au niveau d'une hernie lombaire	40
Figure 17 : Courbe en "J" entre le risque relatif de mortalité total et la consommation d'alcool (96)	42
Figure 18 : Origine et différenciation des macrophages selon les tissus de destination (97) ..	44
Figure 19 : Principe général de fonctionnement des cytokines.....	45
Figure 20 : Classification des inflammasomes (114).....	48
Figure 21 : Structure de l'inflammasome NLRP3 (117)	49
Figure 22 : Structure d'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (120)	49
Figure 23 : Pré-activation de l'inflammasome par des agonistes des TLRs (125)	51
Figure 24 : Mécanismes moléculaires régulant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (132)53	
Figure 25 : Rash persistant de l'enfant dans le cadre de NOMID/CINCA (148)	54
Figure 26 : Classification des récepteurs purinergiques (161).....	56

Figure 27 : Représentation schématique du récepteur P2Y ₁₂ (165).....	57
Figure 28 : Représentation schématique d'une sous unité d'un récepteur P2X (170).....	58
Figure 29 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de P2Y ₁₂ (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor), comme antiagrégant plaquettaire.	61
Figure 30 : Séparation des cellules mononucléées du sang par gradient de densité, à l'aide des tubes UNI-SEP [®]	66
Figure 31 : Protocole d'obtention des macrophages dérivés de monocytes humains à partir d'une poche de sang	68
Figure 32 : Protocole de culture et traitement cellulaire des MdMs	68
Figure 33 : Principe du test MTT	69
Figure 34 : Principe de la RT-qPCR	70
Figure 35 : Principe de la technique ELISA	71
Figure 36 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux	73
Figure 37 : Traitement des MdMs par les cristaux d'acide urique (MSU) à 0 heure (à gauche) et à six heures (à droite). Observation de la phagocytose des cristaux de MSU après six heures.	74
Figure 38 : Effets de sept heures d'éthanol sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de macrophages humains après stimulation par LPS + BzATP.....	75
Figure 39 : Effets de 7 heures d'éthanol sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de macrophages humains après stimulation par LPS + MSU.....	76
Figure 40 : Effets de sept heures et 48 heures d'éthanol sur la sécrétion des cytokines pro- inflammatoires après traitement par LPS + MSU 300µg/mL	77
Figure 41 : Effet d'une exposition de sept heures d'éthanol sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires (<i>IL-1β</i> , <i>IL-1α</i> et <i>IL-6</i>) et des composants de l'inflammasome (<i>NLRP3</i> , <i>CASP-1</i> et <i>ASC</i>).....	78
Figure 42 : Effet de l'éthanol sur l'expression des gènes de P2X ₁ R, P2X ₄ R et P2X ₇ R.....	79
Figure 43 : L'éthanol induit l'expression des récepteurs purinergiques P2X ₇ chez les MdMs	80
Figure 44 : Schéma récapitulatif de l'effet de l'éthanol sur les récepteurs purinergiques	84

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH	Alcool Déshydrogénase
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain
ATP	Adénosine triphosphate
BzATP	3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl ATP
CAPS	Syndrome périodique associé à la cryopyrine
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CINCA	Syndrome chronique infantile neurologique, cutané et articulaire
CMF	Cytométrie en flux
CRP	Protéine C réactive
DAMPs	Danger associated molecular patterns = motifs moléculaires associés aux dangers
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FAEE	Esters éthyliques d'acide gras
FCAS/FCU	Syndrome inflammatoire automatique froid familial
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GABA	Acide gamma amino-butyrique
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GM-CFU	Granulocyte/Macrophage Colony-Forming Units = progéniteur granulocytaire et macrophagique
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor = Facteur stimulant les granulocytes-macrophages
IL	Interleukine
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat = répétition riche en lysine
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MdMs	Monocyte-derived macrophages = Macrophages dérivés de monocytes
MSU	Monosodium urate

MTT	3-[4-5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NLRP3	Nucleotide oligomerization domain receptors-like receptor pyrin domain containing
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NOMID	Maladie systémique inflammatoire à début néo-natal
P2XR	Purinergic 2X receptor
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns = motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	Phosphate Buffer Salin = Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase chain reaction = Réaction de chaîne par polymérase
PRRs	Pattern recognition receptors = récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PYD	Pyrin Domain
ROS	Reactive oxygen species = Espèces réactives de l'oxygène
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TLRs	Toll-like receptors
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TRX	Thioredoxin
TXNIP	Thioredoxin (TRX)-interacting protein

INTRODUCTION

Selon une enquête Américaine de 2016, conduit par l'administration des services de toxicomanie et de santé mentale, 136.7 millions d'Américains âgés de 12 ans ou plus rapportent un usage courant d'alcool. Parmi eux, 65.3 millions rapportent la pratique du « binge drinking » ou « biture express », et 16.3 millions rapportent une consommation intense dans le mois passé (1). Les classifications pharmacologiques classent l'alcool parmi les drogues les plus dangereuses en termes de dommages physiques, sociaux et d'addiction (2). De plus, la consommation d'alcool est considérée comme étant la 3^{ème} cause de mort aux Etats-unis, principalement de cancers, cirrhoses hépatiques et blessures (3).

La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), au cours du métabolisme de l'éthanol, est impliquée dans l'augmentation de fluidité des membranes cellulaires, l'apoptose et les maladies alcooliques du foie comme la fibrose ou la cirrhose (4–6). De plus, la dérégulation des réponses immunes normales par l'alcool semble contribuer à l'altération de la perméabilité intestinale, l'inflammation gastro-intestinale, la neuroinflammation et au développement de certains cancers (7).

Cependant, l'éthanol montre une double face sur le système immunitaire. La consommation aigue d'alcool cause une immunodépression, tandis que l'exposition chronique mène à l'inflammation (7–9). Récemment, l'inflammasome « Nucleotide oligomerization domain receptors-Like Receptor, Pyrin domain containing 3 » (NLRP3) a été décrit comme étant impliqué dans ce double effet. Ainsi, une exposition aigue d'éthanol sur des leucocytes inhibe la voie de l'inflammasome NLRP3 alors qu'une exposition chronique l'active (10–12).

Les inflammasomes sont une famille de senseurs de l'immunité innée, appelés Pattern Recognition Receptors (PRRs). Le plus connu de ces complexes multiprotéiques intracellulaires est l'inflammasome NLRP3, majoritairement exprimé par les cellules myéloïdes, comme les monocytes et les macrophages. Cet inflammasome permet la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 en réponse à des motifs cellulaires caractéristiques de pathogènes, comme le lipopolysaccharide (LPS), ou des motifs moléculaires associés aux dangers, comme l'ATP ou les cristaux, notamment d'acide urique (MSU). Ces cytokines pro-inflammatoires permettent l'activation de la phase aigüe de l'inflammation dans l'organisme (13).

L'adénosine triphosphate (ATP) active notamment l'inflammasome NLRP3 par interaction avec des récepteurs membranaires : les récepteurs purinergiques.

Les récepteurs purinergiques sont des récepteurs ubiquitaires impliqués dans la douleur et la réponse inflammatoire, et sont activés par les nucléotides extracellulaires (14). Ces récepteurs se sont révélés être impliqués dans des processus physiopathologiques. Considérant que certains xénobiotiques sont capables de réguler l'activité des récepteurs purinergiques, il est concevable que ces derniers puissent promouvoir une pathologie inflammatoire *via* la voie de signalisation des récepteurs purinergiques et de l'inflammasome NLRP3.

L'équipe du Professeur Vincent Lagente, au sein de l'équipe EXPRES de l'institut NUMECAN, travaille notamment sur les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 au travers des récepteurs purinergiques sur des macrophages humains. Les expériences détaillées dans ce manuscrit s'ancrent dans la continuité de ces travaux, avec pour objectif d'étudier les effets de l'éthanol sur les récepteurs purinergiques. Elles ont été réalisées au cours d'une année recherche dans cette équipe, entre ma 2^{ème} et ma 3^{ème} année d'internat en pharmacie hospitalière pratique et recherche.

Bien qu'il soit déjà démontré que l'éthanol régule la voie de l'inflammasome NLRP3, l'action de l'éthanol sur les récepteurs purinergiques est encore mal connue. Le travail présenté dans ce manuscrit s'articule donc en 3 objectifs. Le premier objectif est de vérifier la validité du modèle de macrophage utilisé pour l'étude de l'éthanol sur la voie de l'inflammasome NLRP3 en regard des publications existantes sur le sujet. Le second est d'étudier les effets de l'éthanol sur la voie de signalisation de l'inflammasome NLRP3. Enfin, le troisième objectif est d'étudier les effets de l'éthanol sur les récepteurs purinergiques.

La partie expérimentale de ce travail a pu être valorisée et acceptée pour publication dans le journal scientifique *Fundamental and clinical pharmacology*.

Chapitre 1 : Ethanol

I. De la genèse d'un breuvage

I.1. Définition

L'éthanol, ou alcool éthylique, est un alcool primaire, de formule développée $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ (15). C'est un liquide mobile, volatil, incolore, inflammable et miscible à l'eau. L'éthanol est également miscible à la plupart des solvants usuels, étant lui-même un bon solvant des graisses et dissolvant des nombreuses matières plastiques.

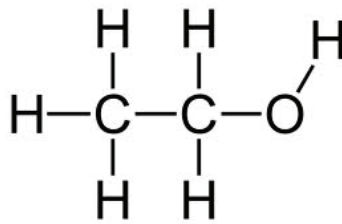


Figure 1 : Formule développée de l'éthanol

Cet alcool étant une molécule amphiphile de faible poids moléculaire, il possède une forte capacité de diffusion aux travers de tous les tissus et fluides corporels. Cette caractéristique lui permet d'atteindre de nombreux sites d'action.

I.2. Production

a. Fermentation

La fermentation alcoolique est une des principales sources d'alcool. Elle est principalement assurée par les levures de la famille des *Saccharomyces*, qui sont d'ailleurs utilisés pour la fabrication du vin, de la bière, du cidre et de diverses boissons fermentées. Ce phénomène naturel résulte de l'oxydation incomplète du glucose selon la formule suivante : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (glucose) $\Rightarrow 2 \text{CO}_2 + 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2 \text{ATP}$ (16). Cependant, de nombreux sucres sont fermentescibles en éthanol par les levures.

L'alcool produit paralysant les levures, la fermentation s'arrête définitivement à partir d'un certain degré d'alcool, variable selon les espèces de levures (17). Une solution fermentée ne pourra ainsi pas dépasser les 13° d'alcool (18). Pour recourir à des taux d'éthanol plus élevés, d'autres procédés sont utilisés.

b. Procédés industriels

Les procédés industriels regroupent principalement la « catalyse indirecte », développé dans les années 30 et aujourd'hui obsolète, ainsi que la « catalyse directe », développé dans les années 1970, et toujours grandement utilisée. La catalyse indirecte consiste en l'estérification de l'éthylène par l'acide sulfurique, produisant du sulfate d'éthyle, lui-même hydrolysé pour donner de l'éthanol et de l'acide sulfurique. La catalyse directe consiste quant à elle à l'hydratation de l'éthylène, en présence d'acide phosphorique comme catalyseur (19,20).

I.3. Historique

Il est difficile de dater l'apparition de l'alcool dans les découvertes de l'Homme. On peut cependant supposer que le hasard n'y est pas pour rien, comme souvent dans l'évolution des modes de vie et des pratiques. L'éthanol étant produit par fermentation des sucres contenus dans les fruits, les ancêtres de l'Homme ont pu en consommer involontairement, en se nourrissant de fruits parfois pourris ayant pu fermenter.

Au néolithique, l'apparition simultanée de l'agriculture et de la poterie ont grandement facilité la découverte de ce phénomène naturel. Ainsi, c'est au VII^{ème} millénaire avant Jésus Christ que semblent remonter les plus anciennes traces de boisson fermentées à base de riz, miel et fruits, dans la province de Henan, en Chine (21).



Figure 2 : Tablette évoquant l'attribution de la bière découverte en Mésopotamie (22).

L'apparition de l'écriture en Mésopotamie, au cours du IV^{ème} millénaire avant Jésus Christ, permet de retrouver les premières références à une boisson alcoolique : La bière (Figure 2) (23). Mille ans plus tard, les Grecs et les Romains cultivent l'art viticole et décrivent notamment l'hydromel et la cervoise.

L'Egypte ancienne voit également naître des papyrus décrivant les étapes de fabrication, et de commercialisation de la bière et du vin. Dans l'antiquité, des écrits rapportant le culte de Dionysos en Grèce, et de Bacchus à Rome, tous deux dieux de la vigne et du vin, traduisent une méconnaissance de l'effet enivrant de l'alcool (Figure 3). Ce dernier est alors utilisé à des fins sacrées et prend un aspect mystique, supposé pouvoir donner accès au monde des dieux (24,25).



Figure 3 : Représentations de Dionysos et Bacchus.
(Respectivement <https://www.lamythologie.fr> et <http://www.allposters.fr>)

Le Christianisme marque réellement un tournant dans l'histoire de l'alcool. Dans la genèse de la bible, la première vigne aurait été plantée par Noé : « Noé planta la vigne et s'enivra ». Le nouveau Testament permet le passage du vin païen au vin chrétien, relatant le premier miracle de Jésus Christ aux noces de Cana, transformant l'eau en vin, et son dernier repas où le vin devient le sang du Christ. Dès lors, l'expansion de la chrétienté propage le culte de la vigne.

Les croisés, au moyen âge, ramènent l'alambic permettant l'obtention de boisson plus fortement alcoolisées. L'arrivée de ces dernières sur le marché va de pair avec les premières grandes réglementations de la consommation et du négoce du vin. L'ivresse devient péché (23). Ainsi, charges, impôts, et privilèges accompagnent le marché du vin. Jusqu'à la fin du 15ème siècle, seuls les apothicaires, ancêtres des pharmaciens, possèdent le droit de vendre de l'alcool distillé devenu un remède précieux (24).



Figure 4 : Alambic
(<https://alambic-distillery.com/fr>)

Le mot AL KHOL, inventé par les arabes, traduction de « ce qui est très subtil », apparaît dans la langue romane en 1278. Celui-ci sera introduit au XVI^{ème} siècle dans notre langue dans son orthographe actuelle (23).

La Renaissance marque l'essor du vin-plaisir, signant de ce fait la qualité et la naissance des grands crus (XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècles) (23). Au XVIII^{ème} siècle, le développement de nouvelles techniques en matière d'agriculture et de distillation permettent aux spiritueux de devenir des produits de consommation courante.

Avec le début de la révolution industrielle, les populations les plus précaires recourent de manière croissante à l'alcool pour supporter leurs conditions de travail ou de vie pénibles. Ce n'est que vers la fin du 18^{ème} siècle que la dépendance et l'abus d'alcool commencent à être perçus comme des problèmes de santé physique et mentale (24).



Figure 4 : Brasserie pendant la révolution industrielle (22).

En 1849, le médecin suédois Magnus Huss introduit le terme d'alcoolisme et décrit les multiples alcoolopathies viscérales ou mentales dans son ouvrage « alcoholismus chronicus ». Les décennies suivantes voient se constituer les premières sociétés de tempérance, tels que La Croix bleue en 1877 ou La Croix d'or en 1910, supportées par des publications scientifiques et les écrits de romanciers tels que Zola et Dickens traitant de l'alcoolisme. Les messages publicitaires sont alors très hétéroclites quant à la consommation d'alcool, tantôt encourageant et tantôt alarmant. C'est à cette période que les premiers centres de cure et de post-cure sont créés (26).



Figure 5 : De gauche à droite : Affiche de 1900 ; Affiche de 1910; Affiche de 1960
Respectivement sur <http://www.europeana.eu>; <http://pubchoquante.e-monsite.com>; et
<https://www.parisposters.com>

Sur le plan médical, la prise en charge des malades alcooliques commence dans des services hospitaliers spécialisés, comme l'hôpital psychiatrique de Sainte-Anne à Paris en 1922. Les premiers traitements médicamenteux apparaissent avec l'apomorphine, utilisée dans « les cures de dégoûts » dans les années 1930, du fait des nausées et vomissements qu'elle provoque. Le disulfirame, découvert en 1948, est utilisé pour des cures ambulatoires (26).

Actuellement, la dépendance à l'alcool est considérée comme un trouble relevant du domaine plus large des addictions et l'accumulation des recherches scientifiques permet d'éclairer les mécanismes physiopathologiques de l'éthylisme, qu'il soit aiguë ou chronique (23).

II. Métabolisme

La toxicologie de l'éthanol étant étroitement liée à son métabolisme, la connaissance de ce dernier est indispensable pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques.

L'Alcool Déshydrogénase (ADH) hépatique est la principale enzyme responsable du métabolisme oxydatif de l'éthanol, produisant de l'acétaldéhyde et du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) (27). L'acétaldéhyde est ensuite oxydé par l'Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH) en acétate (Figure 6). L'acétate n'est cependant pas le métabolite final puisqu'il peut lui-même être converti en CO_2 , acides gras, corps cétoniques, cholestérol ou stéroïdes (27).



Figure 6 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol (22).

La balance entre les différents isoformes d'ADH et ALDH régule les concentrations d'acétaldéhyde, et constitue un facteur de risque dans le développement de l'alcoolisme (28). En effet, les effets d'intolérance à l'éthanol tels que des nausées, et vasodilatations responsables notamment de « flush » faciaux, sont attribués à la concentration d'acétaldéhyde.

Une accumulation de ce métabolite chez les populations présentant une inactivation ou une déficience de l'isoenzyme ALDH, explique ainsi un « découragement » à boire de grande quantité d'alcool dans la vie quotidienne, les protégeant de l'alcoolisme. C'est particulièrement le cas de l'Asie de l'Est, où 15 à 40% de la population présente une inactivation de l'ALDH, menant à des taux d'acétaldéhyde 5 à 20 fois supérieur à la population présentant une isoenzyme active (27).

Il existe également une voie de métabolisation secondaire de l'éthanol, impliquant la voie des cytochromes P450, notamment le CYP2E1. Cette voie de métabolisation oxydative, principalement retrouvée au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes, permet la production d'acétaldéhyde à partir de l'éthanol, puis d'acétate à partir de l'acétaldéhyde.

Par ailleurs, l'éthanol induit son propre métabolisme, par inhibition de la dégradation du CYP2E1 (29). Ce mécanisme est considéré comme jouant un rôle majeur dans la tolérance à l'éthanol chez les consommateurs chroniques (27).

Les autres voies de métabolisation mineures de l'éthanol comprennent la glucuroconjugaison, donnant naissance à l'éthylglucuronide, la sulfoconjugaison produisant de l'éthylsulfate, la voie des esters éthyliques d'acides gras (FAEE) synthèses formant des esters éthyliques d'acides gras et la voie de la phospholipase D synthétisant du phosphatidyléthanol.

III. Toxicité de l'éthanol

III.1. Toxicité aiguë

Les manifestations cliniques des intoxications aiguës alcooliques sont bien connues, et sont étroitement liées à l'alcoolémie. Ces symptômes sont essentiellement d'ordre neuropsychiques, retrouvant une excitation intellectuelle et psychique, suivi d'un syndrome cérébelleux accompagnant l'ivresse caractérisée, puis d'un coma plus ou moins profond pouvant engager le pronostic vital par paralysie des centres respiratoires (30,31).

Chez l'Homme, les premiers symptômes sont observables à partir de 0.2g/L, pouvant donner lieu à une diminution de la coordination motrice, du temps de réaction, et des troubles du jugement. Ces effets, caractérisant l'ébriété, disparaissent rapidement après la fin de l'exposition (32).

Curieusement, les effets psychoactifs à une certaine concentration d'alcool dans le sang ont été démontrés comme étant plus intenses lorsque cette concentration d'éthanol augmente dans le sang par rapport à lorsqu'elle descend. Cet effet a été appelé « effet Mellanby ». Par extension, ce terme désigne ainsi le phénomène de tolérance rapide à l'éthanol, les effets neuropsychiques étant moins intenses lorsque la concentration diminue (33,34).

Les effets dépresseurs neuropsychiques de l'éthanol sont bien documentés et reliés à leur interaction avec les récepteurs GABA-A (35). Ces récepteurs appartiennent à une famille de canaux ioniques transmembranaires ligands dépendants qui permettent une réponse neuronale rapide dans le système nerveux central des mammifères. Ils sont principalement post-synaptiques, bien que certains sous types soient localisés en dehors des synapses (35).

Ces récepteurs sont hétéropentamériques, et peuvent ainsi s'agencer différemment en fonction des 19 sous-unités connues (α_{1-6} ; β_{1-4} ; γ_{1-3} ; δ ; ϵ ; π ; ρ_{1-2} et θ) (35). La grande partie des récepteurs GABA-A cérébraux sont constitués de 2 sous-unités α , 2 sous-unités β et une sous-unité γ , formant des sites de liaisons à de nombreux médicaments, comme les barbituriques, les benzodiazépines ou certains anesthésiques (Figure 7).

Lors de l'activation des récepteurs GABA-A par un agoniste, le canal s'ouvre, provoquant un gradient électrochimique par une entrée d'ion chlore (35). L'hyperpolarisation résultante est responsable de la diminution du potentiel d'action.

L'acide gamma amino-butyrique (GABA) est donc classé comme neurotransmetteur inhibiteur du fait de l'effet exercé au travers de ces récepteurs sur le neurone post-synaptique. Ainsi, la fixation de l'éthanol sur la sous-unité α des récepteurs GABA-A entraîne une inhibition du neurone post-synaptique par modulation allostérique, responsable des effets dépresseurs centraux (Figure 7).

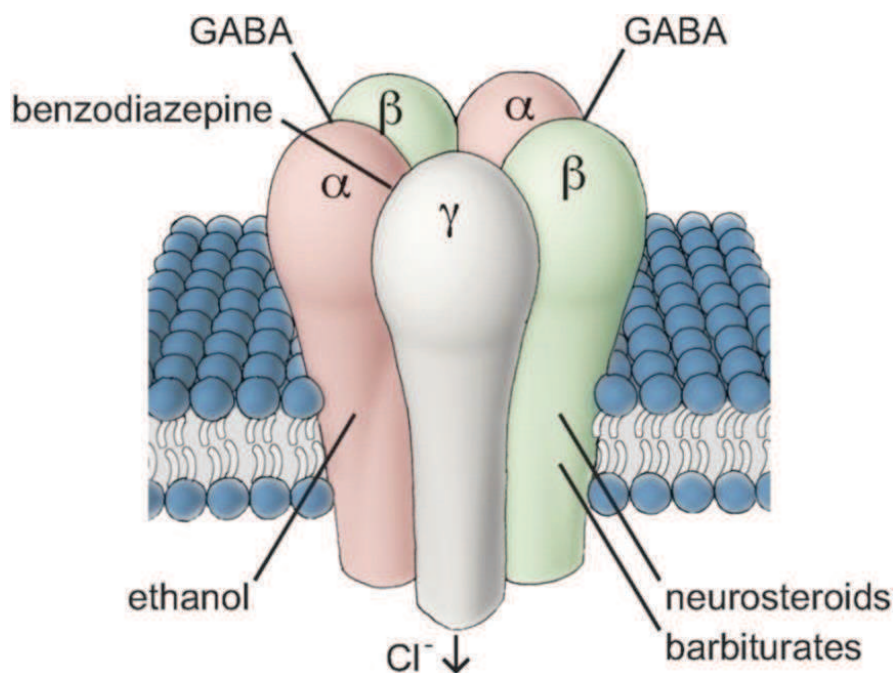


Figure 7 : Régulation des récepteurs GABA-A par différents xénobiotiques (36)

Au-delà de ces effets sur les récepteurs GABA-A, l'éthanol antagonise 3 types de récepteurs au glutamate : N-méthyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid (AMPA) et Kainate (37,38). Le glutamate étant un neurotransmetteur exciteur, le blocage de ces récepteurs participe aux effets dépresseurs de l'éthanol sur le système nerveux central (39).

Enfin, l'éthanol a également été montré comme interagissant avec les récepteurs à la glycine, les récepteurs nicotiques neuronaux, et les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₃ (35).

III.2. Toxicité chronique

La toxicité chronique de l'éthanol est multi-organe, retrouvant des retentissements digestifs avec des stéatoses et cirrhoses hépatiques, gastrite chronique, pancréatite et des retentissements neuropsychiques à type de polynévrite, atrophie cérébelleuse, et troubles de la mémoire.

a. Atteintes hépatiques

Dans les premiers stades des maladies hépatiques liées à l'éthanol, il est important de souligner que la production précoce de ROS lié à son métabolisme est responsable d'une augmentation rapide de la fluidité membranaire des hépatocytes. Cette dernière provoque une élévation secondaire de la teneur en fer de bas poids moléculaire cytoplasmique, conduisant à une augmentation de la production de ROS. Ce phénomène peut alors induire une peroxydation lipidique et l'apoptose (4). Considérant cette explosion de la production de ROS par l'augmentation de la fluidité membranaire, on comprend dès lors l'effet pervers d'une consommation chronique d'alcool.

Les lésions hépatiques dues à l'éthanol peuvent être divisées en trois phases. La première phase de stéatose hépatique correspond à l'accumulation de lipides dans les hépatocytes. Cette phase est relativement bénigne et généralement réversible. Sa physiopathologie est étroitement liée au métabolisme oxydatif de l'éthanol. En provoquant la lipolyse au niveau des adipocytes, la consommation chronique d'alcool augmente la fraction d'acides gras libres pouvant être capté par le foie (40). Par ailleurs, l'acétaldéhyde, métabolite de l'éthanol, augmente l'expression de SREBP1C, responsable d'une augmentation des gènes de la lipogénèse (41).

La deuxième phase est celle de la stéatohépatite, qui se développe à partir de la stéatose sous-jacente. Les lipides accumulés au sein des hépatocytes sont d'avantage sujet à la peroxydation lipidique et aux dommages oxydatifs subséquent.

Des interactions complexes impliquant les effets de l'acétaldéhyde, les ROS, les lésions médiées par les endotoxines intestinales (LPS) et le stress du réticulum endoplasmique sont responsables de l'infiltration hépatique de cellules du système immunitaire comme les polynucléaires neutrophiles et cellules de Kuppfer, macrophages résidents du foie (41). Le relargage de cytokines pro-inflammatoire massif résultant est directement responsable de la mort des hépatocytes et l'entretien de l'hépatite alcoolique (42).

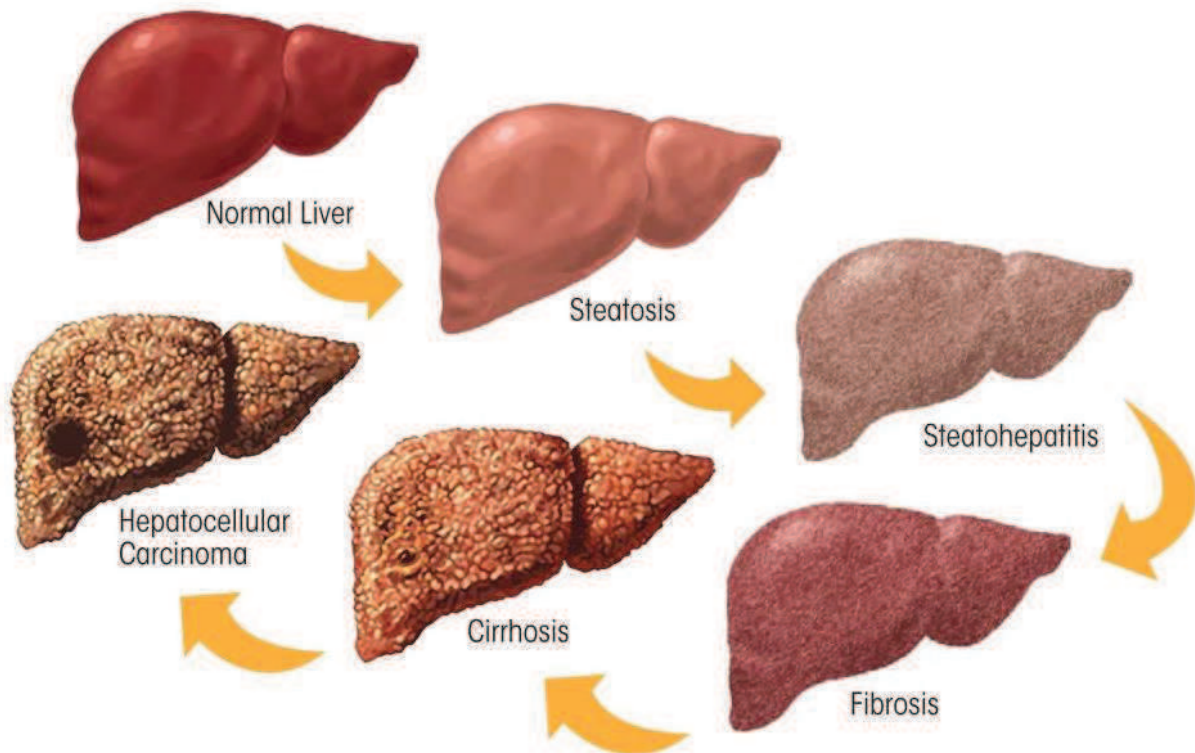


Figure 8 : Evolution des hépatopathies alcooliques (41)

La troisième phase est le reflet de la progression de la stéatohépatite à partir de l'état inflammatoire, où la régénération des hépatocytes est sévèrement compromise. Les lésions hépatiques entraînent l'activation des cellules stellaires hépatiques, principales sources de dépôt de matrice extracellulaire, caractérisant la fibrose. La progression de la fibrose lors de l'inflammation chronique produite par l'éthanol mène au remplacement progressif du parenchyme hépatique par un tissu cicatriciel, compromettant les fonctions métaboliques et homéostasiques hépatiques (41). Ce stade de cirrhose est alors le siège de développement de complications sévères, comprenant l'hypertension portale et le carcinome hépatocellulaire, deuxième cause de décès par cancer (43) (Figure 8).

b. Atteintes neuropsychiques

La toxicité et les effets métaboliques de l'éthanol au niveau cérébral varient en fonction de la région du cerveau, l'âge, la dose, et la durée d'exposition. Les effets toxiques de l'éthanol et de ses métabolites affectent les neurones et les cellules gliales. Les principales complications comprennent l'altération des fonctions des astrocytes et des oligodendrocytes, qui se traduisent par une réduction de la synaptogenèse, et de la survie cellulaire.

Ainsi, le diencephale, le cortex cérébral, l'hippocampe, et la matière blanche correspondant à la myéline, sont des cibles de la toxicité de l'éthanol et de ses métabolites. De cette atteinte résulte une atrophie cérébrale, même si le mécanisme sous-jacent n'est pas encore totalement élucidé (44–46). Ces différentes conséquences neurotoxiques sont aggravées par une carence en thiamine (vitamine B1), provoquée par l'inhibition de son absorption et de ses action physiologiques par l'éthanol (47).

De plus, les preuves sont grandissantes concernant un lien entre la perte de fonction hépatique due à l'alcool et la neurotoxicité. D'une part, la perte de fonction métabolique de l'éthanol par le foie est responsable d'une surexposition du cerveau à ce toxique. D'autre part, les lésions hépatiques mènent à la production de médiateurs toxiques, métaboliques et inflammatoires lésant le cerveau. Cette relation est retrouvée notamment sous la dénomination d'encéphalopathie hépatique (48,49).

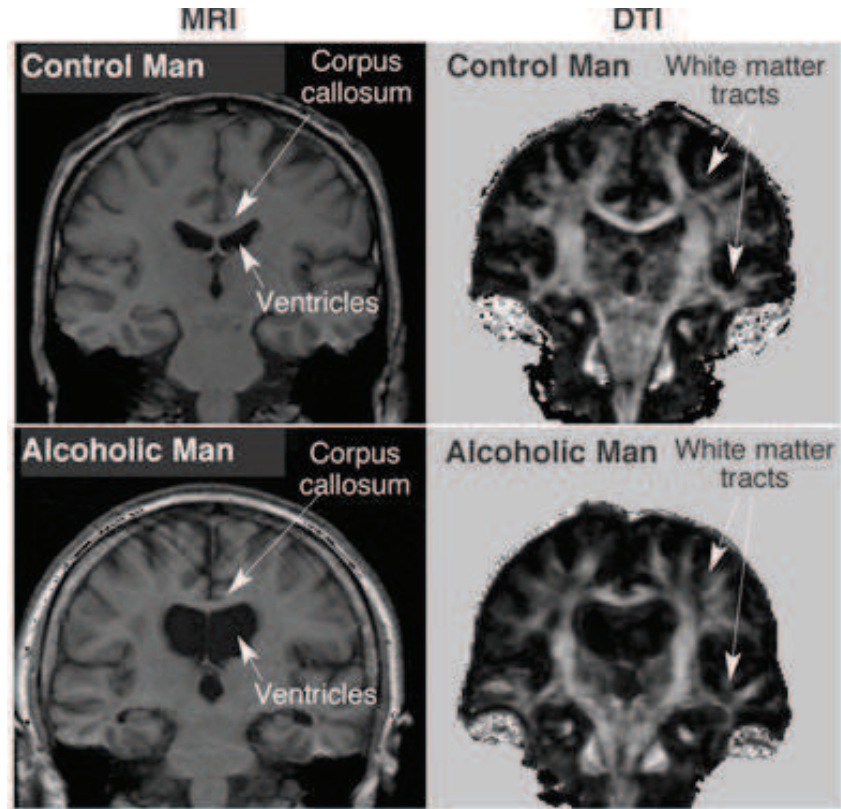


Figure 9 : Imagerie cérébrale d'un patient sain témoin de 61 ans (control man) comparé à un patient alcoolique chronique de 60 ans (alcoholic man) par MRI (imagerie par résonance magnétique) et DTI (imagerie du tenseur de diffusion) (50)

Aux vues de ces éléments, il n'est pas surprenant de constater que la consommation chronique d'alcool est responsable de déficience cognitive sévère allant jusqu'à la démence. Les principales démences retrouvées comprennent notamment le syndrome de Wernicke-Korsakoff et la maladie de Marchiafava-Bignami (51,52). Actuellement, l'imagerie est utilisée pour détecter les atrophies cérébrales frontales, cérébelleuses ou encore temporales, reliées à la consommation d'éthanol (53) (Figure 9).

c. Dépendances, addictions et syndrome de sevrage

Dans le domaine des addictions, les produits « classiques » agissent sur une cible spécifique, tel que les récepteurs aux opiacés pour l'héroïne, les récepteurs cannabinoïdes CB1 pour le cannabis, les récepteurs nicotiniques pour le tabac ou les transporteurs des monoamines pour la cocaïne (54). Contrairement à ces produits, l'éthanol agit à de nombreux niveaux. Comme mentionné précédemment, l'éthanol facilite la transmission GABAergique *via* les récepteurs GABA-A et diminue la neurotransmission glutaminergique (36–39).

A l'instar des autres produits addictogènes, la consommation d'alcool entraîne une activation du circuit de la récompense, et par conséquent la libération de dopamine au niveau du système méso-cortico-limbique. Ce système est formé de neurones dopaminergiques, dont les corps cellulaires se trouvent dans l'aire tegmentale ventrale (ATV), et dont les axones se projettent dans le noyau *accumbens*, l'amygdale et le cortex frontal (Figure 10) (55).

Bien que le rôle de la dopamine soit central dans le mécanisme de dépendance, d'autres neurotransmetteurs sont également impliqués, comme le GABA, le glutamate, la sérotonine, la noradrénaline et les peptides opioïdes (55).

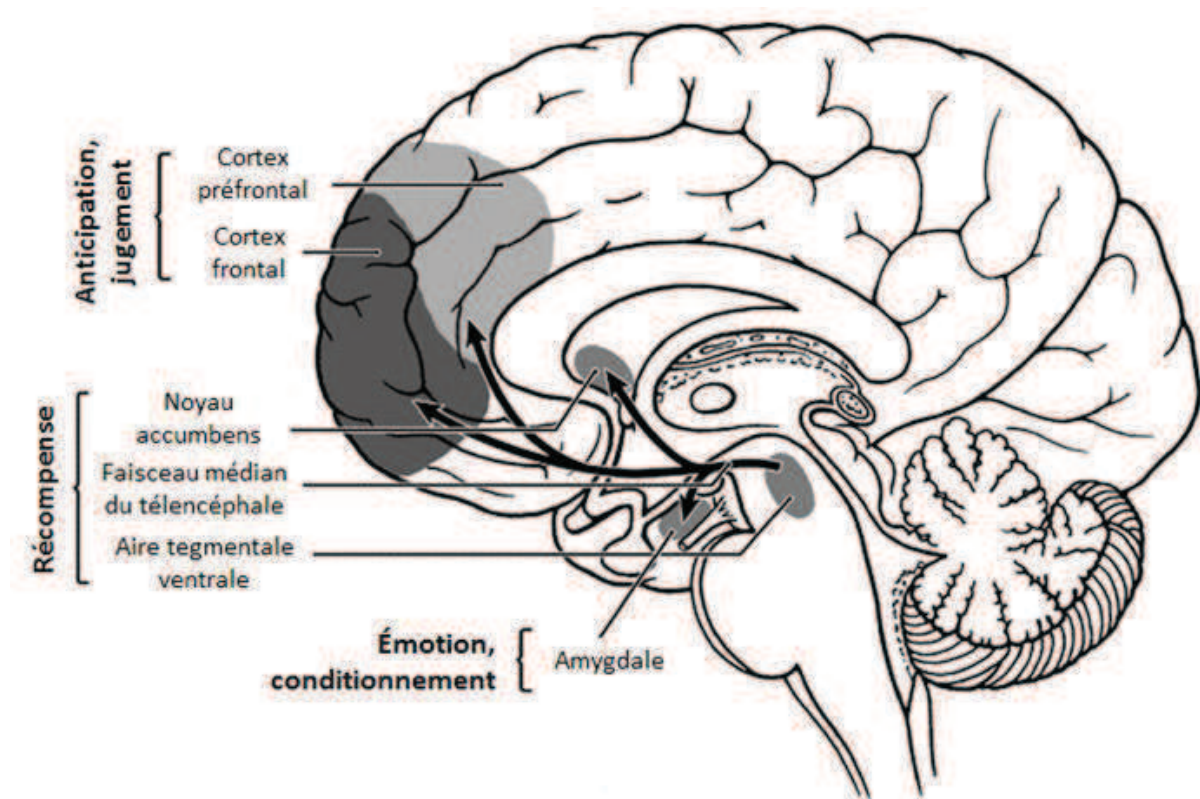


Figure 10 : Circuit de la récompense : schématisation de la voie dopaminergique (<http://quantum-mind.co.uk>)

La prise répétée d'alcool est responsable d'un phénomène de tolérance, entraînant des processus adaptatifs diminuant notamment l'efficacité de la neurotransmission GABAergique et facilitant la neurotransmission glutaminergique. Ces processus mènent à une hyperexcitabilité neuronale, caractéristique de l'alcoolodépendance (54).

De plus, une exposition chronique d'éthanol est à l'origine d'une intégration d'acides gras saturés et de cholestérol au niveau membranaire, augmentant ainsi sa rigidité. Cette rigidité s'oppose aux effets fluidifiants de l'éthanol décrit précédemment. Par conséquent, une diminution brutale de la consommation d'alcool est à l'origine d'une hyper-rigidité membranaire temporaire, perturbant l'homéostasie cellulaire (56).

Lors d'un retrait brutal d'alcool, le syndrome de sevrage se présente sous une forme clinique résultant de ces changements adaptatifs, retrouvant hypertension, tachycardie, hallucinations, agitation, hyperthermie, tremblements, crises convulsives, et hyperexcitation (57).

d. Atteintes cardiovasculaires

Bien que la consommation d'alcool semble présenter certains bénéfices à des doses modérées, la consommation à de fortes doses semble au contraire être pourvoyeur de troubles cardiovasculaires, tels que l'hypertension, la fibrillation auriculaire, l'athérosclérose, et les cardiomyopathies alcooliques (Figure 11) (31,32,58).

Maladie cardiovasculaire	Mécanismes potentiels
Hypertension	Augmentation de la sécrétion des catécholamines
Fibrillation auriculaire	Augmentation des métabolites oxydatifs réactifs
Athérosclérose	Activation de l'immunité innée et adaptative, présence de médiateurs de l'inflammation (TNF, IFN-gamma)
Cardiomyopathie alcoolique	Augmentation des effets pro-inflammatoires, activation neuro-hormonale, changements métaboliques, accumulation d'acétaldéhyde, synthèse protéique altérée
Insuffisance cardiaque	Maladie cardiovasculaire, maladie coronarienne, malnutrition, carence vitaminique

Figure 11 : Mécanismes potentiels reliant la consommation d'alcool avec les pathologies cardiovasculaires (58)

Aussi, malgré le fait que les mécanismes sous-jacents à cette toxicité d'organe ne soient pas totalement élucidés, la place des métabolites de l'éthanol semble ici aussi être étroitement liée. En effet, les lésions des cellules myocardiques semblent liées à l'accumulation d'acétaldéhyde (59).

Le stress imposé aux myocytes par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, les ROS, les dysfonctions mitochondriales et le stress du réticulum endoplasmique ont par ailleurs été démontré comme impliqué dans l'hypertrophie des myocytes. Cette dernière est responsable de l'altération des performances contractiles du cœur (60). Ces atteintes cardiovasculaires associées à la consommation excessive d'alcool peuvent par conséquent aller jusqu'à l'arrêt cardiaque (61).

e. Atteintes hématologiques

Des troubles hématologiques sont également rapportés à la consommation d'alcool, retrouvant des leucopénies, anémies et thrombopénies ainsi que des myélodysplasies et leucémies aigues (31,32). Récemment, une étude de Smith et al. (2015) a émis l'hypothèse d'une prédisposition à ces troubles hématologiques du fait d'un polymorphisme de l'ALDH.

L'isoforme ALDH1A1 étant présente au sein des cellules souches hématopoïétiques, une surexposition à l'acétaldéhyde pourrait expliquer l'augmentation du risque de perturbation de l'hématopoïèse associée à l'inhibition de la réparation d'ADN (62).

III.3. Effets cancérigènes

Selon Seits et Stickel (2007), 3.6% des cancers dans le monde sont dus à la consommation chronique d'alcool. Ce lien de cause à effet concerne particulièrement les tumeurs du tractus digestif supérieur tels que la bouche, le pharynx, le larynx ou l'œsophage, les tumeurs hépatiques, les tumeurs coliques et les tumeurs du sein (63).

Une fois de plus, l'acétaldéhyde est incriminé dans la physiopathologie de ces atteintes. En effet, ce premier métabolite de l'éthanol a la capacité de se lier à des protéines, altérant leurs structures et leurs fonctions. C'est notamment le cas des enzymes impliqués dans la réparation de l'ADN et le glutathion (64).

Par ailleurs, l'acétaldéhyde peut se lier à l'ADN, formant des adduits (65) (Figure 12). Enfin, les porteurs d'un allèle codant pour l'ALDH2*2 inactive présentent un risque augmenté de cancer de l'œsophage, du fait d'une surexposition à ce métabolite (63).

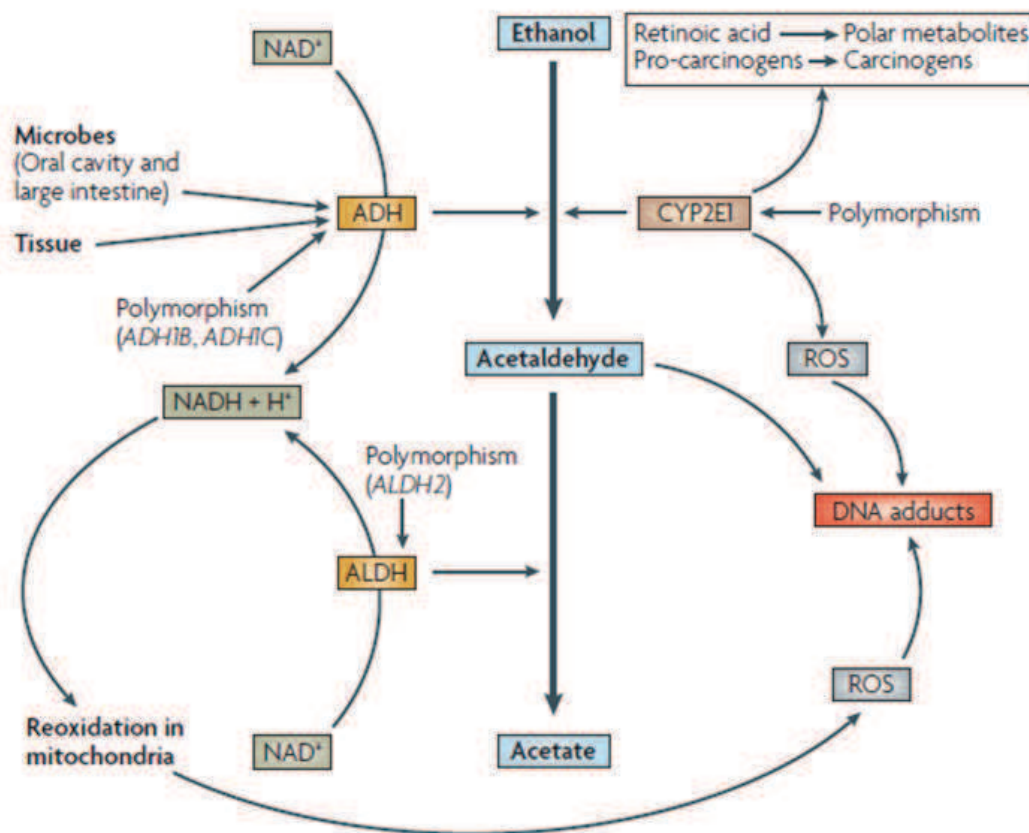


Figure 12 : Rôle du métabolisme de l'éthanol dans la carcinogénèse (63)

Les mécanismes d'hépatocarcinogénèse induite par l'éthanol sont étroitement liés à l'induction d'une cirrhose hépatique, l'augmentation du stress oxydant notamment lors du métabolisme de l'éthanol, et l'altération des méthylations. Enfin, l'acide rétinoïque, essentiel au bon déroulement de la prolifération et la différenciation cellulaire, est anormalement métabolisé du fait de l'augmentation d'expression du CYP2E1 par l'éthanol (63).

Les tumeurs du sein présentent quant à elles un risque relatif de 1.13 chez les consommateurs chronique l'alcool et seraient en lien avec l'augmentation des taux d'œstradiol induit par l'éthanol. Les hormones stéroïdiennes étant métabolisées par l'ADH, une compétition entre le métabolisme des œstrogènes et de l'éthanol expliquerait cet effet (63).

Par ailleurs, l'éthanol altère les transferts de groupement méthyl. Or les méthylations de gènes sont capitales dans le contrôle de l'expression des gènes : une hyperméthylation tend à diminuer l'expression de ce gène et inversement. Ainsi, une promotion d'oncogènes ou une répression de gènes suppresseurs de tumeurs apparaissent comme étapes clés dans la carcinogenèse induite par l'éthanol.

Enfin, des expériences chez l'animal montrent qu'une importante quantité d'acétaldéhyde est produite par les bactéries coliques après une consommation d'alcool (66). De plus, une augmentation des concentrations coliques d'acétaldéhyde par inhibition de l'ALDH a montré une induction de la carcinogenèse colique pour la première fois en 1990 (67).

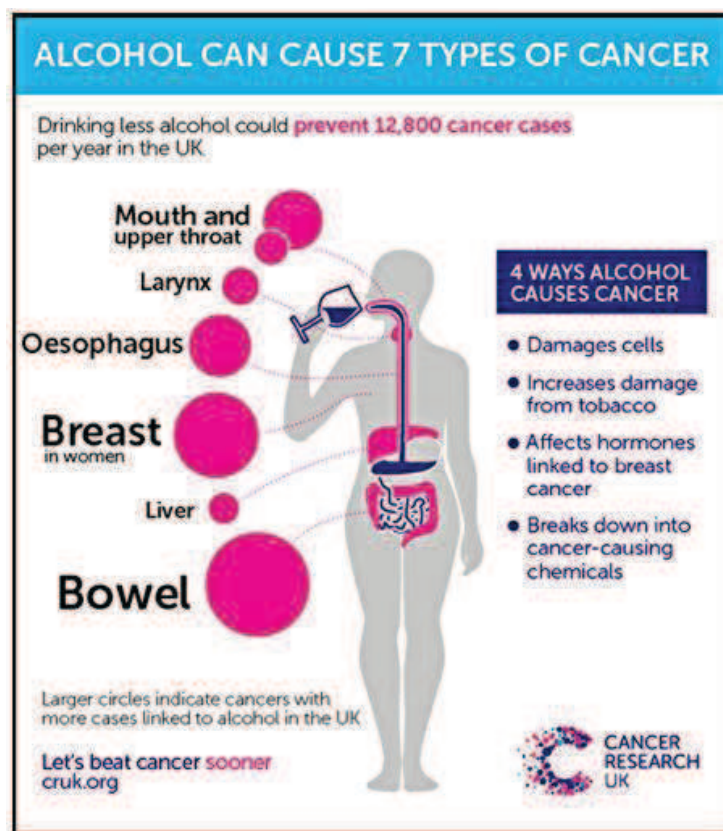


Figure 13 : Affiche du « Cancer Research UK » (<http://www.alcoholpolicy.net>)

III.4. Effets sur la reproduction

La consommation d'éthanol perturbe les cycles menstruels chez la femme et diminue la fertilité masculine, notamment par atrophie testiculaire, réduction de la libido, et diminution de la testostérone. De plus, une diminution de l'incidence de conception par cycle a été observée à partir de 5 verres par semaine (68,69).

Pendant la grossesse, la consommation d'éthanol est responsable, de manière dose dépendante, d'anomalies congénitales multiples, comme des retards de croissance, des perturbations du système nerveux central et des malformations externes.

Ces manifestations sont regroupées sous le terme de syndrome d'alcoolisation fœtal et donne lieu à un facies particulier retrouvant des fentes palpébrales étroites, l'étage moyen de la face plat, un nez court, un philtrum absent, une lèvre supérieure fine, un épicanthus, une racine du nez plate, des anomalies mineures de l'oreille et une micrognathie (70).

Des consommations de 10 à 20g d'alcool par jour chez la mère ont également montré des retards intellectuels et comportementaux, augmentés par une exposition de l'enfant au cours de l'allaitement (15).



Figure 14 : Caractéristiques faciales du syndrome d'alcoolisation fœtale présentées sur des enfants de différentes nationalités (70)

IV. Utilisation de l'éthanol en thérapeutique

Il semble que depuis la fin du XIX^{ème} siècle, la recherche scientifique met en avant l'alcool comme agent thérapeutique (71,72). La connaissance du métabolisme et de la toxicité de l'éthanol, synthétisé par Fermie A. en 1894 par la phrase « It can save as well as destroy », témoigne des nuances qu'il fallait jauger dans ce discours. Quand bien même, l'utilisation d'alcool était préconisée dans l'insomnie, la fièvre, ou encore le choléra (72).

Aujourd'hui, l'usage le plus connu de l'éthanol en thérapeutique reste certainement l'usage externe en tant qu'antiseptique désinfectant. En effet, son action dénaturant des protéines cytoplasmiques et membranaires, ainsi que l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines qu'il entraîne sont responsable de cette activité.

Contrairement aux autres antiseptiques, son efficacité n'est pas corrélée de manière linéaire à sa concentration. Ainsi, l'éthanol à 70% est plus actif qu'à 96% (73). Ses indications concernent majoritairement l'antisepsie de la peau saine avant injection intraveineuse ou sous-cutanée, et les prélèvements sanguins. N'ayant pas d'action rémanente après évaporation, l'éthanol est principalement utilisé en association à d'autres antiseptiques comme la chlorhexidine (chlorhexidine alcoolique®) ou la povidone iodée (Bétadine alcoolique®) (74).

Outre son usage externe, l'éthanol est actuellement utilisé dans diverses indications. Les ampoules d'éthanol à 26% ont une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) sous le nom de CURETHYL® dans le traitement des traitements d'appoint au cours des cures de sevrage éthylique (Figure 15). Dix à deux ampoules par jour sont administrées à dose dégressives en fonction du syndrome de sevrage observé (75).

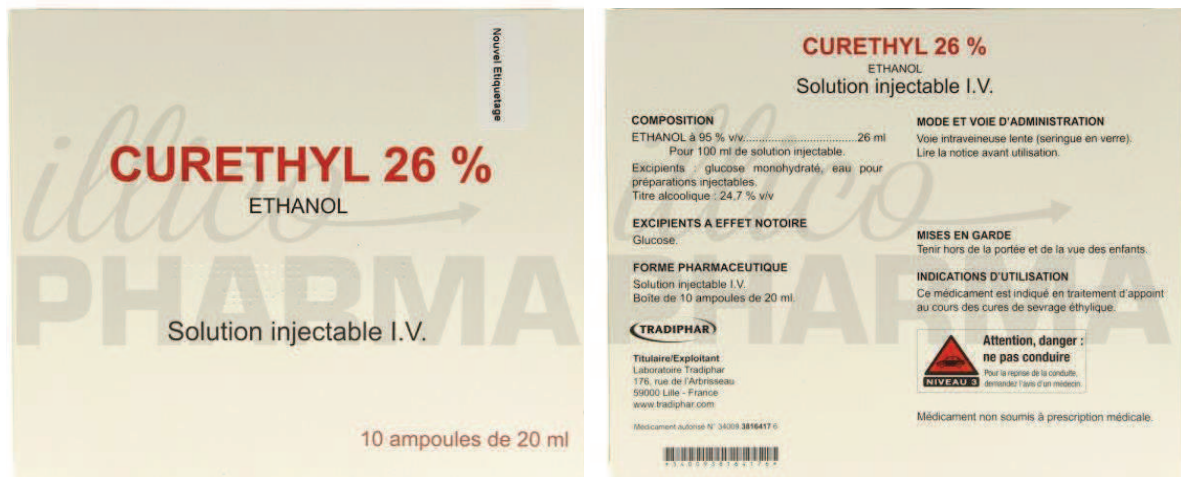


Figure 15 : Présentation de la spécialité CURETHYL 26%®

Dans le cadre d'une intoxication au méthanol ou à l'éthylène glycol, l'éthanolthérapie peut être utilisée en milieu hospitalier afin de shunter le métabolisme toxique de ces deux poisons. Le but du traitement consiste à maintenir une éthanolémie entre 1 et 1.5g/L jusqu'à que la concentration sérique de méthanol ou d'éthylène glycol soit inférieure à 20mg/100mL (76,77).

L'éthanol possède également une indication dans la neurolyse chimique à visée antalgique et dans le traitement de la spasticité (78). Les indications analgésiques regroupent principalement la destruction d'un névrome cicatriciel, le traitement de douleurs neuropathiques par envahissement néoplasique ou d'origine paranéoplasique, le traitement des manifestations douloureuses virales diverses telles que le zona et les névralgies post-zostériennes ou post-herpétiques. L'éthanol est injecté localement au niveau des nerfs cibles médullaires, périmédullaires ou périphériques sous électrostimulation (79).

La chimio-embolisation à l'éthanol est également utilisée dans les malformations artério-veineuses, les tumeurs hépatiques et le traitement de certaines myocardiopathies hypertrophiques (78,80–82).

Sous la dénomination de DISCOGEL[®], l'éthanol à 96% sous forme de gel radio-opaque par adjonction de tungstène micronisé, est considéré comme dispositif médical de classe III, et est indiqué dans le traitement de certaines hernies discales (83). L'efficacité de ce dispositif est attribuée à l'action déshydratante du disque, entraînant une rétractation du nucleus aqueux et par conséquent une diminution de la pression intra-discale (Figure 16).



Figure 16 : Administration de DISCOGEL au niveau d'une hernie lombaire
(<http://www.ortomedica.ro/fr/about.html>)

Enfin, également commercialisé sous le statut de dispositif médical, ETHIBLOC[®] est une solution alcoolique utilisé comme agent sclérosant, notamment dans le cadre de malformations kystiques lymphatiques (84).

V. Effets bénéfiques de l'éthanol

Malgré les nombreux effets délétères de la consommation d'éthanol, il semblerait que des effets bénéfiques soient retrouvés pour des consommations légères à modérées. Dans une étude de Di Giuseppe D. et al. (2012), réalisée chez 34 141 femmes, dont 197 ont présentées une polyarthrite rhumatoïde, une consommation d'au moins 3 verres d'alcool par semaine diminuait de moitié l'incidence de la polyarthrite rhumatoïde, comparé aux femmes ne buvant jamais d'alcool (85).

Curieusement, cet effet protecteur de l'éthanol s'étendrait également au niveau des appareils sensitifs. En effet, une forte consommation d'alcool, aux alentours de 50 grammes par semaine, a montré un retard d'apparition de la maladie de Menière d'environ six ans, dans une étude sur 180 personnes, en comparaison des personnes buvant aux alentours de 30g par semaine d'alcool (86).

Parallèlement, une récente étude prospective réalisée sur 9 087 participants âgées entre 35 et 55 ans à l'inclusion, rapporte un effet bénéfique de l'éthanol sur le risque de démence. Au cours des 23 années d'études, les personnes abstinentes ou consommant plus de 14 unités d'alcool par semaine présentaient un risque plus élevé de démence (hazard ratio de 1.47 avec un intervalle de confiance à 95% entre 1.15 et 1.89). Les personnes consommant entre une et 14 unités d'alcool par semaine présentait donc une protection relative face à ce risque (87).

En endocrinologie, une méta-analyse réalisée par Knott C. et al (2015) sur 1 902 605 participants rapporte une diminution du risque de développer un diabète de type 2 pour une consommation inférieure à 63 grammes d'alcool par jour chez les femmes, et les populations non asiatiques (88). Ce même risque devenait plus élevé pour des consommations dépassant ce seuil. Cet effet est attribué à une diminution des concentrations d'insuline à jeun, couplée à une augmentation de la sensibilité de cette hormone chez ces consommateurs modérés (89). Par ailleurs, la consommation d'alcool semble bénéfique sur le métabolisme des lipides, augmentant les taux d'Apolipoprotéine A1 et A2 et des particules de HDL (90).

Les preuves s'accumulent également dans le sens d'une corrélation inverse entre la consommation faible à modérée d'alcool, correspondant à 1 à 2 verres par jour, et la mortalité par maladie cardiovasculaire, donnant naissance au « paradoxe français » (91–93).

Cependant, de fortes consommations d'alcool augmentent le risque de mortalité par d'autres causes, balayant les effets bénéfiques et se traduisant par une courbe en « J » entre la mortalité et la consommation d'alcool (Figure 17) (94). A l'heure actuelle, aucun consensus n'existe reliant ces effets protecteurs cardiovasculaires à un type de boisson, qu'il s'agisse de vin, bière ou liqueurs (95).



Figure 17 : Courbe en "J" entre le risque relatif de mortalité total et la consommation d'alcool (96)

La recherche des mécanismes physiopathologiques sous-jacents ont amené Nurmi et al. (2013) à proposer l'inflammasome NLRP3 comme acteur dans cet effet protecteur cardiovasculaire (10). En effet, ces derniers ont mis en évidence un effet anti-inflammatoire de l'exposition aiguë d'éthanol par inhibition de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages.

*Chapitre 2 : Senseurs de l'immunité innée,
l'inflammasome NLRP3
et les récepteurs purinergiques*

I. Immunité innée et inflammation

L'immunité innée est un système de défense de l'organisme réagissant de manière immédiate contre les pathogènes. Il s'oppose à l'immunité adaptative, qui permet une réponse plus tardive, ciblée et durable dans le temps, notamment par la synthèse d'anticorps spécifiques.

I.1. Acteurs de l'immunité innée

Les acteurs de la réponse immune innée sont nombreux. Cependant, les monocytes circulants et les macrophages tissulaires, appartenant au système phagocytaire, apparaissent comme des acteurs primordiaux.

Les monocytes se développent à partir d'une cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse. En réponse à divers signaux, dont le Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), cette cellule progénitrice se différencie en précurseurs myéloïdes (appelés GM-CFU pour Granulocyte/Macrophage Colony-Forming Units), qui se différencient à leur tour en monoblastes, pro-monocytes et finalement en monocytes relâchés dans la circulation sanguine (Figure 18) (97).

La migration des monocytes du sang vers les différents tissus, grâce à des adhérences à l'endothélium vasculaire, permet la différenciation en macrophages.

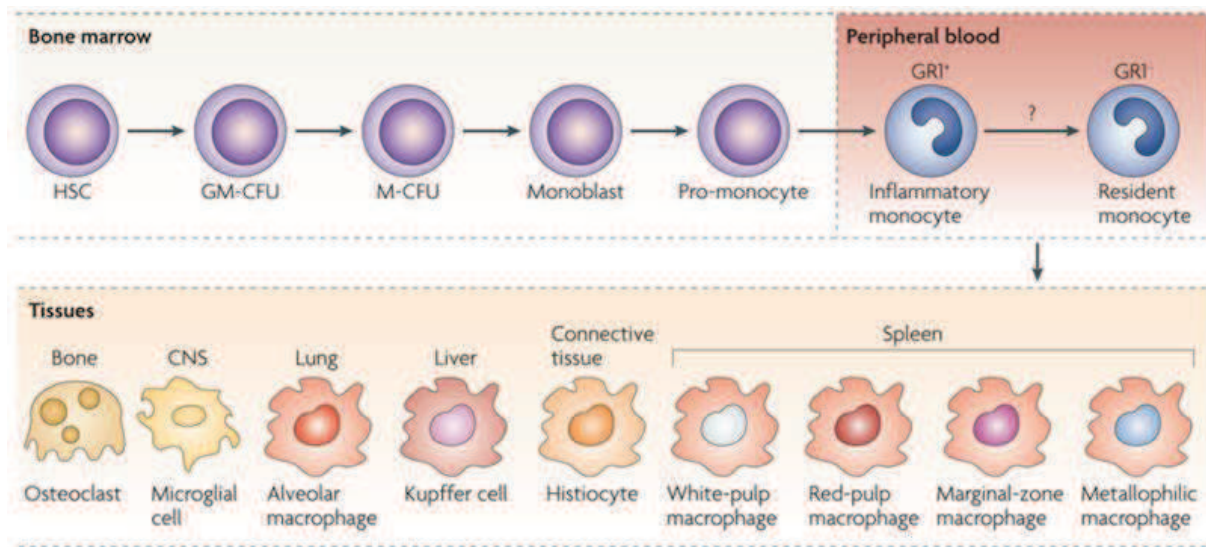


Figure 18 : Origine et différenciation des macrophages selon les tissus de destination (97)

En fonction du tissu de résidence du macrophage et de la présence de médiateurs, les macrophages vont se différencier de manière spécifique. On différencie ainsi les ostéoclastes dans l'os, les cellules de la microglie dans le système nerveux central, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les cellules de Kupffer dans le foie, les histiocytes dans le tissu conjonctif et les différents macrophages spléniques dans la rate.

Les macrophages sont impliqués dans l'homéostasie, la réparation tissulaire, la lutte contre les pathogènes, l'angiogenèse ou encore la résolution de l'inflammation. Cependant, ces cellules sont avant tout des phagocytes. Lors de leur activation, la réponse immunitaire innée est initiée, entraînant une augmentation de l'activité phagocytaire, et une production de cytokines pro-inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1 α (IL-1 α) et l'interleukine-1 β (IL-1 β), ainsi qu'une faible production de cytokines anti-inflammatoire comme l'interleukine 10 (98).

I.2. Cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines sont de petites protéines sécrétées par de nombreux types cellulaires, permettant la communication entre les cellules. Ces messagers moléculaires peuvent ainsi moduler les activités biologiques des cellules environnantes ou réguler l'expression de gènes (Figure 19) (99).

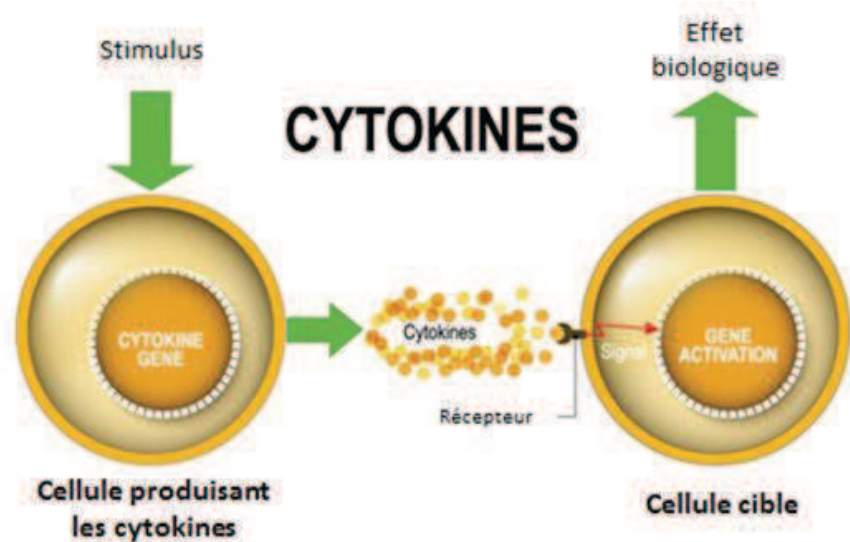


Figure 19 : Principe général de fonctionnement des cytokines
Production de cytokines par une cellule suite à un stimulus puis transmission d'un signal à une cellule cible par l'intermédiaire des récepteurs. Le signal est ensuite traduit en un effet biologique (d'après <https://medicaldailyjournal.com>).

On appelle ainsi cytokines pro-inflammatoires les cytokines pouvant induire une réaction inflammatoire locale et systémique (100). Ces dernières ayant un rôle important dans l'adhérence à l'endothélium, le chimiotactisme, la phagocytose et les phénomènes lytiques, elles nous intéressent particulièrement dans l'étude des macrophages. Comme mentionné précédemment, ces cellules phagocytaires sécrètent lors de leur activation des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 α et l'IL-1 β (98).

L'IL-6 est une cytokine jouant des rôles multiples au niveau systémique, à savoir la thermorégulation, ou la production de protéines de la phase aigüe de l'inflammation par les hépatocytes comme la protéine C réactive (CRP), le fibrinogène, l'haptoglobine, ou la sérum amyloïde A (101). Lors de l'activation de l'immunité innée, la sécrétion rapide de ce pyrogène va ainsi induire une inflammation, permettant d'alarmer l'organisme et de déclencher l'élimination des pathogènes.

L'IL-1 α est une cytokine pro-inflammatoire ayant de nombreuses similitudes avec l'IL-1 β . Elle est notamment impliquée dans les processus inflammatoires stériles comme la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis (102). Contrairement à l'IL-1 β , l'IL-1 α n'a pas besoin d'être clivée pour être active, même si ce clivage par la calpaïne permet d'augmenter la puissance de cette cytokine (103).

L'IL-1 β est une puissante cytokine pro-inflammatoire majeure intervenant dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Son implication est notamment retrouvée dans la réponse aux agents infectieux, les maladies dégénératives et la réparation tissulaire (104). Cette cytokine est majoritairement produite par les monocytes ou les macrophages, bien que d'autres types cellulaires comme les lymphocytes sont également impliqués (105).

La libération de cette cytokine dans l'espace extracellulaire est responsable de l'initiation et de l'amplification de multiples réponses immunitaires et inflammatoires (106). En effet, par fixation sur les récepteurs IL-1R1, l'IL-1 β induit, entre autre, la synthèse de chimiokines et de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales, et la synthèse de CRP par les hépatocytes. En résulte un recrutement massif de leucocytes sur le lieu de l'inflammation et/ou le déclenchement d'une fièvre au niveau cérébral (107,108). Du fait de sa puissance, la production d'IL-1 β est très finement régulée afin de protéger l'organisme de ces propriétés.

Ainsi, trois étapes de régulation sont décrites dans la littérature. La première étape correspond à la transcription de l'ARNm de la pro-IL-1 β , et doit être stimulée par un signal pro-inflammatoire. La seconde étape nécessite le clivage de la pro-IL-1 β inactive en IL-1 β active par une caspase-1. Enfin, la troisième étape correspondant à sa libération (109). En 2003, la découverte des mécanismes d'activation de la caspase-1 mettent à jour l'inflammasome NLRP3, indispensable à l'activation de l'IL-1 β .

II. Les inflammasomes

II.1. Définition et classification

Les inflammasomes sont des complexes moléculaires intracytoplasmiques faisant partie des récepteurs de l'immunité innée, appelés Pattern Recognition Receptors (PRRs). Ils permettent la reconnaissance de composés d'origine pathogène, appelés Pathogen associated molecular patterns (PAMPs), ou des molécules de danger, appelés Danger associated molecular patterns (DAMPs).

Les inflammasomes sont majoritairement composés de 3 éléments : une protéine senseur, une protéine adaptatrice « apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain » (ASC) et une caspase pro-inflammatoire, la caspase 1 (110).

L'assemblage de ces inflammasomes en réponse à ces DAMPs et PAMPs permet l'activation de la caspase-1, pouvant alors cliver les pro-IL-1 β et pro-IL-18 inactives en IL-1 β et IL-18 actives. En plus d'activer la sécrétion rapide de ces interleukines, une hyper-activation des inflammasomes peut aussi déclencher une pyroptose, mort cellulaire permettant de freiner la réplication des pathogènes intracellulaires (111).

La famille des NOD-like receptor, pour « nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor » (NLR), est une famille de protéines senseurs formant des inflammasomes (112). Vingt-deux gènes de ces NLRs ont été identifiés chez l'homme, permettant de les classer et de les nommer selon la structure de leurs domaines.

Tous les NLRs contiennent un domaine NACHT central et un domaine de répétition riche en leucine « leucine-rich repeat » (LRR) en C-terminal, à l'exception de NLRP1. Leur classification se fait alors par leurs domaines N-terminaux.

Ces derniers peuvent contenir un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), donnant naissance à la famille NLRC, ou un domaine PYD (Pyrin Domain), formant la famille NLRP (Figure 20). Les domaines CARD permettent le recrutement direct de la caspase-1 alors que les domaines PYD nécessitent une protéine adaptatrice ASC (113).

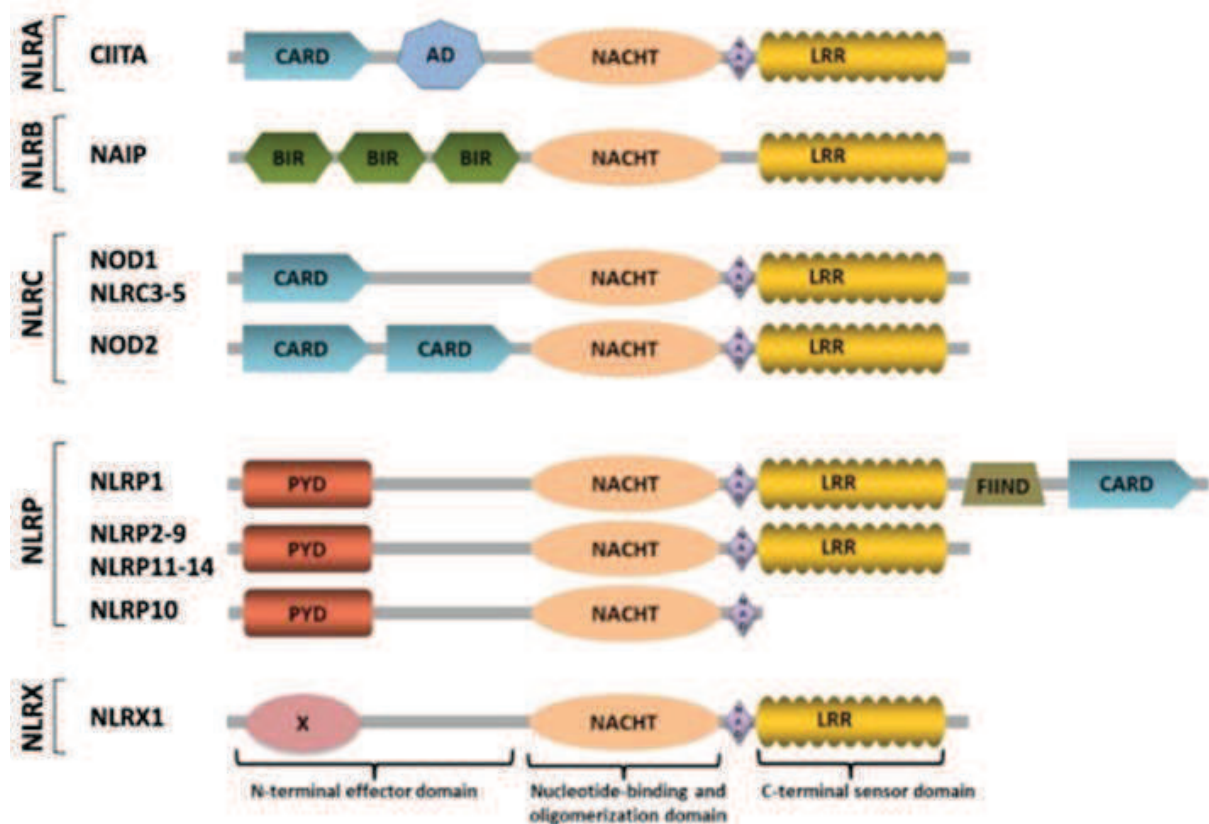


Figure 20 : Classification des inflammasomes (114)

En plus des NLRs, on retrouve les familles ALR pour « AIM2-like receptor » et RLR pour « RIG-I-like receptor » pouvant provoquer l'assemblage des inflammasomes (115,116).

II.2. L'inflammasome NLRP3

a. Présentation

Parmi les inflammasomes, la protéine NLRP3 est la plus étudiée. Comme sa nomenclature l'indique, cette protéine contient un domaine PYD, nécessitant l'intervention d'une protéine adaptatrice ASC pour activer la caspase-1 (Figure 21).

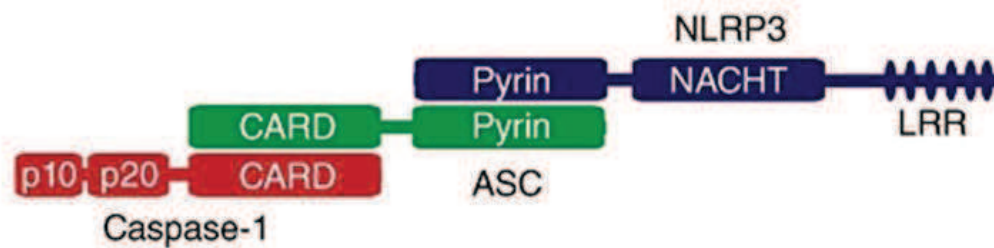


Figure 21 : Structure de l'inflammasome NLRP3 (117)

Lors de son activation, l'inflammasome NLRP3 s'oligomérisise grâce à des interactions entre les domaines NACHT, permettant la présentation de son domaine PYD au domaine PYD de la protéine ASC (118). Cette dernière permet le recrutement et l'autocatalyse de la pro-caspase-1, *via* l'interaction de leurs domaines CARD respectifs. Cette oligomérisation est décrite comme une plateforme intra-cytoplasmique de haut poids moléculaire (119) (Figure 22).

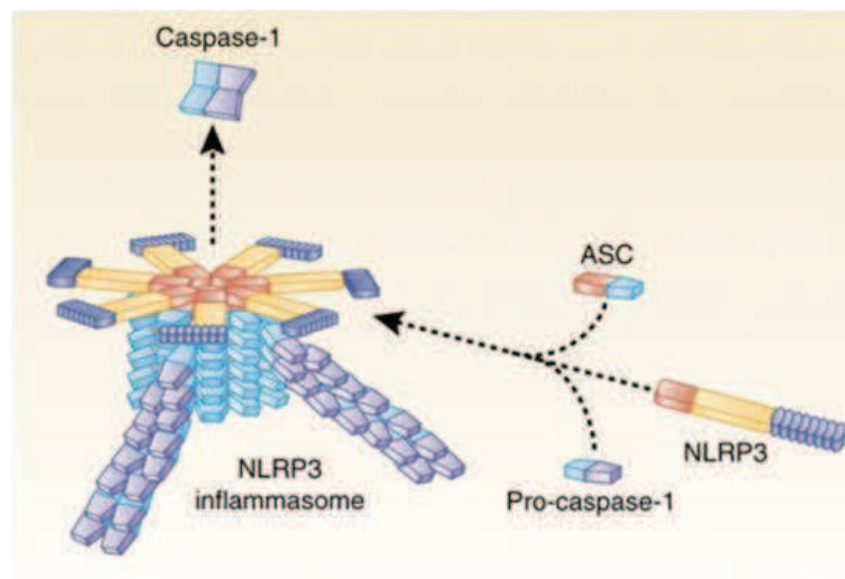


Figure 22 : Structure d'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (120)

La caspase-1 est une cystéine protéase permettant le clivage de la pro-IL-1 β inactive en IL-1 β active. Cette cytokine peut alors être libérée dans l'espace extracellulaire (121,122). D'autres cytokines, comme la pro-IL-18 et l'IL-33, ont également été décrites comme clivées par la caspase-1 (123,124).

b. Activation de l'inflammasome NLRP3

Pour être actif dans les macrophages, l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux. Le premier signal, appelé pré-activation ou « priming », permet d'induire l'expression de la pro-IL-1 β et de la protéine NLRP3. Le second signal permet l'assemblage du complexe inflammasome, capable d'activer la pro-IL-1 β en IL-1 β active.

(i) Pré-activation de l'inflammasome NLRP3

La protéine NLRP3 est exprimée à faible niveau dans les cellules myéloïdes, mais son expression peut être induite par des agonistes des Toll-like receptors (TLRs), récepteurs de l'immunité innée présents au niveau de la membrane plasmique et des endosomes.

Le lipopolysaccharide (LPS), composant essentiel de la face externe de la membrane des bactéries à Gram négatif, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , font partie de ces activateurs (Figure 23). Cependant, ce premier signal ne permet que d'augmenter la production de pro-IL1 β et n'est pas suffisant pour activer la sécrétion d'IL-1 β actif des macrophages.

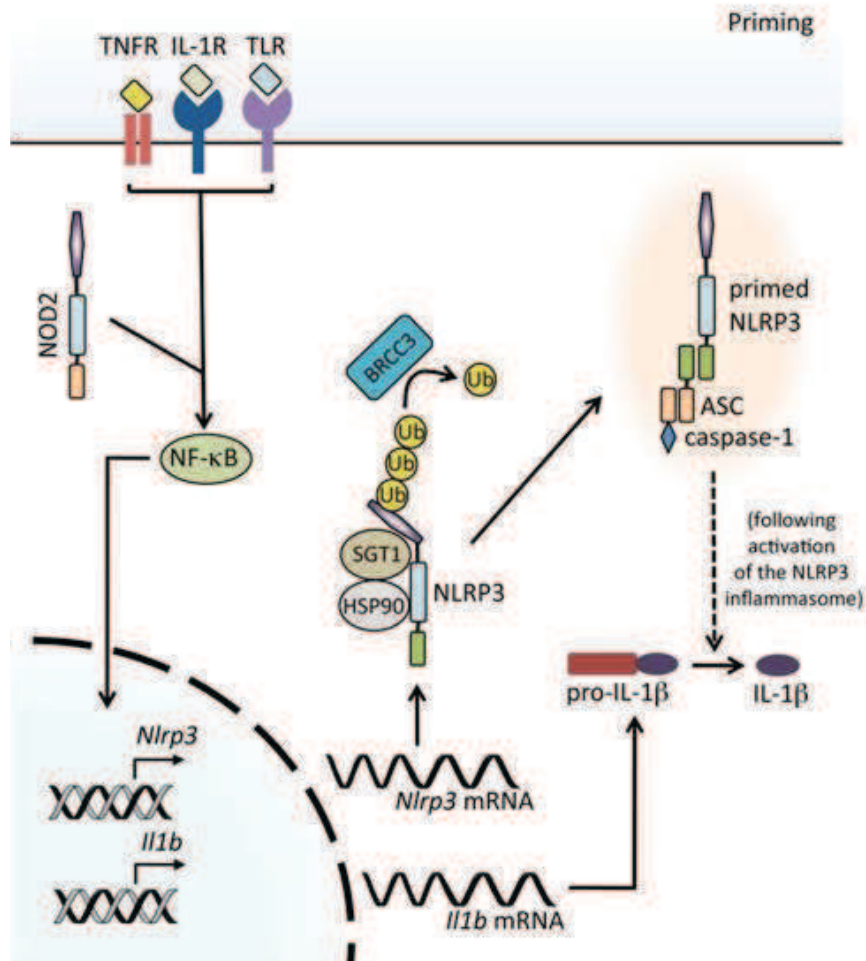


Figure 23 : Pré-activation de l'inflammasome par des agonistes des TLRs (125)

(ii) Activation de l'inflammasome NLRP3

Le second signal permettant l'assemblage du complexe inflammasome NLRP3 peut être provoqué par de nombreux activateurs. Ces signaux incluent des PAMPs et toxines bactériennes (126–128), virus (129), champignons (130) et protozoaires (131) mais également de nombreux signaux de danger (DAMPs) comme l'ATP, la nigéricine, et les cristaux de cholestérol, de silice ou d'acide urique (132).

La diversité de ces signaux rend peu probable le fait que ces différents acteurs activent directement l'inflammasome NLRP3. Ainsi, l'état actuel des connaissances s'accorde sur le fait que ces différents signaux convergent vers des voies communes de signalisation.

Trois principaux modèles ont ainsi été proposés concernant l'activation de l'inflammasome NLRP3 : Le modèle du flux ionique, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et de la rupture lysosomale.

Dans le modèle du flux ionique, les variations de concentrations de divers cations, comme le K^+ , le Ca^{2+} et le H^+ , ont été proposés comme élément activateur de l'inflammasome NLRP3. Plusieurs activateurs ont en effet montré une induction de puissants flux ioniques. L'ATP extracellulaire active les récepteurs purinergiques P2X7 et provoque un efflux potassique (133,134) tandis que la nigéricine crée des pores potassiques dans la membrane cellulaire (126). La protéine du virus de l'influenza M2 a été montrée comme provoquant un efflux d'ions H^+ de l'appareil de Golgi vers le cytosol (135).

Enfin, une forte concentration extracellulaire de Ca^{2+} provoque une augmentation des concentrations cytosoliques de Ca^{2+} et d'AMPc également responsable de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (136–138) (Figure 24). Cependant, les flux ioniques peuvent provoquer l'activation d'autres inflammasomes et ne constituent donc pas un signal spécifique de NLRP3 (139).

Le stress oxydant, sous la forme des ROS est fortement impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 du fait des nombreux acteurs responsable de leur formation, incluant l'ATP, les cristaux d'alun ou d'acide urique (110). Une étude suggère que des quantités accrues de ROS provoquent la fixation de la thioredoxin (TRX)-interacting protein à l'inflammasome NLRP3, provoquant son activation (140). La source principale de ROS étant la mitochondrie, d'autres études rapportent que l'ADN mitochondrial oxydé et relargué lors d'un dysfonctionnement mitochondrial peut activer de manière directe l'inflammasome NLRP3 (141,142).

Par ailleurs, la cardiolipine mitochondriale, phospholipide de la paroi interne des mitochondries, a été démontrée comme activateur de l'inflammasome NLRP3 (143). Cependant, l'état actuel des connaissances ne permet pas d'affirmer clairement la part mitochondriale ROS dépendant ou indépendant dans ce phénomène (Figure 24).

Dans le modèle de rupture lysosomale, la phagocytose de cristaux ou grosses particules comme les cristaux d'acide urique, d'alun, de silice, ou de β -amyloïd serait responsable d'une production de ROS, un efflux potassique, et une déstabilisation du phagosome associée à la rupture du lysosome (134,144). Le relargage du contenu du lysosome dans le cytoplasme, contenant des protéases lysosomales comme la cathepsine B, est associé à l'activation de la caspase-1 (145) (Figure 24).

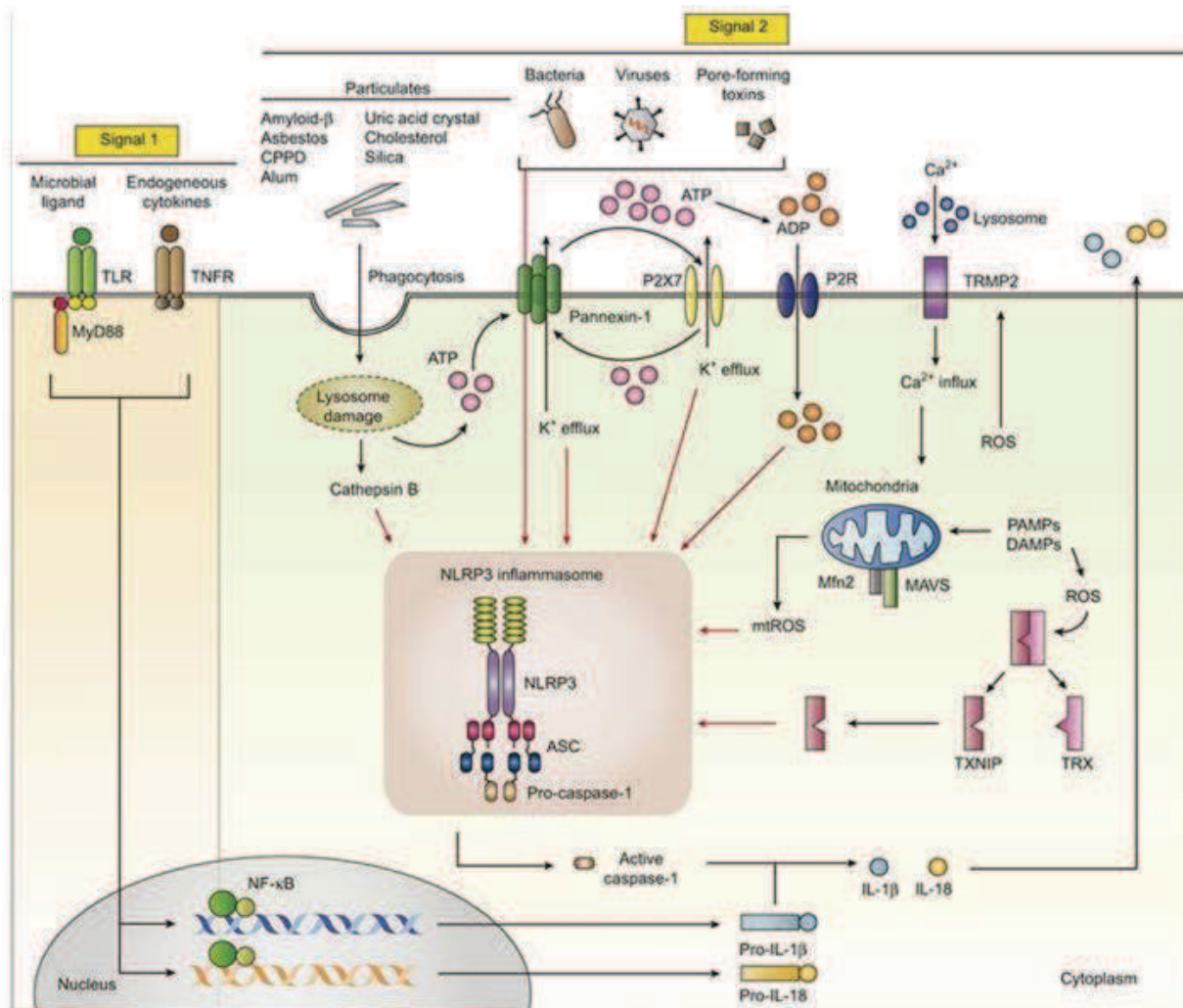


Figure 24 : Mécanismes moléculaires régulant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (132)

c. Pathologies associées

Au-delà de son rôle protecteur dans les réponses aux pathogènes, des mutations activatrices de l'inflammasome NLRP3 peuvent mener à des pathologies comme les CAPS (Syndrome périodique associé à la cryopyrine) (146). La protéine NLRP3 mutée résultante déclenche l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et le clivage de la pro-IL-1 β en réponse à des stimuli normalement insuffisant pour déclencher cette activation (147).

Ces CAPS regroupent le syndrome de Muckle-Wells, le syndrome inflammatoire automatique froid familial (FCAS/FCU) et le syndrome chronique infantile neurologique, cutané et articulaire (CINCA)/maladie systémique inflammatoire à début néo-natal (NOMID) (148).

Les traitements de fond actuellement sur le marché dans l'indication des CAPS regroupent notamment l'anakinra (KINERET®) et le canakinumab (ILARIS®), respectivement IL-1RA synthétique et anticorps monoclonal, tous deux neutralisant l'IL-1 β extracellulaire. Le traitement des crises repose quant à lui sur l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdien et de corticoïdes dans le but de diminuer l'intensité des symptômes et la durée des crises (149).



Figure 25 : Rash persistant de l'enfant dans le cadre de NOMID/CINCA (148)
(<http://www.nomidalliancefr.org/nomid.php>)

De manière similaire, l'hyper-activation de l'inflammasome NLRP3 est impliqué dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, le diabète, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ou la goutte (10,113,150).

d. Inflammasome NLRP3 comme cible thérapeutique

Considérant son implication dans les maladies inflammatoires, l'inflammasome NLRP3 est la cible d'inhibiteurs, actuellement en développement. Dans un modèle d'Alzheimer murin, l'administration de JC-124 un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3, a montré une réduction des dépôts de β -amyloïde, encourageant le développement de cette cible comme traitement anti-Alzheimer (151).

L'inhibiteur CY-09 a montré des résultats très encourageants dans la prévention de la mortalité néonatale de modèles murins atteints de CAPS ainsi que dans le traitement des désordres métaboliques (résistance à l'insuline, méta-inflammation et hyperglycémie) de souris diabétiques (152). D'autres inhibiteurs ont également montré une réduction de l'inflammation colique et de la neuroinflammation (153,154).

De vieilles molécules comme la colchicine se sont également révélées inhibitrices de l'inflammasome NLRP3, ouvrant de nouvelles perspectives d'indications thérapeutiques dans l'inhibition de l'inflammation associée à l'athérosclérose (155–157).

Récemment, des études de conception moléculaire structurelle ont montré que les analogues du benzène sulfonamide présentaient une activité inhibitrice de l'inflammasome NLRP3, encourageant leurs développements comme potentiels candidats médicaments (158).

La recherche de nouvelles thérapeutiques anti-inflammatoires s'oriente également vers un blocage d'autres signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3. Comme mentionné précédemment, les récepteurs purinergiques font partie des acteurs important dans l'activation de cet inflammasome. Ainsi, l'exploration de la voie NLRP3-récepteurs purinergiques et le blocage de celle-ci ouvre des perspectives thérapeutiques encore balbutiantes.

III. Récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont des récepteurs aux nucléotides extracellulaires, situés au niveau membranaire de la cellule. Ils sont présents de manière ubiquitaires, même si chaque sous-type de ces récepteurs possède une localisation préférentielle (14).

III.1. Classification

Les récepteurs purinergiques sont classés en deux familles selon des critères génétiques et pharmacologiques : Les récepteurs P1, qui sont sélectifs de l'adénosine, et les récepteurs P2, activés par les nucléotides, majoritairement ADP et ATP (159). Une sous classification des récepteurs P2 sépare les récepteurs P2Y comme récepteurs métabotropes couplés à la protéine G, et les récepteurs P2X comme récepteurs canaux ionotropes (Figure 26) (160).

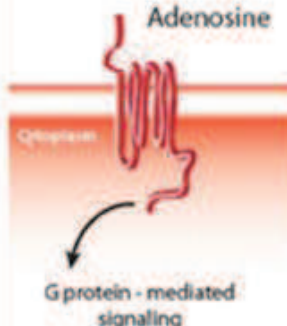
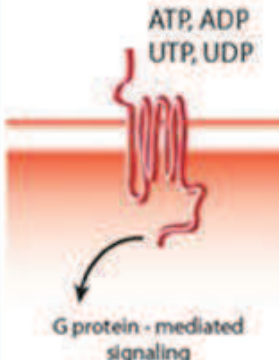
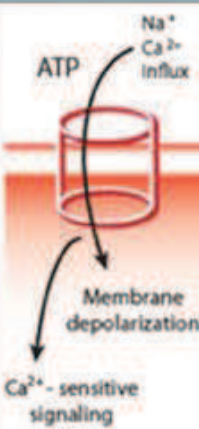
Purinergic Receptors			
Family	Adenosine/P1 receptors (P1Rs)	P2 receptors (P2Rs)	
Subfamily	-	P2Y	P2X
Receptor Subtypes	A1, A2A, A2B, A3	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14	P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7
Structure	G protein-coupled receptors	G protein-coupled receptors	Ligand-gated ion channels
Ligands	 Adenosine Cytoplasm G protein - mediated signaling	 ATP, ADP UTP, UDP G protein - mediated signaling	 ATP Na⁺ Ca²⁺ influx Membrane depolarization Ca²⁺ - sensitive signaling

Figure 26 : Classification des récepteurs purinergiques (161)

III.2. Les récepteurs P2

a. Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont divisés en 8 sous-types (P2Y₁₋₂₋₄₋₆₋₁₁₋₁₂₋₁₃₋₁₄), et sont tous couplés aux protéines G. Ces récepteurs peuvent être activés par de nombreux ligands nucléotidiques : ATP, ADP, UTP, UDP ou UDP-glucose (161). Ces récepteurs exercent des rôles très variés en fonction de leurs localisations cellulaires.

Les récepteurs P2Y₁ sont impliqués dans la vasodilatation et la prolifération des cellules endothéliales (162). Les récepteurs P2Y₂ jouent quant à eux un rôle important dans la neuro-protection et l'activation de la réponse immunitaire innée (163).

Par ailleurs, les récepteurs P2Y₁₂ exercent un rôle important dans l'activation plaquettaire, tandis que les récepteurs P2Y₁₃ seraient impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol et du glucose, dans l'homéostasie osseuse, la neuro-protection et la transmission de la douleur (164). Enfin, les récepteurs P2Y₁₄, principalement présent dans le tissu adipeux, jouent un rôle dans les fonctions neuro-immunes et le chimiotactisme (162).

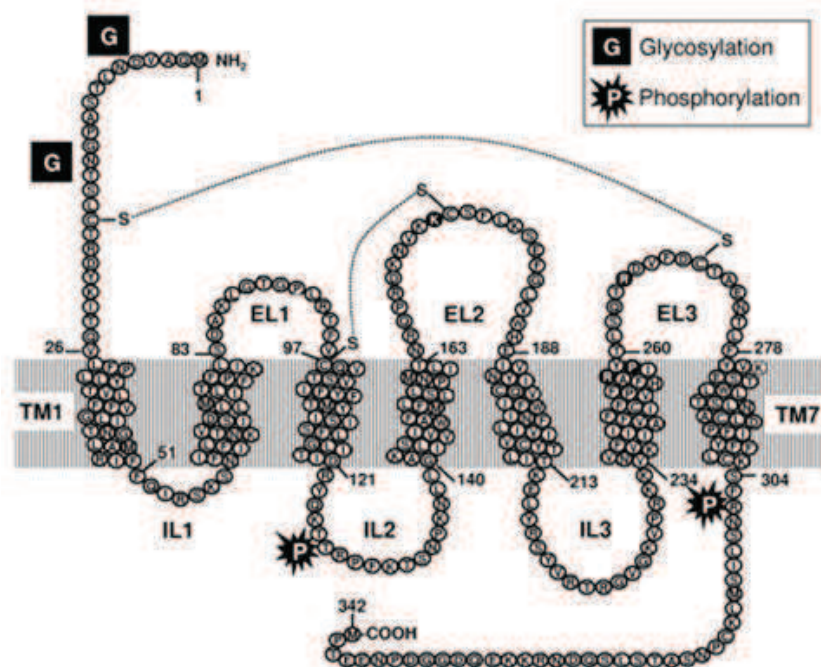


Figure 27 : Représentation schématique du récepteur P2Y₁₂ (165)

b. Les récepteurs P2X

Les récepteurs purinergiques P2X sont des récepteurs canaux divisés en 7 sous-types ($P2X_1$ - $P2X_7$), et dont l'ATP est le seul ligand physiologique (161). Ces sept sous types comprennent entre 379 et 595 acides aminés, partageant 35 à 54% d'homologie de séquence (166).

Les récepteurs canaux P2X fonctionnels sont des homo-multimères ou hétéro-multimères formés par l'association d'au moins 3 sous-unités (162). Ainsi, il a été montré par des études de co-immunoprécipitation que les récepteurs $P2X_4$ et $P2X_7$ pouvaient s'associer en hétéro-trimères (167). Par ailleurs, au moins 3 molécules d'ATP doivent se fixer sur la partie extracellulaire de ces récepteurs afin de les activer (168).

Lors d'une stimulation prolongée par l'agoniste, les P2R peuvent augmenter leur perméabilité par changement conformationnel et former un canal cationique non sélectif permettant le passage aux ions de grande taille (169).

L'activation des récepteurs P2X peut être suivie d'une période réfractaire, ou de désensibilisation. Ainsi, un regroupement des récepteurs P2X est classiquement réalisé en fonction de l'affinité des agonistes et de la capacité de désensibilisation. Les récepteurs $P2X_7$ sont les seuls à montrer une très faible désensibilisation et une faible affinité pour l'ATP (162).

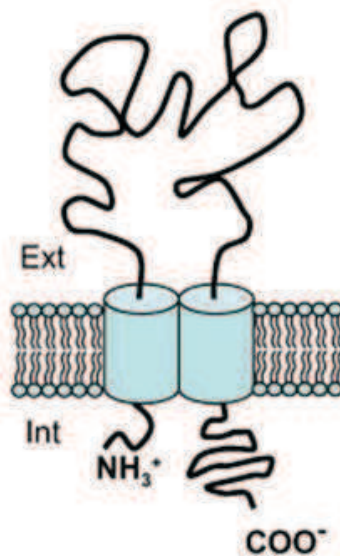


Figure 28 : Représentation schématique d'une sous unité d'un récepteur P2X (170)

A l'instar des récepteurs P2Y, les PXR exercent des rôles très variés en fonction de leurs localisations cellulaires et de la nature des trimères. Le récepteur P2X1 est impliqué dans la contraction du muscle lisse, et l'activation plaquettaire tandis que P2X2R et P2X3R sont impliqués dans la signalisation de la douleur, et les neurotransmissions intestinales ou cérébrales (166).

Parmi les P2XR, les récepteurs P2X1, P2X4 et P2X7 sont les plus exprimés chez les macrophages, et constituent donc des cibles privilégiées dans l'étude des récepteurs purinergiques dans cette population cellulaire (171). De plus, les deux récepteurs les plus impliqués dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire sont les P2X4R et les P2X7R (14).

L'objet du travail présenté dans ce manuscrit étant porté sur les macrophages, seules les fonctions des récepteurs purinergiques exprimés chez cette population cellulaire seront présentées.

(i) Le récepteur P2X1

Dans la réponse inflammatoire, le récepteur P2X1 est principalement impliqué dans le chimiotactisme et la motilité cellulaire (172). Par ailleurs, ce récepteur pouvant former des hétéromères avec les récepteurs P2X4, il devient particulièrement intéressant dans l'étude des récepteurs purinergiques au sein des populations cellulaires du système immunitaire (167).

(ii) Le récepteur P2X4

Comme mentionné précédemment, les récepteurs P2X4 peuvent se polymériser avec d'autres sous-unités de P2XR, donnant des homo ou hétéro-trimères (162,173). Après stimulation par l'ATP, le récepteur P2X4 forme un canal perméable aux ions Ca^{2+} et K^{+} .

Du fait de la diminution de concentration intracellulaire de K^{+} qu'il entraîne, ainsi que l'activation de la sécrétion d'IL-1 β , ce récepteur jouerait un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (174). Une étude de Sakaki H et al. (2013) suggère d'ailleurs que le récepteur P2X4 est nécessaire pour la sécrétion d'IL-1 β dépendante de P2X7R dans des cellules dendritiques de moelle osseuse de souris (175).

C'est les macrophages, P2X4R est principalement impliqué dans la modulation de l'inflammation bien qu'il soit impliqué dans les douleurs neuropathiques chroniques et le contrôle de la contraction cardiaque dans d'autres types cellulaires (166,176).

(iii) *Le récepteur P2X7*

Le récepteur P2X7 est le mieux décrit des récepteurs P2XR, notamment pour son rôle dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ce récepteur est d'ailleurs retrouvé dans toutes les cellules du système immunitaire, notamment les macrophages (177). De nombreuses fonctionnalités lui sont attribuées, comme l'inflammation au travers du relargage de cytokines pro-inflammatoires (166,178), la prolifération cellulaire (179), la migration et l'invasion (180), le métabolisme (181), l'autophagie (182), et la mort cellulaire (183).

A l'instar de P2X4R, l'activation de P2X7 peut aboutir à la formation d'homo ou hétéro-trimères, formant un canal ionique permettant le passage d'ions et de molécules à poids moléculaire élevé (184). Cependant, P2X7R peut également activer de nombreuses voies de signalisation intracellulaire comme l'activation de plusieurs kinases ou la génération de stress oxydant (185,186). La fixation d'ATP stimulerait ainsi un efflux rapide potassique et la production de ROS, aboutissant notamment à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (185,187,188).

c. Pathologies associées

Décortiquer le rôle des récepteurs purinergiques a permis de mettre en évidence leur implication dans le développement de certaines pathologies. Récemment, les récepteurs P2Y6 ont été reliés au développement de la fibrose pulmonaire (189) et P2X7R a été incriminé dans la maladie de Parkinson, l'hypertension artérielle pulmonaire, les allergies, le diabète de type 2, la neuroinflammation, la fibrose pulmonaire et hépatique, ou encore la stéatose hépatique qu'elle soit liée à l'alcool ou non (153,190–196). De plus, une forte expression des récepteurs P2X7 semble constituer un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer colorectal (197).

En cancérologie, l'implication des récepteurs P2X7R, en particulier leur surexpression, est incriminée dans la physiopathologie des cancers du côlon, pancréas, œsophage, sein et prostate (197–202).

d. Récepteurs purinergiques P2 comme cible thérapeutique

L'identification du rôle de chaque sous type de récepteur purinergique et leur implication dans des processus physiopathologiques a permis le développement de médicaments actuellement sur le marché. Le clopidogrel, le prasugrel, ou le ticagrelor, antagonistes des récepteurs P2Y₁₂, indiqués notamment dans la prévention des événements thromboemboliques en post syndrome coronarien aigue, en sont l'exemple parfait (203).

Le diquafosol, agoniste des récepteurs P2Y₂ commercialisé en Asie, est quant à lui utilisé dans le traitement le syndrome de l'œil sec (204). En parallèle des médicaments ayant obtenu leur AMM, beaucoup de molécules ciblant les récepteurs purinergiques sont actuellement en développement.

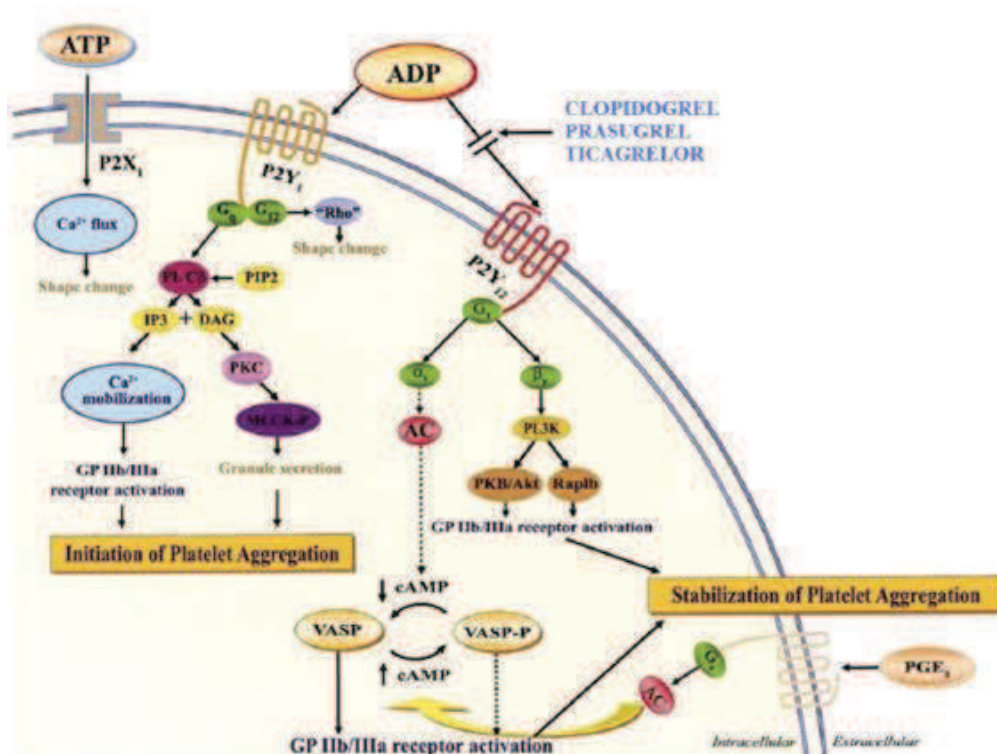


Figure 29 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de P2Y₁₂ (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor), comme antiagrégant plaquettaire.
(<https://reanesth.chu-bordeaux.fr>)

Dans le domaine de la neurologie, la découverte du rôle de l'inflammation et des lésions associées au niveau neuronal et glial dans les maladies neurodégénératives, a conduit à tester des antagonistes de récepteurs purinergiques. Ainsi, des antagonistes de P2X7R ont montrés des résultats encourageants dans la maladie de Parkinson tandis que le blocage des récepteurs P2X7, P2Y4 et P2Y1 semble prometteur dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (205–210). Les récepteurs P2X3 montrent quant à eux un intérêt grandissant dans le traitement des migraines, et des douleurs neuropathiques (211,212).

L'arsenal thérapeutique des maladies cardiovasculaires présente également de potentiels nouveaux candidats médicaments ciblant les récepteurs purinergiques. Le A740003, antagoniste de P2X7R, réduit de manière expérimental les symptômes de myocardite auto-immunes (213). De manière similaire, la modulation des récepteurs purinergiques est fortement étudiée dans les pathologies respiratoires comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, la toux chronique et la fibrose pulmonaire (214).

Aucun domaine ne semble donc délaisser l'étude des récepteurs purinergiques, notamment aux vues des recherches dans les troubles génito-urinaires de l'homme incluant les troubles érectiles (215).

L'intérêt majeur de ces antagonistes semble toutefois se dessiner dans les nouvelles thérapeutiques des pathologies inflammatoires. En gastro-entérologie, l'antagoniste A438079 de P2X7R a montré une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et une atténuation des colites chez la souris (216). Par ailleurs, P2X7R est surexprimé dans la muqueuse inflammée des patients atteints de maladie de Crohn. Fort de ce constat, il n'est pas étonnant que l'AZD9056, un autre anti-P2X7R, se soit révélé efficace dans l'obtention de rémissions et l'augmentation du taux de réponse de patients atteint de maladie de Crohn (217,218).

Au-delà des molécules antagonistes classiques en pharmacologie, des biothérapies ciblant ces récepteurs commencent à être utilisées. Le mAb12D4, un anticorps anti-P2X3 et P2X2/3 semble présenter des résultats intéressants dans un modèle d'hypersensibilité viscéral (219).

Au niveau hépatique, les hépatocytes, les cellules stellaires et les cholangiocytes expriment des récepteurs purinergiques sur leur membrane plasmique, rendant intéressant la modulation de ces derniers, en particulier dans des situations pathologiques (220). En 2007, Dranoff et al, ont ainsi montré qu'un traitement par un antagoniste des récepteurs P2R inhibait la prolifération des cellules stellaires et prévenait le développement de la fibrose hépatique (221).

Bien que le lien récepteurs purinergiques et inflammasome NLRP3 soit actuellement établi dans la physiopathologie de la fibrose hépatique, il reste des zones d'ombres quant à de potentiels modulateurs jouant un rôle en amont (222). On peut dès lors concevoir que des substances exogènes puissent moduler les récepteurs purinergiques, initiant ou accélérant le processus physiopathologique.

Bien que l'éthanol soit connu comme pro-fibrosant par de multiples mécanismes décrits précédemment, aucun lien n'est encore démontré quant à l'effet de l'éthanol sur les récepteurs purinergiques. Le but des expériences décrites dans ce manuscrit est d'étudier les effets de cet alcool sur la voie de signalisation récepteurs purinergiques - inflammasome NLRP3 chez les macrophages.

Chapitre 3 : Partie expérimentale

I. Introduction

Dans le but d'étudier les effets de l'éthanol sur la voie de signalisation récepteurs purinergiques – inflammasome NLRP3, nous avons utilisé un modèle de macrophages issus de cellules du sang périphérique de donneurs sain humain. A partir de données de la littérature, nous avons choisi deux stimulateurs de l'inflammasome NLRP3 : Les cristaux d'acide urique (MSU) et un analogue de l'ATP sélectif des récepteurs purinergiques P2X7 : le BzATP.

Les macrophages stimulés ont ensuite été exposés à différentes concentrations d'éthanol, dans le but d'étudier les effets de cet alcool sur l'inflammasome NLRP3. Les résultats obtenus nous ont par ailleurs permis de valider le modèle de macrophage utilisé, en regard des données de la littérature. L'effet de l'éthanol sur les niveaux de sécrétion de cytokines, d'expression d'ARNm et des protéines des récepteurs purinergiques a également été analysé.

La partie expérimentale de ce travail a pu être valorisée et acceptée pour publication dans le journal scientifique *Fundamental and clinical pharmacology*. Le texte intégral de cet article est par ailleurs présent à la fin de ce manuscrit, à la suite des références bibliographiques.

II. Matériel et méthodes

II.1. Préparation des cristaux d'acide urique

Les cristaux d'acide urique (monosodium urate = MSU), destinés à activer les macrophages utilisés dans nos expériences, ont été préparés par recristallisation à partir d'acide urique. Ces cristaux ont été obtenus en dissolvant 1.68mg d'acide urique dans 500mL de NaOH 0.01M préchauffé à 70°C (pH 7.1-7.2).

La solution a été agitée de manière douce et continue à température ambiante jusqu'à formation des cristaux. Les cristaux d'acide urique obtenus ont été lavés deux fois par de l'éthanol 100%, séchés, autoclavés et pesés en conditions stériles. Enfin, les cristaux sont ensuite resuspendus dans du PBS par sonication et un contrôle visuel est réalisé au microscope comme décrit dans la littérature (171,223).

II.2. Isolement de cellules mononucléées du sang périphérique

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées d'un concentré leuco-plaquettaire non thérapeutique ("Buffy-Coat") d'un donneur sain après centrifugation sur un milieu polysucrose – métrizoate de sodium dans des tubes UNI-SEP® U-10 (Novamed®).

Les échantillons sont dilués au demi dans du tampon phosphate salin (PBS) isotonique, déposés dans les tubes UNI-SEP® et centrifugés à 1500 g, 20 minutes sans frein à 20°C (Figure 30).

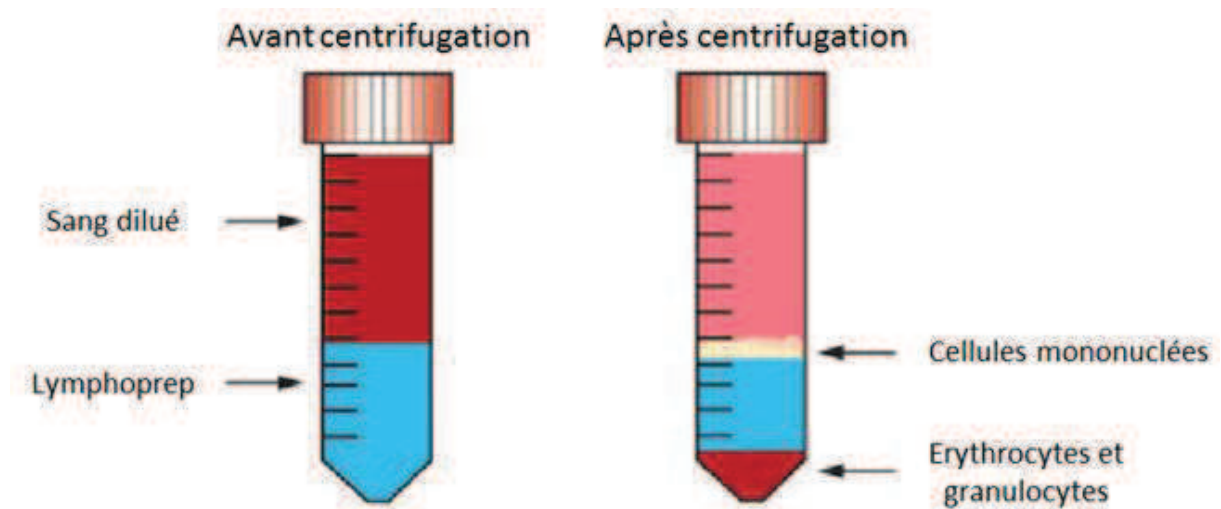


Figure 30 : Séparation des cellules mononucléées du sang par gradient de densité, à l'aide des tubes UNI-SEP®

L'anneau de cellules mononucléées, présent à l'interface entre le plasma et la solution de polysucrose est prélevé et déposé dans un tube conique contenant 40 mL de PBS. Après centrifugation pendant 10 minutes à 450 g, le culot cellulaire est lavé une seconde fois dans du PBS. Les trois dernières centrifugations sont réalisées pendant 15 minutes à 160 g afin d'éliminer les plaquettes.

II.3. Sélection d'une population monocyttaire : Enrichissement en monocytes humains

Dans cette technique, les cellules sont marquées puis triées grâce à des anticorps couplés à des microbilles magnétiques. Les cellules mononucléées provenant de donneurs sains sont centrifugées 10 minutes à 450 g, remises en suspension par 80 μ L de solution tampon (PBS, BSA 0,5%, EDTA 2 mM) pour 10^6 cellules et incubées en présence d'anticorps anti-CD14+ couplés à des microbilles magnétiques (human CD14 Microbeads®) pendant 15 minutes.

Les cellules sont lavées par centrifugation dans 15mL de tampon puis resuspendues dans la solution tampon et séparées magnétiquement sur la colonne (LS Miltenyi Biotec) posée sur un aimant (QuadroMACS® Separators, Miltenyi Biotec). Après avoir déposé la suspension cellulaire, la colonne, préalablement rincée avec 3 mL de tampon, est éluée trois fois par 3 mL de tampon.

La fraction non marquée par les anticorps n'est pas retenue par l'aimant sur la colonne. Après séparation de l'aimant, elle est éluée par 5 mL de tampon à l'aide d'un piston, les cellules marquées CD14+ sont collectées.

II.4. Culture cellulaire

a. Mise en culture des cellules

Les monocytes sont mis en culture à $0,5 \cdot 10^6$ cellules/mL dans des plaques 24 puits (BD Falcon®). A J0, les cellules sont cultivées en présence de milieu de culture RMPI supplémenté à 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) ainsi que du Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) à une concentration de 50ng/mL permettant la différenciation des monocytes en macrophages.

A J3, le milieu est changé au 1/3 avec ajout de GM-CSF à 50 ng/mL dans du milieu de culture. La différenciation complète des monocytes en macrophages est obtenue à J7 (Figure 31). Ces cellules sont ainsi appelées macrophages dérivés de monocytes (MdMs).

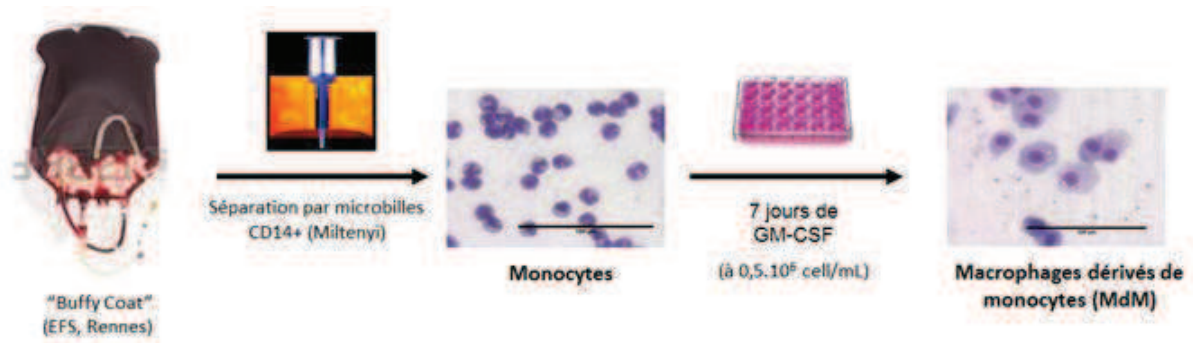


Figure 31 : Protocole d'obtention des macrophages dérivés de monocytes humains à partir d'une poche de sang

b. Traitement des cellules

A J7, le surnageant des MdMs est aspiré et les prétraitements par 1mL de LPS à 100ng/mL sont laissés 18h. Les surnageants sont ensuite aspirés et les traitements par 6h de MSU ou de 3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl ATP (BzATP) sont débutés. L'éthanol est laissé 7 h ou 48 h en présence des différents traitements, comme présenté en figure 32.

En fin de période de traitement, les surnageants sont stockés à -20°C afin de minimiser les risques de dénaturations des molécules d'intérêt, à savoir les cytokines pro-inflammatoires. Les cellules sont conservées pour être utilisées, soit dans le cadre d'un test de viabilité cellulaire, soit pour l'étude de l'ARNm, soit pour l'étude des protéines membranaires par cytométrie en flux (CMF).

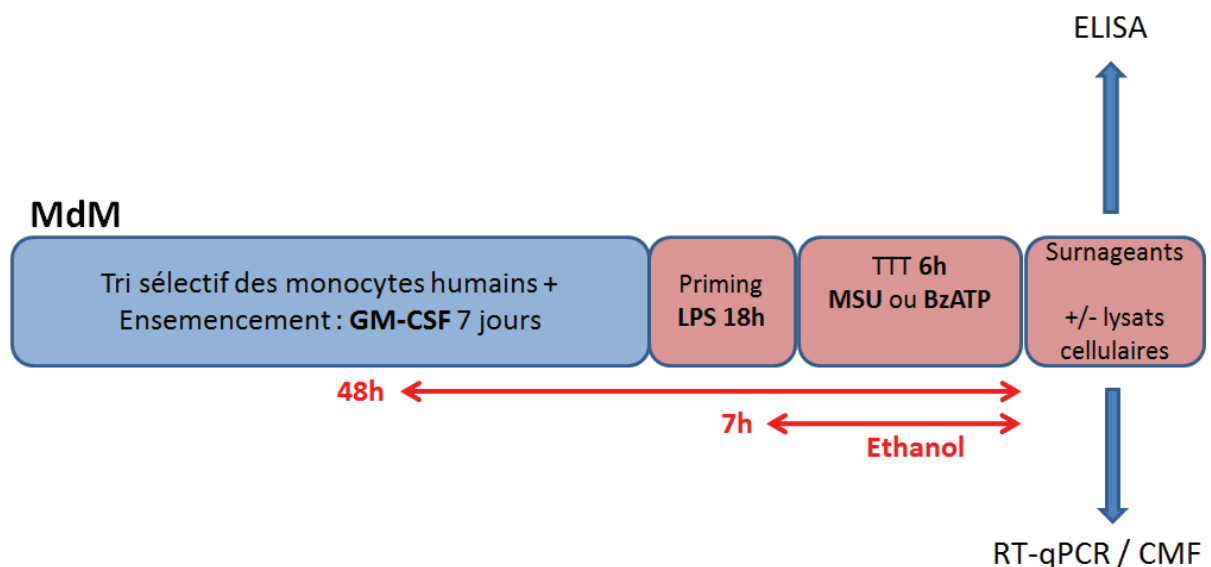


Figure 32 : Protocole de culture et traitement cellulaire des MdMs

II.5. Analyse cellulaire

a. Observation et numération cellulaire

Les numérations cellulaires ont été établies sur hématimètre de Malassez. L'observation, la photographie et le comptage ont été effectués au microscope optique couplé un appareil photo (Alphaspot-2 YS - NIKON®).

b. Mesure de la viabilité cellulaire

La mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée par un test MTT. Ce test se base sur l'activité de la succinate deshydrogenase, une enzyme mitochondriale qui transforme le MTT jaune (3-[4-5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) en cristaux insolubles de formazan de couleur violet.

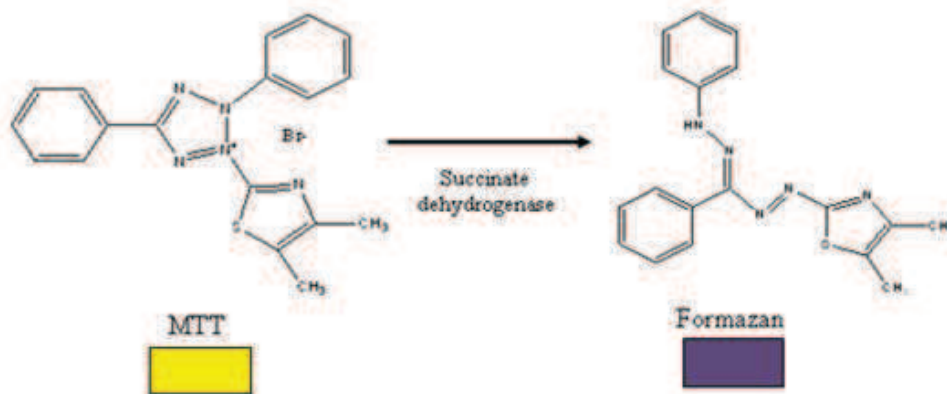


Figure 33 : Principe du test MTT

Transformation du MTT (jaune) en cristaux de formazan (violet) par l'action de la succinate deshydrogénase, enzyme mitochondriale.

La quantité de cristaux de formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrométrie à 540nm au POLARstar Omega® (BMG Labtech®) après dissolution dans du DMSO, et est corrélée à l'activité mitochondriale. Par conséquent, une mort cellulaire provoquera une diminution de l'intensité de la couleur violette, voire une couleur jaune en cas de mort de toute la population cellulaire.

c. Mesure de l'expression d'ARNm par RT-qPCR

La mesure de l'expression des gènes a été réalisée par RT-qPCR. Cette technique consiste à extraire les ARNm des cellules, les transcrire en ADNc, puis amplifier ces derniers à l'aide d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Figure 34). Le nombre de cycle de PCR réalisé permet ainsi de quantifier l'expression des gènes de manière indirecte.

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir des cellules grâce au kit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNAII, selon les instructions du fournisseur. La quantité et la qualité d'ARN total a été mesurée par spectrophotométrie UV en utilisant un NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific®). Les ARN sont conservés à -80°C afin d'éviter leur dénaturation. La quantification d'ARNm a ensuite été réalisée par RT-qPCR.

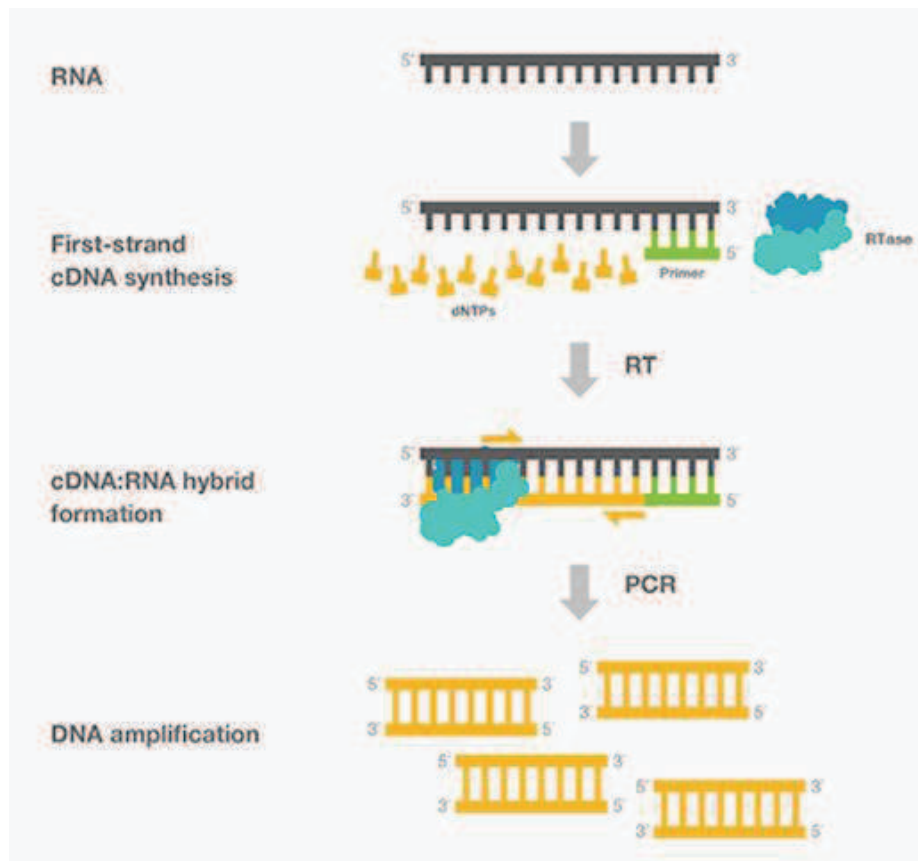


Figure 34 : Principe de la RT-qPCR

Rétrotranscription (RT) d'ARNm (RNA) en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une rétrotranscriptase, puis amplification du gène obtenu par PCR
(<https://www.thermofisher.com/fr>)

L'étape de transcription inverse a été réalisée à l'aide d'un kit «high Capacity cDNA Reverse Transcriptase » de Thermo Fisher Scientific®. Les échantillons ont été déposés en triplicat sur plaque 384 puits ABI PRISM (Applied Biosystems®) et les qPCR ont été réalisées à l'aide du thermocycleur ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems®). Le « rapporteur » fluorescent utilisé était le SYBR Green I (SYBR Green I PCR Master Mix, Applied Biosystems®).

Les résultats obtenus ont ensuite été analysés grâce au logiciel de traitement des données fourni avec l'appareil (Step One Plus Software en thermocycleur Step One plus et SDS Software en thermocycleur ABI PRISM 7900HT) (Applied Biosystems®).

II.6. Dosage immuno-enzymatique dans les surnageants de culture cellulaire

Le dosage des cytokines dans les surnageants cellulaires a été réalisé par technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Cette technique immuno-enzymatique permet de visualiser une réaction antigène anticorps grâce à une réaction colorée.

L'anticorps de capture, déposé sur une plaque pour ELISA (96 puits, EIA/RIA, Costar®) fixe la protéine qui lui est spécifique. Celle-ci est reconnue par l'anticorps de détection couplé à la biotine, ce qui permet la liaison avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort. Cette enzyme catalyse la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) permettant l'oxydation du substrat, le tétraméthylbenzidine (TMB), en son produit coloré.

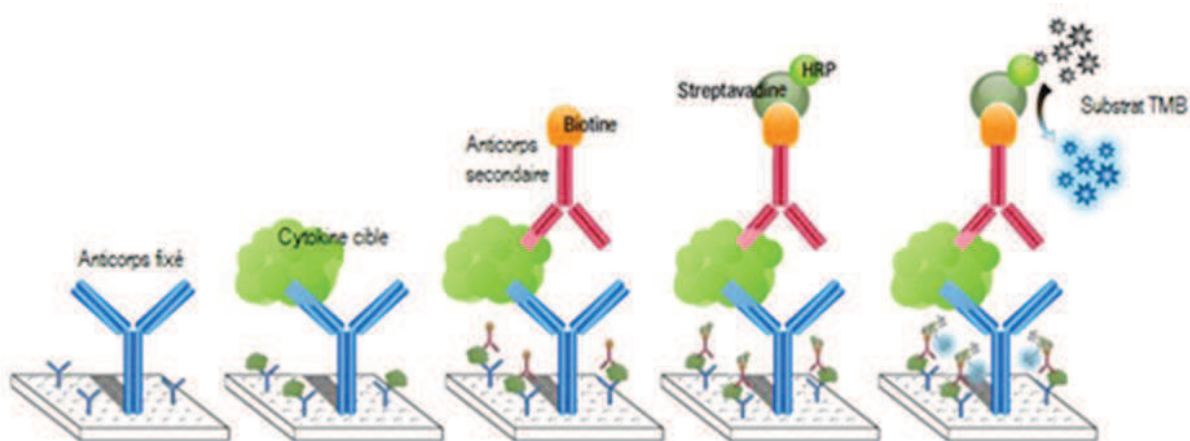


Figure 35 : Principe de la technique ELISA

L'intensité de coloration, détectée par spectrophotométrie, permet d'estimer la concentration de la protéine d'intérêt dans le surnageant de culture, par comparaison à une gamme étalon. Le lecteur de microplaque POLARstar Omega® (BMG LABTECH®) permet l'analyse grâce au logiciel MARS (BMG LABTECH®).

Les cytokines IL-1 β , IL-1 α et IL-6, présentes dans les surnageants de culture des macrophages sont dosées par cette méthode ELISA grâce à des Kits Duoset® ELISA Development system (R&D System®).

II.7. Détection des récepteurs P2X4 et P2X7 sur les MdMs en cytométrie de flux

Afin de détecter les récepteurs P2X4 et P2X7 sur la membrane plasmique des MdMs, nous avons utilisé la cytométrie en flux. Cette technique permet de faire défiler les cellules à travers un faisceau laser, permettant ainsi leur analyse. En fixant un anticorps couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (anticorps FITC) sur les récepteurs purinergiques, l'intensité de fluorescence recueillie par le système informatique permet une quantification de ces récepteurs.

Les cellules sont détachées des puits avec de la trypsine et rincées deux fois avec du PBS avant d'être fixées 10 min par du paraformaldehyde 4% tamponné au PBS. Le paraformaldehyde est enlevé et les MdMs sont resuspendus dans du PBS supplémenté à 2.5% par du sérum de lapin dans le but de bloquer les sites non spécifiques. Les isotypes contrôles des immunoglobulines, ainsi que les anticorps primaires P2X4R et P2X7R sont dilués au 1/100, 1/100 et 1/75 respectivement avant d'y incuber les cellules pendant 1 heure.

Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire conjugué FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) dilué au 1/100 puis sont analysés par cytométrie de flux (BD LSRFortessa™ X-20 cell analyzer / BD FACSDiva™ software). Les MdMs ont d'abord été contrôlés en fonction de leurs profils de diffusion, puis définis avec P2X4R+ et P2X7R+. Le logiciel Software FlowLogic 7.2.1 a été utilisé pour l'analyse des résultats (Inivai Technologies).

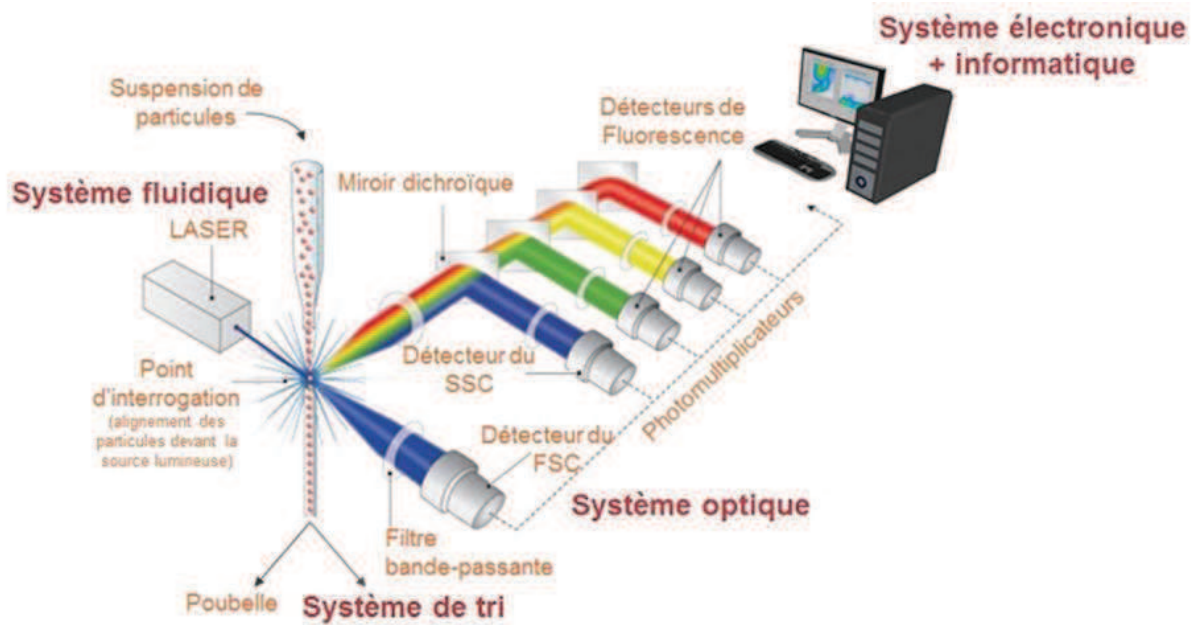


Figure 36 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux
(<http://www.univ-reims.fr/site/plateaux-techniques>)

II.8. Analyse statistique

Les données sont présentées sous la forme moyenne $\pm$ écart-type et ont été analysées grâce au logiciel Prism 5.0® (GraphPad Software®, La Jolla, CA). Les différences d'intergroupe en fonction des traitements ont été testées par une analyse des variances en ANOVA one-way suivi d'un post-test de Bonferroni. Les différences entre les groupes traités et non traités de RT-qPCR ont été analysées par un test de Mann et Whitney.

Pour chaque analyse, les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

III. Résultats

III.1. Effets de l'exposition de 7 heures d'éthanol sur les macrophages humains

Partant du constat que l'éthanol a déjà été montré comme inhibiteur de l'inflammasome chez des macrophages stimulé par de l'ATP, nous avons examiné si cet alcool était capable d'inhiber la sécrétion d'interleukines avec deux stimuli différents : BzATP (Figure 38) et MSU (Figure 39). Le traitement des MdMs était constitué de 18 heures de LPS suivi de six heures de traitement par BzATP ou MSU.

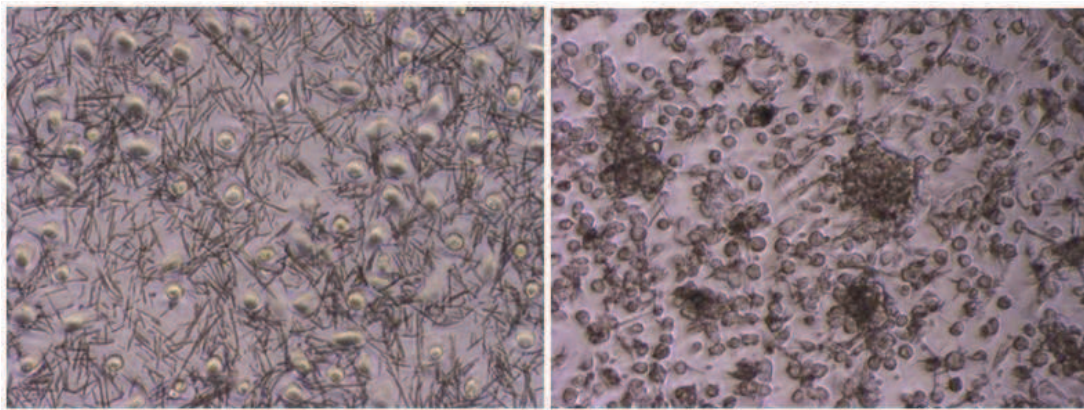


Figure 37 : Traitement des MdMs par les cristaux d'acide urique (MSU) à 0 heure (à gauche) et à six heures (à droite). Observation de la phagocytose des cristaux de MSU après six heures.

L'éthanol est incubé une heure avant le traitement par BzATP ou MSU et présent pendant toute la durée du traitement, soit sept heures au total. Les données des figures 38 et 39 représentent la moyenne $\pm$ écart type d'une expérience en triplicata représentative de trois expériences indépendantes en triplicata.

Premièrement, nous avons observé une augmentation significative de la production d'IL-1 β après traitement par LPS + BzATP et LPS + MSU comparé au LPS seul (Figures 38A et 39A). Par ailleurs, nous avons également observé qu'une exposition de sept heures d'éthanol inhibe la production d'IL-1 β chez les MdMs de manière dose dépendante, à partir de 30mM après stimulation par du BzATP et à partir de 100 mM après stimulation par du MSU (Figures 38A et 39A). La production d'IL-6 et IL-1 α est quant à elle restée inchangée (Figures 38B-C et 39B-C).

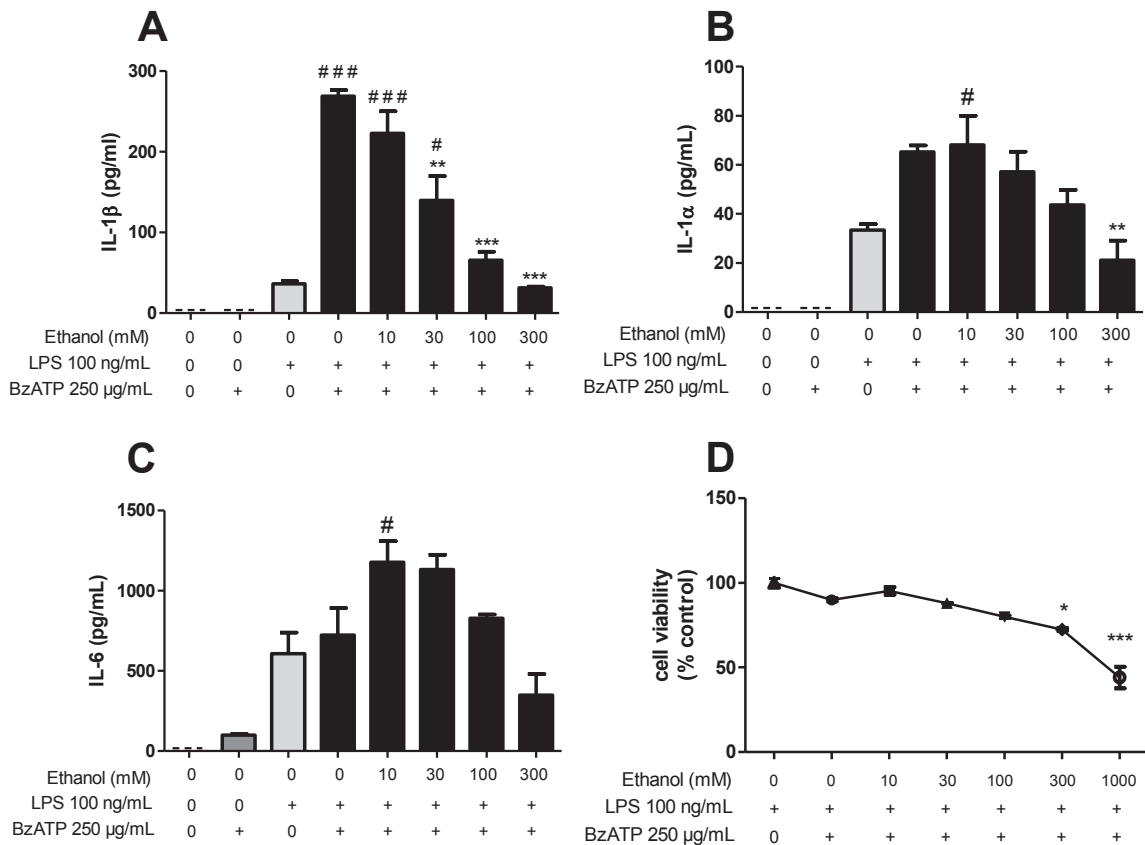


Figure 38 : Effets de sept heures d'éthanol sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de macrophages humains après stimulation par LPS + BzATP.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$: LPS + BzATP sans éthanol comparé à LPS + BzATP avec éthanol à différentes concentrations. # $p < 0.05$: LPS comparé avec LPS + BzATP avec ou sans éthanol.

La viabilité cellulaire est exprimée de manière arbitraire en pourcentage par rapport au traitement par LPS seul. Ainsi, une mort cellulaire significative était observée à partir de 300 mM d'éthanol lorsque les macrophages étaient stimulés par BzATP, et 1000 mM lorsqu'ils étaient stimulés par du MSU (Figures 38D et 39D).

Considérant que l'inhibition de la sécrétion d'IL-1 β par l'éthanol apparaît à des doses inférieures aux doses toxiques, ces résultats montrent que l'effet de l'éthanol n'est pas lié à une mort cellulaire. Par ailleurs, la diminution significative d'IL-1 α observée en présence de 300 mM d'éthanol n'a pas été prise en compte du fait d'un effet cytotoxique à cette dose. Le fait que les taux d'IL-1 α et IL-6 ne soit modifiés montre ainsi une certaine sélectivité d'inhibition de la voie de l'inflammasome NLRP3.

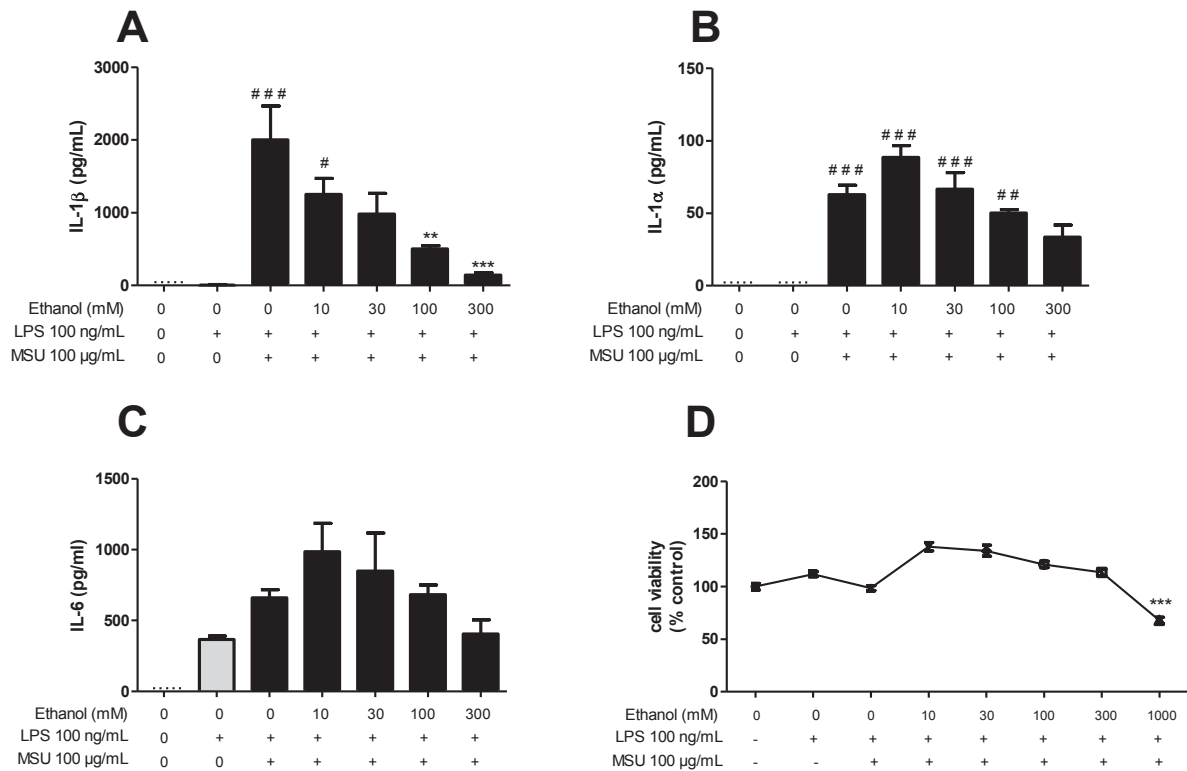


Figure 39 : Effets de 7 heures d'éthanol sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de macrophages humains après stimulation par LPS + MSU.

***p < 0.001; **p < 0.01: LPS + MSU sans éthanol comparé avec LPS + MSU avec éthanol à différentes concentrations. ## p < 0.01; ### p < 0.001 : LPS compare avec LPS + MSU avec ou sans éthanol.

III.2. Effets de l'exposition de 48 heures d'éthanol sur les macrophages humains

L'identification de la concentration d'éthanol la plus faible capable d'inhiber l'inflammasome NLRP3 nous a permis d'explorer une réponse temps-dépendant de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β et IL-6.

La sécrétion des IL-1 β , IL-1 α , et IL-6 a été évaluée par ELISA dans le surnageant de culture cellulaire des MdMs après activation par 100 ng/mL de LPS pendant 18 h suivi de six heures de MSU à 300 μ g/mL.

Après une exposition de sept heures d'éthanol à 100 mM et 300 mM, seule la sécrétion d'IL-1 β était inhibée chez les macrophages stimulés par 18 heures de LPS puis six heures de MSU à 300 μ g/mL (Figure 40). Les sécrétions d'IL-6 et IL-1 α sont restées inchangées.

Cependant, après 48 heures d'exposition à 100 mM ou 300 mM d'éthanol, la sécrétion de ces trois cytokines n'était significativement pas diminuée.

La viabilité cellulaire des MdMs incubés avec 300 mM d'éthanol pendant 48 heures a été réalisée par un test MTT après 18 heures de LPS, suivi de six heures de MSU 300 µg/mL. Aucune mort cellulaire significative n'a été observée dans ces conditions (données non présentées). Ces résultats montrent que la sécrétion de l'IL-1 β n'est plus inhibée lors d'une exposition de 48 heures d'éthanol. Les données de la figure 40 représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

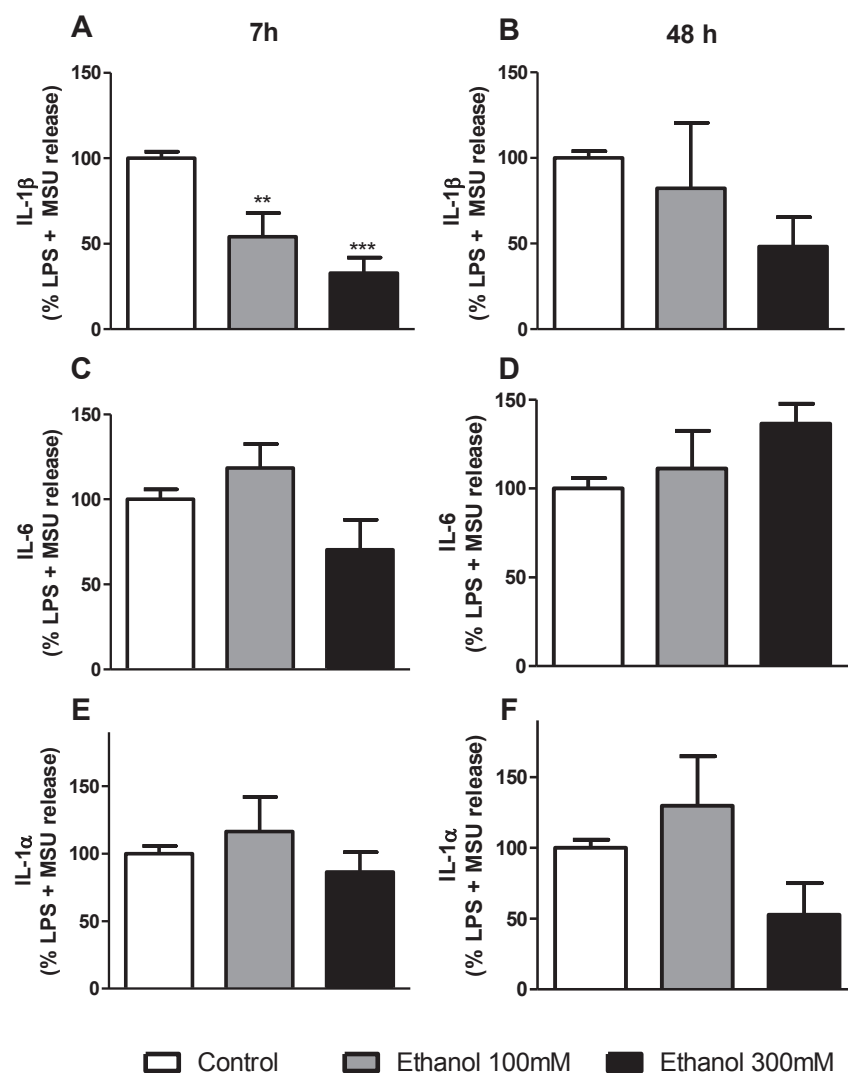


Figure 40 : Effets de sept heures et 48 heures d'éthanol sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires après traitement par LPS + MSU 300µg/mL

***p < 0.001; **p < 0.01 : LPS + MSU sans éthanol comparé à LPS + MSU avec éthanol à différentes concentrations.

III.3. Effets de l'exposition de 7 heures d'éthanol sur les gènes des interleukines pro-inflammatoires et des composants de l'inflammasome NLRP3

Afin de déterminer le mécanisme par lequel la voie de l'inflammasome NLRP3 est inhibée après sept heures d'exposition à l'éthanol et établir pourquoi cette inhibition n'était plus présente après 48 heures d'exposition à l'éthanol, nous avons mesuré l'expression d'ARNm des interleukines pro-inflammatoires ($IL-1\beta$, $IL-1\alpha$ et $IL-6$) et des composants de l'inflammasome (NLRP3, Caspase-1 et ASC).

De la même manière que précédemment, les MdMs ont été incubés pendant 18 heures en présence de LPS 100 ng/mL, suivi d'un traitement par MSU 100 μ g/L. Les lysats cellulaires ont ensuite été collectés afin d'évaluer l'expression des gènes cibles par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés avec l'expression du gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les résultats de la figure 41 représentent la moyenne $\pm$ écart type de trois expériences indépendantes en triplicats.

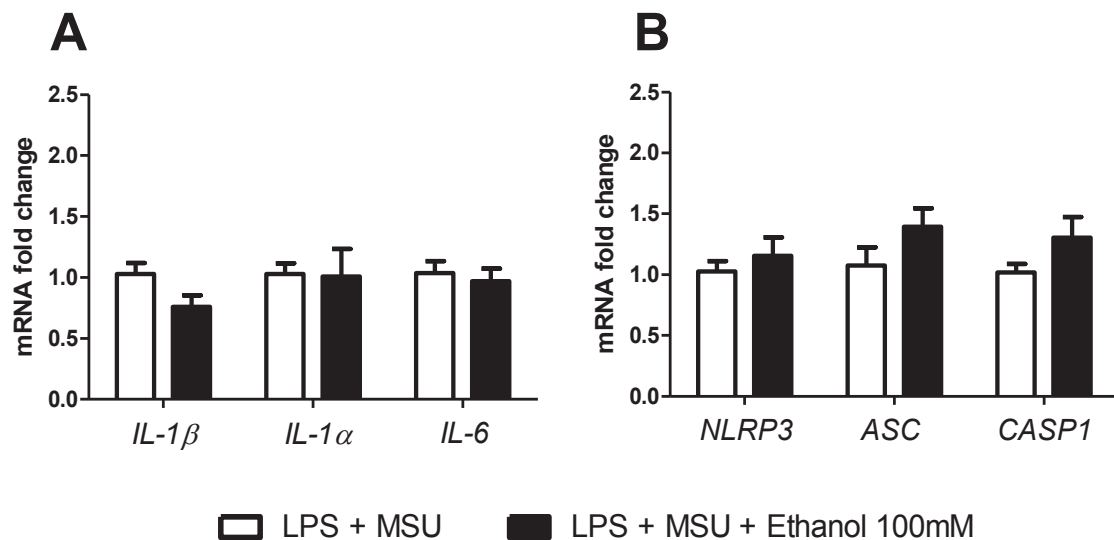


Figure 41 : Effet d'une exposition de sept heures d'éthanol sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires ($IL-1\beta$, $IL-1\alpha$ et $IL-6$) et des composants de l'inflammasome (NLRP3, CASP-1 et ASC)

Aucun changement significatif n'a été observé en comparaison du contrôle sans éthanol (Figure 41). Ces résultats montrent que les phénomènes observés après sept heures et 48 heures d'éthanol ne sont pas en lien avec une induction ou une inhibition des interleukines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-1 α et IL-6 ou des composants de l'inflammasome NLRP3.

III.4. Effets de l'exposition de sept heures d'éthanol sur l'expression des gènes des récepteurs purinergiques

Etant donné que l'inflammasome NLRP3 est notamment activé par les récepteurs P2X, nous avons étudié l'expression des ARNm des récepteurs purinergiques majoritairement exprimés chez les macrophages, à savoir P2X1, P2X4 et P2X7.

De la même manière que précédemment, les MdMs ont été incubés pendant 18 heures en présence de LPS 100 ng/mL, suivi d'un traitement par MSU 100 μ g/L ou BzATP 250mM. L'éthanol à 100 mM a été ajouté une heure avant le MSU ou le BzATP et était présent pendant toute la durée du traitement.

Les lysats cellulaires ont ensuite été collectés afin d'évaluer l'expression des gènes de ces récepteurs purinergiques par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés avec l'expression du gène de la GAPDH.

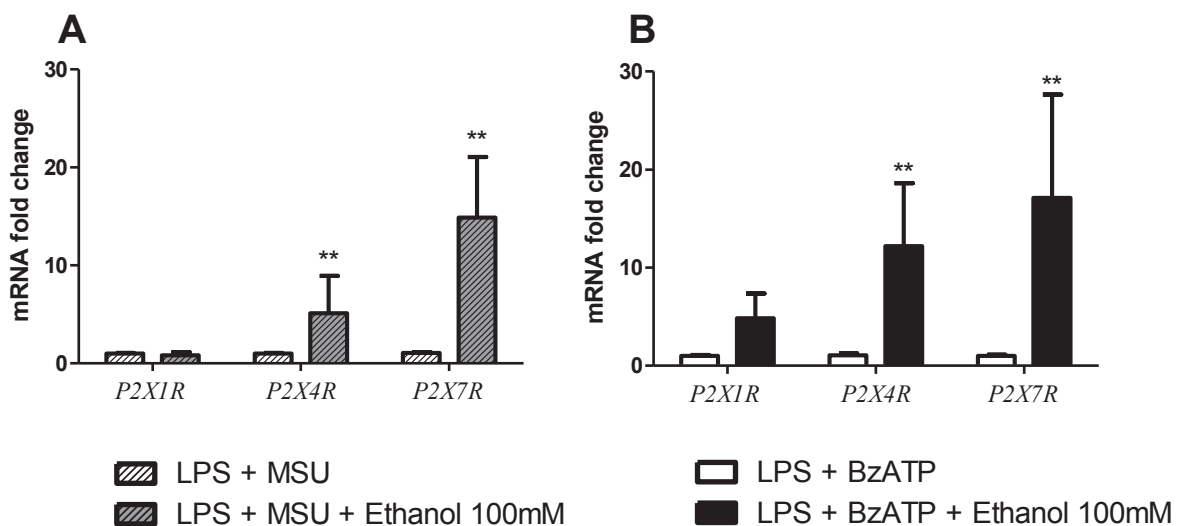


Figure 42 : Effet de l'éthanol sur l'expression des gènes de P2X1R, P2X4R et P2X7R

**p < 0.01 : LPS + MSU comparé avec ou sans éthanol

Nous avons observé que l'expression des ARNm de P2X4R et P2X7R était significativement augmentée par l'éthanol, alors que celle de P2X1R ne l'était pas. Cette induction de l'expression des gènes a été retrouvée, que les cellules soit traitées avec le MSU ou le BzATP (Figure 42A-B). Les résultats de la figure 42 représentent la moyenne $\pm$ écart type d'au moins trois expériences indépendantes en triplicats.

III.5. Effets de l'exposition aigue d'éthanol sur l'expression protéique des récepteurs purinergiques

Afin de confirmer que l'induction d'ARNm des récepteurs P2X4 et P2X7 observée correspond à une augmentation de leur expression au niveau de la surface cellulaire, nous avons utilisé la cytométrie en flux en présence ou en l'absence d'éthanol à 100 mM pendant 24 heures.

Les cellules ont été incubées avec 100ng/mL de LPS pendant 18 heures suivi de 300 μ g/mL de MSU pendant six heures. Les données de la figure 43 représentent les valeurs de fluorescence d'une expérience réalisée en triplicat.

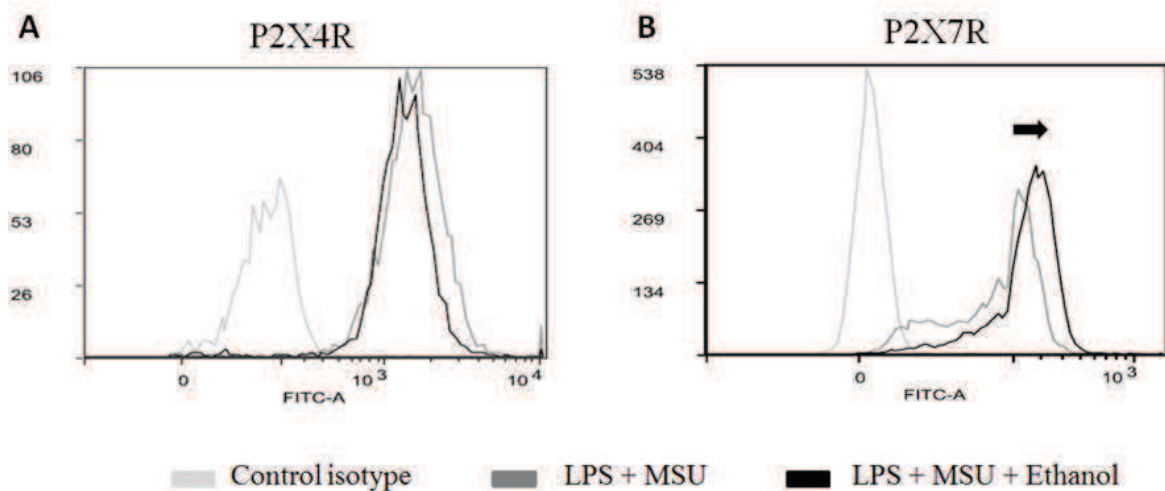


Figure 43 : L'éthanol induit l'expression des récepteurs purinergiques P2X7 chez les MdMs

Un décalage de fluorescence a été retrouvé avec P2X7R, indiquant une surexpression de ces récepteurs sur les cellules traitées par éthanol. L'expression protéique du récepteur P2X4R n'était cependant pas surexprimé.

IV. Discussion et perspectives

Il est maintenant bien établi que l'abus d'alcool est une des principales causes de processus inflammatoires pathologiques, incluant la fibrose, la cirrhose, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, le diabète de type 2 ou la neuroinflammation (7,8,224–228). Par ailleurs, l'éthanol est un facteur de risque évitable de cancers, dont le cancer du côlon (161), le carcinome hépatocellulaire (229), le cancer du sein (230), de l'oesophage, du pancréas et de la prostate (231).

Via l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 et la production de ROS, les récepteurs purinergiques sont impliqués dans la physiopathologie de maladies liées à l'éthanol comme la fibrose hépatique, le diabète de type 2, et la neuroinflammation (194–196). De plus, la surexpression des récepteurs purinergiques (en particulier P2X7R), est incriminée dans la tumorigenèse (197–202). Par conséquent, nous avons cherché à étudier un éventuel lien entre l'éthanol et la voie de l'inflammasome NLRP3 – récepteurs purinergiques.

Les résultats présentés dans ce manuscrit montrent qu'une courte exposition des MdMs à l'éthanol inhibe l'inflammasome NLRP3. Cependant cet effet inhibiteur n'était plus observé lors d'une exposition plus longue à l'éthanol. De plus, nous avons montré que l'éthanol induit l'expression des récepteurs purinergiques P2X7, connus pour être impliqués dans la physiopathologie de maladies liées à l'alcool.

Des études sur les effets immunomodulateurs de l'éthanol ont récemment mis en évidence l'implication de l'inflammasome NLRP3 (10). Cependant, l'éthanol présente un effet double sur l'inflammation, dépendant de la concentration et du temps d'exposition.

Considérant que le BzATP est le plus puissant agoniste de P2X7R disponible, nous avons décidé d'utiliser ce composé pour étudier de manière sélective l'activation de P2X7R dans la voie de l'inflammasome NLRP3. Les cristaux d'acide urique (MSU) sont également connus pour être un puissant signal de danger activant la voie de l'inflammasome NLRP3 au travers de la cathepsine B, le relargage d'ATP, et la signalisation purinergique autocrine (171).

Comme précédemment démontré, la stimulation des MdMs par LPS + BzATP provoque de manière sélective la production d'IL-1 β (232). La stimulation par LPS + MSU était quant à elle en mesure de stimuler la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-1 α et IL-6. Après stimulation par le BzATP ou le MSU, l'exposition de sept heures d'éthanol inhibait sélectivement la sécrétion d'IL-1 β (à partir de 30 mM d'éthanol pour le BzATP et 100 mM pour le MSU) mais n'affectait pas les niveaux d'IL-6 et IL-1 α (Figures 38A-C ; Figures 39A-C).

Ces résultats sont cohérents avec la publication de Hoyt et al. (2017), rapportant que l'éthanol inhibe de manière puissante et sélective la voie de l'inflammasome NLRP3 (12). Cette vue d'ensemble nous indique que notre modèle est pertinent pour l'étude de l'activation ou de l'inhibition de la voie de l'inflammasome NLRP3.

Quarante-huit heures d'exposition à l'éthanol se sont révélées suffisantes pour supprimer l'effet inhibiteur premièrement observé de sept heures d'exposition sur la sécrétion d'IL-1 β (Figure 40A-B). Cette observation montre que seulement 48 heures d'exposition à l'éthanol sont suffisantes pour promouvoir une réponse capable d'activer l'inflammasome NLRP3. Or, il été montré que les effets de l'éthanol sur la voie de l'inflammasome NLRP3 sont associés à une plus grande expression de la « nitric oxyde synthase inductible », production de NO, et dysfonction mitochondriale (générant des ROS).

De plus, les métabolites de l'éthanol (dont l'acétaldéhyde) ont été montrés comme probables activateurs de l'inflammasome NLRP3 (12). Cependant, le dosage sanguin de l'acétaldéhyde reste difficile en pratique, du fait des faibles concentrations produites après une consommation d'alcool chez l'Homme (233–235). En effet, l'acétaldéhyde est rapidement éliminé du compartiment sanguin et métabolisé en acide acétique et autres composés (27,236). Bien que la concentration sanguine en acétaldéhyde soit plus élevée chez les alcooliques chroniques comparé au non alcooliques, les concentrations plasmatiques moyennes mesurées dans ce premier groupe ne sont que de 3.74 μ M dans la littérature (237). Ces concentrations sont toujours bien plus basses que les concentrations utilisées dans les études d'activation de l'inflammasome NLRP3 (12). De plus, l'acétaldéhyde est hautement volatile en culture cellulaire à 37°C.

Considérant le fait que l'acétaldéhyde est également métabolisé par voie oxydative, il est possible que le stress oxydant en résultant soit plus impliqué que l'acétaldéhyde lui-même dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'exposition prolongée d'éthanol activait une autre voie de signalisation, supprimant ainsi les effets inhibiteurs de l'exposition de sept heures de cet alcool sur la voie de l'inflammasome NLRP3.

Les données de la littérature montrent que deux semaines d'exposition à l'éthanol sur des macrophages provoquent une hypersécrétion des composants de l'inflammasome, dont la protéine NLRP3, la caspase-1 et l'ASC (12). A l'inverse, nous avons montré dans notre modèle de MdMs que 48 heures d'éthanol ne modifiaient pas l'expression des interleukines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ainsi que les composants de l'inflammasome NLRP3, Caspase-1 et ASC (Figure 41). Ces résultats ont également été montrés sur des THP-1, une lignée cellulaire de macrophages humains (données non présentées). Ceci suggère que l'éthanol n'induit pas l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'augmentation du nombre de ce complexe intracytoplasmique. Par conséquent, il était intéressant d'étudier l'expression des protéines impliquées de l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3.

Comme mentionné précédemment, les récepteurs purinergiques sont impliqués dans l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3. Nous avons montré que l'exposition à l'éthanol est associée à une augmentation de l'expression des ARNm de P2X4R et P2X7R, mais pas de P2X1R (Figure 42). A des concentrations de 100 mM et 300 mM d'éthanol, les mêmes résultats ont été trouvés de manière dose-dépendante sur la lignée cellulaire THP-1 (données non montrées). Ces résultats ont été confirmés pour nos expériences de cytométrie en flux, où la fluorescence de P2X7R était plus intense lorsque les cellules étaient exposées à l'éthanol (Figure 43).

Etant donné que le MSU est connu pour induire l'expression de P2X7R (171), il est concevable que les effets inducteurs de l'éthanol sur P2X7R, observés en cytométrie en flux, soient masqués par les effets du MSU. Il serait donc intéressant d'évaluer l'induction de l'expression des récepteurs purinergiques après stimulation par du BzATP afin de s'affranchir des effets inducteurs du MSU.

Par ailleurs, le fait que l'augmentation des ARNm de P2X4R ne se vérifie pas au niveau protéique peut s'expliquer par les hétérotrimères formés avec P2X7R. En effet, l'étude des récepteurs purinergiques membranaires par cytométrie en flux ne permet pas de différencier des complexes. On peut ainsi imaginer qu'une augmentation de l'expression protéique d'un hétérotrimère associant deux P2X7R et un P2X4R soit mal détectée par cette technologie. Pris ensemble, ces résultats montrent que l'éthanol induit de manière indépendante l'expression du récepteur P2X7.

Pour aller plus loin, les preuves s'accumulent montrant que l'activation de P2X7R conduit à une toxicité mitochondriale, un stress oxydant et l'activation de l'inflammasome NLRP3 (185,187,188). En parallèle, la surexpression des récepteurs purinergiques a été montrée comme impliquée dans des processus physiopathologiques. Par ces expériences, nous avons montré que l'éthanol induit l'expression des récepteurs P2X7 à la surface des cellules dans un modèle de MdM (Figure 44). Il est donc concevable que l'éthanol amplifie l'inflammation et les processus physiopathologiques par des mécanismes impliquant la surexpression des récepteurs purinergiques.

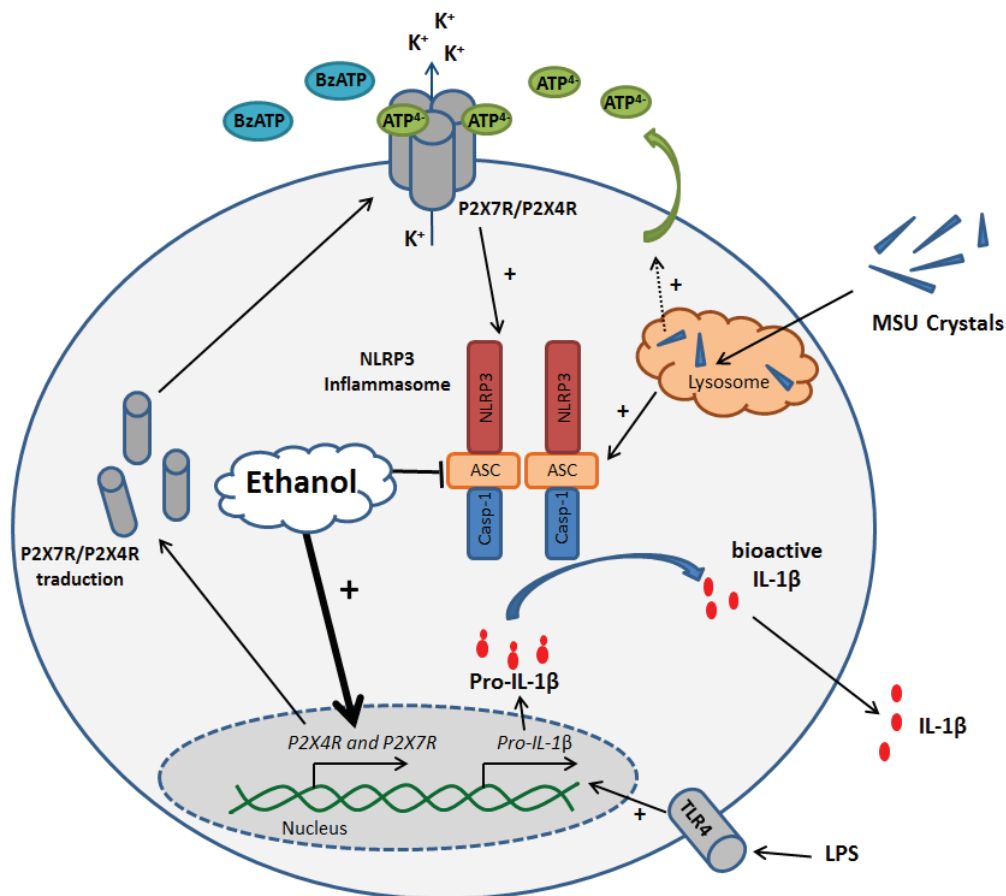


Figure 44 : Schéma récapitulatif de l'effet de l'éthanol sur les récepteurs purinergiques

Cette surexpression indique par ailleurs qu'il paraît judicieux de tester des antagonistes de cette cible présumée dans un contexte de pathologie induite par l'éthanol.

Plusieurs modèles impliquant l'éthanol sont actuellement utilisés dans le but d'observer les effets d'antagonistes de P2X7R. Dans des cellules hépatiques HepG2, il a été montré que la diminution d'expression de P2X7R et de l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 par de la dihydroquercetine réduit *in vitro* la stéatose hépatique alcoolique par une inhibition de la lipogenèse (238). De manière similaire, l'inhibition de P2X7R par du gentiopicroside améliore la stéatose hépatique alcoolique, là où la sécrétion d'IL-1 β l'aggrave (239). Dans un modèle de carotide athéromateuse *ex-vivo*, le A740003, antagoniste sélectif de P2X7R a montré une diminution de la sécrétion d'IL-1 β sans impliquer la voie NLRP3 / Caspase-1, là où des hauts niveaux de cette même cytokine étaient associés à une instabilité de la plaque d'athérome (240). Ces résultats suggèrent que P2X7R pourrait être une cible de choix dans la prise en charge de l'athérosclérose.

Dans le domaine de la neurologie, il a été montré que l'éthanol induisait de manière dose-dépendante l'expression de P2X4R et P2X7R dans des cellules de la microglie BV2 (241). En toute logique, des antagonistes de P2X7R commencent à être étudiés comme candidat médicament pour l'inhibition de la neuroinflammation (242).

CONCLUSION GENERALE

Aux vues des multiples actions de l'éthanol, aux niveaux moléculaire et somatiques, il est clair que cette molécule présente un spectre bien singulier. Dans le but d'éclairer une infime partie de ses effets, nous nous sommes concentrés sur les effets immunomodulateurs de cet alcool.

Ainsi, nous avons démontré que la voie de l'inflammasome NLRP3 était inhibée par une courte exposition d'éthanol mais sans effet observable sur cette même voie après une exposition plus longue à l'éthanol. L'induction de l'expression des récepteurs purinergiques P2X7 observée dans notre modèle de macrophages suggère par ailleurs un mécanisme de défense des macrophages, pouvant expliquer la diminution des effets inhibiteurs de l'éthanol précédemment observée.

Dès lors, nos résultats mettent en lumière un nouveau mécanisme présumé d'activation de l'inflammation dans les pathologies liées à l'alcool. Ainsi, les antagonistes de P2X7R pourraient constituer une nouvelle classe de molécules anti-inflammatoires potentielles dans le traitement des pathologies inflammatoires liées à l'éthanol.

Dans un cadre plus large d'étude de l'éthanol sur les voies de l'inflammation, et à l'instar de l'étude des mélanges en toxicologie, il serait intéressant d'évaluer les effets des boissons alcoolisées dans leur composition exhaustive. Prenant l'exemple du vin, les procyanidines contenus dans les pépins de raisin ont été démontrés comme inhibiteurs de l'inflammasome NLRP3, suggérant que certaines boissons auraient des effets bénéfiques plus marqués sur la santé (243). En clin d'œil au passé, le vin thérapeutique d'Hippocrate ou la bière thérapeutique autrefois utilisés paraissent alors moins archaïques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. National Survey on Drug Use and Health. Key Substance Use and Mental Health Indicators in the United States: Results from the 2016 National Survey on Drug Use and Health [Internet]. SAMHSA; 2016 [cité 9 août 2018]. Disponible sur: <https://www.samhsa.gov/data/report/key-substance-use-and-mental-health-indicators-united-states-results-2016-national-survey>
2. Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *The Lancet*. mars 2007;369(9566):1047-53.
3. Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Correction: actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA*. 19 janv 2005;293(3):293-4.
4. Sergeant O. Role for Membrane Fluidity in Ethanol-Induced Oxidative Stress of Primary Rat Hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 10 nov 2004;313(1):104-11.
5. Miñana J. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*. mai 2002;35(5):1205-14.
6. Nieto N. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology*. janv 2002;35(1):62-73.
7. Szabo G, Mandrekar P, Oak S, Mayerle J. Effect of Ethanol on Inflammatory Responses. *Pancreatology*. juill 2007;7(2-3):115-23.
8. González-Reimers E. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14660.
9. Dai Q, Pruett SB. Different Effects of Acute and Chronic Ethanol on LPS-Induced Cytokine Production and TLR4 Receptor Behavior in Mouse Peritoneal Macrophages. *J Immunotoxicol*. janv 2006;3(4):217-25.
10. Nurmi K, Virkanen J, Rajamäki K, Niemi K, Kovanen PT, Eklund KK. Ethanol Inhibits Activation of NLRP3 and AIM2 Inflammasomes in Human Macrophages—A Novel Anti-Inflammatory Action of Alcohol. *Catapano A, éditeur. PLoS ONE*. 11 nov 2013;8(11):e78537.
11. Hoyt LR, Ather JL, Randall MJ, DePuccio DP, Landry CC, Wewers MD, et al. Ethanol and Other Short-Chain Alcohols Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation through Protein Tyrosine Phosphatase Stimulation. *J Immunol*. 15 août 2016;197(4):1322-34.
12. Hoyt LR, Randall MJ, Ather JL, DePuccio DP, Landry CC, Qian X, et al. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. *Redox Biol*. août 2017;12:883-96.
13. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine*. sept 2014;69(1):136-45.
14. Surprenant A, North RA. Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu Rev Physiol*. mars 2009;71(1):333-59.
15. Bonnard N, Falcay M, Jargot D, Pasquier E. Ethanol – Fiche toxicologique n°48 [Internet]. Institut National de Recherche et de Sécurité; 2011 [cité 3 juill 2018]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_48§ion=bibliographieAuteurs
16. Guiraud J-P. Microbiologie alimentaire. Edition Dunod; 1998.
17. Bourgeois C., Larpent J-P. Microbiologie alimentaire. Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires – 2ème édition. Edition Tec & Doc; 1996.
18. Regnault J-P. Microbiologie générale – Vol.1. Edition Vigot;
19. Logsdon JE. Ethanol. In: John Wiley & Sons, Inc., éditeur. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2004 [cité

27. juill 2018]. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471238961.0520080112150719.a01.pub2>
20. Mills GA, Ecklund EE. Alcohols as Components of Transportation Fuels. *Annu Rev Energy*. nov 1987;12(1):47-80.
21. McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci*. 21 déc 2004;101(51):17593-8.
22. Chebli M, Rapior S, Bataille B, Chaine C. La bière : Production, Consommation et Santé Publique / Beer: Production, Consumption and Public Health. Unpublished; 2017.
23. Histoire de l'alcool [Internet]. 2007 [cité 3 juill 2018]. Disponible sur: <http://hepatoweb.com/Alcoolisme-historique.php>
24. Petite histoire de la consommation d'alcool [Internet]. [cité 4 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.stop-alcool.ch/une-substance-psychoactive/historique>
25. Science et Avenir. L'alcool a accéléré l'évolution de l'être humain ! [Internet]. 2017 [cité 4 juill 2018]. Disponible sur: https://www.sciencesetavenir.fr/archeo-paleo/l-evolution-humaine-a-ete-acceleree-par-l-alcool_112696
26. Porter R. Jean-Charles Sournia, Histoire de l'alcoolisme, Paris, Flammarion, 1986, 8vo, pp. 323, Fr. 125.00 (paperback). *Med Hist*. juill 1987;31(03):372-3.
27. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis*. nov 2012;16(4):667-85.
28. Agarwal DP, Goedde HW. Human aldehyde dehydrogenases: their role in alcoholism. *Alcohol Fayettev N*. déc 1989;6(6):517-23.
29. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med*. mars 2008;44(5):723-38.
30. Wimer W, Russel J, Kaplan H. Alcohols toxicology. Park Ridg : Noyes Data Corp; 1983.
31. Girre C, Hispard E, Tuszyński T. Toxicité de l'éthanol. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale Toxicologie-Pathologie professionnelle*. Elsevier, Paris; 1995.
32. Bismuth C, Baud F, Conso F, Dally S, Frejaville J., Garnier R. Toxicologie clinique. Médecine-Sciences Flammarion, Paris; 2000.
33. Holland MG, Ferner RE. A systematic review of the evidence for acute tolerance to alcohol – the “Mellanby effect”. *Clin Toxicol*. 3 juill 2017;55(6):545-56.
34. Wang MQ, Nicholson ME, Mahoney BS, Li Y, Perko MA. Proprioceptive Responses under Rising and Falling BACs: A Test of the Mellanby Effect. *Percept Mot Skills*. août 1993;77(1):83-8.
35. Davies M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci JPN*. juill 2003;28(4):263-74.
36. Uusi-Oukari M, Korpi ER. Regulation of GABAA Receptor Subunit Expression by Pharmacological Agents. *Pharmacol Rev*. 1 mars 2010;62(1):97-135.
37. Valenzuela CF, Bhavé S, Hoffman P, Harris RA. Acute effects of ethanol on pharmacologically isolated kainate receptors in cerebellar granule neurons: comparison with NMDA and AMPA receptors. *J Neurochem*. oct 1998;71(4):1777-80.
38. Läck AK, Ariwodola OJ, Chappell AM, Weiner JL, McCool BA. Ethanol inhibition of kainate receptor-mediated excitatory neurotransmission in the rat basolateral nucleus of the amygdala. *Neuropharmacology*. oct 2008;55(5):661-8.
39. Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem*. juin 1989;52(6):1937-40.
40. Wei X, Shi X, Zhong W, Zhao Y, Tang Y, Sun W, et al. Chronic Alcohol Exposure Disturbs Lipid Homeostasis at the Adipose Tissue-Liver Axis in Mice: Analysis of

- Triacylglycerols Using High-Resolution Mass Spectrometry in Combination with In Vivo Metabolite Deuterium Labeling. Mukhopadhyay P, éditeur. PLoS ONE. 6 févr 2013;8(2):e55382.
41. Osna NA, Donohue TM, Kharbanda KK. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res Curr Rev*. 2017;38(2):147-61.
 42. Duddempudi AT. Immunology in Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis*. nov 2012;16(4):687-98.
 43. Grewal P, Viswanathen VA. Liver Cancer and Alcohol. *Clin Liver Dis*. nov 2012;16(4):839-50.
 44. Konrad A, Vucurevic G, Lorscheider M, Bernow N, Thümmel M, Chai C, et al. Broad Disruption of Brain White Matter Microstructure and Relationship with Neuropsychological Performance in Male Patients with Severe Alcohol Dependence. *Alcohol Alcohol*. 1 mars 2012;47(2):118-26.
 45. de la Monte SM. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch Neurol*. sept 1988;45(9):990-2.
 46. Bühler M, Mann K. Alcohol and the Human Brain: A Systematic Review of Different Neuroimaging Methods: ALCOHOL AND THE HUMAN BRAIN. *Alcohol Clin Exp Res*. oct 2011;35(10):1771-93.
 47. Vetreno RP, Hall JM, Savage LM. Alcohol-related amnesia and dementia: Animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiol Learn Mem*. nov 2011;96(4):596-608.
 48. De la Monte S, Longato L, Tong M, DeNucci S, Wands J. The Liver-Brain Axis of Alcohol-Mediated Neurodegeneration: Role of Toxic Lipids. *Int J Environ Res Public Health*. 23 juill 2009;6(7):2055-75.
 49. Chen C-H, Walker J, Momenan R, Rawlings R, Heilig M, Hommer DW. Relationship Between Liver Function and Brain Shrinkage in Patients with Alcohol Dependence: RELATIONSHIP BETWEEN LIVER FUNCTION AND BRAIN SHRINKAGE. *Alcohol Clin Exp Res*. avr 2012;36(4):625-32.
 50. Rosenbloom M, Sullivan EV, Pfefferbaum A. Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics. *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol*. 2003;27(2):146-52.
 51. Victor M. Alcoholic dementia. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol*. mai 1994;21(2):88-99.
 52. Charness ME. Brain lesions in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. févr 1993;17(1):2-11.
 53. Matsui T, Sakurai H, Toyama T, Yoshimura A, Matsushita S, Higuchi S. [Clinical application of neuroimaging to alcohol-related dementia]. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. juin 2012;47(3):125-34.
 54. Hamon M. Bases neurobiologiques des traitements de l'alcool-dépendance – Quelles perspectives ? *Eur Psychiatry*. nov 2014;29(8):539.
 55. Inserm. Médicaments psychotropes : Consommations et pharmacodépendances [Internet]. Paris : Les éditions Inserm; 2012 [cité 9 août 2018]. Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/2072/?sequence=30&wb48617274=5B7365DD>
 56. Littleton J. Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal. *Alcohol Health Res World*. 1998;22(1):13-24.
 57. Tetrault JM, O'Connor PG. Substance Abuse and Withdrawal in the Critical Care Setting. *Crit Care Clin*. oct 2008;24(4):767-88.

58. Obad A, Peeran A, Little JJ, Haddad GE, Tarzami ST. Alcohol-Mediated Organ Damages: Heart and Brain. *Front Pharmacol* [Internet]. 13 févr 2018 [cité 25 juill 2018];9. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00081/full>
59. Guo R, Hu N, Kandadi MR, Ren J. Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts. *Autophagy*. avr 2012;8(4):593-608.
60. Machackova J, Barta J, Dhalla NS. Myofibrillar remodeling in cardiac hypertrophy, heart failure and cardiomyopathies. *Can J Cardiol*. sept 2006;22(11):953-68.
61. Haddad GE, Saunders L, Carles M, Crosby SD, del Monte F, Macgillivray TE, et al. Fingerprint Profile of Alcohol-Associated Heart Failure in Human Hearts. *Alcohol Clin Exp Res*. mai 2008;32(5):814-21.
62. Smith C, Gasparetto M, Jordan C, Pollyea DA, Vasiliou V. The Effects of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases on Disorders of Hematopoiesis. In: Vasiliou V, Zakhari S, Seitz HK, Hoek JB, éditeurs. *Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cité 25 juill 2018]. p. 349-59. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-09614-8_20
63. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. août 2007;7(8):599-612.
64. Garro AJ, Espina N, Farinati F, Salvagnini M. The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O6-methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986;10(6 Suppl):73S-77S.
65. Wang M, McIntee EJ, Cheng G, Shi Y, Villalta PW, Hecht SS. Identification of DNA adducts of acetaldehyde. *Chem Res Toxicol*. nov 2000;13(11):1149-57.
66. Jokelainen K, Matysiak-Budnik T, Mäkisalo H, Höckerstedt K, Salaspuro M. High intracolonic acetaldehyde values produced by a bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation in piglets. *Gut*. juill 1996;39(1):100-4.
67. Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout JM, Peters TJ, Koch A, et al. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology*. févr 1990;98(2):406-13.
68. Council of the Netherlands TH. Ethanol, evaluation of the effects on reproduction, recommendation for classification. Committee for Compounds toxic to reproduction, a committee of the Health. 2000.
69. ANSES. L'éthanol en population professionnelle. Evaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle ; avis et rapport d'expertise collective. 2010.
70. Wattendorf DJ, Muenke M. Fetal alcohol spectrum disorders. *Am Fam Physician*. 15 juill 2005;72(2):279-82, 285.
71. Mellanby E. DISCUSSION ON THE VALUE OF ALCOHOL AS A THERAPEUTIC AGENT. *Proc R Soc Med*. 1920;13(Ther Pharmacol Sect):36-43.
72. Fermie A. Alcohol as a Therapeutic Agent. *Indian Med Gaz*. mai 1894;29(5):199.
73. Pharmacie des Hôpitaux Universitaires de Genève. CAPP-INFO-N°46-Désinfectant et antiseptiques [Internet]. 2007 [cité 9 août 2018]. Disponible sur: <https://pharmacie.hug-ge.ch/infomedic/cappinfo/cappinfo46.pdf>
74. Centre d'appui pour la prévention des infections associées aux soins. Utilisation des antiseptiques en établissement médico-social [Internet]. 2016 [cité 9 août 2018]. Disponible sur: <http://www.cpias-ile-de-france.fr/REGION/NPC/EMS190516/Antiseptiques.pdf>

75. VIDAL HOPTIMAL 2018. CURETHYL (éthanol), Monographie VIDAL [Internet]. 2018 [cité 23 juill 2018]. Disponible sur: <http://sw016:8012/showProduct.html?productId=4638>
76. Jacobsen D, McMartin KE. Antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1997;35(2):127-43.
77. Beatty L, Green R, Magee K, Zed P. A systematic review of ethanol and fomepizole use in toxic alcohol ingestions. *Emerg Med Int*. 2013;2013:638057.
78. THERIAQUE 2018. ETHANOL AP-HP 96% SOL INJ AMP [Internet]. [cité 23 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=33045>
79. Viel E, Pelissier J, Pellas F, Boulay C, Eledjam J. Les traitements locaux de la spasticité : Blocs périphériques des membres pour alcoolisation ou phénolisation neurolytique. Elsevier Masson SAS; 2003.
80. Su L, Jia R-B, Wang D-M, Lv M-M, Fan X. Absolute Ethanol Embolization of Arteriovenous Malformations in the Periorbital Region. *Cardiovasc Intervent Radiol*. juin 2015;38(3):632-41.
81. Zheng LZ, Fan XD, Zheng JW, Su LX. Ethanol Embolization of Auricular Arteriovenous Malformations: Preliminary Results of 17 Cases. *Am J Neuroradiol*. oct 2009;30(9):1679-84.
82. Sofue K, Arai Y, Shimada K, Takeuchi Y, Kobayashi T, Satake M, et al. Right portal vein embolization with absolute ethanol in major hepatic resection for hepatobiliary malignancy. *Br J Surg*. août 2014;101(9):1122-8.
83. Sayhan H, Beyaz SG, Ülgen AM, Yuce MF, Tomak Y. Long-term Clinical Effects of DiscoGel for Cervical Disc Herniation. *Pain Physician*. janv 2018;21(1):E71-8.
84. Herbreteau D, Riche MC, Enjolras O, Khayata M, Lemarchand-Venencie F, Borsik M, et al. Percutaneous embolization with Ethibloc of lymphatic cystic malformations with a review of the experience in 70 patients. *Int Angiol J Int Union Angiol*. mars 1993;12(1):34-9.
85. Di Giuseppe D, Alfredsson L, Bottai M, Askling J, Wolk A. Long term alcohol intake and risk of rheumatoid arthritis in women: a population based cohort study. *BMJ*. 10 juill 2012;345:e4230.
86. Sánchez-Sellero I, San-Román-Rodríguez E, Santos-Pérez S, Rossi-Izquierdo M, Soto-Varela A. Alcohol consumption in Menière's disease patients. *Nutr Neurosci*. 7 mai 2018;1-7.
87. Yasar S. Relation between alcohol consumption in midlife and dementia in late life. *BMJ*. 1 août 2018;k3164.
88. Knott C, Bell S, Britton A. Alcohol Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of More Than 1.9 Million Individuals From 38 Observational Studies. *Diabetes Care*. sept 2015;38(9):1804-12.
89. Schrieks IC, Heil ALJ, Hendriks HFJ, Mukamal KJ, Beulens JWJ. The effect of alcohol consumption on insulin sensitivity and glycemic status: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Diabetes Care*. avr 2015;38(4):723-32.
90. Fragopoulou E, Choleva M, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. *Metabolism*. juin 2018;83:102-19.
91. Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. févr 2002;18(2):173-7.

92. Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM, Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation*. 31 août 1999;100(9):944-50.
93. Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 22 févr 2011;342:d671.
94. Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Alcohol and mortality. *Ann Intern Med*. 15 oct 1992;117(8):646-54.
95. Bau PFD, Bau CHD, Rosito GA, Manfroï WC, Fuchs FD. Alcohol consumption, cardiovascular health, and endothelial function markers. *Alcohol*. nov 2007;41(7):479-88.
96. Di Castelnuovo A. Alcohol Dosing and Total Mortality in Men and Women: An Updated Meta-analysis of 34 Prospective Studies. *Arch Intern Med*. 11 déc 2006;166(22):2437.
97. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. déc 2008;8(12):958-69.
98. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. déc 2004;25(12):677-86.
99. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1 mars 2012;76(1):16-32.
100. Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Takahashi N, Cauwels A, Fiers W. Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin 1 and interleukin 6. *Immunobiology*. avr 1993;187(3-5):317-29.
101. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett*. 23 mai 1988;232(2):347-50.
102. Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN. Interleukin-1 α . *Semin Immunol*. déc 2013;25(6):430-8.
103. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 7 avr 2011;117(14):3720-32.
104. Dinarello CA. IL-1: Discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol*. mars 2010;40(3):599-606.
105. Eleftheriadis T, Pissas G, Karioti A, Antoniadis G, Goulinopoulos S, Liakopoulos V, et al. Uric acid induces caspase-1 activation, IL-1 β secretion and P2X7 receptor dependent proliferation in primary human lymphocytes. *Hippokratia*. avr 2013;17(2):141-5.
106. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 15 mars 1996;87(6):2095-147.
107. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. déc 2013;39(6):1003-18.
108. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. févr 2010;10(2):89-102.
109. Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology*. juill 2009;214(7):543-53.
110. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. mars 2010;140(6):821-32.
111. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death: Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*. sept 2011;243(1):206-14.
112. Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. *Immunity*. mars 2008;28(3):285-7.

113. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1 déc 2014;6(12):a016287-a016287.
114. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. Pharmacol Ther. juill 2018;187:133-49.
115. Ireton RC, Gale Jr. M. RIG-I Like Receptors in Antiviral Immunity and Therapeutic Applications. Viruses. 23 juin 2011;3(6):906-19.
116. Schattgen SA, Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses: PYHIN/p200 family in innate immunity. Immunol Rev. sept 2011;243(1):109-18.
117. Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly: Inflammasomes: the good, the bad and the ugly. Clin Exp Immunol. oct 2011;166(1):1-15.
118. Dinarello CA. A Signal for the Caspase-1 Inflammasome Free of TLR. Immunity. avr 2007;26(4):383-5.
119. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell. août 2002;10(2):417-26.
120. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat Med. juill 2015;21(7):677-87.
121. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. Science. 3 avr 1992;256(5053):97-100.
122. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. Nature. avr 1992;356(6372):768-74.
123. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. Science. 10 janv 1997;275(5297):206-9.
124. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. Immunity. nov 2005;23(5):479-90.
125. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation: Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. Ann N Y Acad Sci. juin 2014;1319(1):82-95.
126. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature. mars 2006;440(7081):228-32.
127. Duncan JA, Gao X, Huang MT-H, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Activates the Proteinase Cathepsin B to Mediate the Signaling Activities of the NLRP3 and ASC-Containing Inflammasome. J Immunol. 15 mai 2009;182(10):6460-9.
128. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Chen S, Chiba N, Ramanujan VK, et al. Caspase-1 Dependent IL-1 β Secretion Is Critical for Host Defense in a Mouse Model of Chlamydia pneumoniae Lung Infection. Häcker G, éditeur. PLoS ONE. 23 juin 2011;6(6):e21477.
129. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. Immunity. avr 2009;30(4):556-65.

130. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*. mai 2009;459(7245):433-6.
131. Tiemi Shio M, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare M-J, Harder KW, et al. Malarial Hemozoin Activates the NLRP3 Inflammasome through Lyn and Syk Kinases. Kazura JW, éditeur. *PLoS Pathog*. 21 août 2009;5(8):e1000559.
132. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. mars 2016;13(2):148-59.
133. Franchi L, Kanneganti T-D, Dubyak GR, Núñez G. Differential Requirement of P2X7 Receptor and Intracellular K^+ for Caspase-1 Activation Induced by Intracellular and Extracellular Bacteria. *J Biol Chem*. 29 juin 2007;282(26):18810-8.
134. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. sept 2007;14(9):1583-9.
135. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol*. mai 2010;11(5):404-10.
136. Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature*. déc 2012;492(7427):123-7.
137. Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci*. 10 juill 2012;109(28):11282-7.
138. Rossol M, Pierer M, Raulien N, Quandt D, Meusch U, Rothe K, et al. Extracellular Ca^{2+} is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun [Internet]*. janv 2012 [cité 17 juill 2018];3(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms2339>
139. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 10 nov 2012;28(1):137-61.
140. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. févr 2010;11(2):136-40.
141. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*. mars 2011;12(3):222-30.
142. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity*. mars 2012;36(3):401-14.
143. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, et al. Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. *Immunity*. août 2013;39(2):311-23.
144. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev Immunol*. avr 2009;27(1):229-65.
145. Hornung V, Bauernfeind 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*. août 2008;9(8):847-56.
146. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*. nov 2001;29(3):301-5.

147. Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W. A Mutation in the Nlrp3 Gene Causing Inflammasome Hyperactivation Potentiates Th17 Cell-Dominant Immune Responses. *Immunity*. juin 2009;30(6):860-74.
148. Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, et al. De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): A new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum*. déc 2002;46(12):3340-8.
149. Kuemmerle-Deschner JB. CAPS — pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. *Semin Immunopathol*. juill 2015;37(4):377-85.
150. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. mai 2011;12(5):408-15.
151. Yin J, Zhao F, Chojnacki JE, Fulp J, Klein WL, Zhang S, et al. NLRP3 Inflammasome Inhibitor Ameliorates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. mars 2018;55(3):1977-87.
152. Jiang H, He H, Chen Y, Huang W, Cheng J, Ye J, et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *J Exp Med*. 11 oct 2017;jem.20171419.
153. Xu X, Yin D, Ren H, Gao W, Li F, Sun D, et al. Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. sept 2018;117:15-27.
154. Perera AP, Fernando R, Shinde T, Gundamaraju R, Southam B, Sohal SS, et al. MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. *Sci Rep [Internet]*. déc 2018 [cité 19 juill 2018];8(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-26775-w>
155. Stack J, Ryan J, McCarthy G. Colchicine: New Insights to an Old Drug. *Am J Ther*. 2015;22(5):e151-7.
156. Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR. Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. *Clin Ther*. oct 2014;36(10):1465-79.
157. Martínez GJ, Celermajer DS, Patel S. Corrigendum to: "The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation" [Atherosclerosis. 2018 Feb;269:262–271]. *Atherosclerosis*. juin 2018;273:157.
158. Fulp J, He L, Toldo S, Jiang Y, Boice A, Guo C, et al. Structural Insights of Benzenesulfonamide Analogues as NLRP3 Inflammasome Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Characterization. *J Med Chem*. 28 juin 2018;61(12):5412-23.
159. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. sept 1998;50(3):413-92.
160. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*. 1994;64(3):445-75.
161. Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Di Virgilio F, Lemoli RM. The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood*. 20 sept 2012;120(12):2365-75.
162. Burnstock G, Knight GE, Greig AVH. Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. *J Invest Dermatol*. mars 2012;132(3):526-46.
163. Weisman GA, Ajit D, Garrad R, Peterson TS, Woods LT, Thebeau C, et al. Neuroprotective roles of the P2Y2 receptor. *Purinergic Signal*. sept 2012;8(3):559-78.

164. Cunningham MR, Nisar SP, Mundell SJ. Molecular mechanisms of platelet P2Y₁₂ receptor regulation. *Biochem Soc Trans.* 1 févr 2013;41(1):225-30.
165. Cattaneo M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood.* 17 févr 2011;117(7):2102-12.
166. Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi É, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal.* sept 2012;8(3):375-417.
167. Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F. Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X₁ and P2X₄ subunits. *J Neurochem.* févr 2005;92(4):925-33.
168. Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology.* janv 2009;56(1):208-15.
169. Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci.* avr 1999;2(4):322-30.
170. Schlichter R. Les récepteurs P2X de l'ATP dans les neurones du système nociceptif spinal : rôle dans les douleurs neuropathiques. *Douleurs Eval - Diagn - Trait.* juin 2008;9(3):127-33.
171. Gicquel T, Robert S, Loyer P, Victoni T, Bodin A, Ribault C, et al. IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J.* oct 2015;29(10):4162-73.
172. Lecut C, Frederix K, Johnson DM, Deroanne C, Thiry M, Faccinnetto C, et al. P2X₁ Ion Channels Promote Neutrophil Chemotaxis through Rho Kinase Activation. *J Immunol.* 15 août 2009;183(4):2801-9.
173. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for Functional P2X₄/P2X₇ Heteromeric Receptors. *Mol Pharmacol.* 11 sept 2007;72(6):1447-56.
174. Seil M, El Ouaili M, Fontanils U, Etxebarria IG, Pochet S, Dal Moro G, et al. Ivermectin-dependent release of IL-1 β in response to ATP by peritoneal macrophages from P2X₇-KO mice. *Purinergic Signal.* déc 2010;6(4):405-16.
175. Sakaki H, Fujiwaki T, Tsukimoto M, Kawano A, Harada H, Kojima S. P2X₄ receptor regulates P2X₇ receptor-dependent IL-1 β and IL-18 release in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* mars 2013;432(3):406-11.
176. Suurväli J, Boudinot P, Kanellopoulos J, Rüütel Boudinot S. P2X₄: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J.* oct 2017;40(5):245-56.
177. Burnstock G, Knight GE. The potential of P2X₇ receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signal.* mars 2018;14(1):1-18.
178. Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X₇ on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol* [Internet]. 19 mai 2015 [cité 26 juill 2018];6. Disponible sur: <http://www.frontiersin.org/Inflammation/10.3389/fimmu.2015.00204/abstract>
179. Monif M, Burnstock G, Williams DA. Microglia: Proliferation and activation driven by the P2X₇ receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* nov 2010;42(11):1753-6.
180. Qiu Y, Li W, Zhang H, Liu Y, Tian X-X, Fang W-G. P2X₇ Mediates ATP-Driven Invasiveness in Prostate Cancer Cells. *Kanellopoulos J, éditeur. PLoS ONE.* 8 déc 2014;9(12):e114371.
181. Amoroso F, Falzoni S, Adinolfi E, Ferrari D, Di Virgilio F. The P2X₇ receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell Death Dis.* août 2012;3(8):e370-e370.

182. Young CN, Sinadinos A, Lefebvre A, Chan P, Arkle S, Vaudry D, et al. A novel mechanism of autophagic cell death in dystrophic muscle regulated by P2RX7 receptor large-pore formation and HSP90. *Autophagy*. 2 janv 2015;11(1):113-30.
183. Massicot F, Hache G, David L, Chen D, Leuxe C, Garnier-Legrand L, et al. P2X7 Cell Death Receptor Activation and Mitochondrial Impairment in Oxaliplatin-Induced Apoptosis and Neuronal Injury: Cellular Mechanisms and In Vivo Approach. Mukhopadhyay P, éditeur. *PLoS ONE*. 27 juin 2013;8(6):e66830.
184. Khakh BS, Alan North R. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 3 août 2006;442(7102):527-32.
185. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *J Biol Chem*. 2 févr 2007;282(5):2871-9.
186. Bradford MD, Soltoff SP. P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem J*. 15 sept 2002;366(3):745-55.
187. Seeland S, Kettiger H, Murphy M, Treiber A, Giller J, Kiss A, et al. ATP-induced cellular stress and mitochondrial toxicity in cells expressing purinergic P2X7 receptor. *Pharmacol Res Perspect*. mars 2015;3(2):e00123.
188. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*. avr 2015;4:296-307.
189. Müller T, Fay S, Vieira RP, Karmouty-Quintana H, Cicko S, Ayata CK, et al. P2Y6 Receptor Activation Promotes Inflammation and Tissue Remodeling in Pulmonary Fibrosis. *Front Immunol* [Internet]. 22 août 2017 [cité 19 juill 2018];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01028/full>
190. Miras-Portugal MT, Sebastián-Serrano Á, de Diego García L, Díaz-Hernández M. Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *J Neurosci*. 26 juill 2017;37(30):7063-72.
191. Yin J, You S, Liu H, Chen L, Zhang C, Hu H, et al. Role of P2X7R in the development and progression of pulmonary hypertension. *Respir Res* [Internet]. déc 2017 [cité 19 juill 2018];18(1). Disponible sur: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-017-0603-0>
192. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, et al. Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X₇ Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 sept 2010;182(6):774-83.
193. Chandrashekar V, Das S, Seth RK, Dattaroy D, Alhasson F, Michelotti G, et al. Purinergic receptor X7 mediates leptin induced GLUT4 function in stellate cells in nonalcoholic steatohepatitis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. janv 2016;1862(1):32-45.
194. Vaughn BP, Robson SC, Burnstock G. Pathological roles of purinergic signaling in the liver. *J Hepatol*. oct 2012;57(4):916-20.
195. Burnstock G, Novak I. Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic Signal*. sept 2013;9(3):307-24.
196. Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. P2X₇ Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Biol Chem*. 11 avr 2003;278(15):13309-17.

197. Qian F, Xiao J, Hu B, Sun N, Yin W, Zhu J. High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer. *Hum Pathol.* juin 2017;64:61-8.
198. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. *Cancer Res.* 15 juin 2012;72(12):2957-69.
199. Giannuzzo A, Pedersen SF, Novak I. The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Mol Cancer* [Internet]. déc 2015 [cité 19 juill 2018];14(1). Disponible sur: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0472-4>
200. Santos AA, Cappellari AR, de Marchi FO, Gehring MP, Zaparte A, Brandão CA, et al. Potential role of P2X7R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. *Purinergic Signal.* sept 2017;13(3):279-92.
201. Tan C, Han L, Zou L, Luo C, Liu A, Sheng X, et al. Expression of P2X7R in breast cancer tissue and the induction of apoptosis by the gene-specific shRNA in MCF-7 cells. *Exp Ther Med.* oct 2015;10(4):1472-8.
202. Ghalali A, Wiklund F, Zheng H, Stenius U, Högborg J. Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X7 and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* juill 2014;35(7):1547-55.
203. Kupka D, Sibbing D. P2Y₁₂ receptor inhibitors: an evolution in drug design to prevent arterial thrombosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4 mars 2018;14(3):303-15.
204. Nakamura M, Imanaka T, Sakamoto A. Diquafosol Ophthalmic Solution for Dry Eye Treatment. *Adv Ther.* juill 2012;29(7):579-89.
205. Metzger MW, Walser SM, Aprile-Garcia F, Dedic N, Chen A, Holsboer F, et al. Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice. *Purinergic Signal.* juin 2017;13(2):153-70.
206. Cunha RA. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J Neurochem.* déc 2016;139(6):1019-55.
207. Harmse R, van der Walt MM, Petzer JP, Terre'Blanche G. Discovery of 1,3-diethyl-7-methyl-8-(phenoxymethyl)-xanthine derivatives as novel adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* déc 2016;26(24):5951-5.
208. Woods LT, Ajit D, Camden JM, Erb L, Weisman GA. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* mai 2016;104:169-79.
209. Guzman SJ, Gerevich Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast.* 2016;2016:1-12.
210. Fathalla AM, Soliman AM, Ali MH, Moustafa AA. Adenosine A_{2A} Receptor Blockade Prevents Rotenone-Induced Motor Impairment in a Rat Model of Parkinsonism. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 29 févr 2016 [cité 23 juill 2018];10. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2016.00035/abstract>
211. Cantin L-D, Bayrakdarian M, Buon C, Grazzini E, Hu Y-J, Labrecque J, et al. Discovery of P2X3 selective antagonists for the treatment of chronic pain. *Bioorg Med Chem Lett.* avr 2012;22(7):2565-71.
212. Yegutkin GG, Guerrero-Toro C, Kilinc E, Koroleva K, Ishchenko Y, Abushik P, et al. Nucleotide homeostasis and purinergic nociceptive signaling in rat meninges in migraine-like conditions. *Purinergic Signal.* sept 2016;12(3):561-74.
213. Zempo H, Sugita Y, Ogawa M, Watanabe R, Suzuki J, Isobe M. A P2X7 receptor antagonist attenuates experimental autoimmune myocarditis via suppressed myocardial

- CD4⁺ T and macrophage infiltration and NADPH oxidase 2/4 expression in mice. *Heart Vessels*. juill 2015;30(4):527-33.
214. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* [Internet]. 25 sept 2017 [cité 20 juill 2018];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00661/full>
 215. Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJG. Purinergic (P2) receptor control of lower genitourinary tract function and new avenues for drug action: an overview. *Curr Pharm Des*. 2007;13(31):3236-44.
 216. Wan P, Liu X, Xiong Y, Ren Y, Chen J, Lu N, et al. Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 × 7 receptor signaling. *Sci Rep* [Internet]. mai 2016 [cité 30 juill 2018];6(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep19108>
 217. Neves AR, Castelo-Branco MTL, Figliuolo VR, Bernardazzi C, Buongusto F, Yoshimoto A, et al. Overexpression of ATP-activated P2X7 Receptors in the Intestinal Mucosa Is Implicated in the Pathogenesis of Crohn's Disease: *Inflamm Bowel Dis*. mars 2014;20(3):444-57.
 218. Eser A, Colombel J-F, Rutgeerts P, Vermeire S, Vogelsang H, Braddock M, et al. Safety and Efficacy of an Oral Inhibitor of the Purinergic Receptor P2X7 in Adult Patients with Moderately to Severely Active Crohn's Disease: A Randomized Placebo-controlled, Double-blind, Phase IIa Study. *Inflamm Bowel Dis*. juill 2015;1.
 219. Shcherbatko A, Foletti D, Poulsen K, Strop P, Zhu G, Hasa-Moreno A, et al. Modulation of P2X3 and P2X2/3 Receptors by Monoclonal Antibodies. *J Biol Chem*. 3 juin 2016;291(23):12254-70.
 220. Kruglov EA, Correa PRAV, Arora G, Yu J, Nathanson MH, Dranoff JA. Molecular basis for calcium signaling in hepatic stellate cells. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. avr 2007;292(4):G975-82.
 221. Dranoff JA, Kruglov EA, Abreu-Lanfranco O, Nguyen T, Arora G, Aurora G, et al. Prevention of liver fibrosis by the purinoceptor antagonist pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS). *Vivo Athens Greece*. déc 2007;21(6):957-65.
 222. Jiang S, Zhang Y, Zheng J-H, Li X, Yao Y-L, Wu Y-L, et al. Potentiation of hepatic stellate cell activation by extracellular ATP is dependent on P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation. *Pharmacol Res*. mars 2017;117:82-93.
 223. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. mars 2006;440(7081):237-41.
 224. Sueblinvong V, Kerchberger VE, Saghafi R, Mills ST, Fan X, Guidot DM. Chronic Alcohol Ingestion Primes the Lung for Bleomycin-Induced Fibrosis in Mice. *Alcohol Clin Exp Res*. févr 2014;38(2):336-43.
 225. Siegmund SV, Brenner DA. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res*. nov 2005;29(11 Suppl):102S-109S.
 226. Arvers P. Alcool et poumon : des liaisons dangereuses. *Rev Mal Respir* [Internet]. juin 2018 [cité 19 juill 2018]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0761842518301293>
 227. Pascual M, Baliño P, Aragón CMG, Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*. févr 2015;89:352-9.
 228. Kim S-J, Kim D-J. Alcoholism and Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*. 2012;36(2):108.
 229. Ramadori P, Cubero F, Liedtke C, Trautwein C, Nevzorova Y. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: Adding Fuel to the Flame. *Cancers*. 25 sept 2017;9(12):130.

230. Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between Alcohol Consumption and Breast Cancer: A Look at the Evidence. *Womens Health*. janv 2015;11(1):65-77.
231. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Volume 100E: Personal habits and indoor combustion: consumption of alcoholic beverages. Lyon, France [Internet]. 2012 [cité 13 juin 2018]. Disponible sur: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100E.pdf>
232. Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, et al. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. avr 2014;41(4):279-86.
233. Lindros KO, Stowell A, Pikkarainen P, Salaspuro M. Elevated blood acetaldehyde in alcoholics with accelerated ethanol elimination. *Pharmacol Biochem Behav*. 1980;13 Suppl 1:119-24.
234. Eriksson CJ. Human blood acetaldehyde concentration during ethanol oxidation (update 1982). *Pharmacol Biochem Behav*. 1983;18 Suppl 1:141-50.
235. Kozutsumi D, Arita M, Kawashima A, Adachi M, Takami M. An improved method for acetaldehyde determination in blood by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *J Chromatogr Sci*. oct 2002;40(9):477-82.
236. Eriksson CJP. Measurement of acetaldehyde: what levels occur naturally and in response to alcohol? *Novartis Found Symp*. 2007;285:247-55; discussion 256-260.
237. Hernandez-Munoz R, Ma XL, Baraona E, Lieber CS. Method of acetaldehyde measurement with minimal artifactual formation in red blood cells and plasma of actively drinking subjects with alcoholism. *J Lab Clin Med*. juill 1992;120(1):35-41.
238. Zhang Y, Jin Q, Li X, Jiang M, Cui B-W, Xia K-L, et al. Amelioration of Alcoholic Liver Steatosis by Dihydroquercetin through the Modulation of AMPK-Dependent Lipogenesis Mediated by P2X7R–NLRP3-Inflammasome Activation. *J Agric Food Chem*. 16 mai 2018;66(19):4862-71.
239. Li X, Zhang Y, Jin Q, Xia K-L, Jiang M, Cui B-W, et al. Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase-mediated regulation by gentiopicroside ameliorates P2X7 receptor-dependent alcoholic hepatosteatosis: Gentiopicroside improves alcoholic hepatosteatosis. *Br J Pharmacol*. mai 2018;175(9):1451-70.
240. Lombardi M, Mantione ME, Baccellieri D, Ferrara D, Castellano R, Chiesa R, et al. P2X7 receptor antagonism modulates IL-1 β and MMP9 in human atherosclerotic vessels. *Sci Rep* [Internet]. déc 2017 [cité 19 juill 2018];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05137-y>
241. Asatryan L, Ostrovskaya O, Lieu D, Davies DL. Ethanol differentially modulates P2X4 and P2X7 receptor activity and function in BV2 microglial cells. *Neuropharmacology*. janv 2018;128:11-21.
242. Karoutzou O, Kwak S-H, Lee S-D, Martínez-Falguera D, Sureda F, Vázquez S, et al. Towards a Novel Class of Multitarget-Directed Ligands: Dual P2X7–NMDA Receptor Antagonists. *Molecules*. 21 janv 2018;23(1):230.
243. Liu H-J, Pan X-X, Liu B-Q, Gui X, Hu L, Jiang C-Y, et al. Grape seed-derived procyanidins alleviate gout pain via NLRP3 inflammasome suppression. *J Neuroinflammation* [Internet]. déc 2017 [cité 13 août 2018];14(1). Disponible sur: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-017-0849-y>



Ethanol upregulates the P2X7 purinergic receptor in human macrophages

Journal:	<i>Fundamental & Clinical Pharmacology</i>
Manuscript ID:	FCP-FUND-OA-08-18-0208.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	19-Sep-2018
Complete List of Authors:	Le Daré, Brendan; Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Pharmacy; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) Victoni, Tatiana; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) Bodin, Aude; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) Vlach, Manuel; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) Vene, Elise; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) Loyer, Pascal; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) Lagente, Vincent; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) Gicquel, Thomas; Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Toxicologie; Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer)
Keywords:	Ethanol, NLRP3, P2X7, inflammation, macrophage, inflammasome
Areas of Speciality:	Inflammation, Immunopharmacology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Ethanol upregulates the P2X7 purinergic receptor in human macrophages

Running head: Ethanol upregulates P2X7R in human macrophages

Brendan **Le Daré**^{a,b,*}, Tatiana **Victoni**^a, Aude **Bodin**^a, Manuel **Vlach**^a, Elise **Vene**^a,
Pascal **Loyer**^a, Vincent **Lagente**^a, Thomas **Gicquel**^{a,c}

^a Univ Rennes, INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer) F-35000 Rennes, France

^b Pontchaillou University Hospital, Pharmacy Service, F-35000, Rennes, France.

^c Pontchaillou University Hospital, Forensic and Toxicology Laboratory, F-35000, Rennes, France

*Corresponding author
Brendan Le Daré
Centre Hospitalier Universitaire de Rennes Ringgold standard institution - Pharmacy
Rennes, France

Email: brendan.ledare@hotmail.fr

Email: thomas.gicquel@chu-rennes.fr

ABSTRACT

Alcohol consumption is considered to be the third leading cause of death in the United States. In addition to its direct toxicity, ethanol has two contrasting effects on the immune system: the nucleotide oligomerization domain-like receptor pyrin domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome is inhibited by acute ethanol exposure but activated by chronic ethanol exposure. Purinergic receptors (especially the P2X7 receptor) are able to activate the NLRP3 inflammasome, and are involved in many ethanol-related diseases (such as gout, pulmonary fibrosis, alcoholic steatohepatitis and certain cancers). We hypothesized that ethanol regulates purinergic receptors and thus modulates the NLRP3 inflammasome's activity. In experiments with monocyte-derived macrophages, we found that interleukin (IL)-1 β secretion was inhibited after 7h of exposure (but not 48 h of exposure) to ethanol. The disappearance of ethanol's inhibitory effect on IL-1 β secretion after 48 h was not mediated by the upregulated production of IL-1 β , IL-1 α , IL-6 or the inflammasome components NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, and caspase 1. P2X7R expression was upregulated by ethanol, whereas expression of the P2X4 and P2X1 receptors was not. Taken as a whole, our results suggest that ethanol induces NLRP3 inflammasome activation by upregulating the P2X7 receptor. This observation might have revealed a new mechanism for inflammation in ethanol-related diseases.

KEYWORDS: ethanol, NLRP3, P2X7, monosodium urate, inflammation, macrophage

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABBREVIATIONS

- AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
- ASC: apoptosis-associated speck like protein containing a CARD
- ATP: adenosine triphosphate
- BSA: bovine serum albumin
- BzATP: 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate
- DAMPs: danger-associated molecular patterns
- EtOH: ethanol
- FCS: fetal calf serum
- GABA: gamma-aminobutyric acid
- LPS: lipopolysaccharide
- MSU: monosodium urate
- NMDA: N-methyl-D-aspartate
- NLRP3: nucleotide oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3
- PAMPs: pathogen-associated molecular patterns
- P2X1R: purinergic receptor P2X1
- P2X4R: purinergic receptor P2X4
- P2X7R: purinergic receptor P2X7
- PBS: phosphate buffer saline
- PRRs: pattern recognition receptors
- ROS: reactive oxygen species
- SEM: standard error of the mean

INTRODUCTION

According to the 2015 National Survey on Drug Use and Health (conducted by the US government's Substance Abuse and Mental Health Services Administration), 138.3 million of Americans aged 12 or older reported current use of alcohol. Nearly half of these current alcohol users (66.7 million people) reported binge alcohol use in the previous month, and 17.3 million reported heavy alcohol use in the previous month. Alcohol is considered to be among the most harmful drugs with regard to physical injury, social damage, and addiction (1). Furthermore, alcohol consumption is considered to be the third leading cause of death in the USA, mainly from cancer, liver cirrhosis, and injury. The pathophysiological effects of alcohol are now being better characterized. The production of ethanol-induced reactive oxygen species (ROS) is now known to increase membrane fluidity, and ROS are also involved in the induction of apoptosis and alcoholic liver diseases such as fibrosis and cirrhosis (2–4). Interestingly, ethanol has several contrasting effects on the immune system. Acute alcohol consumption leads to immunosuppression, whereas chronic exposure leads to inflammation (5,6). It was recently reported that the nucleotide oligomerization domain-like receptor pyrin domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome was involved in this dual effect: acute ethanol exposure was found to inhibit the NLRP3 inflammasome pathway in leukocytes, whereas chronic exposure activated the pathway (7–9).

Inflammasomes are part of the pattern recognition receptor family of intracellular innate immune system sensors. The best known of these is the NLRP3 inflammasome, which is mainly expressed by myeloid cells like monocytes and macrophages. The NLRP3 inflammasome enables the production of IL-1 β and IL-18 in response to pathogen-associated molecular patterns such as lipopolysaccharide (LPS). However, this first signal only enhances pro-IL-1 β production, and is not enough to activate the release of active IL-1 β from macrophages; a second signal (such as a danger-associated molecular pattern (DAMP) or pathogen-associated molecular pattern (PAMP)) is required (10). This second step leads to the oligomerization of three main effectors: NLRP3, the apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC, an adaptor protein), and procaspase 1. This assembly converts procaspase-1 into mature caspase 1, which can cleave pro-IL-1 β and pro-IL-18 into their respective active forms. These pro-inflammatory cytokines activate the acute inflammation pathway (11). Over-activation of the inflammasome leads to pyroptosis, a type

of programmed cell death that amplifies local inflammatory reactions (12). The NLRP3 inflammasome can be activated by many different DAMPs and PAMPs, such as ATP or its synthetic analog BzATP, nigericin, and crystals of silica, cholesterol or uric acid (13–15). These molecular patterns activate the inflammasome through several pathways: potassium efflux triggered by purinergic receptors, and lysosomal breakdown triggered by crystals, for example. Membrane pore formation, ROS production, and ASC phosphorylation are also involved in activation of the NLRP3 inflammasome (16,17). However, genetic mutations of NLRP3 protein lead to pathologies such as cryopyrin-associated periodic syndrome. Similarly, inflammasome overactivation is involved in several diseases, such as atherosclerosis, diabetes, or gout (7,18). In view of the NLRP3 inflammasome's involvement in inflammatory diseases, cognate inhibitors are being developed as drug candidates. Interestingly, treatment with these compounds *in vitro* and *in vivo* is associated with reductions in neuroinflammation and colonic inflammation (19,20). Furthermore, colchicine (an old compound used for the symptomatic treatment of various inflammatory diseases, including gout, Behçet syndrome, and familial Mediterranean fever) has been found to inhibit the NLRP3 inflammasome (21,22). This observation highlighted new potential indications in the inhibition of atherosclerosis-associated inflammation (23). Recently, molecular design studies have shown that benzene sulfonamide analogs can inhibit the NLRP3 inflammasome, and these compounds are also being developed as drug candidates (24). However, given that two steps are required to activate the NLRP3 inflammasome, studying the factors able to modulate the second step is a challenge in anti-inflammatory drug research. As mentioned above, the stimulation of purinergic receptors (especially the P2X7 receptor (P2X7R)) has been shown to activate the NLRP3 inflammasome (25).

Purinergic receptors are ubiquitous receptors involved in nociception and the inflammatory response. They are activated by extracellular nucleotides (26). Purinergic receptors are classified into two families: P1 receptors are selective for adenosine, and P2 receptors mainly bind ATP and ADP (27). The P2 receptors can be subclassified into P2Y G-protein-coupled receptors and P2X ligand-gated ion channels (28). Purinergic receptors are known to be involved in several disease processes. Recently, P2Y6R was linked to the development of pulmonary fibrosis (29), and P2X7R is thought to be involved in Parkinson's disease, pulmonary hypertension, gout, allergy, pulmonary fibrosis, and alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis (30–35). Furthermore, high P2X7R expression levels may indicate a poor prognosis for patients with colorectal cancer (36). In the present paper, we used BzATP,

a potent agonist of P2X7R, in order to activate NLRP3 inflammasome through purinergic receptor pathway. Given that ethanol is able to regulate purinergic receptor P2X4 and P2X7 activity in a microglia cell line (37), we hypothesized that this alcohol might promote inflammatory disease regulating purinergic receptors in monocyte-derived macrophage (MdMs).

Thus, the objective of the present study was to gain a better understanding of the mechanisms linking ethanol, the NLRP3 inflammasome and purinergic receptors in MdMs.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Phosphate-buffered saline (PBS), RPMI 1640 medium, penicillin-streptomycin, and L-glutamine were purchased from Life Technologies (Eugene, OR, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Hyclone (Logan, UT, USA), bovine serum albumin was from Eurobio (Les Ulis, France), ultrapure E. coli 0111:B4 LPS was purchased from InvivoGen (Toulouse, France), and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) was from R&D Systems Europe (Lille, France). 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Specific antibodies against P2X7R and P2X4R were purchased from Alomone (Jerusalem, Israel).

Crystal preparation

Monosodium urate (MSU) crystals were prepared by recrystallization from uric acid (38). Briefly, the crystals were obtained by dissolving 1.68 mg of MSU in 500 mL of 0.01 M NaOH preheated to 70°C (pH 7.1-7.2). The solution was slowly and continuously agitated at room temperature, until crystals formed. The crystals were washed twice with 100% ethanol, dried, autoclaved, and weighed under sterile conditions. Crystals were resuspended in PBS by sonication and examined with phase microscopy prior to use in our experiments. The crystal size (greatest dimension) ranged from 2 µm to 20 µm.

Preparation and treatment of MdMs

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from human buffy coat (French Blood Establishment, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP® U-10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments were performed in compliance with the French legislation on blood donation and blood product use and safety. Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 separation kit (Microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), plated at a density of 0.5×10^6 cells/well in 24 well-plates and cultured at 37°C with 5% humidified CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU/mL penicillin - 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1% sodium pyruvate, and 10% FCS. Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI 1640 medium. After 7 days, the supernatant was removed, and cells were exposed to various treatments. The MdMs were incubated overnight with 0.1 µg/mL ultrapure E. coli 0111:B4 LPS, incubated with ethanol for 1 h or for 42 h, and then incubated with ethanol and MSU or ethanol and BzATP for a further 6 h. At each change of treatment, the supernatant is removed in order to renew the ethanol-containing medium.

Cell viability

Cytotoxicity was assessed using MTT colorimetric assays. Briefly, after medium removal, 500 µL of RPMI medium containing MTT (0.5 mg/ml) was added to each well, and the cells were incubated for 2 h at 37°C. The water-insoluble formazan was dissolved in 500 µL of DMSO, and absorbance was measured at 540 nm.

Cytokine production assays

The concentrations of IL-1β, IL-1α and IL-6 in the culture supernatant were measured using Duoset® ELISA kits (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom), according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR (RT-qPCR) analysis

After lysis of the MdMs, total RNA was isolated using a Macherey-Nagel NucleoSpin® RNAII kit, according to the manufacturer's protocol. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed into first-strand cDNA using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). qPCR was performed using the fluorescent dye SYBR Green method, with SYBR Green PCR Master Mix in 384-well plates and the StepOnePlus™ system (Applied Biosystems). Human GAPDH was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method as fold changes in the target gene, normalized to the reference gene, and related to the expression level in control experiments.

Flow cytometry detection of P2X4R and P2X7R proteins on MdMs

Cells were detached with trypsin, washed twice in PBS, and fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde in PBS. After the paraformaldehyde had been discarded, the MdMs were resuspended in PBS supplemented with 2.5% nonimmune rabbit serum (in order to block nonspecific sites). Isotype control immunoglobulins and primary antibodies against P2X4R and P2X7R were diluted 1/100, 1/100 and 1/75 respectively, and then incubated with the MdMs for 1 h. After washing with PBS, the cells were incubated for 1 h with FITC-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) diluted 1/100. After a final wash with PBS, the cells were analyzed by flow cytometry (using a BD LSRFortessa™ X-20 cell analyzer and BD FACSDiva™ software). The MdMs were first gated according to their forward- and side-scatter profiles, and then defined as P2X4R⁺ and/or P2X7R⁺. FlowLogic software (version 7.2.1, Inivai Technologies, Mentone, Australia) was used to analyze the flow cytometry data.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Intergroup differences as a function of the treatment were probed in a one-way analysis of variance (ANOVA), with a Bonferroni *post hoc* test for group comparisons. The significance of intergroup differences in the PCR analysis was determined using a Mann-Whitney test. All analyses were performed using Prism software (version 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All tests were two-sided, and the threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

RESULTS

Acute exposure to ethanol dose-dependently inhibits IL-1 β hypersecretion by MdMs

Since acute ethanol exposure has been shown to inhibit the NLRP3 inflammasome in macrophages (7,8), we looked at whether this alcohol was able to dose-dependently inhibit interleukin production in response to BzATP (Figure 1) or MSU (Figure 2). BzATP and MSU were used in order to stimulate NLRP3 inflammasome through P2X7R pathway. We found that ethanol inhibited IL-1 β production at a concentration of 30 mM or more when the MdMs had been previously stimulated with BzATP and at a concentration of 100 mM or more when the cells had been stimulated with MSU (Figure 1A; 2A). Interestingly, IL-6 and IL-1 α levels were unchanged (Figure 1B; 1C; 2B; 2C). Furthermore, we observed a greater IL-1 β production in the LPS + BzATP and LPS + MSU conditions, relative to LPS alone (Figure 1A; 2A). When BzATP had been added, the presence of 300 mM ethanol was associated with lower cell viability. When MSU had been added, the presence of 1000 mM ethanol was associated with lower cell viability (Figure 1D; 2D). Considering that IL-1 β production was first inhibited at a non-toxic concentration of ethanol, our results show that ethanol's effect was not associated with cell death. Furthermore, given that others cytokines levels (IL-6 and IL-1 α), regardless produced from NLRP3 inflammasome, were not affected by ethanol, the effect of this alcohol can be considered selective for the NLRP3 inflammasome pathway.

Ethanol's inhibition of IL-1 β production disappears after 48 h

Identification of the lowest concentration of ethanol capable of inhibiting the NLRP3 inflammasome enabled us to investigate the time course of IL1 α , IL-1 β and IL-6 production. After 7 h of ethanol exposure at 100 mM or 300 mM, only IL-1 β production was inhibited in MdMs stimulated with LPS overnight and then with 300 μ g/mL MSU for 6 h (Figure 3A). Levels of IL-6 and IL-1 α were unchanged (Figure 3C, 3E). Forty-eight hours of ethanol exposure at 100 mM or 300 mM did not significantly inhibit the production of any of the ILs, regardless of the cell stimulus (3B, 3D, 3F). The MdMs' viability was not impaired by exposure to 300 mM ethanol for 48 h, followed by activation with 100 ng/mL LPS overnight and then with 300 μ g/mL MSU for 6 h (data not shown). These results show that the inhibition of IL-1 β production associated with acute ethanol exposure (7 h) is no longer present after 48 h of exposure.

Ethanol does not influence the mRNA expression of inflammasome components or interleukins 1 β , 1 α and 6

To investigate the mechanism whereby the inflammasome NLRP3 pathway is inhibited by 7 h of ethanol exposure and to establish why this inhibition is no longer present after 48 h of ethanol exposure, we measured the mRNA expression of inflammatory cytokines (*IL-1 β* , *IL-1 α* and *IL-6*) and inflammasome components (*NLRP3*, *CASP1* and *ASC*) after 7 h of exposure to ethanol. There were no significant changes, relative to a control experiment in the absence of ethanol (Figure 4). These results show that the phenomena observed after 7 and 48 h of ethanol exposure were not related to the induction or inhibition of NLRP3 inflammasome components or the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-1 α and IL-6.

Ethanol promotes the mRNA expression of P2X7R and P2X4R

Given that NLRP3 inflammasome is mainly activated by P2X receptors, we measured the mRNA expression levels of P2X1R, P2X4R and P2X7R after 7 h of exposure to ethanol or medium alone in MdMs treated with 100 μ g/L MSU or 250 mM BzATP. We found that ethanol exposure was associated with an induction of P2X4R and P2X7R mRNA expression but not P2X1R mRNA expression, regardless of whether the cells had been treated with MSU or BzATP (Figure 5A; B).

Ethanol promotes P2X7R and P2X4R expression

In order to confirm that the induction of P2X4R and P2X7R mRNA expression corresponded to higher cell surface levels of these receptors, we used flow cytometry to study MdMs incubated in the presence or absence of 100 mM ethanol for 24 h. The cells were incubated with 100 ng/mL LPS overnight and then with 300 μ g/mL MSU for 6 h. A shift in fluorescence was observed for P2X7R but not P2X4R - indicating that P2X7R (but not P2X4R) was overexpressed in ethanol-treated cells (Figure 6).

DISCUSSION

Our present results show that prolonged exposure of MdMs to ethanol promoted activation of the NLRP3 inflammasome and upregulation of the P2X7R, which are known to be involved in the pathophysiology of alcohol abuse. It has been well established that alcohol abuse is a leading cause of inflammatory diseases, including fibrosis, cirrhosis, chronic obstructive pulmonary disease, diabetes, and neuroinflammation (5,10,38–43). It is also known that ethanol is a preventable risk factor for certain cancers, including colon cancer (44), hepatocellular carcinoma (45), breast cancer (46), and esophageal, pancreatic and prostate cancers (47). *Via* activation of the NLRP3 inflammasome pathway and ROS generation, purinergic receptors are involved in the pathogenesis of many of these diseases - including liver fibrosis (48), diabetes (49), and neuroinflammation (50). The overexpression of purinergic receptors (especially P2X7R) is thought to be involved in tumorigenesis (36,51–55).

Studies of ethanol's immunomodulatory effect on macrophages have recently highlighted the involvement of the NLRP3 inflammasome. Moreover, ethanol has a dual, contrasting effect on inflammation, depending on the concentration and exposure time. Considering that BzATP is the most potent P2X7R agonist available, we decided to use this compound to study selective P2X7R activation in the NLRP3 inflammasome pathway. Monosodium urate is also known to be a potent danger signal that activates the NLRP3 inflammasome pathway through cathepsin B, ATP release, and autocrine purinergic signaling (56). As we have reported previously, LPS + BzATP stimulation selectively enhanced IL-1 β production (25). Furthermore, LPS + MSU stimulation was found to enhance IL-1 β , IL-1 α and IL-6 production. After stimulation with BzATP or MSU, acute (7h) ethanol exposure selectively inhibited IL-1 β secretion (from 30 mM ethanol for BzATP and from 100 mM for MSU) but did not inhibit IL-6 and IL-1 α levels (Figure 1A-C; Figure 2A-C). These results were consistent with Hoyt et al.'s (2017) report whereby acute ethanol exposure strongly and selectively inhibits the NLRP3 inflammasome pathway. Interestingly, IL-1 α levels were greater after 10mM of ethanol exposure for 7 h, but not after exposure of a higher concentration of ethanol, when MdMs were stimulated with BzATP (Figure 1B). Redox imbalance, known to induce IL-1 α expression (57), is induced by ethanol (58). Thus, we hypothesized that ethanol-induced oxidative stress is responsible of the greater amount of this cytokine. Same results were found with IL-6 (Figure 1C). These results are consistent with those of Chen et al. (59) and Hong et al. (60), reporting elevated amount of IL-6 during acute exposure of ethanol. Furthermore, we think that the disappearance of the greater amount of

IL-1 α and IL-6 with higher concentration of ethanol is linked to the inhibition of IL-1 β by ethanol from 30mM. These results are supported by those of Cahill et al. (61) and Fettelschoss et al. (62), reporting that IL-1 β secretion induces IL-6 production and is required for IL-1 α secretion. Taken as a whole, these results indicate that our model is a relevant one for studying activation or inhibition of the NLRP3 inflammasome.

Forty-eight hours exposure to ethanol was enough to suppress the previously observed inhibitory effect of acute ethanol exposure on IL-1 β secretion (Figure 3A-B). This observation indicates that only 48 h of ethanol exposure is enough to promote a response capable of activating the NLRP3 inflammasome. It has been shown that ethanol's effect on the NLRP3 inflammasome pathway is associated with greater inducible nitric oxide synthase expression, NO production, and mitochondrial dysfunction (ROS generation). Moreover, ethanol metabolites (including acetaldehyde) were found to be probable activators of the NLRP3 inflammasome (9). However, toxicological monitoring of acetaldehyde is challenging, given the very low concentrations produced after alcohol consumption in humans (63–65). Indeed, acetaldehyde is rapidly cleared from blood and metabolized into acetic acid and other compounds (66,67). Although the blood acetaldehyde concentration is higher in alcoholics than in non-alcoholics, the mean plasma concentration measured in the former group was only 3.74 μ M (68). This acetaldehyde concentration is still far lower than those used in studies of NLRP3 inflammasome activation (9). Furthermore, acetaldehyde is highly volatile in cell cultures at 37°C. Considering that acetaldehyde is also metabolized through an oxidative pathway, it is possible that oxidative stress is more involved than acetaldehyde *per se* in NLRP3 inflammasome activation. We therefore hypothesize that chronic ethanol exposure triggers another pathway and thus suppresses an inhibitory effect of acute ethanol exposure on the NLRP3 inflammasome pathway.

The literature data show that two weeks of ethanol treatment leads to the hypersecretion of inflammasome compounds, including NLRP3, caspase-1 and ASC (9). Conversely, our experiments on the THP-1 cell line (data not shown) and on MdMs demonstrated that 48 h of ethanol exposure does not modify the expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 or the inflammasome components NLRP3, caspase-1 and ASC (Figure 4). These results suggest that ethanol does not increase NLRP3 inflammasome activity by increasing intracytoplasmic levels of this complex. We therefore decided to study the expression of proteins involved in the NLRP3 inflammasome activation pathway. As mentioned above, purinergic receptors are involved in NLRP3 inflammasome activation. Remarkably, we found

that ethanol exposure is associated with greater mRNA expression levels of P2X4R and P2X7R but not P2X1R (Figure 5). For 100 mM and 300 mM ethanol, the same dose-dependent results were found with THP-1 (data not shown). Considering that MSU is known to upregulate P2X7R (56), we first hypothesized that ethanol potentiates this effect but does not have its own specific role. This hypothesis was rejected because P2X7R expression was induced with ethanol after BzATP stimulation - making ethanol the only common factor. These findings were confirmed by our flow cytometry experiments; P2X7R fluorescence was shifted when cells were exposed to ethanol (Figure 6). Taken as a whole, these results show for the first time that ethanol induces P2X7R expression independently of other treatments.

There is a growing body of evidence to show that P2X7R activation leads to mitochondrial toxicity, oxidative stress, and activation of the NLRP3 inflammasome pathway (69–71). In parallel, overexpression of purinergic receptors has been observed in several disease processes. Here, we found that ethanol induced P2X7R protein expression in an MDM model. Thus, given that chronic use of alcohol is a leading cause of inflammatory diseases and cancer, and that purinergic receptor (particularly P2X7R) are involved in the pathogenesis of many of these ethanol-related diseases, it is therefore conceivable that ethanol amplifies inflammation activation and pathophysiological processes through mechanisms involving the upregulation of purinergic receptors. In the inflammatory environment, ethanol-induced overexpression of P2X7R in peripheral macrophages can trigger a greater fixation of agonistic danger signals of purinergic receptors, such as endogenous ATP. Therefore, the severity of inflammatory ethanol-related diseases can be directly linked to the upregulation of P2X7R. The observed upregulation of P2X7R indicates that it is especially worthwhile to test antagonists *in vitro* of this putative target in the context of ethanol-associated pathologies.

Several disease models involving ethanol are now being used to examine the effects of P2X7R antagonists. In HepG2 cells, it has been shown that decreasing the expression of P2X7R and the NLRP3 inflammasome pathway by treatment with dihydroquercetin reduces alcoholic liver steatosis through the inhibition of lipogenesis (72). Similarly, inhibiting P2X7R with gentiopicroside enhances alcoholic liver steatosis, while IL-1 β secretion aggravates it (34). In *ex vivo* cultures of vessels with carotid plaques, the selective P2X7R antagonist A740003 decreased IL-1 β secretion without involving the NLRP3/caspase-1 pathway; high IL-1 β levels are usually associated with carotid plaque instability (73). These findings suggest that targeting P2X7R might be of value in the treatment of atherosclerosis (73). In the field of neurology, it has been shown that ethanol dose-dependently induces P2X4 and P2X7

1
2
3 expression in BV2 microglial cells (37). Justifiably, P2X7 antagonists are now starting to be
4 studied as drug candidates for the inhibition of neuroinflammation (74).
5
6

7
8 In conclusion, we found that the NLRP3 inflammasome pathway was inhibited by 7 h
9 of exposure to ethanol and stimulated after 48 h of exposure to ethanol. Furthermore, ethanol
10 induced P2X7R expression in MdMs. It is therefore conceivable that ethanol amplifies
11 inflammation activation pathways and the pathophysiological processes through purinergic
12 receptor upregulation - making macrophages react more strongly to danger signals. Our
13 present results highlight a new putative mechanism for inflammation activation in ethanol-
14 induced diseases. Hence, P2X7R antagonists might constitute a novel class of anti-
15 inflammatory molecules with potential value in the treatment of ethanol-related inflammatory
16 diseases.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *The Lancet*. 2007 Mar;369(9566):1047–53.
2. Sergeant O. Role for Membrane Fluidity in Ethanol-Induced Oxidative Stress of Primary Rat Hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Nov 10;313(1):104–11.
3. Miñana J. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*. 2002 May;35(5):1205–14.
4. Nieto N. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1–derived reactive oxygen species. *Hepatology*. 2002 Jan;35(1):62–73.
5. González-Reimers E. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14660.
6. Dai Q, Pruett SB. Different Effects of Acute and Chronic Ethanol on LPS-Induced Cytokine Production and TLR4 Receptor Behavior in Mouse Peritoneal Macrophages. *J Immunotoxicol*. 2006 Jan;3(4):217–25.
7. Nurmi K, Virkanen J, Rajamäki K, Niemi K, Kovanen PT, Eklund KK. Ethanol Inhibits Activation of NLRP3 and AIM2 Inflammasomes in Human Macrophages—A Novel Anti-Inflammatory Action of Alcohol. Catapano A, editor. *PLoS ONE*. 2013 Nov 11;8(11):e78537.
8. Hoyt LR, Ather JL, Randall MJ, DePuccio DP, Landry CC, Wewers MD, et al. Ethanol and Other Short-Chain Alcohols Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation through Protein Tyrosine Phosphatase Stimulation. *J Immunol*. 2016 Aug 15;197(4):1322–34.
9. Hoyt LR, Randall MJ, Ather JL, DePuccio DP, Landry CC, Qian X, et al. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. *Redox Biol*. 2017 Aug;12:883–96.
10. Kim JS, Kim KD, Na HS, Jeong SY, Park HR, Kim S, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β expression pathway induced by *Streptococcus mutans* in macrophage cell line RAW 264.7: Macrophage cytokine induction by *S. mutans*. *Mol Oral Microbiol*. 2012 Jun;27(3):149–59.
11. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine*. 2014 Sep;69(1):136–45.
12. LaRock CN, Cookson BT. The *Yersinia* Virulence Effector YopM Binds Caspase-1 to Arrest Inflammasome Assembly and Processing. *Cell Host Microbe*. 2012 Dec;12(6):799–805.
13. Liao P-C, Chao LK, Chou J-C, Dong W-C, Lin C-N, Lin C-Y, et al. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1 β secretion. *Inflamm Res*. 2013 Jan;62(1):89–96.
14. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*. 2008 May 2;320(5876):674–7.
15. Rajamäki K, Lappalainen J, Öörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A

- Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. Unutmaz D, editor. PLoS ONE. 2010 Jul 23;5(7):e11765.
16. Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y, et al. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat Immunol*. 2013 Nov 3;14(12):1247–55.
 17. Lin Y-C, Huang D-Y, Wang J-S, Lin Y-L, Hsieh S-L, Huang K-C, et al. Syk is involved in NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation through adaptor ASC phosphorylation and enhanced oligomerization. *J Leukoc Biol*. 2015 May;97(5):825–35.
 18. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):408–15.
 19. Xu X, Yin D, Ren H, Gao W, Li F, Sun D, et al. Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2018 Sep;117:15–27.
 20. Perera AP, Fernando R, Shinde T, Gundamaraju R, Southam B, Sohal SS, et al. MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. *Sci Rep [Internet]*. 2018 Dec [cited 2018 Jul 19];8(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-26775-w>
 21. Stack J, Ryan J, McCarthy G. Colchicine: New Insights to an Old Drug. *Am J Ther*. 2015;22(5):e151–7.
 22. Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR. Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. *Clin Ther*. 2014 Oct;36(10):1465–79.
 23. Martínez GJ, Celermajer DS, Patel S. Corrigendum to: “The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation” [Atherosclerosis. 2018 Feb;269:262–271]. *Atherosclerosis*. 2018 Jun;273:157.
 24. Fulp J, He L, Toldo S, Jiang Y, Boice A, Guo C, et al. Structural Insights of Benzenesulfonamide Analogues as NLRP3 Inflammasome Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Characterization. *J Med Chem*. 2018 Jun 28;61(12):5412–23.
 25. Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, et al. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Apr;41(4):279–86.
 26. Surprenant A, North RA. Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu Rev Physiol*. 2009 Mar;71(1):333–59.
 27. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998 Sep;50(3):413–92.
 28. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*. 1994;64(3):445–75.
 29. Müller T, Fay S, Vieira RP, Karmouty-Quintana H, Cicko S, Ayata CK, et al. P2Y6 Receptor Activation Promotes Inflammation and Tissue Remodeling in Pulmonary Fibrosis. *Front Immunol [Internet]*. 2017 Aug 22 [cited 2018 Jul 19];8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01028/full>

30. Miras-Portugal MT, Sebastián-Serrano Á, de Diego García L, Díaz-Hernández M. Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *J Neurosci*. 2017 Jul 26;37(30):7063–72.
31. Yin J, You S, Liu H, Chen L, Zhang C, Hu H, et al. Role of P2X7R in the development and progression of pulmonary hypertension. *Respir Res* [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 Jul 19];18(1). Available from: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-017-0603-0>
32. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, et al. Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X₇ Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 15;182(6):774–83.
33. Chandrashekar V, Das S, Seth RK, Dattaroy D, Alhasson F, Michelotti G, et al. Purinergic receptor X7 mediates leptin induced GLUT4 function in stellate cells in nonalcoholic steatohepatitis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2016 Jan;1862(1):32–45.
34. Li X, Zhang Y, Jin Q, Xia K-L, Jiang M, Cui B-W, et al. Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase-mediated regulation by gentiopicroside ameliorates P2X7 receptor-dependent alcoholic hepatosteatosis: Gentiopicroside improves alcoholic hepatosteatosis. *Br J Pharmacol*. 2018 May;175(9):1451–70.
35. Gicquel T, Le Daré B, Boichot E, Lagente V. Purinergic receptors: new targets for the treatment of gout and fibrosis. *Fundam Clin Pharmacol*. 2017 Apr;31(2):136–46.
36. Qian F, Xiao J, Hu B, Sun N, Yin W, Zhu J. High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2017 Jun;64:61–8.
37. Asatryan L, Ostrovskaya O, Lieu D, Davies DL. Ethanol differentially modulates P2X4 and P2X7 receptor activity and function in BV2 microglial cells. *Neuropharmacology*. 2018 Jan;128:11–21.
38. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar;440(7081):237–41.
39. Sueblinvong V, Kerchberger VE, Saghaifi R, Mills ST, Fan X, Guidot DM. Chronic Alcohol Ingestion Primes the Lung for Bleomycin-Induced Fibrosis in Mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014 Feb;38(2):336–43.
40. Siegmund SV, Brenner DA. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Nov;29(11 Suppl):102S-109S.
41. Szabo G, Mandrekar P, Oak S, Mayerle J. Effect of Ethanol on Inflammatory Responses. *Pancreatology*. 2007 Jul;7(2–3):115–23.
42. Arvers P. Alcool et poumon : des liaisons dangereuses. *Rev Mal Respir* [Internet]. 2018 Jun [cited 2018 Jul 19]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0761842518301293>
43. Pascual M, Baliño P, Aragón CMG, Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*. 2015 Feb;89:352–9.
44. Marco Rossi, Muhammad Jahanzaib Anwar, Ahmad Usman, Ali Keshavarzian, Faraz Bishehsari. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption—Populations to Molecules. *Cancers*. 2018 Jan 30;10(2):38.

45. Ramadori P, Cubero F, Liedtke C, Trautwein C, Nevzorova Y. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: Adding Fuel to the Flame. *Cancers*. 2017 Sep 25;9(12):130.
46. Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between Alcohol Consumption and Breast Cancer: A Look at the Evidence. *Womens Health*. 2015 Jan;11(1):65–77.
47. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Volume 100E: Personal habits and indoor combustion: consumption of alcoholic beverages. Lyon, France [Internet]. 2012 [cited 2018 Jun 13]. Available from: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100E.pdf>
48. Vaughn BP, Robson SC, Burnstock G. Pathological roles of purinergic signaling in the liver. *J Hepatol*. 2012 Oct;57(4):916–20.
49. Burnstock G, Novak I. Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic Signal*. 2013 Sep;9(3):307–24.
50. Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. P2X₇ Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):13309–17.
51. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X₇ Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. *Cancer Res*. 2012 Jun 15;72(12):2957–69.
52. Giannuzzo A, Pedersen SF, Novak I. The P2X₇ receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Mol Cancer* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Jul 19];14(1). Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0472-4>
53. Santos AA, Cappellari AR, de Marchi FO, Gehring MP, Zaparte A, Brandão CA, et al. Potential role of P2X₇R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. *Purinergic Signal*. 2017 Sep;13(3):279–92.
54. Tan C, Han L, Zou L, Luo C, Liu A, Sheng X, et al. Expression of P2X₇R in breast cancer tissue and the induction of apoptosis by the gene-specific shRNA in MCF-7 cells. *Exp Ther Med*. 2015 Oct;10(4):1472–8.
55. Ghalali A, Wiklund F, Zheng H, Stenius U, Högberg J. Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X₇ and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 2014 Jul;35(7):1547–55.
56. Gicquel T, Robert S, Loyer P, Victoni T, Bodin A, Ribault C, et al. IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J*. 2015 Oct;29(10):4162–73.
57. McCarthy DA, Ranganathan A, Subbaram S, Flaherty NL, Patel N, Trebak M, et al. Redox-control of the alarmin, Interleukin-1 α . *Redox Biol*. 2013;1(1):218–25.
58. Liang Y, Harris FL, Jones DP, Brown LAS. Alcohol induces mitochondrial redox imbalance in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:1427–34.
59. Chen MM, Bird MD, Zahs A, Deburghraeve C, Posnik B, Davis CS, et al. Pulmonary inflammation after ethanol exposure and burn injury is attenuated in the absence of IL-6. *Alcohol*. 2013 May;47(3):223–9.
60. Hong F, Kim W-H, Tian Z, Jaruga B, Ishac E, Shen X, et al. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against

- ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-xL proteins. *Oncogene*. 2002 Jan;21(1):32–43.
61. Cahill CM, Rogers JT. Interleukin (IL) 1 β Induction of IL-6 Is Mediated by a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent AKT/I κ B Kinase α Pathway Targeting Activator Protein-1. *J Biol Chem*. 2008 Sep 19;283(38):25900–12.
62. Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer H-D, Johansen P, Senti G, et al. Inflammasome activation and IL-1 target IL-1 for secretion as opposed to surface expression. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Nov 1;108(44):18055–60.
63. Lindros KO, Stowell A, Pikkarainen P, Salaspuro M. Elevated blood acetaldehyde in alcoholics with accelerated ethanol elimination. *Pharmacol Biochem Behav*. 1980;13 Suppl 1:119–24.
64. Eriksson CJ. Human blood acetaldehyde concentration during ethanol oxidation (update 1982). *Pharmacol Biochem Behav*. 1983;18 Suppl 1:141–50.
65. Di Padova C, Alderman J, Lieber CS. Improved methods for the measurement of acetaldehyde concentrations in plasma and red blood cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986 Feb;10(1):86–9.
66. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis*. 2012 Nov;16(4):667–85.
67. Eriksson CJP. Measurement of acetaldehyde: what levels occur naturally and in response to alcohol? *Novartis Found Symp*. 2007;285:247–55; discussion 256–260.
68. Hernandez-Munoz R, Ma XL, Baraona E, Lieber CS. Method of acetaldehyde measurement with minimal artifactual formation in red blood cells and plasma of actively drinking subjects with alcoholism. *J Lab Clin Med*. 1992 Jul;120(1):35–41.
69. Seeland S, Kettiger H, Murphy M, Treiber A, Giller J, Kiss A, et al. ATP-induced cellular stress and mitochondrial toxicity in cells expressing purinergic P2X7 receptor. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 Mar;3(2):e00123.
70. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *J Biol Chem*. 2007 Feb 2;282(5):2871–9.
71. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*. 2015 Apr;4:296–307.
72. Zhang Y, Jin Q, Li X, Jiang M, Cui B-W, Xia K-L, et al. Amelioration of Alcoholic Liver Steatosis by Dihydroquercetin through the Modulation of AMPK-Dependent Lipogenesis Mediated by P2X7R–NLRP3-Inflammasome Activation. *J Agric Food Chem*. 2018 May 16;66(19):4862–71.
73. Lombardi M, Mantione ME, Baccellieri D, Ferrara D, Castellano R, Chiesa R, et al. P2X7 receptor antagonism modulates IL-1 β and MMP9 in human atherosclerotic vessels. *Sci Rep [Internet]*. 2017 Dec [cited 2018 Jul 19];7(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05137-y>
74. Karoutzou O, Kwak S-H, Lee S-D, Martínez-Falguera D, Sureda F, Vázquez S, et al. Towards a Novel Class of Multitarget-Directed Ligands: Dual P2X7–NMDA Receptor Antagonists. *Molecules*. 2018 Jan 21;23(1):230.

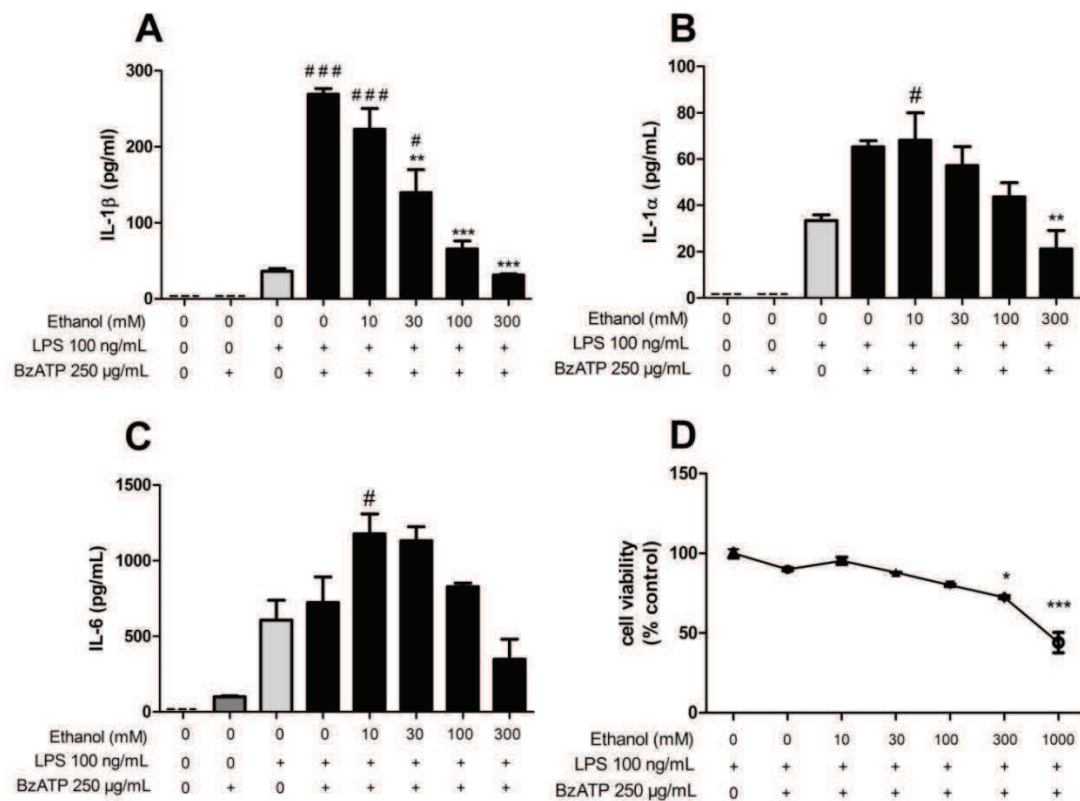


Figure 1: Acute exposure of MdMs to ethanol dose-dependently inhibits IL-1 β hypersecretion after cell stimulation with LPS + BzATP. Secretion of IL-1 β , IL-1 α , and IL-6 into the cell culture supernatant was assessed (using an ELISA) after activation of MdMs with 100 ng/mL LPS overnight or medium, followed by a 6 h incubation with 250 μ M BzATP or medium (A-C). Cell viability was measured in an MTT assay and expressed relative to the value determined after LPS treatment alone (set arbitrarily to 100%) (D). The data are quoted as the mean $\pm$ SEM from one representative experiment performed in triplicate. *** p <0.001; ** p <0.01: LPS + BzATP in the absence of ethanol, compared with LPS + BzATP in the presence of various concentrations of ethanol. #### p <0.01; # p <0.05: LPS compared with LPS + BzATP in the presence or absence of ethanol.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

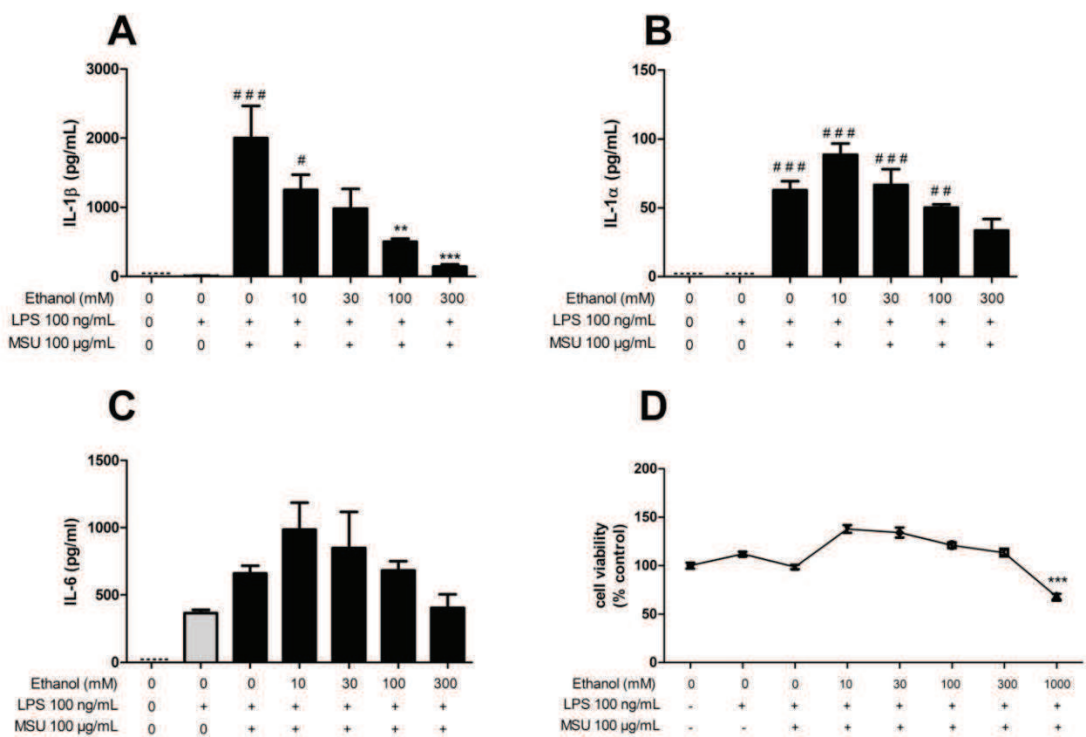


Figure 2: The acute exposure of MdMs to ethanol dose-dependently inhibits IL-1 β hypersecretion after LPS + MSU stimulation. Secretion of IL-1 β , IL-1 α , and IL-6 into the culture supernatant was assessed by ELISA after cell activation with 100 ng/mL LPS overnight or medium, followed by 6 h of treatment with 100 µg/mL MSU or medium (A-C). Cell viability was measured in an MTT assay and expressed relative to the value determined after LPS treatment alone (arbitrary set to 100%) (D). The data are quoted as the mean $\pm$ SEM from one representative experiment performed in triplicate. *** p <0.001; ** p <0.01: LPS + MSU in the absence of ethanol, compared with LPS + MSU in the presence of ethanol at various concentrations. ## p <0.01; ### p <0.001: LPS compared with LPS + MSU in the presence or absence of ethanol.

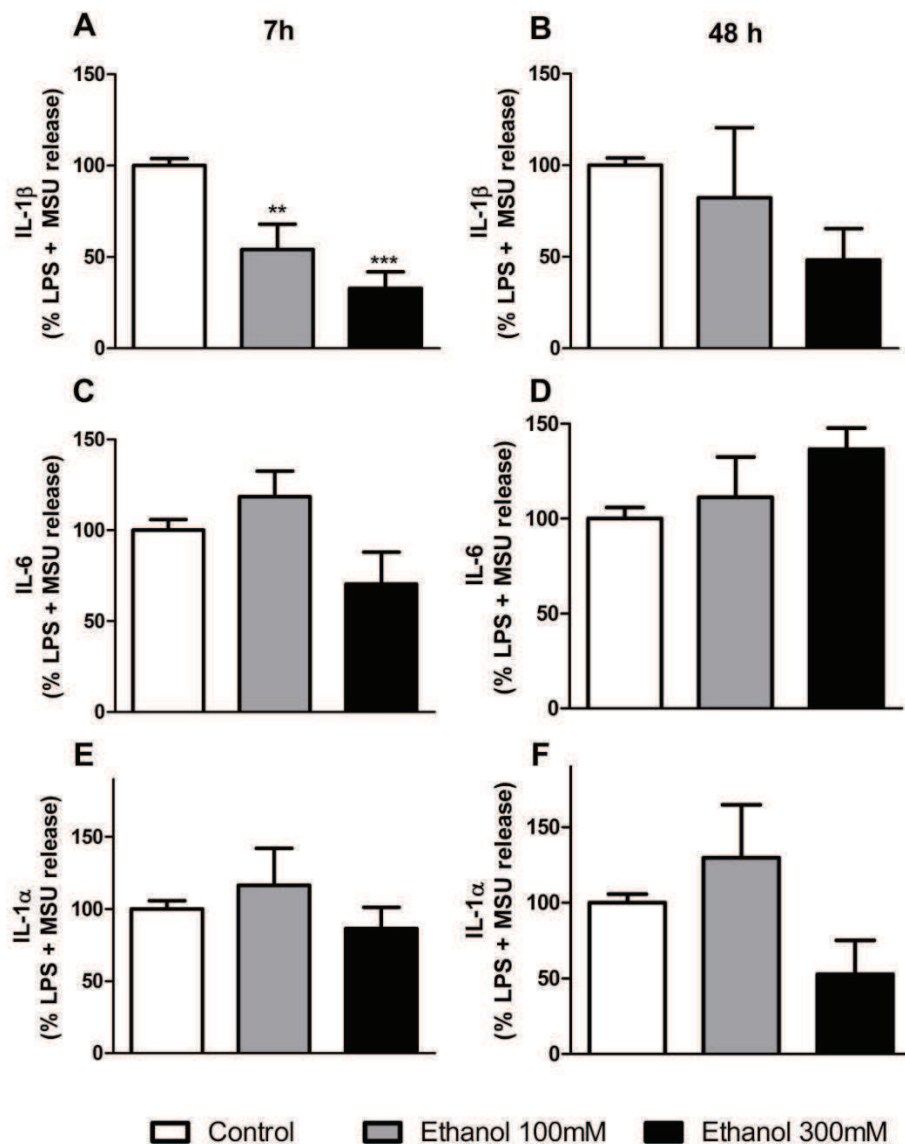


Figure 3: Ethanol's inhibition of IL-1 β production disappears after 48 h. Secretion IL-1 β , IL-1 α , and IL-6 into the culture supernatant was assessed by ELISA in the cell culture supernatant of MdMs after activation with 100 ng/mL LPS overnight, followed by 6 h of treatment with 300 μ g/mL MSU (A-F). Ethanol at 100 mM or 300 mM was added 1 h (A; C; E) or 42 h (B; D; F) before MSU treatment, and was present throughout the treatment period. The data are quoted as the mean $\pm$ SEM from three independent experiments performed in triplicate. ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05: LPS + MSU in the absence of ethanol, compared with LPS + MSU in the presence of ethanol at various concentrations.

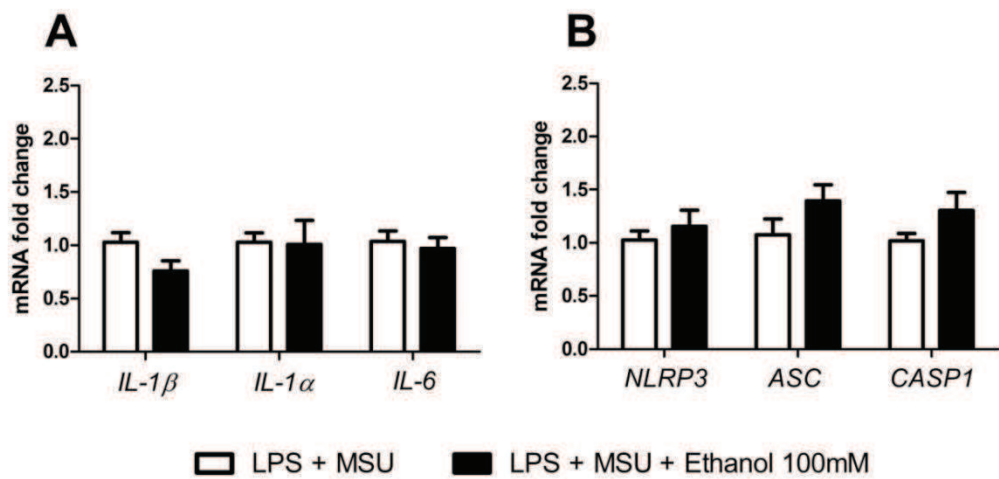


Figure 4: Ethanol does not influence the mRNA expression of inflammasome components or IL-1β, IL-1α and IL-6 after LPS + MSU stimulation of MdMs. The MdMs were incubated overnight with 100 ng/mL LPS, and then stimulated with 100 μg/mL MSU for 6 h. Ethanol (at 100 mM) was added 1 h before MSU, and was present throughout the treatment period. Cell lysates were collected, and the mRNA expression levels of *IL-1β*, *IL-1α*, *IL-6* (A) and inflammasome components (*NLRP3*, *CASP1*, and *ASC*) (B) were determined using RT-qPCR. The results were normalized against *GAPDH* gene expression. The data are quoted as the mean ± SEM from three independent experiments performed in triplicate. ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05 for ethanol treatment compared with the control treatment, for each receptor.

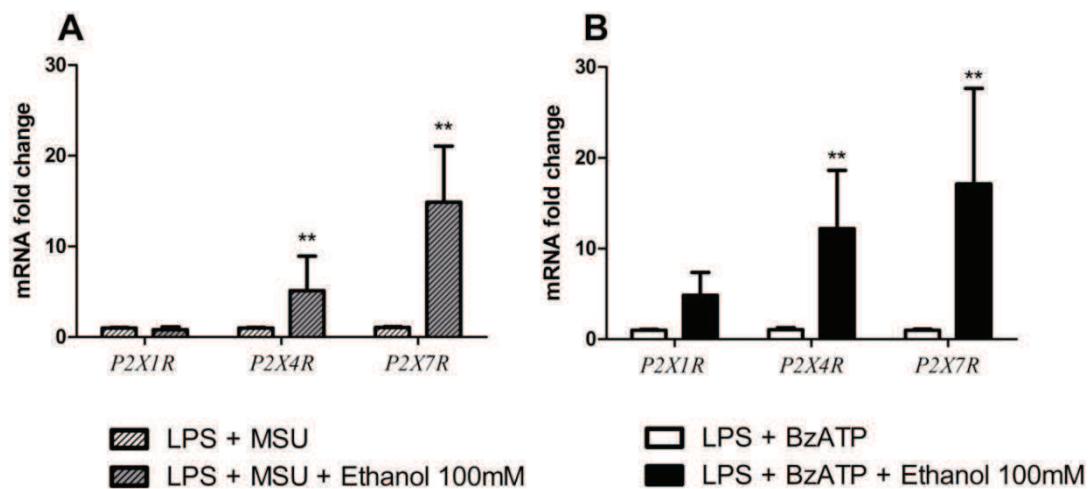


Figure 5: Ethanol promotes the mRNA expression of the purinergic receptors P2X7 and P2X4 following stimulation of MdMs with LPS + MSU. The MdMs were incubated overnight with 100 ng/mL LPS, followed by treatment with 100 μ g/mL MSU or 250 mM BzATP for 6 h. Ethanol (100 mM) was added 1 h before MSU or BzATP, and was present throughout the treatment period. Cell lysates were collected, and mRNA expression levels of purinergic receptors (P2X1, P2X4, and P2X7) were determined using RT-qPCR (A-B). The results were normalized against *GAPDH* gene expression. The data are quoted as the mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments performed in triplicate. ** $p < 0.01$: treatment with ethanol, compared with the control treatment for each receptor.

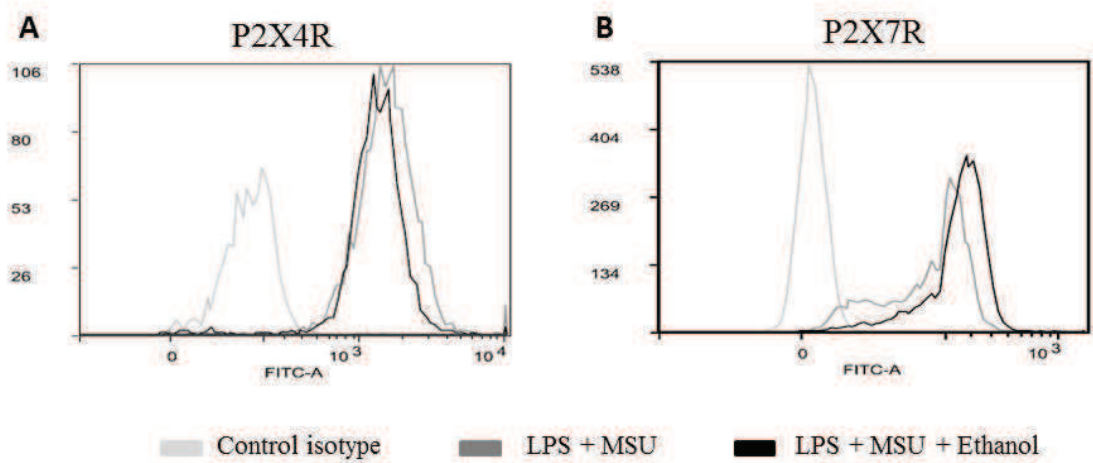


Figure 6: Ethanol increases mRNA expression levels of purinergic receptors in MdMs. The MdMs were obtained by incubating monocytes with rhGM-CSF (50 ng/mL) in medium. After 8 d, the cells were incubated overnight with 100 ng/mL LPS and then with 300 µg/mL MSU for 6 h. Ethanol (at 100 mM) or medium was added 18 h before MSU, and was present throughout the treatment period. Expression of P2X7R and P2X4R on the cell surface was studied using flow cytometry. The data correspond to the fluorescence values for one experiment performed in triplicate.

LE DARÉ, Brendan - Récepteurs purinergiques : nouvelles cibles de médicaments anti-inflammatoires dans les pathologies liées à l'éthanol ?

100 feuilles., 44 figures., 30 cm.- Thèse : Diplôme d'Etudes Spécialisées : Pharmacie Hospitalière Pratique et Recherche ; Rennes 1; 2018 ; N° .

Résumé :

La consommation d'alcool est considérée comme la troisième cause de décès aux États-Unis. Cependant, en plus de sa toxicité directe, l'éthanol possède deux effets distincts sur le système immunitaire : il inhibe l'inflammasome NLRP3 lors d'une courte exposition tandis qu'une exposition prolongée active cet inflammasome. L'inflammasome NLRP3 est un complexe de l'immunité innée, permettant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels que l'Interleukine 1 β et l'interleukine 18, en réponse à des motifs de pathogènes ou des signaux de danger. Les récepteurs purinergiques (notamment le récepteur P2X7) sont des récepteurs aux nucléotides extracellulaires, pouvant activer l'inflammasome NLRP3 et sont impliqués dans de nombreuses maladies liées à l'éthanol (telles que la goutte, la fibrose pulmonaire, la stéatohépatite alcoolique et certains cancers). Dans ce contexte, notre équipe a émis l'hypothèse que l'éthanol pouvait réguler les récepteurs purinergiques et moduler ainsi l'activité de l'inflammasome NLRP3. Dans des expériences sur des macrophages dérivés de monocytes humains, nous avons constaté que la sécrétion d'interleukine 1 β était inhibée après 7 heures d'exposition (mais pas 48 heures d'exposition) à l'éthanol. La disparition de l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la sécrétion d'IL-1 β après 48 h n'était pas médiée par une augmentation de la production des interleukines (IL-1 α , IL-6 et IL-1 β) ou des composants de l'inflammasome (protéine NLRP3, ASC et Caspase 1). Par ailleurs, l'éthanol induisait l'expression protéique du récepteur P2X7. Les résultats des expériences suggèrent que l'éthanol induirait l'activation de l'inflammasome NLRP3 en régulant positivement le récepteur P2X7. Cette observation pourrait représenter un nouveau mécanisme d'inflammation dans les maladies liées à l'éthanol, et positionnerait ainsi les récepteurs purinergiques comme nouvelle cible des médicaments anti-inflammatoires dans ces pathologies.

Rubrique de classement : Pharmacologie - immunologie

Mots-clés : Ethanol, inflammasome NLRP3, récepteurs purinergiques, P2X7R, macrophages, inflammation, acide urique

Mots-clés anglais MeSH : Ethanol, NLRP3 inflammasome, purinergic receptor, P2X7R, macrophages, inflammation, uric acid

JURY :

Président : Madame le Professeur Isabelle MOREL

Assesseurs : Monsieur le Docteur Thomas GICQUEL, Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Vincent LAGENTE

Monsieur le Docteur Stanislas GRASSIN DELYLE

Monsieur le Docteur Pierre-Nicolas BOIVIN