

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

ÉTUDE DE LA REGULATION DE LA PYROPTOSE PAR LA MITOPROTEASE HTRA2 LORS D'UNE INFECTION VIRALE

Par
Paulin Junior Vanié

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Laurent Chatel-Chaix
INRS-Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Marc Germain
Département de biologie médicale
Université du Québec à Trois-Rivières

Directeur de recherche

Ian Gaël Rodrigue-Gervais
INRS-Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

RÉSUMÉ

Le suicide de la cellule infectée est la défense suprême contre les virus, qui sont des parasites intracellulaires obligatoires. La pyroptose est une mort cellulaire nécrotique déclenchée par des caspases inflammatoires utilisant la voie canonique (caspase-1) ou non-canonique (caspase-4,-5,-11) de l'inflammasome en réponse à des virus, mais l'activation de la pyroptose par les inflammasomes a un effet complexe sur la dynamique de l'infection virale et la survie de l'hôte. Si elle élimine la niche de réplication et fournit du carburant aux processus pro-inflammatoires, elle peut aussi causer des dommages aux tissus de l'hôte et augmenter la gravité de la maladie virale. Or, les mécanismes moléculaires qui désactivent la voie inflammasome-pyroptose pour maintenir une réponse équilibrée au cours d'une infection virale n'ont pas été clairement définis. Les résultats présentés dans ce mémoire révèlent la protéase mitochondriale HTRA2 comme un effecteur dans ce processus qui est déclenché par des virus à ARN et à ADN. À l'aide d'un modèle murin contenant une mutation S276C dans l'exon 3 du domaine protéase de HTRA2 (par la suite appelé *mnd2*), nous montrons que seule la voie canonique caspase-1 dépendante est assujettie à une régulation par l'activité catalytique de HTRA2. HTRA2 agirait sur l'activation de la caspase-1 par le complexe inflammasome en maintenant le flux autophagique et la fonction dégradative des lysosomes. Nos résultats montrent aussi que la perte de l'activité HTRA2 sensibilise les macrophages à l'apoptose et ne protège plus ceux-ci contre la mort induite après infection avec le virus influenza. En somme, HTRA2 joue un rôle non redondant en tant qu'interrupteur cellulaire essentiel pour limiter la réponse de l'inflammasome aux infections virales et garde l'inflammation sous contrôle.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1. LES CASPASES : DES MODULATEURS DE LA MORT ET DE L'INFLAMMATION.....	2
1.2. L'INFLAMMASOME : UNE PLATEFORME ACTIVANT LES CASPASES INFLAMMATOIRES	3
1.2.1. LES SENSEURS DE L'INFLAMMASOME	3
1.2.2. L'ACTIVATION DE L'INFLAMMATION	4
1.2.3. L'ADAPTEUR ASC.....	7
1.3. LA PYROPTOSE, UNE HISTOIRE DE LYSE IMPLIQUANT LA FAMILLE GASDERMINE	9
1.3.1. GASDERMINE D : EXECUTRICE DE LA PYROPTOSE INDUITE PAR LES CASPASES INFLAMMATOIRES	10
1.3.2. LES PORES GSDMD PERMETTENT LA LIBERATION DE CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL-1	13
1.4. L'INFLAMMASOME DANS LES PATHOLOGIES VIRALES	14
1.4.1. L'EQUILIBRISTE : LA REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE DE L'INFLAMMASOME	17
1.5. ROLE DE LA MITOCHONDRIE DANS L'AXE INFLAMMASOME-PYROPTOSE : DU POINT DE VUE METABOLIQUE ET DE L'ORGANELLE	20
1.5.1. LES PROTEASES DE L'ESPACE INTERMEMBRANAIRE DE LA MITOCHONDRIE.....	22
1.6. HTRA2 : UNE SERINE PROTEASE MITOCHONDRIALE ESSENTIELLE A LA VIE.....	22
1.6.1. REGULATION DE L'ACTIVITE DE HTRA2 ET SON INTERACTOME	23
1.6.2. FONCTION DE HTRA2 : ROLE PRO-SURVIE.....	27
1.6.3. HTRA2 ET LES PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES, LE MODELE MND2	28
1.6.4. HTRA2 ET LE PARKINSON	31
1.6.5. ROLE DE HTRA2 DANS LES INFECTIONS VIRALES ET LA MORT CELLULAIRE	31
1.6.6. LA PROTEASE MITOCHONDRIALE HTRA2 INHIBE LES INFLAMMASOMES NLRP3 ET AIM2	33
1.6.7. RESULTATS PUBLIES DANS NATURE SCIENTIFIC REPORTS 2018 (EN ANNEXE I).....	34
CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	36
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE	38
3.1. CULTURE CELLULAIRE	39
3.2. TYPAGE GENETIQUE DE LA MUTATION MND2 DE SOURIS	40
3.3. STIMULATIONS CELLULAIRES ET MESURE DE LA FORMATION DES PORES NECROTIQUES EN TEMPS REEL	43

3.3.1. NORMALISATION POUR LE NOMBRE DE CELLULES	44
3.4. MESURE DE L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE SUR LE SEAHORSE XFe96	45
3.5. MESURE DE LA MORT CELLULAIRE ET DE L'ACTIVITE LYSOSOMALE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	46
CHAPITRE 4 RÉSULTATS.....	49
4.0. HTRA2 NE REGULE PAS L'INFLAMMASOME NON-CANONIQUE	50
4.1. PERTE DE FONCTIONS MITOCHONDRIALES ET LYSOSOMALES PAR LE MUTANT MND2 DE HTRA2.....	52
4.2. HTRA2 EST NECESSAIRE POUR LA SURVIE DES MACROPHAGES EXPOSES AU VIRUS DE LA GRIPPE.....	56
4.3. L'ACTIVITE PROTEASE HTRA2 REGULE DIFFEREMMENT D'AUTRES MODALITES DE MORT PROGRAMMEE CHEZ LES MACROPHAGES	57
CHAPITRE 5 DISCUSSION	60
CHAPITRE 6 CONCLUSION	69
BIBLIOGRAPHIE.....	71
ANNEXE I	88

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. CLASSIFICATION ET STRUCTURE DES CASPASES.....	2
FIGURE 2. STRUCTURE DES SENSEURS DE L'INFLAMMASOME ETUDIES DANS CE PROJET (NLRP3, AIM2, NLRC4 ET NLRP1 CHEZ L'HUMAIN ET NLRP1B CHEZ LA SOURIS)	5
FIGURE 3. ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3.....	6
FIGURE 4. STRUCTURE ET ACTIVATION DE L'ADAPTEUR ASC.	8
FIGURE 5. PYROPTOSE INDUITE VIA LA FORMATION D'UN PORE GASDERMINE D (GSDMD).	10
FIGURE 6. STRUCTURE ET FORMATION DES PORES GSDMD.	12
FIGURE 7. LE VIRUS SARS-CoV-2 ET LA MORT CELLULAIRE.....	14
FIGURE 8. STRUCTURE D'INFLUENZA A ET MORT CELLULAIRE CAUSEE DANS LA GRIPPE.	16
FIGURE 9. PROCESSUS GENERAL D'AUTOPHAGIE.	19
FIGURE 10. STRUCTURE DE LA MITOPROTEASE HTRA2.	25
FIGURE 11. TEST DE MYCOPLASME DES BMDMS PROVENANT DE SOURIS C57BL/6 AVEC HTRA2 SAUVAGE (+/+) ET AVEC LE MUTANT (MND2).	40
FIGURE 12. LA MUTATION MND2 (S276C).....	42
FIGURE 13. PROFIL DE DIGESTION AVEC ALUI DES BMDM.....	42
FIGURE 14. MESURE DU RATIO NUCLEAIRE DURANT L'ESSAI DE MORT CELLULAIRE.	45
FIGURE 15. PROFILE THEORIQUE DU TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGENE (OCR).....	47
FIGURE 16. LA PERTE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE HTRA2 ACCELERE LA LYSE PYROPTOTIQUE INDUITE PAR LA CASPASE-1 DES MACROPHAGES, MAIS PAS CELLE INDUITE PAR LA CASPASE-11, ET CE, SANS IMPLIQUER L'APOPTOSE LORS DE L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME.	51
FIGURE 17. L'ABLATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE HTRA2 INDUIT UN DEFICIT D'OXPPOS DANS LES MACROPHAGES.....	54
FIGURE 18. LA PERTE DE L'ACTIVITE PROTEASE DE HTRA2 REDUIT L'ACTIVITE DE LA CATHEPSINE D LYSOSOMALE.	55
FIGURE 19. HTRA2 EST UN FACTEUR DE PRO-SURVIE DANS LES MACROPHAGES INFECTES AVEC LE VIRUS INFLUENZA.	57
FIGURE 20. LA PERTE DE L'ACTIVITE PROTEASE HTRA2 SENSIBILISE A L'APOPTOSE INTRINSEQUE MAIS EST REQUISE POUR LA NECROPTOSE INDUITE PAR LA VOIE TLR4.....	58

FIGURE 21. MECANISME PROPOSE POUR LA REGULATION DE L'INFLAMMASOME PAR HTRA2..... 68

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. RESUME DU ROLE PRO-SURVIE DE HTRA2.....	33
TABLEAU 2. SEQUENCE DES AMORCES POUR LE GENOTYPAGE.....	43
TABLEAU 3. CONDITIONS DE PCR GENOTYPAGE.....	43
TABLEAU 4. REACTIFS UTILISES.....	47
TABLEAU 5. LA PROTEOLYSE DE HTRA2 AUGMENTE LE RATIO ECAR/OCR.....	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AIM2: Absent in Melanoma 2

AM: Alveolar macrophages

APAF1: Apoptotic protease activating factor 1

ARDS: Acute respiratory distress syndrome

ASC/PYCARD: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

ATP: Adenosine triphosphate

BAK: BCL2 antagonist/killer

BAX: BCL2 associated X protein

BCL2: B-cell lymphoma 2

BRISC: Brcc36 isopeptidase complex

CARD: Caspase recruitment domain

CASP1: caspase-1

CASP11: caspase-11

CFLIP: Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein

CMV: Cytomegalovirus

Cyt C: Cytochrome C

Da: Dalton

DAMP: Damage-associated molecular patterns

DENV: Dengue virus

GSDMD: gasdermine D

HMGB1: High mobility group box 1

HSV1: Herpes simplex virus

HTRA2: high-temperature requirement 2

IAP: Inhibitor of apoptosis
IEC: Intestinal epithelial cells
IL: interleukines
IMS: Intermembrane space
JNK1: c-Jun N-terminal kinase 1
LDH: Lactate Dehydrogenase
LPS: Lipopolysaccharide
LRR: leucine-rich repeat domain
MAMs: Mitochondria-associated membranes
MAPL: mitochondria-associated protein ligase
MAVS: mitochondrial antiviral signalling protein
MCMV: Murine Cytomegalovirus
MDA5: Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MLKL: Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase
MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization
mtDNA: mitochondrial DNA
NAIP: Neuronal apoptosis inhibitory protein
NEK7: NIMA-related kinase 7
NF- κ B: nuclear factor- κ B
NK: Natural Killer cells
NLRC4: NLR family CARD domain-containing protein 4
NLRP1: NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 1
NLRP3: NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NOD/NLR: Nucleotide-binding oligomerization domain
OPA1: Optic atrophy gene 1
P2X7R: P2X purinoceptor 7

PARL: Presenilins-associated rhomboid-like

PCR: Polymerase chain reaction

PI: Propidium Iodide

PRR: Pattern Recognition Receptors

PYD: Pyrin domain

RAGE: receptor for advanced glycation endproducts

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted

RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I

RIPK1: Receptor Interacting Protein Kinase 1

RIPK3: Receptor Interacting Protein Kinase 3

ROS: reactive oxygen species

SeV: Sendai virus

TCR: T-cell receptor

TIR: Toll-IL-1 receptor

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumour necrosis factor

TNFR: tumour necrosis factor receptor

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRIF: Toll/Interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon beta

VSV: Vesicular stomatitis virus

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

ZBP1: Z-DNA-binding protein 1

ZIKV: Zika virus

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. Les caspases : des modulateurs de la mort et de l'inflammation

Aujourd'hui, nous avons pris connaissance que les cellules peuvent initier leur propre autodestruction (ou mort) en réponse à divers signaux et par de multiples processus génétiquement encodés et distincts d'un point de vue des cascades biochimiques qui y sont impliquées. Cependant, encore lorsqu'on parle de mort cellulaire programmée, l'apoptose est la modalité de mort qui nous vient en tête, mais il existe d'autres modalités nécrotiques de mort cellulaire programmée dont la pyroptose et la nécroptose. L'apoptose et la pyroptose sont toutes les deux induites par l'activation d'une famille de protéases à cystéine appelée les caspases. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont dites « apoptotiques » tandis que celles impliquées dans la pyroptose sont dites « inflammatoires ». Structurellement, les caspases apoptotiques (initiatrices caspase-8,-9,-10 et exécutoires caspases-3,-6,-7) et les caspases inflammatoires (caspase-1,-4,-5,-11) possèdent une grande et une petite sous-unité catalytique en C-terminale, mais contrairement aux caspases inflammatoires, les caspases apoptotiques ne possèdent pas de domaine d'activation et de recrutement de caspase (CARD) en N-terminale à l'exception de la caspase-9 qui possède un domaine CARD, mais celui-ci est différent du domaine CARD des caspases inflammatoires. La classification des caspases est décrite en détail dans la figure 1.

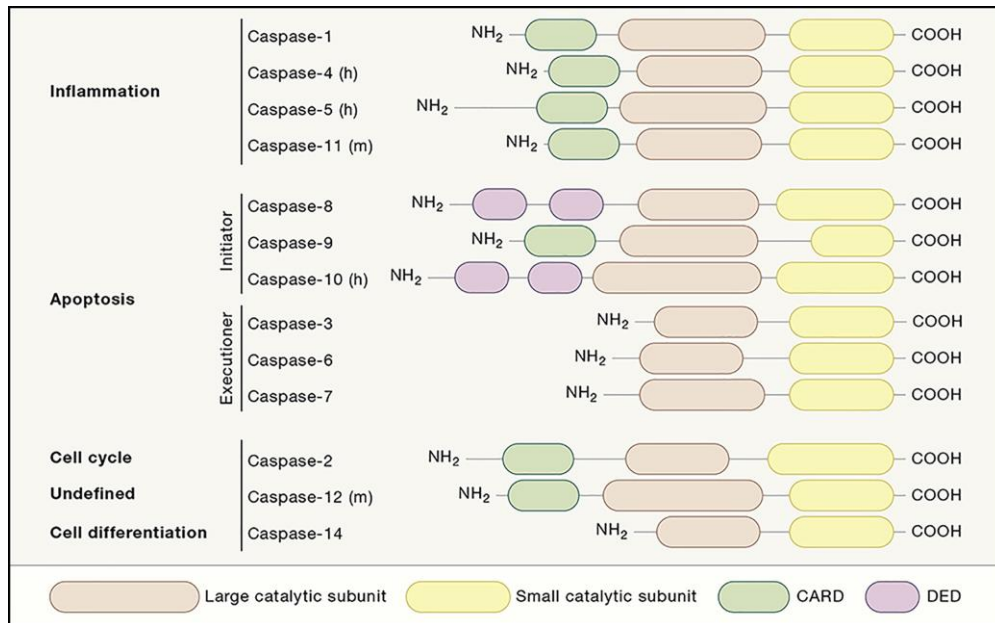


Figure 1. Classification et structure des caspases.

Adaptée de (Van Opendenbosch and Lamkanfi, 2019). Les deux groupes de caspases possèdent une grande et une petite sous-unité catalytique. Les caspases inflammatoires (caspase-1,-4,-5,-11) ont un domaine CARD en N-terminale. Les caspases apoptotiques sont divisées en deux catégories soit les caspases initiatrices (caspase-8,-9,-

10) et les caspases exécutrices (caspase-3,-6,-7). Les caspases présentes uniquement chez l'humain (h) et chez la souris (m) sont indiquées.

Les caspases inflammatoires, bien qu'elles soient des caspases initiatrices, se distinguent de leurs homologues apoptotiques par le fait qu'elles n'ont pas la capacité de cliver les caspases apoptotiques exécutrices sauf dans de rares cas, par exemple, en absence de gasdermine D où la caspase-1 clive la caspase-3,-7 (Sagulenko et al., 2018; Taabazuing et al., 2017). Les caspases inflammatoires sont synthétisées sous la forme d'une proenzyme qui est ensuite clivée en sous-unités de -20 et -10 kDa (p20 et p10) selon un processus d'auto-activation par proximité. Les caspases inflammatoires actives participent dans la maturation de cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 β et IL-18) et dans l'induction de la pyroptose, mort lytique gasdermine dépendante.

1.2. L'inflammasome : une plateforme activant les caspases inflammatoires

L'inflammasome est un complexe d'oligomères multiprotéiques cytosoliques appartenant au système immunitaire inné et est responsable de l'activation des caspases inflammatoires. L'inflammasome canonique, est activé par la voie canonique et est composé d'un senseur, de l'adaptateur ASC et de la procaspase-1. L'inflammasome non canonique n'a pas de senseur à proprement dit, ne requiert pas l'adaptateur ASC et mène à l'activation de la caspase-4,-5,-11 (Martinon et al., 2002; Srinivasula et al., 2002).

1.2.1. Les senseurs de l'inflammasome

Il existe une panoplie de senseurs capables de détecter les *Pathogen associated molecular patterns* (PAMP) qui sont des molécules associées aux pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites) reconnus par le système immunitaire inné ainsi que les *Damage-associated molecular patterns* (DAMP) qui sont des biomolécules de l'hôte qui à la suite de dégâts cellulaires de nature non infectieuse peuvent engendrer une réponse inflammatoire. Les PAMP et les DAMP sont reconnus par des senseurs appelés *Pattern recognition receptors* (PRR) qui comprennent des PRR intracellulaires notamment les *Nucleotide-binding and oligomerization domain* (NBD ou NOD) communément appelé les *NOD-like receptors* (NLR). En plus de leur domaine NBD, les NLR se caractérisent aussi par la présence de motifs répétés riches en leucine (LRR) en C-terminale et d'un domaine d'interaction protéine-protéine homotypique en N-terminale qui peut varier. Certains NLR contiennent un domaine pyrine (NLRP) tandis que d'autres, les NLRC, contiennent un domaine CARD en N-terminale. NLRP3 est le senseur le plus étudié des inflammasomes canoniques. Il est impliqué dans les maladies auto-inflammatoires tels que le *cryopyrin-associated periodic syndromes* (Hoffman et al., 2001). Contrairement aux autres

senseurs de la voie canonique, NLRP3 ne détecte pas un ligand en particulier, mais semble plutôt être capable de détecter les changements métaboliques associés à un dérèglement de l'activité cellulaire. Le senseur AIM2, tout comme NLRP3, possède un domaine PYD, mais contrairement à NLRP3, il possède un domaine HIN-200 en plus qui permet la liaison à l'ADN double-brin (dsDNA) bactérien et viral. Il a été montré que l'inflammasome AIM2 était nécessaire pour la reconnaissance du virus de l'Epstein-Barr (Torii et al., 2017) et le virus de l'Herpès simplex (HSV) de type 1 (Maruzuru et al., 2018). NLRC4, contrairement à NLRP3, contient un domaine CARD lui permettant de recruter directement la procaspase-1 sans passer par l'adaptateur ASC (Poyet et al., 2001). Bien que pas strictement nécessaire pour l'activation de la caspase-1, la liaison de NLRC4 à ASC permet le recrutement d'un plus grand nombre de molécules de procaspase-1, un mécanisme qui amplifie le signal de danger. NLRC4 reconnaît la flagelline (Franchi et al., 2006; Ren et al., 2006) et les protéines du système de sécrétion de type 3 (Kofoed and Vance, 2011; Zhao et al., 2011). NLRP1, le premier senseur de l'inflammasome découvert, est particulier, car en plus de contenir les domaines caractéristiques des NLRP, il contient aussi un domaine *function-to find* (FIIND) (Martinon et al., 2002). Certaines études ont montré que l'activation de NLRP1 était dépendante de l'auto-clivage dans son domaine FIIND (Chavarria-Smith and Vance, 2013), mais il semblerait que cela ne soit pas un mécanisme universel à tous les stimulus détectés par NLRP1 (Cavaillès et al., 2014). Contrairement aux autres NLR, les formes humaine et murine de NLRP1 sont différentes. La souris présente trois formes de NLRP1 (NLRP1a, NLRP1b et NLRP1c) qui sont clivées et activées par le *lethal factor* (LF) de *Bacillus anthracis*. Récemment, il a été montré que la forme humaine de NLRP1 reconnaissait le *dsRNA* intermédiaire de réplication de virus à simple brin d'ARN positif comme le *Semliki Forest virus* (Bauernfried et al., 2021). Similairement à la manière dont le LF active les formes murines de NLRP1, la protéase 3C de plusieurs virus (*human rhinovirus A*, *Coxsackievirus B3*, *Enterovirus 71*, *Poliovirus 1*, *Enterovirus D68* et *Rosavirus A2*) clive la forme humaine de NLRP1 dans la région du maillon pour permettre son activation (Robinson et al., 2020; Tsu et al., 2021). Les senseurs de l'inflammasome étudiés dans ce projet sont décrits dans la Figure 2.

1.2.2. L'activation de l'inflammation

L'activation des inflammasomes canoniques suit les mêmes étapes et à titre d'exemple seule l'activation de NLRP3 qui se fait en deux étapes sera décrite ici. La première étape, le *priming* permet l'activation de la voie NF-KB ce qui mène à l'induction de l'expression au niveau transcriptionnel de NLRP3, des proformes des cytokines inflammatoires de la famille de l'IL-1 (IL-1 β et IL-18) et d'autres composantes de l'inflammasome comme ASC. Le *priming* de

l'inflammasome NLRP3 est nécessaire pour monter une réponse optimale et dans certains types cellulaires, cela est même nécessaire pour la formation de l'inflammasome (Fig. 3a). Toutes les cellules capables de former l'inflammasome n'expriment pas les composantes de l'inflammasome au même niveau. À titre d'exemple, les lignées HEK39T n'expriment pas ASC tandis que les THP1 et les A549 l'expriment à différent niveau (Uhlen et al., 2015). Au-delà d'augmenter l'expression au niveau transcriptionnel des composantes de l'inflammasome pour une réponse immunitaire adéquate, le *priming* permet surtout la de-ubiquitination de NLRP3, modification nécessaire pour son activation (Juliana et al., 2012). La deuxième étape de l'activation de NLRP3 consiste en l'assemblage de l'inflammasome à proprement parler (Fig. 3b). Cette étape peut être faite par divers stimuli notamment les molécules cristalline tels que l'asbestose, la silice, l'alum, des cristaux de monosodium d'urate (MSU), l'acide urique, etc. (Dostert et al., 2008; Eisenbarth et al., 2008) ou encore par le changement dans le volume cellulaire (Compan et al., 2012), l'ARN bactérien ou viral comme celui du virus de Sendai ou d'influenza (Kanneganti et al., 2006a; Kanneganti et al., 2006b).

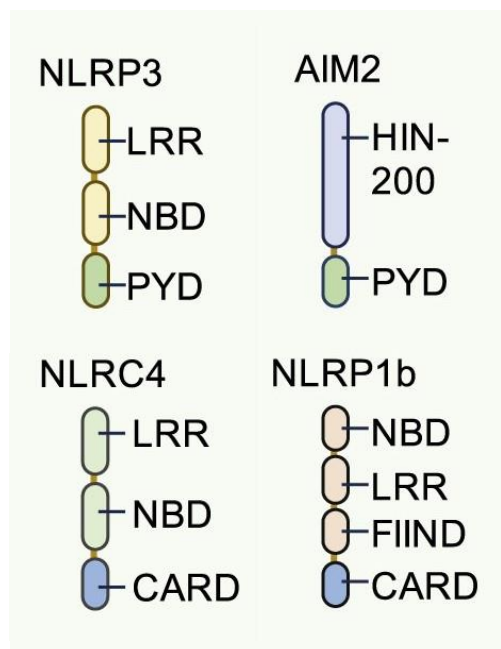


Figure 2. Structure des senseurs de l'inflammasome étudiés dans ce projet (NLRP3, AIM2, NLRC4 et NLRP1 chez l'humain et NLRP1b chez la souris)

Figure adaptée de (Xue et al., 2019). Les senseurs de l'inflammasome sont des protéines cytosoliques qui possèdent une combinaison des différents domaines suivants : un groupement pyrine (PYD), un domaine de recrutement et d'activation des caspases (CARD), un domaine de liaison aux nucléotides (NBD), un domaine riche en résidu leucine (LRR), un groupement HIN-200 ou encore un domaine de fonction à identifier (FIIND).

a Signal 1: Priming

b Signal 2: Activation

c Pyroptosis & cytokines release

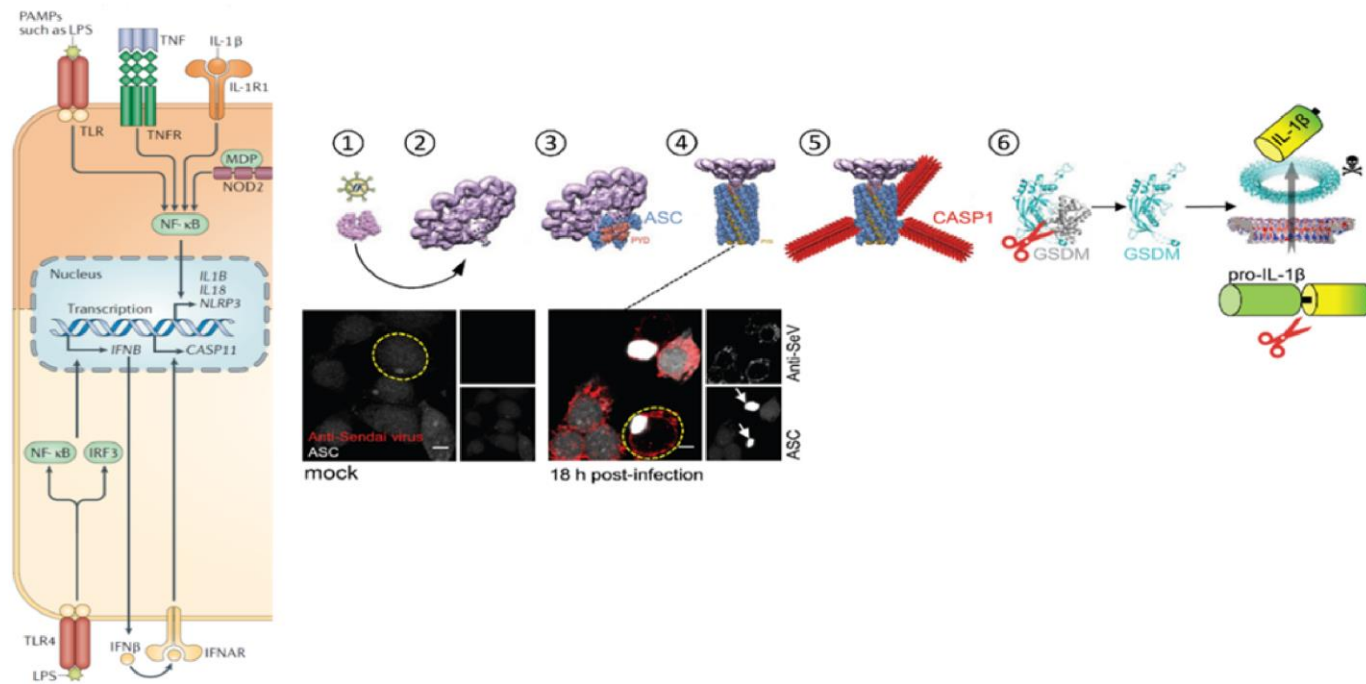


Figure 3. Activation de l'inflammasome NLRP3.

(a) Étape du *priming* de l'inflammasome NLRP3 activé par la voie NF-κB adapté de (Swanson et al., 2019). (b) Activation et nucléation du senseur de l'inflammasome (étape 1-2) par un virus, qui conduit au recrutement de l'adaptateur ASC (3-4) et de l'auto-activation de la pro-caspase-1 par proximité (5), suivit par le clivage de la protéine gasdermine D (GSDMD) par la caspase-1p20 active (6) et (c) finalement déclenchement de la pyroptose par l'induction de pore GSDMD à la surface et sécrétion de l'IL-1β. La rupture de la membrane plasmique et la lyse sont induites par la protéine NINJ1 (non-montré). Les images de microscopie ont été capturées au laboratoire et montre le speck (~1µm) correspondant à l'oligomère de ASC (en fusion avec la protéine fluorescente GFP, en gris-blanc) mesuré 18 h après infection avec le virus de Sendai, souche Cantell (cellules infectées marquées en rouge).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium active aussi NLRP3 (Lee et al., 2012) tout comme l'ATP via le récepteur P2X7R (Mariathasan et al., 2006; Pelegrin et al., 2008; Pelegrin and Surprenant, 2006). L'induction de ROS (Cruz et al., 2007; Zhou et al., 2010) et la nigéricine sont aussi capables de servir de signal 2. La nigéricine forme un pore dans la membrane plasmique qui induit l'efflux du potassium qui semble être un mécanisme convergent d'activation de NLRP3 (Munoz-Planillo et al., 2013; Perregaux and Gabel, 1994; Petrilli et al., 2007). La dépolarisation de la membrane mitochondriale peut aussi activer NLRP3 (Zhou et al., 2011) de même que l'ADN mitochondrial oxydé (ox-mtDNA) (Shimada et al., 2012). Plus précisément, le *mitochondrial deoxyribonucleotide kinase UMP-CMPK2* (CMPK2), induit par IRF1 suite au *priming* de NLRP3 par le LPS selon l'axe MyD88/TRIF, contrôle l'apport de dNTP nécessaire pour la synthèse de mtDNA qui sera oxydé sous l'action des activateurs de NLRP3. Le mtDNA oxydé va ensuite se lier à NLRP3 pour l'activer (Zhong et al., 2018). Suite à l'activation de l'inflammasome dit canonique, la procaspase-1 est recrutée au sein de l'inflammasome par l'intermédiaire de l'adaptateur ASC.

1.2.3. L'adaptateur ASC

L'adaptateur ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) fut découvert lors de l'apoptose induite par l'étoposide dans les HL-60 où il formait des *speck* ou agrégats (Masumoto et al., 1999), toutefois, depuis sa découverte, il a été montré qu'il a principalement un rôle dans la pyroptose et non l'apoptose. ASC est une protéine adaptatrice qui contient un domaine PYD en N-terminale, un domaine CARD en C-terminale et une séquence de 23 résidus entre les deux domaines (Fig.4a) (de Alba, 2009; Masumoto et al., 1999; Sahillioğlu et al., 2014). Il se localise normalement au noyau, mais lors de l'activation l'inflammasome, ASC se retrouve dans le cytoplasme où il lie les senseurs actifs de l'inflammasome tels que NLRP3 via son domaine PYD, mais aussi via des interactions hétérotypiques CARD-CARD pour les senseurs possédant un domaine CARD tels que NLRC4 (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Morrone et al., 2015). Suite à la liaison avec le senseur, ASC forme des dimères grâce aux interactions PYD-PYD et CARD-CARD de sorte à constituer un fil où les domaines PYD sont orientés vers l'intérieur alors que les domaines CARD sont orientés vers l'extérieur. Ces dimères sont plus compacts et recrute ensuite des monomères de l'adaptateur de sorte à former des oligomères qui s'empilent à la verticale donnant lieu à des filaments caractéristiques des *specks* (Fig.4b) (Gambin et al., 2018). L'orientation des domaines CARD vers l'extérieur de la structure facilite ensuite le recrutement de la procaspase-1 par les interactions CARD-CARD. Les molécules de procaspase-1, s'activent ensuite par auto-clivage. Bien qu'on les décrive comme des agrégats, les filaments

d'ASC ne sont pas simplement un amas non spécifique, mais suivent plutôt un échafaudage organisé. Une fois formés, les filaments ont la capacité de recruter d'autres molécules de l'adaptateur et continuer à s'allonger à la manière d'un prion (Cai et al., 2014; Lu et al., 2014). L'inflammasome lorsque libéré dans l'espace extracellulaire à la suite de la mort de la cellule, sera phagocyté par les cellules avoisinantes où il continuera son activité en activant la procaspase-1 et en recrutant de nouvelles molécules d'ASC. L'inflammasome, dans ce contexte, sert de signal de danger en plus de perpétuer l'inflammation (Baroja-Mazo et al., 2014; Franklin et al., 2014). L'activation de l'adaptateur ASC forme un seul inflammasome par cellule qui peut être mesuré. À titre d'exemple, en cytométrie en flux, on mesure la formation des *specks* en rapportant l'intensité sur l'aire du signal. En absence d'activation de l'inflammasome, ASC est sous forme monomérique et le signal est diffus dans la cellule. Le ratio intensité : aire du signal est alors faible. Cependant, l'activation de l'inflammasome engendre l'oligomérisation de l'adaptateur ASC ce qui mène à la formation d'un *speck*. Le signal est alors concentré en un point et le ratio intensité : aire est élevé.

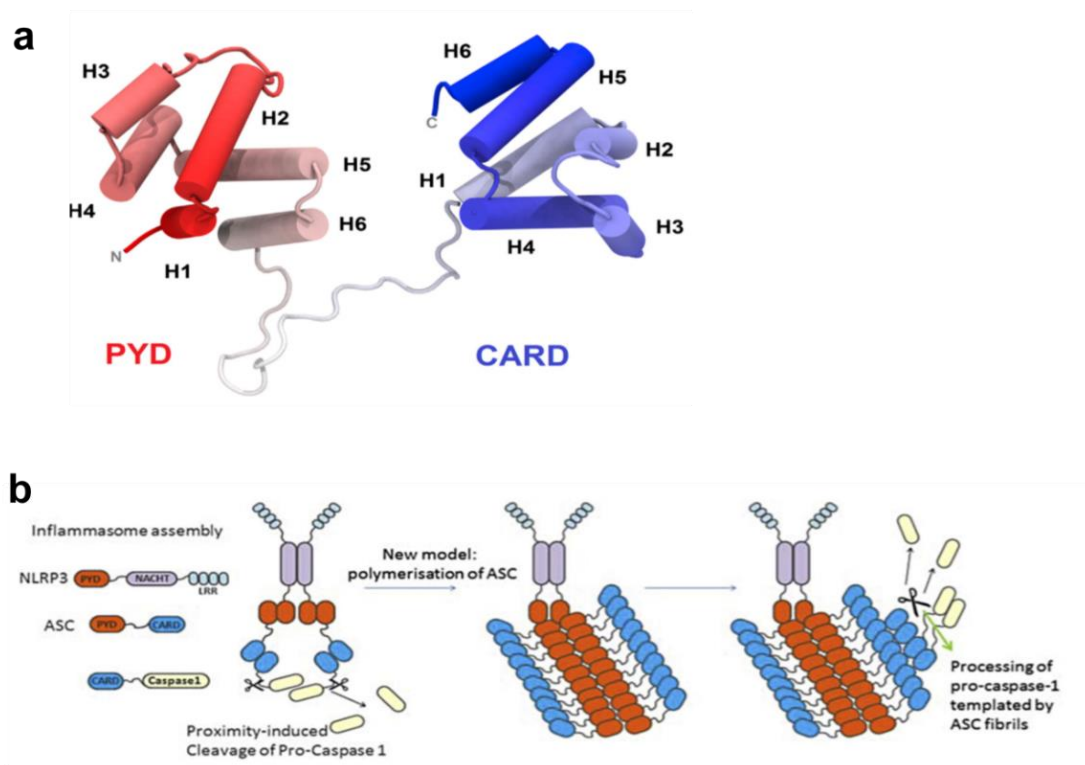


Figure 4. Structure et activation de l'adaptateur ASC.

(a) Structure de l'adaptateur ASC avec le domaine un groupement pyrine (PYD) montré en rouge et le domaine de recrutement et d'activation des caspases (CARD) montré en bleu adapté de (Gambin et al., 2018). (b) formation des filaments de l'adaptateur ASC avec le senseur NLRP3 via leurs domaines PYD respectifs. Les filaments de l'adaptateur

se polymérisent via leur domaine PYD de sorte à exposer leur domaine CARD vers l'extérieur ce qui permet le recrutement de la procaspase-1 via le domaine CARD. La procaspase-1 s'active ensuite par auto-clivage.

L'inflammasome non canonique conduit à l'activation de la caspase-4,-5,-11, mais ne nécessite pas un senseur. La caspase-4,-5,-11 reconnaît directement le LPS cytosolique et les phospholipides oxydés (oxPAPC) (Shi et al., 2014; Zanoni et al., 2016) et s'active par auto-clivage de la même manière que la caspase-1, mais ne nécessite pas la présence de l'adapteur ASC (Lee et al., 2018; Ross et al., 2018).

1.3. La pyroptose, une histoire de lyse impliquant la famille gasdermine

La pyroptose est une modalité de mort cellulaire programmée de type nécrotique qui tire son nom du grec « πῦρ c'est-à-dire feu » (Cookson and Brennan, 2001). La pyroptose, contrairement aux autres formes de mort nécrotique, est coordonnée par les caspases inflammatoires qui peu importe la voie d'activation, clivent ensuite gasdermine D, mais contrairement à la caspase-1, la caspase-4,-5,-11 ne clive pas les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 β et IL-18) qui sont impliqués dans l'induction de la fièvre d'où l'origine du nom de cette mort nécrotique (Fig.3c et 5). La pyroptose s'effectue en deux étapes (Fink and Cookson, 2006). La première étape est la formation du pore gasdermine D qui permet la sécrétion des interleukines pro-inflammatoires de la famille des IL-1 et d'autres ions de petites tailles qui peuvent passer à travers le pore gasdermine D qui a un diamètre interne de 10-20nm (Ruan et al., 2018). La deuxième étape est la lyse osmotique régit par la protéine NINJ1 qui perméabilise la membrane plasmique (Kayagaki et al., 2021). La perte de l'intégrité membranaire, mécanisme qu'on croyait être seulement passif semble être provoquée par NINJ1. Le mécanisme d'activation de NINJ1 reste encore inconnu, mais l'une des hypothèses est un efflux de potassium et une entrée d'eau dans la cellule donnant lieu à un gonflement de la cellule. La sortie de larges molécules de DAMP comme le LDH s'effectue via la perméabilisation provoquée par NINJ1, car ces molécules sont trop grosses pour passer à travers le pore gasdermine D.

L'iodure de propidium (PI) n'est pas perméable aux cellules vivantes et en raison de sa petite taille (-416 Da), il peut passer à travers les pores GSDMD et de ce fait, il peut être employé comme marqueur de la formation des pores GSDMD. À l'opposé, le lactate déshydrogénase (LDH) peut être employé comme marqueur de la lyse cellulaire, car en raison de sa taille (-140 kDa) ne peut traverser les pores GSDMD et est libéré seulement à la suite de la lyse de la membrane plasmique. La mesure en temps réel de la cinétique de l'incorporation du PI après le clivage de GSDMD par les caspases inflammatoires en présence ou en absence de glycine, composé capable de protéger la cellule de la lyse ne montre pas de différence alors que la mesure

du LDH quant à elle montre une dissociation temporelle avec et sans glycine. Cela suggère que la formation des pores GSDMD (mesure de PI) est un évènement qui précède la lyse de la cellule (mesure de LDH) (Russo et al., 2016). La détection par Western blot de la forme active de la caspase-1 (p20) ainsi que de la partie N-terminale de GSDMD sont d'autres moyens pour détecter la pyroptose.

1.3.1. Gasdermine D : exécutrice de la pyroptose induite par les caspases inflammatoires

GSDMD fait partie de la famille des gasdermines, un groupe de protéines qui à ce jour comprend six variants chez l'humain : GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, DFNA5 (GSDME) et DFNB59. Le nom gasdermine provient de la distribution importante de GSDMA dans le tractus gastro-intestinal (œsophage et estomac, mais absent dans l'intestin) et d'une distribution dans la peau bien que plus faible que celle du tractus gastro-intestinal lors de sa découverte chez la souris (Saeki et al., 2000). Parmi les gasdermines, seule GSDME est conservée selon les règnes à l'exception des mouches et des vers de terres où elle est absente.

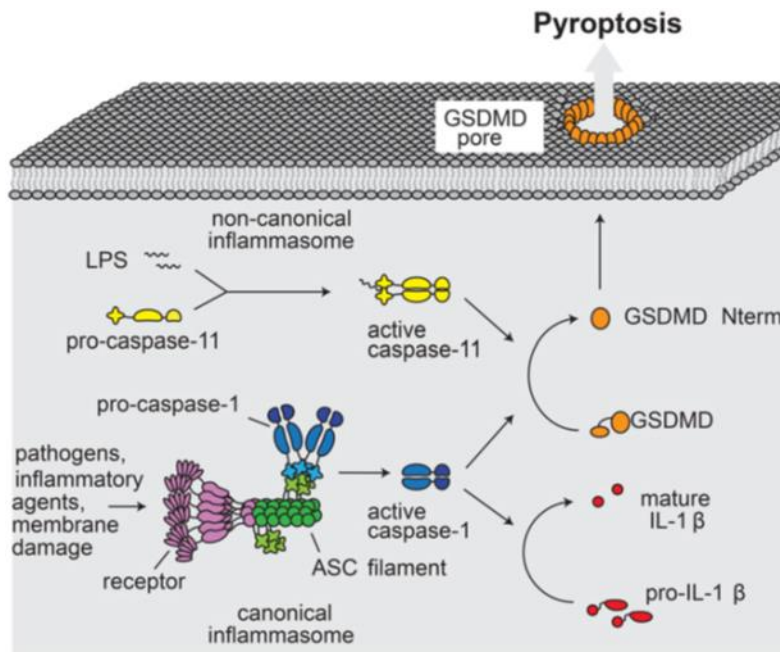


Figure 5. Pyroptose induite via la formation d'un pore gasdermine D (GSDMD).

La voie non-canonique de l'inflammasome montre l'activation de procaspase-1 représenté en jaune à la suite de la détection de LPS adapté de (Sborgi et al., 2016). La voie canonique montre un senseur qui se lie à l'adaptateur ASC représenté en vert pour permettre le recrutement de la procaspase-1 représenté en bleu. Une fois actives, les caspases-1,-11 clivent gasdermine D représentée en orange pour permettre au domaine N-terminale de cette dernière de former un pore dans la membrane plasmique. La caspase-1 contrairement à la caspase-11 clive aussi les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 β) représentées en rouge pour les rendre en leur forme mature.

GSDMD, plus récente que GSDME d'un point de vue évolutif, est présente seulement dans les mammifères. GSDMD se retrouve dans presque tous les organes du système digestif (les glandes salivaires, l'intestin, le pancréas, le foie, l'estomac, etc.), dans l'utérus et la paroi vaginale, les poumons, les reins et la vessie, le cœur, la peau, la rate, les cellules T CD4⁺, CD8⁺, les cellules B, les cellules *Natural Killers* (NK) et les monocytes (Broz et al., 2020; Lachmann et al., 2018). Le gène codant pour GSDMD est situé sur le chromosome 8 chez l'humain et donne une protéine de 484 acides aminés avec une localisation dans le cytosol (Chen et al., 2016; Liu et al., 2016b). Toutes les gasdermines sauf DFNB59 sont formées de deux domaines : une partie N-terminale et une partie C-terminale unie par un maillon (Shi et al., 2015). Le clivage des gasdermines permet la libération de la partie N-terminale qui est inhibée par la partie C-terminale (Fig.6a). Le clivage de GSDMD se fait dans la région du maillon à la position D275 chez l'humain (D276 chez la souris) de sa séquence peptidique par les caspases inflammatoires (caspase-1,-4,-5,-11) (Agard et al., 2010; He et al., 2015; Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015) (Fig.6b). La partie N-terminale de GSDMD est un homo-oligomère composé principalement de dimères et de tétramères donnant lieu à un anneau contenant 27-28 sous-unités qui s'insèrent dans la membrane plasmique formant un pore induisant la pyroptose (Sborgi et al., 2016; Shi et al., 2015). Les pores de GSDMD mesurent en moyenne 10-20nm de diamètre interne et ont une charge globale négative (Fig.6c, d) (Aglietti et al., 2016; Chen et al., 2016; Ding et al., 2016; Liu et al., 2016b; Sborgi et al., 2016).

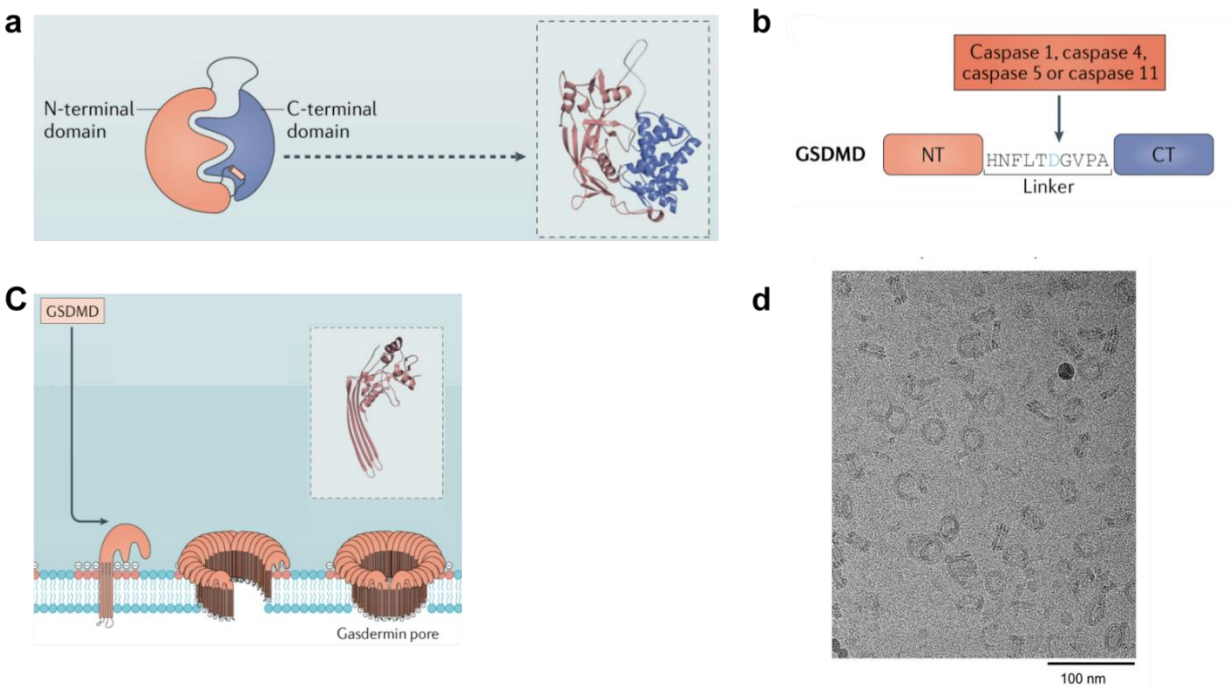


Figure 6. Structure et formation des pores GSDMD.

(a) Structure de GSDMD où la partie N-terminale représentée en orange est inhibée par la partie C-terminale représentée en bleu adapté de (Xia et al., 2021). (b) Séquence peptidique de GSDMD avec le site de clivage à la position D275 chez l'humain (D276 chez la souris). (c) Formation du pore GSDMD chargé négativement avec la partie N-terminale représentée en orange qui s'insère dans la membrane plasmique sous la forme de 27-28 sous-unités adapté de (Broz et al., 2020). (d) Pore GSDMD observé par microscopie électronique.

Les domaines N-terminaux de GSDMA, GSDMB, GSDMC et GSDME peuvent également induire une mort cellulaire similaire en morphologie à la pyroptose médiée par GSDMD, mais les conditions dans lesquelles ces autres membres de la famille GSDM sont activés sont encore mal comprises. De nombreuses études ont commencé à dissocier la pyroptose et l'activation des gasdermines et à les placer encore plus loin des caspases inflammatoires et des inflammasomes. L'élastase des neutrophiles (Karmakar et al., 2020) et la caspase 8 clivent GSDMD pour causer la mort alors que la caspase-3 clive également GSDME pour provoquer la pyroptose (Chen et al., 2019; Demarco et al., 2020; Orning et al., 2018; Sarhan et al., 2018). À la lumière des récentes études, la pyroptose, historiquement perçue comme une mort exécutée uniquement par GSDMD, peut maintenant être mieux définie comme une mort cellulaire nécrotique induite par les exécutrices gasdermines.

GSDMD s'insère dans la membrane plasmique en se liant au groupement phosphate du phosphatidylinositol et de la phosphatidylsérine qui se retrouvent sur le feuillet interne de celle-ci. En raison de sa spécificité pour le feuillet interne de la membrane plasmique, GSDMD ne peut pas former de pores sur les cellules avoisinantes lorsqu'elle se retrouve dans l'espace extracellulaire. GSDMD se lie aussi à la cardiolipine qui se retrouve sur le feuillet interne et externe de la paroi bactérienne. En raison de son affinité pour la cardiolipine, GSDMD est capable de tuer les bactéries en formant des pores sur leur paroi (Liu et al., 2016b). La cardiolipine se retrouve aussi dans la membrane interne de la mitochondrie, mais peut se transloquée à la membrane externe de celle-ci dans certaines conditions (Pizzuto and Pelegrin, 2020). Lorsque la cardiolipine se retrouve dans la membrane externe, GSDMD s'y lie pour former des pores dans la mitochondrie (Rogers et al., 2019). Lors de l'activation de l'inflammasome, en plus de la mitochondrie, des évidences suggèrent une localisation non discriminée de GSDMD à plusieurs organelles tels que les lysosomes, la membrane des autophagosomes et la membrane nucléaire où elle induit des pores (de Vasconcelos et al., 2019; Karmakar et al., 2020). La présence des pores GSDMD sur les organelles comme la mitochondrie ou le lysosome induit la perte de l'intégrité de ces organelles, un relargage de leur contenu dans le cytosol, ce qui peut servir de signal de danger, mais ultimement la présence de pores GSDMD sur ces organelles va commettre la cellule plus fortement à la mort.

1.3.2. Les pores GSDMD permettent la libération de cytokines de la famille de l'IL-1

En plus de son rôle dans la mort cellulaire, GSDMD joue aussi un rôle dans la génération de l'inflammation associée à la pyroptose. En effet, le pore GSDMD, en raison de son diamètre interne (10-20nm), permet la sécrétion des formes matures cytosoliques des prozymogènes IL-1 β et IL-18 clivées par la caspase-1, qui ont des diamètres de 4.5nm et 7.5nm respectivement. Le pore GSDMD a une charge négative ce qui favorise le passage par filtrage électrostatique des formes matures de l'IL-1 β et de l'IL-18 plutôt que de leurs précurseurs (Xia et al., 2021). En plus des pores GSDMD, l'IL-1 β et de l'IL-18 peuvent aussi être libérés de la cellule par une perméabilisation de la membrane plasmique exécutée par NINJ1 qui cause la lyse osmotique de la cellule (Kayagaki et al., 2021; Martin-Sanchez et al., 2016) ; cette dernière voie semble la manière la plus prépondérante pour la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18 en raison du fait qu'elle permet la formation de pores assez grands (plus grands que les pores GSDMD) pour permettre la libération de grosses molécules telles que le LDH en plus de ne pas être sélectif. L'IL-1 β et l'IL-18 peuvent aussi être libérés de la cellule par l'exocytose des lysosomes (Andrei et al., 2004) ou encore des vésicules issues de l'autophagosome, mais ces deux modes sont plutôt rares et spécifiques à certains types cellulaires notamment les neutrophiles. Il n'est pas encore clair comment GSDMD et l'autophagie contribuent à la sécrétion de l'IL-1 β , mais les souris déficientes en ATG7 ou GSDMD sécrètent moins d'IL-1 β (Karmakar et al., 2020; Zhang et al., 2015).

L'IL-1 β favorise la production de prostaglandine E2, enzyme responsable de la génération de la fièvre, en augmentant la production de cyclooxygénase 2 dans l'hypothalamus (Evans et al., 2015). L'IL-1 β favorise aussi le recrutement des neutrophiles et des monocytes qui amplifient la réponse inflammatoire (Rider et al., 2011) tandis que l'IL-18 via l'IL-12 et l'IL-15 induit la production de l'IFN- γ qui induit la réponse TH1, recrute et active les cellules NK pour que celles-ci produisent de l'IFN- γ nécessaire pour amplifier les fonctions cytotoxiques. L'IL-18 augmente aussi l'activité cytotoxique et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ et des NK elles-mêmes. Le rôle protecteur de l'IL-18 au cours d'infections (dont celles par les virus) est principalement lié à sa capacité à entraîner la production d'IFN- γ . Cette capacité de l'IL-1 β et de l'IL-18 à recruter autant les cellules de l'immunité innée que celles de l'immunité adaptative permet d'amplifier la réponse inflammatoire et de faire le pont entre ces deux systèmes pour ultimement aider l'organisme dans la lutte contre les pathogènes (Dinarello, 2018). Paradoxalement, en raison de leurs effets, ces deux cytokines peuvent avoir des effets délétères si elles ne sont pas bien régulées. L'un des mécanismes de régulation est le contrôle de la sécrétion de leurs formes matures qui dépend de la force du stimulus. À titre d'exemple, les monocytes humains, suite à

une stimulation de faible intensité du TLR4, sécrètent faiblement l'IL-1 β via l'exocytose des lysosomes comparativement à lorsqu'ils sont fortement stimulés où ils sécrètent une grande quantité d'IL-1 β via la pyroptose gasdermine-D dépendante (Semino et al., 2018).

1.4. L'inflammasome dans les pathologies virales

L'inflammasome demeure actif lorsqu'il est libéré dans l'espace extracellulaire à la suite de la mort de la cellule qui l'a activé et peut-être phagocyté par les cellules avoisinantes. Il peut ensuite recruter et activer l'adaptateur ASC et la caspase-1 dans la nouvelle cellule que celle-ci soit saine ou infectée ce qui contribue à perpétuer l'inflammation. En raison de son caractère prionique, l'inflammasome est sujet à des mécanismes de régulation strictes, mais il peut s'avérer que ceux-ci soient insuffisants. La perte de régulation de l'inflammasome est associée à plusieurs pathologies auto-inflammatoires telles que le diabète de type 2, la maladie de Crohn, des troubles neurodégénératifs comme le Parkinson (Davis et al., 2011) et des maladies virales, dont le VIH/SIDA qui concrètement se traduisent par un processus incontrôlé de mort cellulaire par pyroptose dans les tissus malades et infectés menant à une déplétion des cellules T CD4 (Doitsh et al., 2014).

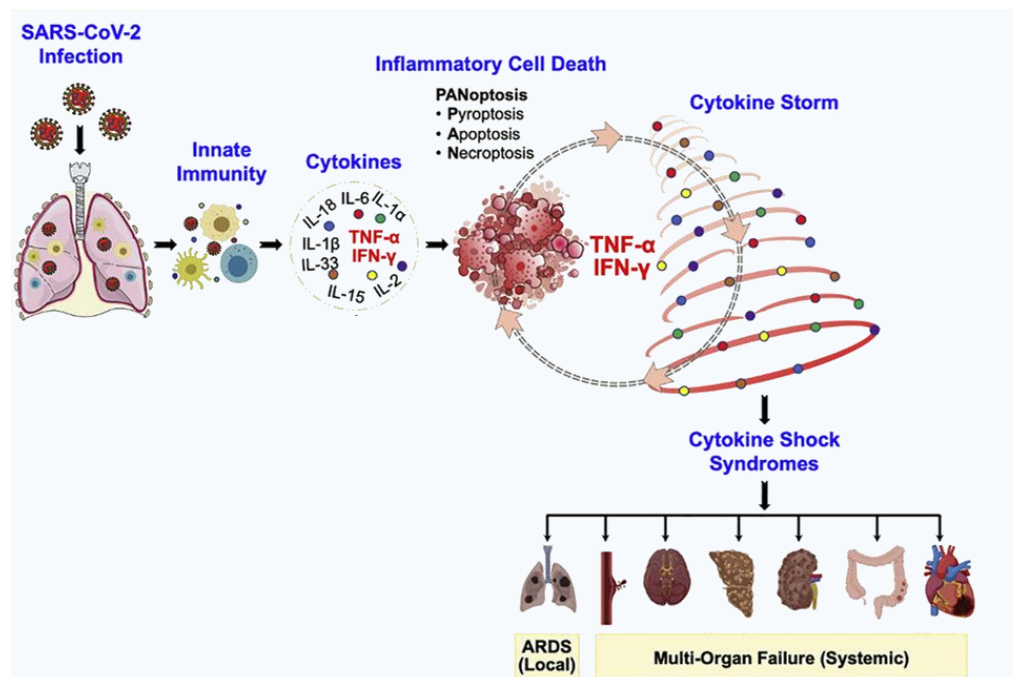


Figure 7. Le virus SARS-CoV-2 et la mort cellulaire.

Le virus SARS-CoV-2 est responsable de la pandémie (COVID-19) qui a débuté en décembre 2019. Il infecte les voies respiratoires inférieures et mène au recrutement des cellules du système immunitaire inné tels les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques. Ces dernières sécrètent plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-15, IL-18, IL-33, TNF- α et IFN- γ) ce qui mène à la mort cellulaire par apoptose, pyroptose et nécroptose

perpétuant l'inflammation via une tempête cytokinique. Le SARS-CoV-2 induit de cette manière un syndrome de détresse respiratoire aiguë menant à une défaillance de plusieurs organes au niveau systémique.

Le SARS-CoV-2 (agent étiologique de la COVID-19), un virus à ARN simple brin de polarité positive à l'origine de la pandémie qui a débuté en décembre 2019 se sert de l'inflammation et de la mort cellulaire pour induire plus de dommages aux tissus. Après infection avec le SARS-CoV-2, les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques sécrètent plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-15, IL-18, IL-33, TNF- α et IFN- γ) (Karki et al., 2021) menant à une tempête cytokinique. Il a été montré que le TNF- α et IFN- γ activaient la voie STAT1-IRF1 via iNOS menant à l'activation du complexe FADD, CASP8, RIPK1, RIPK3 et par la suite à la mort par pyroptose via GSDME, l'apoptose via CASP3/7 et la nécroptose via MLKL (Karki et al., 2021). La mort des cellules (via PANoptose c'est-à-dire par Pyroptose, Apoptose, Nécroptose) et la tempête cytokinique causées par le SARS-CoV-2 mènent localement à un syndrome de détresse respiratoire aiguë et à une défaillance de plusieurs organes au niveau systémique, deux symptômes liés à la sévérité de la COVID-19 (Fig.7).

Influenza est un autre virus respiratoire qui prend avantage de la mort cellulaire et du processus inflammatoire afin d'induire des dommages aux poumons. Influenza est capable d'infecter une panoplie d'animaux (canidés, chevaux, dauphins, etc.), mais les principaux hôtes sont la volaille (le poulet, les canards, etc.), les cochons, et l'humain. Influenza cause la grippe, pathologie générale sans conséquence chez les personnes en bonne santé, mais elle peut aussi occasionner la pulmonie et la mort en cas de complications. La grippe touche 5-10% de la population mondiale chaque année et est responsable de la mort de près de 250 000 à 500 000 personnes. Au Canada, en 2018, le virus Influenza a occasionné près de 50 000 infections, provoqué au-delà de 12 000 hospitalisations et donné lieu à près de 9 000 décès. Jusqu'en novembre 2019, le virus Influenza était la septième cause de décès au Canada et la première cause de décès de maladie infectieuse (Agence de la santé publique du Canada).

Influenza est un virus de la famille des *Orthomyxoviridae*. Il possède un génome à base d'ARN simple brin segmenté. Le virus comporte 8 segments qui codent pour deux polymérases, l'une basique qui est composé de deux protéines (PB1 et PB2) et l'autre acide (PA), ainsi que l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA), la nucléoprotéine (NP), la matrice (M1, M2), et deux protéines non-structurales (NS1 et NS2) (Fig.8a). Il existe quatre types d'Influenza (A, B, C et D), mais seulement trois peuvent induire des pathologies chez l'humain soit Influenza A (IAV), B et C. Parmi ces trois types, Influenza A particulièrement et Influenza B sont ceux associés avec le plus de morbidité et de mortalité chez l'humain. Le virus a deux protéines à sa surface la HA et la NA qui sont importantes dans l'infection et la pathogénicité. Jusqu'à ce jour, 18 HA et 11 NA

ont été recensés. Les virus influenza suivent une nomenclature particulière dans leur dénomination. Le nom du virus va comme suit : type du virus/lieu d'isolation/numéro de la souche/année d'isolation/(sous-type). À titre d'exemple, l'un des virus disponibles dans notre laboratoire est A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) désigné PR8. L'ARN-Z est une double hélice d'ARN ayant une conformation gauchère (Hall et al., 1984). L'ARN-Z d'IAV est détecté par le *Z-DNA Binding Protein 1* (ZBP1), un senseur de l'immunité inné qui reconnaît et lie l'ARN-Z, ce qui mène à la formation du complexe CASP6, FADD, CASP8, RIPK1, RIPK3. Bien que le mécanisme par lequel ce complexe mène à l'activation de NLRP3 ne soit pas encore entièrement compris, il a été montré que la protéine NS1 d'IAV inhibait l'activation de NLRP3 dans les phases précoces de l'infection (Chung et al., 2015; Moriyama et al., 2016; Park et al., 2018) tandis que la protéine de la matrice (M2) activait l'inflammasome NLRP3 dans les phases tardives de l'infection (Ichinohe et al., 2010).

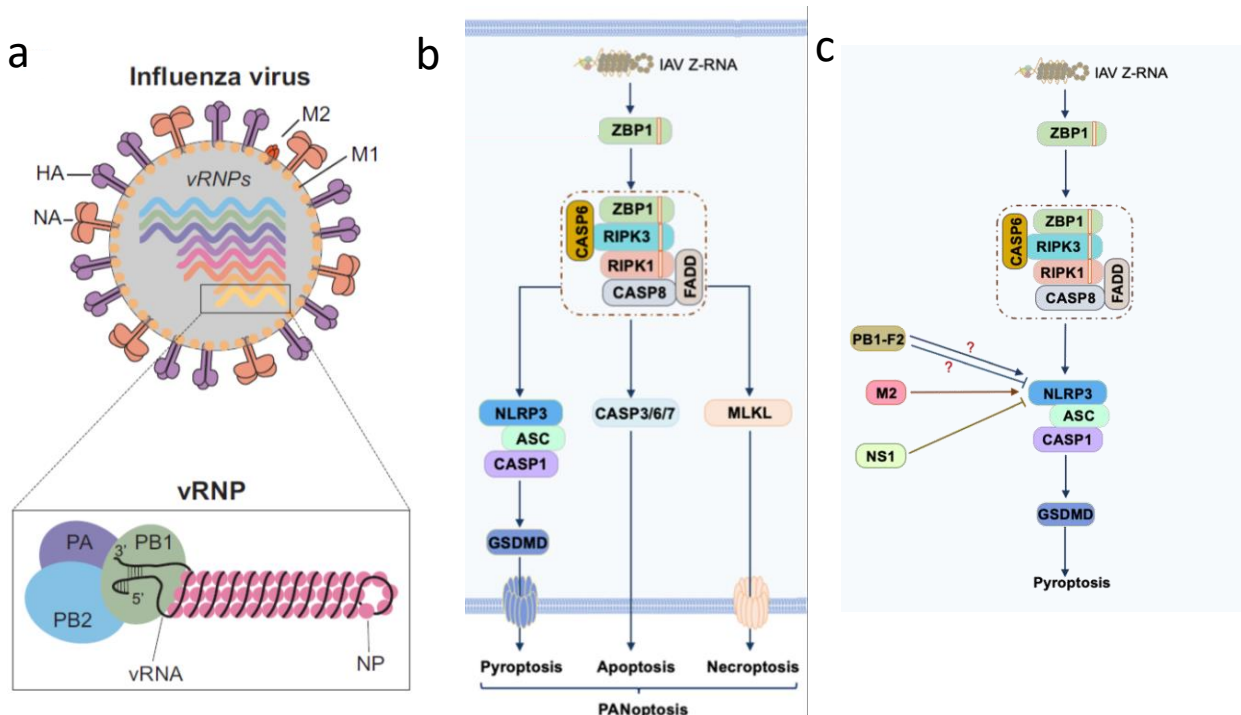


Figure 8. Structure d'influenza A et mort cellulaire causée dans la grippe.

(a) Vue transversale d'une particule virale d'influenza où on peut voir l'hémagglutinine colorée en violet (HA), la neuraminidase colorée en orange (NA), la matrice (M1, M2), la nucléoprotéine virale (vRNP) qui comprend les polymérase, l'une basique qui est composée de deux protéines (PB1 et PB2) et l'autre acide (PA), la nucléoprotéine (NP) et l'ARN viral (vRNA) adapté de (Dou et al., 2018). (b) L'ARN-Z d'IAV est détecté par *Z-DNA Binding Protein 1* (ZBP1) menant à la formation du complexe CASP6, FADD, CASP8, RIPK1, RIPK3 et par la suite à la mort par pyroptose via GSDMD, l'apoptose via CASP3/7 et la nécroptose via MLKL adapté de (Zheng and Kanneganti, 2020). (c) La protéine M2 d'IAV active NLRP3, la protéine NS1 inhibe NLRP3 et la protéine PB1-F2 semble avoir un effet activateur et inhibiteur.

La protéine PB1-F2 est codée par le cadre de lecture ouvert alternatif +1 du gène PB1 de certaines souches du virus de la grippe A (Chen et al., 2001b) et semble avoir autant un rôle activateur (McAuley et al., 2013; Pinar et al., 2017) qu'inhibiteur (Boal-Carvalho et al., 2020; Yoshizumi et al., 2014) sur l'inflammasome NLRP3, et il faudra plus d'études afin de départager son rôle réel sur l'inflammasome (Fig.8b). En somme, l'inflammasome est important dans la défense contre les pathogènes intracellulaires comme les virus. Toutefois, en absence d'une régulation adéquate, il est néfaste, car il induit une inflammation exacerbée, la mort cellulaire non contrôlée et un dommage aux tissus.

1.4.1. L'équilibriste : la régulation post-traductionnelle de l'inflammasome

Il existe une multitude de modifications post-traductionnelles capable de réguler les inflammasomes. Sans surprise, on compte parmi celles-ci la phosphorylation et l'ubiquitination. La phosphorylation de NLRP3 à S295 par la protéine kinase A inhibe son activation (Mortimer et al., 2016). Il a été montré que la E3 ubiquitine-protéine ligase MARCH7 inhibait l'activation du senseur NLRP3 en lui apposant une modification de type K48 sur le domaine LRR ce qui facilite la dégradation du senseur (Yan et al., 2015). Il a aussi été montré que PELLINO2, une autre E3 ubiquitine-protéine ligase, facilitait l'ubiquitination de NLRP3 en K63 lors du *priming* (Humphries et al., 2018). Toujours lors du *priming*, la kinase JNK1 phosphoryle NLRP3 en S194 ce qui facilite son oligomérisation (voir étape 2 de la figure 3) (Song et al., 2017). Le complexe isopeptidase cytoplasmique BRCC3 (chez la souris) et BRCC36 (chez l'humain aussi appelé BRISC) est composé de 4 sous-unités : une (1) composante unique KIAA0157 (également appelé ABAXAS2 ou ABRO1) et trois (3) composantes partagées (BRCC45/MERIT40/BRCC36). BRISC est une déubiquitinase (DUB) spécifique aux ubiquitines en K63. BRCC3 et BRCC36 sont des activateurs de l'inflammasome. En effet, lors de l'étape de *priming*, ABRO1 se lie à NLRP3 d'une manière dépendante de la phosphorylation en S194 et permet à BRISC d'éliminer l'ubiquitine en K63 sur NLRP3 résultant en l'activation du senseur (Py et al., 2013; Ren et al., 2019). USP7/46 sont deux autres DUB dont l'activité varie en fonction du signal de danger déclenchant l'inflammasome qui agissent sur NLRP3 pour réguler l'activation de l'inflammasome (Palazon-Riquelme et al., 2018). Conséquemment, la thiolutine, un inhibiteur des métalloprotéases contenant le domaine JAB1/MPN/Mov34 (JAMM) et son dérivé méthylé, l'holomycine, bloquent l'activation de NLRP3 en empêchant sa dé-ubiquitination en K63 par BRCC3 (chez la souris) et BRCC36 (chez l'humain) (Ren et al., 2021). Il a été récemment montré que le complexe de dé-ubiquitinase UAF1/USP1 élimine sélectivement la polyubiquitination en K48 de NLRP3 ce qui supprime sa dégradation médiée par la voie ubiquitine-protéasome,

augmentant ainsi les niveaux cellulaires de NLRP3 (Song et al., 2020). Ce résultat sous-entend que la position de l'ubiquitine sur NLRP3 joue un rôle différent; K63 a un rôle activateur tandis que K48 a un rôle inhibiteur sur le complexe.

D'autres récepteurs, tels que NLRP1, sont également régulés par une combinaison d'ubiquitination et de phosphorylation ou nécessitent un clivage pour leur activation. Remarquablement, pour activer la caspase-1, le NLRP1B de souris et le NLRP1 humain nécessitent le clivage de leur domaine CARD en C-terminale par des protéases dérivées de pathogènes (Chui et al., 2019; Robinson et al., 2020; Sandstrom et al., 2019; Tsu et al., 2021). Par ailleurs, comme son homologue NLRP1, CARD8, un autre récepteur d'inflammasome contenant également une structure FIIND-CARD en C-terminale, a récemment été découvert comme étant normalement réprimé par les dipeptidyles peptidases DPP8/9 et activé par clivage par des protéases virales (Linder et al., 2020). CARD8 est activé dans les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ traitées avec des inhibiteurs de DPP8/9 et induit une forme de pyroptose indépendante de l'adaptateur ASC. Comme dans le cas de NLRP1, l'activation de CARD8 nécessite une étape de clivage et de dégradation de sa région N-terminale par le protéasome pour libérer la région C-terminale FIIND-CARD, permettant ainsi le recrutement direct de la pro-caspase-1 (Chui et al., 2020; Wang et al., 2021). Dans quelle mesure d'autres événements de clivage et de protéases cellulaires peuvent être impliqués dans la régulation de la signalisation inflammasome-pyroptose reste à être élucidé.

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) et la voie autophagie-lysosome (ALP) sont deux importants systèmes de dégradation qui participent à la protéostasie. L'autophagie désigne un ensemble de procédures physiologiques par lesquels les cellules dirigent des vésicules à double membrane transitoire contenant des protéines (autophagosomes) vers les lysosomes pour dégradation. L'autophagie regroupe la macro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la micro-autophagie. Brièvement, la privation en acides aminés ou la réduction des niveaux d'insuline inactive mTORC1 ce qui mène à l'induction de l'autophagie. Plus précisément, le complexe ULK1 recrute le complexe de la phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PtdIns3K) pour initier la formation du phagophore. Par la suite, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 grâce à son activité E3-ligase permet la liaison du complexe LC3-PE au phagophore pour former l'autophagosome. Enfin, l'autophagosome par l'entremise de VAMP7/VAMP8, SNAP29, les conjugués SNARE YKT6 et STX17 se lie et fusionne avec le lysosome (Ichimiya et al., 2020). Le processus d'autophagie est décrit dans la figure 9.

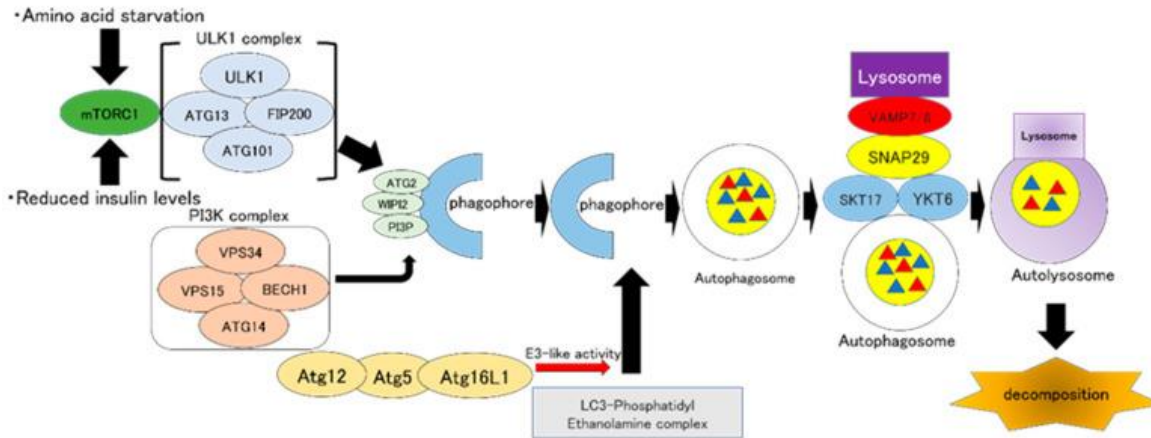


Figure 9. Processus général d'autophagie.

La privation en acides aminés ou la réduction des niveaux d'insuline inactive mTORC1 ce qui mène à l'induction de l'autophagie. Plus précisément, le complexe ULK1 recrute le complexe de la phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PtdIns3K) pour initier la formation du phagophore. Par la suite, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 grâce à son activité E3-ligase permet la liaison du complexe LC3-PE au phagophore pour former l'autophagosome. Enfin, l'autophagosome par l'entremise de VAMP7/VAMP8, SNAP29, les conjugués SNARE YKT6 et STX17 se lie et fusionne avec le lysosome. ULK1: Unc-51-like autophagy activating kinase 1, mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1, PI3K: Class III phosphatidylinositol 3-kinase, VPS34: phosphatidylinositol 3-kinase, PI3P: phosphatidylinositol-3-phosphate, Atg: Autophagy-related gene, LC3: Microtubule-associated protein light chain 3, PE: Phosphatidylethanolamine, SNAP: Synaptosomal-associated protein, VAMP: Vesicle-associated membrane protein, SNARE: Soluble N-ethyl maleimide-sensitive protein (NSF) attachment protein receptor, STX: Syntaxin.

L'UPS est la principale voie protéolytique pour les protéines à courte durée de vie, mal repliées et endommagées tandis que l'ALP reconnaît et élimine les composants cellulaires de grande taille et potentiellement dangereux, tels que les agrégats de protéines et les organelles dysfonctionnelles ou superflues (Dikic, 2017). Généralement, l'ubiquitination en K48 peut agir comme un signal pour la dégradation médiée par le protéasome alors que l'ubiquitination en K63 sert de signal de reconnaissance pour de multiples récepteurs de l'autophagie (Nanduri et al., 2015; Pohl and Dikic, 2019; Tan et al., 2008). La perte de la protéine ATG16L1 (*autophagy-related 16-like 1*), une protéine essentielle à l'initiation de l'autophagie, entraîne une augmentation de l'activation de la caspase-1, ainsi qu'une production accrue d'IL-1 β et d'IL-18 dans les macrophages (Saitoh et al., 2008). Similairement, une perte de la protéine ATG7 (Lupfer et al., 2013; Saitoh et al., 2008; Zhong et al., 2016), ATG5 (Dupont et al., 2011; Zhou et al., 2011) ou LC3B entraîne une augmentation de l'activation de la caspase-1, ainsi qu'une production accrue d'IL-1 β (Nakahira et al., 2011). Finalement, il a été montré que la perte de BECLIN1 entraînait l'activation de la caspase-1, une production accrue d'IL-1 β ainsi qu'une libération du mtDNA (Nakahira et al., 2011; Zhou et al., 2011). À l'opposé, le traitement de macrophages avec la rapamycine ou la privation nutritionnelle entraîne une diminution de l'activation de l'inflammasome AIM2, de l'activation de la caspase-1, ainsi qu'une baisse de la production d'IL-1 β (Shi et al.,

2012; Wang et al., 2014a). La stimulation des inflammasomes AIM2 et NLRP3 déclenche la polyubiquitination d'ASC lié à K63, qui est ensuite reconnue par le capteur d'ubiquitine p62, ce qui dirige ASC vers les autophagosomes pour y être dégradé (Shi et al., 2012). AIM2 peut aussi être dégradé par l'autophagie de la même manière (Liu et al., 2016a). Il a aussi été montré qu'une élimination parkine-dépendante des mitochondries liées à p62 peut réduire l'activation de NLRP3 et la libération d'IL-1 β dans les macrophages (Zhong et al., 2016). Les pro-formes d'IL-1 β peuvent être séquestrées dans les autophagosomes pour être dégradées après traitement de macrophages par la rapamycine ce qui limite la sécrétion d'IL-1 β après activation de l'inflammasome NLRP3 (Harris et al., 2011). Deux autres études ont toutefois montré que l'autophagie contribuait aussi à la sécrétion non conventionnelle d'IL-1 β suite à l'activation de NLRP3 et AIM2 (Dupont et al., 2011; Wang et al., 2014a). En résumé, l'autophagie joue un rôle aussi bien dans l'activation de l'inflammasome en éliminant les DAMPs dérivés des mitochondries que dans l'inactivation de l'inflammasome par la dégradation sélective des complexes de l'inflammasome et des mitochondries illustrant de ce fait la complexité de la relation entre l'autophagie et l'inflammasome, mais aussi de l'importance de la mitochondrie dans la régulation de l'inflammasome.

1.5. Rôle de la mitochondrie dans l'axe inflammasome-pyoptose : du point de vue métabolique et de l'organelle

Le contexte moléculaire dans lequel les cellules s'engagent dans une pyoptose complète ou demeure en vie afin de libérer d'IL-1 β n'est pas entièrement compris. Les mécanismes de régulation régissant cette décision pourraient être spécifiques à la cellule et influencés par l'environnement métabolique de la cellule. Dans cette section, nous soulignons les rôles et l'importance des mitochondries dans la pyoptose pour donner un aperçu de la façon dont les mitochondries régulent également la mort cellulaire lytique médiée par l'inflammasome.

Après l'activation des inflammasomes, la voie de réparation membranaire dépendante de ESCRTIII tente d'abord de contenir les dommages infligés par les pores GSDMD (Ruhl et al., 2018). Cependant, si cette dernière tentative de maintenir la survie échoue, la perte de l'intégrité de la membrane induite par GSDMD entraîne une pyoptose médiée par NINJ1 (Kayagaki et al., 2021). Il est intéressant de noter que la libération d'IL-1 β et d'IL-18 ne nécessite pas la perte complète de l'intégrité de la membrane, car les deux cytokines sont libérées par les pores GSDMD en l'absence de lyse membranaire (c'est-à-dire par des cellules vivantes) (Evavold et al., 2018). En effet, chez les neutrophiles par exemple, la formation de pores GSDMD est découplée de la mort cellulaire, mais permet néanmoins la sécrétion d'IL-1 β (Chen et al., 2014).

Cette résistance des neutrophiles à la pyroptose semble possible du fait de la localisation des pores GSDMD au sein des membranes des granules et des autophagosomes, et non aux mitochondries, facilitant ainsi la libération prolongée d'IL-1 β mature tout en empêchant la lyse de la membrane plasmique (Karmakar et al., 2020). Bref, cela sous-entend que la perforation de la mitochondrie par GSDMD précède la mort. Ainsi, la perte de fonction mitochondriale probablement via perforation de leurs membranes externes par GSDMD est un élément clé du non-retour et engagement vers la lyse. De plus, des études suggèrent que GSDMD activée induit des dommages mitochondriaux, qui pourraient amplifier la pyroptose. L'imagerie à l'échelle cellulaire individuelle en temps réel de macrophages en pyroptose a montré que GSDMD activée provoque une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et une perturbation lysosomale avant même que la membrane plasmique ne soit perméabilisée (de Vasconcelos et al., 2019). Conformément à cette découverte, il a récemment été démontré que la protéine de la famille contenant le domaine TLR-IL-1R, SARM découple l'activation de GSDMD de la sécrétion d'IL-1 β et de la pyroptose. Dans les macrophages, SARM se localise dans les mitochondries et favorise la pyroptose dépendante sur la dépolarisation mitochondriale (Carty et al., 2019). Le traitement des macrophages avec du peptidoglycane, qui provoque la libération d'IL-1b sans pyroptose, ne cause pas cette dépolarisation mitochondriale SARM-dépendant. Comment SARM y parvient et si d'autres protéines localisées dans les mitochondries jouent un rôle dans le contrôle de la pyroptose induite par l'inflammasome n'est pas claire (Carty et al., 2019).

Une étude récente révèle un rôle important pour le fumarate, un intermédiaire métabolique du cycle de l'acide citrique, dans la réduction de la pyroptose induite par GSDMD (Humphries et al., 2020). Les auteurs ont inhibé l'enzyme fumarase ou utilisé le diméthyle fumarate, qui est perméable à la membrane cellulaire, pour accumuler des niveaux élevés de fumarate dans la cellule. Mécanistiquement, le fumarate modifie la cystéine clé Cys191/Cys192 de GSDMD en formant des ponts disulfures S-(2-succinyl)-cystéine. Cette modification inhibe le clivage de GSDMD par la caspase-1 ainsi que son oligomérisation pour former des pores, tout en laissant intacte l'activation de la caspase-1 dans l'inflammasome. Cela empêche la mort cellulaire médiée par GSDMD et la libération de cytokines. Le traitement de souris avec du fumarate réduit la mortalité après un choc endotoxique et limite la maladie dans des modèles murins de sclérose en plaques dépendants sur l'activation de l'inflammasome.

Collectivement, ces études suggèrent que la forme active de GSDMD pourrait se lier rapidement aux membranes mitochondriales pour les endommager afin de provoquer un dysfonctionnement mitochondrial qui favoriserait l'engagement des cellules dans la pyroptose. Cependant, d'autres

études sont nécessaires pour mieux comprendre comment les mitochondries sont endommagées, comment les dommages mitochondriaux sont régulés lors de la signalisation de l'inflammasome (en particulier les protéines impliquées) et comment ils entraînent la pyroptose.

1.5.1. Les protéases de l'espace intermembranaire de la mitochondrie

Il a été montré que la *presenilin-associated rhomboid like* (PARL), une protéase de la membrane interne de la mitochondrie jouait un rôle dans la mort cellulaire. En effet, PARL clive OPA1 pour permettre l'inactivation et la libération de cette dernière de la membrane interne de la mitochondrie vers l'espace intramembranaire de la mitochondrie (IMS). L'inactivation d'OPA1 modifie les crêtes afin de permettre la libération de Cyt C dans l'IMS et dans le cytosol via le MOMP (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006). Dans ce contexte, PARL agit à titre de facteur pro-apoptotique. Dans une récente étude protéomique, PARL a été identifié comme étant capable de cliver Smac/DIABLO (Saita et al., 2017). Le clivage de Smac par PARL permet la maturation de ce dernier qui peut ensuite être libéré de la membrane interne de la mitochondrie avant sa translocation dans le cytosol où il se lie à XIAP afin d'initier l'apoptose. Dans les cardiomyocytes, il a été montré qu'YME1L1, une métalloprotéase de l'IMS, était indispensable pour le développement du cœur lors de l'embryogénèse et aussi à l'âge adulte. La délétion d'YME1L1 cause une cardiomyopathie des cardiomyocytes qui meurent par nécrose résultant en une insuffisance cardiaque et à la mort des souris. L'absence d'YME1L1 favorise le clivage d'OPA1 par OMA1 ce qui résulte en une fragmentation de la mitochondrie, phénomène qui s'accompagne aussi d'un changement métabolique de l'utilisation des acides gras à l'utilisation du glucose comme source première d'énergie (Wai et al., 2015). Comme le démontre ces exemples, les protéases de l'IMS en plus de leur rôle dans la morphologie de la mitochondrie plus précisément en maintenant la morphologie normale des crêtes et l'activité respiratoire du complexe I, fonctionnent aussi à moduler l'activité apoptotique et donc la mort cellulaire. HTRA2, une autre protéase de l'IMS est impliquée dans le contrôle de qualité des protéines à la mitochondrie et semble aussi jouer un rôle dans les maladies neurodégénératives à caractère inflammatoire comme le Parkinson.

1.6. HTRA2 : une sérine protéase mitochondriale essentielle à la vie

HTRA (*high-temperature requirement A*) est un groupe de sérine protéase conservé à travers les règnes de la bactérie aux mammifères sans oublier la levure (Hu et al., 1998; Spiess et al., 1999; Zumbunn and Trueb, 1996). Comme chez la bactérie, les orthologues de mammifères, au

nombre de quatre, jouent un rôle dans le contrôle-qualité des protéines à titre de protéases et/ou de chaperonnes et sont essentielles pour maintenir l'homéostasie cellulaire en réponse à des stress protéotoxiques (Lipinska et al., 1989; Lipinska et al., 1990).

Le gène codant pour la protéase HTRA2 est localisé chez l'humain sur le chromosome 2p13.1 et est exprimé dans divers tissus délicats (dont les neurones et des sous-populations de macrophages pulmonaires résidents) (Gray et al., 2000). La protéine HTRA2 est composée de 458 résidus exprimés à partir de huit exons (Faccio et al., 2000) et est synthétisée sous la forme d'un précurseur immature de -49 kDa, qui contient le signal de localisation à la mitochondrie (MLS) ainsi qu'un domaine transmembranaire (TM) qui lui permet de s'ancrer à la membrane interne de la mitochondrie où elle sera clivée pour exercer de façon soluble sa fonction protéase dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Suzuki et al., 2001). Elle possède 3 domaines structuraux importants à ses fonctions QC, soit un domaine protéique de type sérine semblable à celui de la trypsine, (composé de la triade catalytique H198, D228 et S306) (Fig.9a), un motif IBM lui permettant de se lier aux protéines de la famille des *Inhibitor of Apoptosis* (IAP) et un seul domaine PDZ d'interaction protéine-protéine (Faccio et al., 2000). Le domaine PDZ (**P**SD-95, **D**Ig1 et **Z**O-1) de HTRA2 inhibe son activité protéolytique à moins que la protéase ne soit liée via ce même domaine à un partenaire de liaison et/ou son substrat. L'unité fonctionnelle de HTRA2 est un homotrimère (Fig.9b) qui a la forme d'une pyramide dont l'accès au site actif est restreint par le domaine PDZ. En absence de liaison à son substrat, HTRA2 est maintenue dans une conformation auto-inhibée. À la suite de la liaison à son substrat, il y a un changement conformationnel lui permettant de diriger le substrat au site actif pour le clivage de ce dernier (Li et al., 2002; Merski et al., 2017). HTRA2 est une protéase dite allostérique et n'a donc pas besoin d'ATP pour son activité protéolytique comme OMA1 et PARL, deux autres protéases de l'IMS (Koodathingal et al., 2009; Stiburek et al., 2012). La reconnaissance et la liaison à son substrat sont suffisantes pour l'activer.

1.6.1. Régulation de l'activité de HTRA2 et son interactome

Au niveau transcriptomique, peu de données existent sur la régulation de HTRA2, cependant il fut récemment montré que dans les cardiomyocytes de souris âgées, *Heat shock factor 1* (HSF1), un facteur de transcription se liait au promoteur de HTRA2 pour l'activer (Liu et al., 2019). La forme mature de -36 kDa de HTRA2 est obtenue à la suite d'un processus d'auto-clivage (Gray et al., 2000; Savopoulos et al., 2000; Seong et al., 2004), mais il y a aussi des évidences que d'autres protéines pourraient participer à la maturation de HTRA2. HAX-1, une protéine

apparentée à la famille des Bcl-2, se lie au précurseur de HTRA2 pour le rapprocher de PARL (Chao et al., 2008; Yoshioka et al., 2013). Bien que la séquence en acides aminés de HTRA2 corresponde à la préférence de clivage de PARL, HTRA2 ne semble pas être un substrat de PARL (Saita et al., 2017). Cela étant dit, il n'est pas impossible que PARL clive HTRA2 dans des conditions particulières. Peu importe ce qui en est, il est évident que HAX-1, PARL et d'autres protéines interagissent avec HTRA2 pour la génération de sa forme mature.

Au-delà de la maturation, il y a des évidences que certaines protéines régulent l'activité de HTRA2. C'est le cas de la présiniline-1, une protéine transmembranaire impliqué dans la maladie d'Alzheimer qui augmente l'activité protéase de HTRA2 (Gupta et al., 2004). PINK1 phosphoryle HTRA2 ce qui résulte en une augmentation de son activité protéase (Plun-Favreau et al., 2007).

Les premiers interacteurs de HTRA2 découverts sont les IAP (cIAP1/2, Diap1 et particulièrement XIAP). Dans une étude cherchant à identifier les interacteurs de XIAP, les auteurs montrent que seulement la forme mature de HTRA2 se lie à XIAP via son domaine IBM et le domaine BIR de ce dernier (Suzuki et al., 2001). L'une des premières études portant sur les substrats de HTRA2 a mis en évidence 15 interactants ou candidats potentiels. L'une des limites de cette étude est le fait que HTRA2 ne se retrouve pas dans le cytosol que dans des conditions particulières comme lors de l'induction de l'apoptose, condition peu fréquente. Malgré cette limitation, sur les 15 candidats, 10 ont été validés comme étant des substrats de HTRA2 soit par Western ou par traçage radio-isotopique. Parmi les substrats de HTRA2 validés, 4 avaient une fonction dans le cytosquelette soit l'actine, la tubuline- α et β et la vimentine tandis que 3 de ces substrats TIF-1 β , EF-1 β , et eIF-4G1 étaient impliqués dans la transcription et la traduction respectivement. Parmi les autres substrats de HTRA2, on compte ERAB (*ER-associated amyloid β (A β) binding protein*), une protéine du réticulum endoplasmique (RE) qui interagit avec l'amyloïde- β (A β) ainsi que deux autres protéines (*Cell cycle and apoptosis regulator protein 2* et *Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1*) impliquées dans l'apoptose, mais dont les rôles non pas encore été bien définis (Vande Walle et al., 2007). Il y a maintenant plusieurs substrats validés par MS de HTRA2 dont XIAP (Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2002), cIAP1 (Jin et al., 2003) et l'orthologue humain du complexe *glucose-induced degradation-deficient* (GID) de la levure, une E3 ligase qui dégrade sélectivement les enzymes gluconéogènes superflues (Lampert et al., 2018).

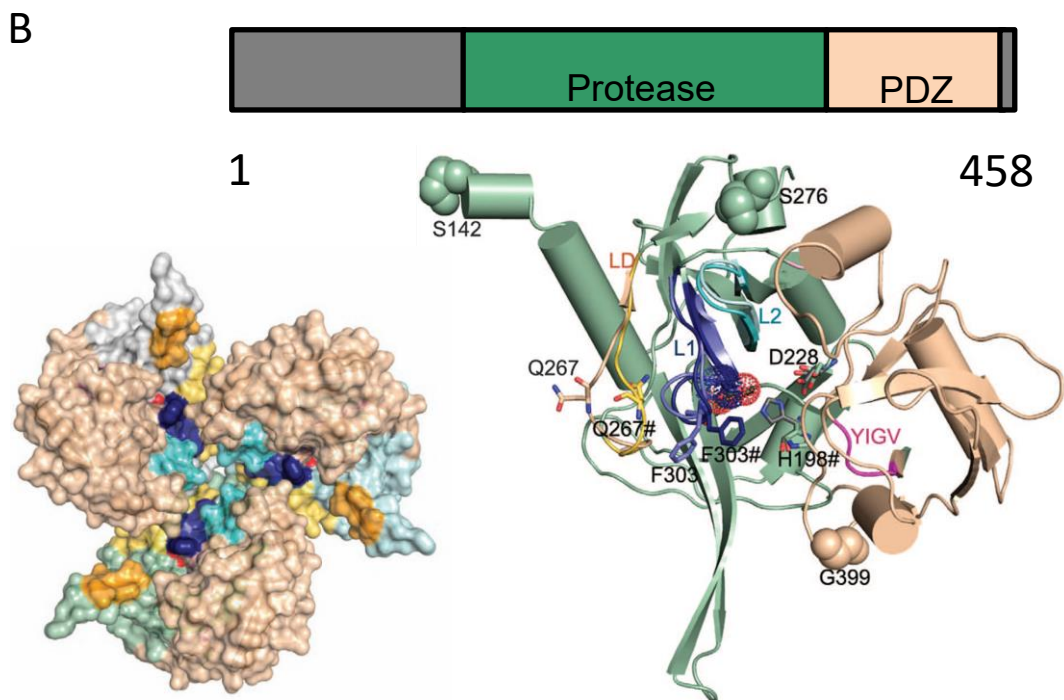
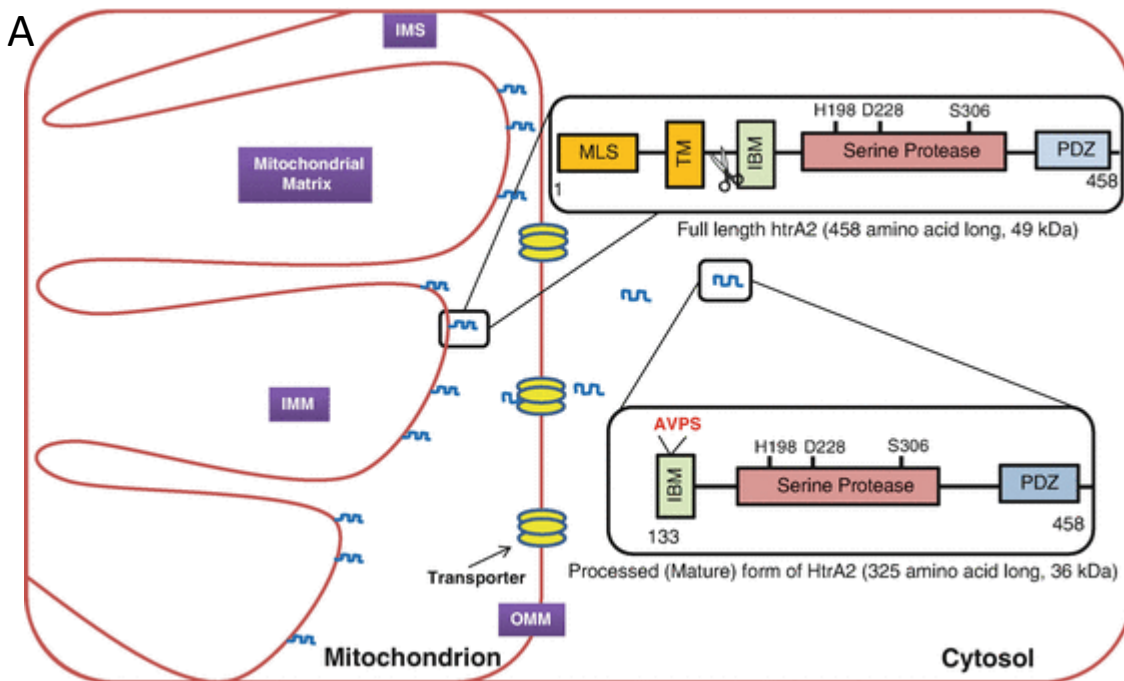


Figure 10. Structure de la mitoprotéase HTRA2.

(a) Distribution des domaines de la mitoprotéase de la proforme (au-dessus) et de la forme mature de HTRA2 (en dessous) contenant le signal de localisation à la mitochondrie (MLS) et le domaine transmembranaire tous deux représentés en jaune, le motif IBM permettant la liaison de HTRA2 aux IAP, la triade catalytique H198, D228 et S306 dans le domaine protéase en rouge et en bleu le domaine PDZ permettant de se lier au substrat adapté de (Merski et al., 2017) (b) Structure tri-dimensionnelle de l'homotrimer de HTRA2 avec en vert le domaine protéase et en beige le domaine PDZ permettant de se lier au substrat.

HTRA2 est aussi capable de contrôler la morphologie de la mitochondrie par son action sur OPA1 en lien avec la présence de mitochondries allongées dans les cellules où l'activité protéolytique de HTRA2 a été abolie (Kieper et al., 2010). En effet, en absence de l'activité protéase de HTRA2, la forme soluble d'OPA1 (S-OPA1) est augmentée par rapport à la forme longue (L-OPA1) (Kieper et al., 2010; You et al., 2020). Bien que plusieurs études confirment par Immuno-Précipitation (IP) ou par *proximity-dependent biotinylation* (BioID) une interaction entre HTRA2 et OPA1, aucune étude n'a montré le clivage d'OPA1 par HTRA2 (Botham et al., 2019a; Kieper et al., 2010; You et al., 2020). Il a été récemment montré à la suite d'une étude portant sur l'interactome des protéases de l'IMS réalisée par BioID que HTRA2 avait 143 *protein-protein interaction* (PPI) uniques (*Bayesian false-discovery rate* (BFDR) $\leq 0.01\%$), dont 79 ont une classification ontologique gènes mitochondriaux avec un *false-discovery rate* (FDR) de $2,9 \times 10^{-22}$. Parmi ces interactions, on compte 9 des 46 composantes du complexe I de la chaîne respiratoire. Le BioID a aussi identifié 8 des 13 protéines du complexe structural intermembranaire (*mitochondrial intermembrane space bridging* (MIB) comme capable d'interagir avec HTRA2. Le complexe MIB est le regroupement de deux complexes soit le *Sorting and Assembly Machinery* (SAM), complexe formé par SAMM50, METAXIN1, METAXIN2 et METAXIN3 et le complexe *Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System* (MICOS) composé d'IMMT, DNAJC11, CHCHD3, CHCHD6, CHCHD10, APOO, APOOL, MINOS1 et MIC13 (Botham et al., 2019a; Huynen et al., 2016). Le MIB sert de charpente à la mitochondrie en supportant l'ancrage de la membrane externe de la mitochondrie à la membrane interne. Il régule aussi la morphologie des crêtes ce qui pourrait expliquer pourquoi la délétion de HTRA2 perturbe leurs structures. En effet, les cellules HTRA2 KO présentent des structures de membranes internes plus condensées et plus serrées. L'une des composantes du MIB, IMMT (aussi connue sous le nom de MIC60/mitofiline), une sous-unité de MICOS, est clivé par HTRA2 et cela semble expliquer les perturbations des crêtes observées dans le KO de HTRA2. IMMT a été validé par *Western Blot* comme étant un substrat de HTRA2, toutefois cette expérience a été faite avec une surexpression de la forme murine qui est 85% similaire à la forme humaine ce qui ne représente pas les conditions physiologiques (Botham et al., 2019b). Les perturbations des crêtes pourraient avoir un impact sur la structure des chaînes respiratoires ce qui pourrait avoir un effet sur la respiration mitochondriale. D'autres interactants notables de HTRA2 sont MAVS impliqué dans la défense antiviral et l'endonuclease G (ENDOG), une protéine mitochondriale codée par le noyau qui est impliquée dans la mort cellulaire (Botham et al., 2019b). En absence de stress à la mitochondrie, HSP70 permet l'interaction entre la *E3 ligase C terminus of Hsc-70 interacting protein* (CHIP), ENDOG et le protéasome. En condition de stress, ENDOG n'est plus dégradée par le protéasome

et peut aller au noyau pour dégrader l'ADN pour induire l'apoptose (Lee et al., 2013). En cas d'inhibition du protéasome, ENDOG est clivée par HTRA2 favorisant ainsi la survie (Radke et al., 2008). Dans les cellules Ba/F3, lors de déprivation avec l'IL-3, HTRA2 clive RIPK1, ce qui induit l'apoptose caspase-indépendante par l'inhibition du signal de NF-KB (Vande Walle et al., 2010). HTRA2 interagit aussi avec PED/PEA-15, une protéine ubiquitaire qui a un rôle anti-apoptotique (Trencia et al., 2004).

En résumé, HTRA2 interagit avec une variété de protéines impliquées dans la mort cellulaire et la morphologie des crêtes de la mitochondrie, ce qui n'est pas étonnant vu son rôle dans le contrôle de la qualité au niveau de cette organelle. HTRA2 favorise la survie lorsqu'elle clive ENDOG, tandis qu'elle favorise la mort lorsqu'elle clive les IAP.

1.6.2. Fonction de HTRA2 : rôle pro-survie

Le contrôle-qualité (QC) des protéines mitochondriales s'effectue à plusieurs niveaux. Au niveau de la matrice, il existe des protéines de QC telles que LON et CLPXP. Au niveau de la membrane interne, il existe des métalloprotéases (AAA) dont l'activité protéase est soit vers la matrice (m-AAA) soit vers l'IMS (i-AAA). Au niveau de l'IMS, il existe plusieurs protéines notamment HTRA2 tandis qu'au niveau de la membrane externe, il existe PINK1, une kinase, qui contribuent au QC. Comme le RE, la mitochondrie peut mettre en place une réponse d'urgence contre le stress (UPR). L'UPR mitochondrial fait intervenir les gènes comme CHOP. Au niveau organelle, le QC se fait via l'axe ubiquitine-protéasome et l'axe PINK1-PARKIN qui favorise l'autophagie. Bien que beaucoup d'études aient porté sur sa fonction pro-mort en raison de son interaction avec les IAP, il est nécessaire de souligner que la première fonction de HTRA2 est une fonction pro-survie. L'évidence la plus frappante est la mort néonatale associée à un défaut relié à HTRA2 (Kovacs-Nagy et al., 2018). Un séquençage génomique a révélé un défaut dans les deux allèles de HTRA2 responsable de l'acidurie 3-méthylglutaconique de type 8, un trouble métabolique autosomal récessif qui entraîne la mort dans la petite enfance (Kovacs-Nagy et al., 2018). Tous les individus atteints présentaient un phénotype reconnaissable avec une neurodégénérescence d'apparition néonatale ou infantile et un décès dans le premier mois de vie. Ce phénotype est aussi observé chez la souris *mnd2* ou HTRA2 KO (Kovacs-Nagy et al., 2018; Olahova et al., 2017). Le rôle de HTRA2 dans le clivage d'ENDOG en cas d'inhibition du protéasome supporte aussi son rôle pro-survie, car cela contribue au bon fonctionnement de la mitochondrie en inhibant l'apoptose (Radke et al., 2008). L'absence de HTRA2 engendre l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress tels que CHOP qui est activé par le stress du RE et indirectement par

l'*integrated stress response* lors de certains stress mitochondriaux particulièrement dans le cerveau. À cela, s'ajoute une augmentation de ROS, une accumulation de protéines mal repliées, un défaut au niveau de la respiration mitochondriale et une neuro-dégénération (Moiso et al., 2009). L'absence de HTRA2 est aussi liée à une baisse du potentiel membranaire mitochondrial, à une élongation des mitochondries, à une perte des jonctions au niveau des crêtes ainsi qu'à une modification des structures de la membrane interne (Kieper et al., 2010). La perte du potentiel membranaire dans les cellules sans HTRA2 est attribuable à un découplage au niveau de la F₁F₀-ATP synthase du complexe V de la chaîne respiratoire. Ceci a pour conséquence une diminution de la production d'ATP et se traduit chez les souris par des difficultés respiratoires et une incapacité à faire face à un stress énergétique soudain comme lors d'une ischémie à titre d'exemple (Plun-Favreau et al., 2012). Dans le cerveau de souris, l'absence de HTRA2 est associée à une augmentation de ROS, à une rupture sur le brin simple de l'ADN mitochondrial (mtDNA), à une diminution du mtDNA attaché aux membranes, à une conformation plus relâchée du mtDNA, à une plus grande fréquence de mutations du mtDNA et à une augmentation de l'expression des gènes responsable de la réparation du mtDNA tels que POLG2, Twinkle et APTX1 (Goo et al., 2013). Une autre évidence du rôle pro-survie de HTRA2 est le fait que le double mutant HTRA2 et Smac/DIABLO, tous deux capables d'interagir avec les IAP, n'offre pas une résistance à l'apoptose, bien au contraire le double mutant est plus sensible à l'apoptose causé par l'étoposide (Martins et al., 2004). L'absence de HTRA2 ou la présence de son mutant catalytique dans les hépatocytes est associée à une augmentation de ROS, à une augmentation des dommages à l'ADN mitochondrial, ainsi qu'à une accumulation de mitochondries anormales (Hur et al., 2019). De plus, l'ADN mitochondrial de ces hépatocytes à la suite de la mort de ces derniers, peut servir de DAMP pour activer les cellules stellaires ce qui contribue à la progression plus rapide de la fibrose du foie. Une solution saline contenant 30 µg de plasmide pFLAG-HTRA2, un vecteur d'expression contenant le cadre de lecture ouvert de Htra2 murin, injectée de manière hydrodynamique dans le foie de souris BALB/C ou *mnd2/+* via un cathéter avec des occlusions temporelles du flux sanguin, atténue la fibrose du foie en maintenant l'intégrité mitochondriale (Hur et al., 2019).

1.6.3. HTRA2 et les pathologies neurodégénératives, le modèle *mnd2*

La délétion de HTRA2 est infantile létale autant chez la souris que l'humain et afin mieux comprendre le rôle et l'importance de HTRA2, le modèle *mnd2* (*motor neuron degeneration 2*) fut créé. Pour rendre la souris *mnd2* viable, la forme humaine de HTRA2 fut réexprimée dans les neurones (Jones et al., 1993; Jones et al., 2003; Kovacs-Nagy et al., 2018; Weber et al., 1998).

La souris mutante *mnd2* présente une atrophie musculaire, une neurodégénérescence, une involution de la rate et du thymus et ne survit pas au-delà de 40 jours (Jones et al., 1993; Weber et al., 1998). La mutation *mnd2* est attribuable à une mutation de l'adénine en thymine sur l'exon 3 de HTRA2 résultant à la substitution de la sérine en position 276 à une cystéine (Ser276Cys) (Jones et al., 2003). Bien que cette mutation soit dans le domaine protéase, mais pas dans le site catalytique, elle donne tout de même lieu à une abolition de l'activité protéase de HTRA2 en réduisant l'accès du substrat au site actif de HTRA2. Dans les fibroblastes embryonnaires de souris, les cellules *mnd2* sont plus susceptibles à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et au stress induit via le Ca^{2+} selon des modalités de mort qui ont des caractéristiques apoptotiques et nécrotiques (Jones et al., 2003). Similairement, la délétion complète de HTRA2 chez la souris est associée à une incapacité des souris à prendre du poids après le sevrage, à une augmentation de la taille de divers organes particulièrement le thymus, le cœur et la rate et à une perte de poils. L'absence de HTRA2 cause aussi une perte de la coordination attribuable à une perte de neurones du striatum (Martins et al., 2004; Rathke-Hartlieb et al., 2002). La perte de HTRA2 est aussi associée à une diminution du citrate synthase ce qui implique un défaut mitochondrial généralisé phénomène supporté par une présence plus accrue de mitochondries avec un gonflement des crêtes et une forme anormale. Finalement, la délétion de HTRA2 prédispose la souris à l'apoptose intrinsèque causé par l'étoposide et aux agents qui ont un impact sur l'intégrité mitochondrial tels que la CCCP, la roténone et le peroxyde d'hydrogène, mais ne sensibilise pas à l'apoptose extrinsèque (Martins et al., 2004). Nous voyons en fait une plus grande sensibilité par la voie $TNF\alpha$ (la voie extrinsèque de l'apoptose) dans les macrophages ce qui suggère que la sensibilité est type cellulaire spécifique. L'expression de la forme humaine de HTRA2 dans les neurones des souris *mnd2* permet de prolonger la vie de ces dernières à 67 semaines comparativement à 40 jours (Kang et al., 2013). Ces souris transgéniques développent toutefois un phénotype de vieillissement prématuré qui s'accompagne de perte de poids, de courbature de la colonne vertébrale, d'une atrophie musculaire, de l'ostéoporose, de la splénomégalie, un grossissement du cœur, tous des signes de vieillissement prématuré (Kang et al., 2013). Dans les souris avec une délétion de HTRA2 seulement dans les neurones via le système Lox-Cre, les souris ont une atrophie du thymus et de la rate, une perte de poids et une perturbation des crêtes (gonflement, fragmentation, et vésiculation). Elles présentent aussi un défaut dans le clivage d'OPA1, mais le phénotype le plus frappant est le fait qu'elle ne dépassent pas 40 jours de vie elles non plus (Patterson et al., 2014). L'importance de HTRA2 sur l'homéostasie de la mitochondrie est aussi supportée par son rôle dans la régulation de deux autres protéines du contrôle qualité de la mitochondrie soit *Lon*

protease 1 (LONP1) et la prohibitine (PHB1 et PHB2). PHB1 ou PHB2 sont associées à la membrane interne de la mitochondrie où elles régulent la stabilité des complexes de la chaîne respiratoire tandis que située dans la matrice, LONP1 régule la stabilité des protéines mitochondriales. L'absence de HTRA2 ou l'abolition de son activité catalytique est associée à une surexpression de ces deux protéines, à une dépolarisation du potentiel mitochondrial qui se traduit par une augmentation de la production de ROS et à une diminution de la production d'ATP. L'effet de HTRA2 sur LONP1 est indirect, mais pas celui sur PHB. En effet, HTRA2 se lie et clive PHB1 et PHB2 (Goo et al., 2014). La déficience des sous-unités I-III de cytochrome oxidase (COX) codées par le mtDNA (MT-CO1/2/3) est attribuée à des mutations et délétions clonales au niveau du mtDNA. Le déficit en HTRA2 dans les tissus non neuronaux donne lieu à une délétion de 6.5-8.5 Kb dans la séquence d'ADN codant pour les gènes MT-CO1/2/3 confirmé par PCR occasionnant une perte de l'expression de MT-CO1/2/3 dans les tissus du cœur, des muscles squelettiques et du duodénum de souris *mnd2* secourues âgées de 15 mois et de leurs homologues hétérozygotes *mnd2/+* comparativement aux souris témoins (Kang et al., 2013). Les auteurs rapportent aussi un changement du ratio LC3 peut être plutôt lié à un changement de l'activité lysosomale comme l'atteste l'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I significativement plus élevé dans les muscles cardiaques et squelettiques des souris *mnd2* âgées et secourues comparativement aux tissus correspondants des souris témoins et la dégradation plus rapide de Cyclophiline D et de MnSOD, deux protéines mitochondriales. Cette augmentation de l'activité de l'autophagosome est aussi observée dans les souris âgées de cinq (5) semaines, ce qui suggère que l'activité accrue des autophagosomes est déclenchée tôt dans la vie par un dysfonctionnement mitochondrial afin d'éliminer les mitochondries défectueuses (Kang et al., 2013). Il est fort probable que les nouvelles mitochondries ne puissent pas supporter les besoins énergétiques de l'organe et sont éliminées par mitophagie ce qui amplifie le processus de vieillissement et de mort cellulaire. Une autre évidence du rôle pro-survie de HTRA2 est son implication dans la mitophagie par l'action sur MUL1 (gène codant pour Mulan/Map1), une E3 ligase localisée dans l'OMM, mais qui a un domaine dans l'IMS et un autre domaine dans le cytoplasme. MULAN ubiquitine MFN2 ce qui envoie ce dernier pour la dégradation par le protéasome. L'absence de HTRA2 ou la présence du mutant protéolytique est incapable de cliver MULAN ce qui favorise l'accumulation de ce dernier. L'augmentation du niveau de MULAN coïncide avec une diminution de MFN2 ce qui favorise la mitophagie (Cilenti et al., 2014). En résumé, HTRA2 maintient l'intégrité de la mitochondrie d'une part par son rôle dans le contrôle de qualité et empêche l'accumulation de mitochondries endommagées en favorisant la

mitophagie d'une part par son action sur MULAN ce qui enlève une source de matériels pour l'activation de l'inflammasome.

1.6.4. HTRA2 et le Parkinson

La première évidence du rôle de HTRA2 dans les maladies neurodégénératives est arrivée lorsqu'il a été montré qu'HTRA2 interagissait avec le précurseur de l'amyloïde- β (Park et al., 2004) et la préséniline (Gupta et al., 2004) tous deux impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Puis, il a été montré que la délétion de HTRA2 tout comme les souris *mnd2* souffraient d'une perte de neurones, présentaient des défauts mitochondriaux et d'autres symptômes du genre parkinsonien. Par la suite, deux mutations de HTRA2, les mutations A141S et G399S ont été mises en évidence chez des patients allemands souffrant de Parkinson sporadique (Strauss et al., 2005). Finalement, il fut montré que PINK1, aussi impliquée dans le Parkinson, phosphorylerait HTRA2 via l'axe p38 à la position S142 et S400 juste à côté des mutations rapportés chez les patients allemands souffrant de Parkinson sporadique (Plun-Favreau et al., 2007).

1.6.5. Rôle de HTRA2 dans les infections virales et la mort cellulaire

Durant l'infection de CMV, la protéine *viral mitochondrial-localized inhibitor of apoptosis* (vMIA) interagit avec Cyt C pour inhiber l'apoptose intrinsèque (Goldmacher et al., 1999). vMIA est aussi capable d'interagir avec HTRA2 pour empêcher ce dernier de déclencher la mort des cellules infectées lors des étapes tardives de l'infection favorisant la dissémination du virus. Contrairement à son effet sur les IAP où HTRA2 est délocalisé au cytoplasme, lors de l'infection de CMV, HTRA2 induit cette mort caspase-indépendante tout en demeurant dans l'IMS (McCormick et al., 2008).

La forme mature de HTRA2 possède en N-terminale un groupement Alanine similaire aux antagonistes des IAP tels que Smac/DIABLO, HID, Reaper et Grim et cela lui permet de se lier aux domaines BIR2 et BIR3 de XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Livin α , Livin β et DIAP1 (Hegde et al., 2002; Verhagen et al., 2002; Yang et al., 2003). En raison de cette interaction, HTRA2 est capable de libérer la caspase-3 de l'effet des IAP et induire l'apoptose. Il est toutefois nécessaire de mentionner que l'interaction seule entre HTRA2 et les IAP n'est pas suffisante pour l'induction de l'apoptose. En effet, l'activité protéolytique de HTRA2 est aussi requise comme le montre l'absence de mort à la suite d'un traitement aux rayons UV de cellules N2 *in vivo* avec le mutant catalytique (Verhagen et al., 2002). Finalement, HTRA2 contrecarre les effets des IAP plus fortement que Smac/DIABLO et cela est dû au fait que contrairement à ce dernier, HTRA2 ne fait

pas que se lier aux IAP, mais les clive aussi. Le clivage de c-IAP1 par HTRA2 à titre d'exemple, empêche c-IAP1 de polyubiquitiner les formes actives des caspases-3 et -9. L'effet de HTRA2 sur les IAP est donc irréversible et plus efficace comparativement à celui de Smac/Diablo (Yang et al., 2003). HTRA2 se lie et clive aussi Apollon/BRUCE via son domaine IBM et le domaine BIR de ce dernier (Sekine et al., 2005). Apollon/BRUCE se lie et ubiquitine Smac/DIABLO et la caspase-9 ce qui facilite la dégradation par le protéasome de ces derniers. Il est toutefois nécessaire de préciser que le domaine IBM n'est pas strictement requis pour sa liaison à Apollon, car le mutant sans domaine IBM de HTRA2 donne lieu aux mêmes produits de clivage que le génotype sauvage (Sekine et al., 2005). Ce résultat s'expliquerait par le fait que HTRA2 peut aussi se lier à ses substrats via son domaine PDZ et les cliver. HTRA2 est inversement régulée par Apollon. En effet, Apollon ubiquitine HTRA2 ce qui facilite sa dégradation par le protéasome tout comme Smac/DIABLO et la caspase-9 (Sekine et al., 2005). Finalement, HTRA2 est capable de réguler l'apoptose via son activité protéolytique, mais aussi via son domaine IBM en absence de son activité protéase (Hegde et al., 2002; Sekine et al., 2005). HTRA2 contrôle aussi la mort cellulaire en se liant au domaine induisant la mort (DED) de PED/PEA-15, une protéine ubiquitaire qui a un rôle anti-apoptotique en induisant une augmentation de la dégradation de cette dernière (Trencia et al., 2004). Il est nécessaire de mentionner que l'interaction entre HTRA2 et XIAP ou PED/PEA-15 se fait seulement en contexte de stress lorsque HTRA2 se retrouve dans le cytosol. Il a aussi été montré qu'HTRA2 était impliqué dans des modalités nécrotiques de mort. C'est le cas notamment lors de la nécroptose induite par TNF dans les podocytes où HTRA2 induit la mono-ubiquitination de UCH-L1, activant cette dernière et contribuant ainsi à propager le signal nécroptotique de mort. La délétion génétique de HTRA2 ou UCH-L1 permet de protéger les podocytes du rein contre la nécroptose (Sosna et al., 2013). Dans un modèle de colite induite par *Dextran Sulfate Sodium* (DSS), il y a été récemment montré que les cellules épithéliales mouraient par nécroptose et que HTRA2 était impliqué en raison des niveaux protéiques fortement diminués de cette dernière dans ces cellules (Zhang et al., 2019). Le traitement par ailleurs avec l'inhibiteur protéolytique de HTRA2, UCF-101, permet de diminuer la mort des souris, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β), la perte de poids et la perméabilité associées à la colite (Zhang et al., 2019). L'une des limitations de cette étude est que les conclusions ne sont basées que sur l'usage de l'inhibiteur pharmacologie UCF-101 sans démonstration de la conservation de ces observations dans un modèle génétique *protease-dead*, or il a été montré qu'UCF-101 avait des effets *off target* sur les voies qui contrôlent les processus pro-inflammatoires, effets sur CHOP, ATF3, SAPK/JNK et ERK (Klupsch and Downward, 2006). L'idéal aurait été de faire une expérience *in vivo* avec le mutant catalytique de HTRA2. La

pyroptose tel que décrite précédemment est une autre forme de mort nécrotique comme la nécroptose, mais qui est orchestrée par les gasdermines à la suite de l'activation de l'inflammasome. Ultiment, HTRA2 joue un rôle pro-survie même s'il est impliqué dans certaines voies de mort cellulaire. Un résumé du rôle pro-survie de HTRA2 se trouve dans le tableau 1.

Tableau 1. Résumé du rôle pro-survie de HTRA2.

Rôle	Action - effet	Références
Rôle dans la survie	Délétion de HTRA2 – cause une léthale infantile autant chez la souris que l'humain et un défaut métabolique inné soit l'acidurie 3-méthylglutaconique.	(Kovacs-Nagy et al., 2018; Olahova et al., 2017).
	Délétion dans les neurones chez la souris – les souris ne survivent pas dépasser 40 jours.	(Patterson et al., 2014)
	Rôle de qualité-contrôle des protéines - sauvegarde de l'intégrité des protéines mitochondriales. L'absence de HTRA2 donne lieu à : <ul style="list-style-type: none"> • une augmentation de ROS • une accumulation de protéines mal repliées • un défaut au niveau de la respiration mitochondriale • une neuro-dégénération • une baisse du potentiel membranaire mitochondrial • une élongation des mitochondries • une perte des jonctions au niveau des crêtes • des mutations et délétions clonales au niveau du mtDNA 	(Moiso et al., 2009) (Kieper et al., 2010) (Plun-Favreau et al., 2012). (Martins et al., 2004) (Goo et al., 2014). (Kang et al., 2013)
Rôle dans la mort cellulaire	HTRA2 clive les IAP notamment XIAP, CIAP1/2 pour induire l'apoptose	(Hegde et al., 2002; Verhagen et al., 2002; Yang et al., 2003) (Sekine et al., 2005)
	Délétion de HTRA2 – sensibilise à l'apoptose intrinsèque par étoposide	(Martins et al., 2004)
	La protéine vMIA de CMV inhibe HTRA2 pour empêcher l'induction de l'apoptose	(McCormick et al., 2008)
	HTRA2 favorise la nécroptose – mécanisme inconnu.	(Sosna et al., 2013)

1.6.6. La protéase mitochondriale HTRA2 inhibe les inflammasomes NLRP3 et AIM2

Beaucoup d'études portent sur l'activation de l'inflammasome, mais il existe peu de données sur la manière dont le signal est arrêté afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. Il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes permettant l'arrêt du signal de l'inflammasome, car cela nous permet d'avoir les avantages de l'activation du complexe sans avoir les possibles effets néfastes

occasionnés par une perte de régulation. L'inflammasome cause la mort de la cellule qui l'a activée à l'intérieur de quelques minutes (Rathkey et al., 2017) et sa régulation nécessite des mécanismes tout aussi rapides. Le clivage par des protéases fait partie des modifications post-traductionnelles qui ont un effet rapide sur les processus qu'elles régulent. Afin d'élargir nos connaissances actuelles sur la régulation de l'inflammasome et de la pyroptose induite par des virus ARN, mon laboratoire d'accueil a effectué un criblage génétique sur 6 985 gènes ayant la capacité à être utilisée comme médicament. Sur ce nombre, il y avait 313 régulateurs de l'inflammasome dont 19 protéases incluant HTRA2 parmi les régulateurs négatifs de l'inflammasome activé après infection avec la souche Cantell du Respirivirus murin de la famille des *Paramyxoviridae* (aussi connue anciennement sous le nom de virus Sendai).

1.6.7. Résultats publiés dans Nature Scientific Reports 2018 (en Annexe I)

En tant que co-auteur, j'ai participé à la découverte du rôle inhibiteur de HTRA2 sur les inflammasomes ASC-dépendant, données publiées dans la revue Nature Scientific Reports en 2018 dans le volume 8(1) à la page 8446. Noter que les figures citées à travers cette section correspondent à la numérotation des figures de l'article publié (consulter l'Annexe I pour l'article). Cet article, en ayant recours au modèle murin *mnd2* catalytiquement inactif démontre que l'activité protéolytique de HTRA2 est nécessaire pour réguler l'activité de la caspase-1 (Fig. 1c) et que cela permet la régulation des inflammasomes NLRP3 et AIM2, mais pas NLRC4 (Fig. 2b). De plus, HTRA2 ne régule pas NLRP3 au niveau du *priming* (Fig. 1h et 2a). Nous montrons aussi que HTRA2 n'interagit ni directement avec l'inflammasome assemblée, ni avec les composantes individuelles de ce dernier (Fig. S2b). HTRA2 semble jouer un rôle au niveau de la stabilité des oligomères de l'adaptateur ASC (Fig. 1j), dont la formation est plus rapide et la demi-vie accrue dans les macrophages mutants *mnd2*. HTRA2 agirait sur l'inflammasome en influençant le flux autophagique et la capacité cellulaire à dégrader le complexe ASC. Toutefois, nous ne pouvons pas distinguer entre la possibilité que le défaut en autophagie dans le mutant *mnd2* est dû soit à une réduction du taux de fusion des autophagosomes avec les lysosomes, soit à un désordre de la fonction enzymatique hydrolytiques des lysosomes (Fig. 3b et d). L'infection MCMV, qui active l'inflammasome AIM2 pour son contrôle, montre que HTRA2 n'a pas une fonction antivirale *in vivo* puisqu'il n'y a pas de différence répliquative entre les souris contrôles ou mutantes (Fig. 4g), mais en l'absence de l'activité catalytique de HTRA2, il y a exacerbation de la réponse inflammatoire innée (quantifier par le taux d'IL-18 dans le plasma et la production d'IFN γ par les cellules *Natural Killers*) (Fig. 4a et d). En somme, nous avons montré dans cet article que la protéase HTRA2, via la voie lysosomale de dégradation, est requise pour réguler (i) la

signalisation spécifique des inflammasomes nécessitant l'adaptateur ASC et la pyroptose qui en découle, (ii) la survie des macrophages exposés à un virus, (iii) l'intensité de la réponse inflammatoire antivirale. À la lumière de cette découverte, j'ai jugé pertinent de répondre expérimentalement aux questions suivantes pour approfondir notre connaissance sur la régulation de la pyroptose par HTRA2 et de son rôle dans la défense antiviral:

- (1) Est-ce que l'inflammasome non canonique faisant intervenir la caspase-11 chez la souris est aussi assujetti à un contrôle négatif par HTRA2? **Abordé à la section 4.0.**
- (2) Est-ce que l'atténuation du flux autophagique en absence de l'activité catalytique de la protéase HTRA2 dans des macrophages est due à une perte de fonction du lysosome tel que rapporté en contexte de défaut mitochondrial (Demers-Lamarche et al., 2016; Fernandez-Mosquera et al., 2019)? **Abordé à la section 4.1.**
- (3) Est-ce que HTRA2 agit comme facteur de survie des macrophages infectées avec d'autres virus, notamment le virus influenza responsable de la grippe? **Abordé aux sections 4.2 et 4.3.**

CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Afin d'élargir nos connaissances actuelles sur la régulation de l'inflammasome et de la pyroptose induite par des virus ARN, mon laboratoire d'accueil a effectué un criblage génétique fonctionnelle à l'échelle du génome qui a révélé HTRA2 parmi les régulateurs négatifs de l'inflammasome activé après infection avec la souche Cantell du Respirivirus murin de la famille des *Paramyxoviridae* (aussi connue anciennement sous le nom de virus Sendai).

Peu de données existe sur les substrats de HTRA2 et la mort cellulaire excepté les IAP et l'apoptose. Pour son rôle pro-apoptotique, HTRA2 se retrouve hors de la mitochondrie, or dans le papier, nous avons démontré qu'HTRA2 restait localisé à la mitochondrie lorsqu'il inhibe indirectement l'inflammasome via son activité protéase. Comme peu de données existent sur les substrats de HTRA2, il est difficile de formuler un mécanisme qui pourrait expliquer son rôle dans la pyroptose. Il est donc primordial de mieux comprendre le rôle de HTRA2 dans les différentes voies de mort.

Étant donné qu'HTRA2 est un effecteur essentiel du contrôle de la qualité du repliement des protéines mitochondriales et son rôle comme facteur pro-survie tant à l'échelle cellulaire que celle de l'organisme, nous proposons que son activité protéase agit comme un régulateur négatif de l'axe inflammasome-caspase inflammatoire, bloquant la pyroptose GSMD-dépendante et la réponse hyperinflammatoire contre une infection virale. Dans le but de mieux comprendre le rôle de HTRA2 dans la régulation de l'axe inflammasome-pyroptose et de définir sa fonction antivirale, nous avons eu pour objectif de :

- Caractériser la fonction protéolytique de HTRA2 dans la signalisation de l'inflammasome.
- Déterminer si HTRA2 régule toutes les formes de pyroptose GSMD-dépendante.
- Déterminer le rôle de HTRA2 dans la défense contre des infections virales (c'est-à-dire la survie des macrophages).

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

3.1. Culture cellulaire

Des macrophages immortalisés dérivés de la moëlle osseuse de souris (iBMDM) C57BL/6 et HTRA2^{mnd2} (contenant une mutation S276C dans l'exon 3 du domaine de protéase, par la suite appelé mnd2) ont été maintenue en cultures dans du RPMI 1640 supplémenté (10% de *Fetal Bovine Serum*, 100 U/ml Pénicilline-100 µg/ml Streptomycine, 1 mM Sodium Pyruvate, 10 mM HEPES et 100 µM Non-Essential Amino Acids) dans des pétris à bactérie stérile de 10 cm placés dans un incubateur humide à 37°C, 5% v/v de CO₂ jusqu'à une confluence de 10⁷ par pétri. L'usage des pétris de bactérie pour la culture des macrophages au lieu des plaques de culture cellulaire conventionnelle a pour but de prévenir la trop forte adhésion des macrophages. Les BMDM ont été passés aux trois jours pour 15 passages consécutifs en ensemençant 10⁶ cellules par pétri dans 10 ml de RPMI-1640 complet. Une fois que les cellules ont atteint au moins 80% de confluence, nous les avons testées pour de la contamination contre les mycoplasmes, car cela pourrait avoir un effet néfaste sur la prolifération cellulaires et biaisé la mort cellulaire, processus que nous avons plus tard mesuré. De routine, nous avons utilisé le *Mycoplasma PCR Detection Kit* d'ABM pour valider que les cellules utilisées dans nos expériences n'étaient pas contaminées avec des mycoplasmes. Brièvement, 500 µl du surnageant cellulaire fut prélevé dans un tube Eppendorf 1.5 ml et centrifugé dans un Sorvall Legend Micro 21R Microcentrifuge de Thermo Scientific à 21°C pendant 1 minute à 2 000 g, puis transféré dans un nouveau tube 1.5 ml pour une deuxième centrifugation de 10 minutes à 20 000 g. Une micropipette de 1 ml fut utilisé pour enlever 450 µl et le culot fut resuspendu avec les 50 µl restants. Par la suite, 2.5 µl de cette solution fut amplifiée par PCR par une unité de BlasTaq d'ABM et 1 µM de chaque amorce fournie pour amplifier le génome des mycoplasmes à l'aide d'un T3000 Thermocycler de Biometria pour 40 cycles de 95°C pendant 30 sec, 55°C pendant 30 sec, 72°C pendant 60 sec. La figure 11 indique que les BMDM utilisés dans l'étude sont négatives pour la présence de mycoplasme.

Les macrophages (WT et mnd2) utilisés ne présentent pas de bande à 500 bp comme le control positif (Fig.11). En somme, nos lignées cellulaires ne sont pas contaminées au mycoplasme.

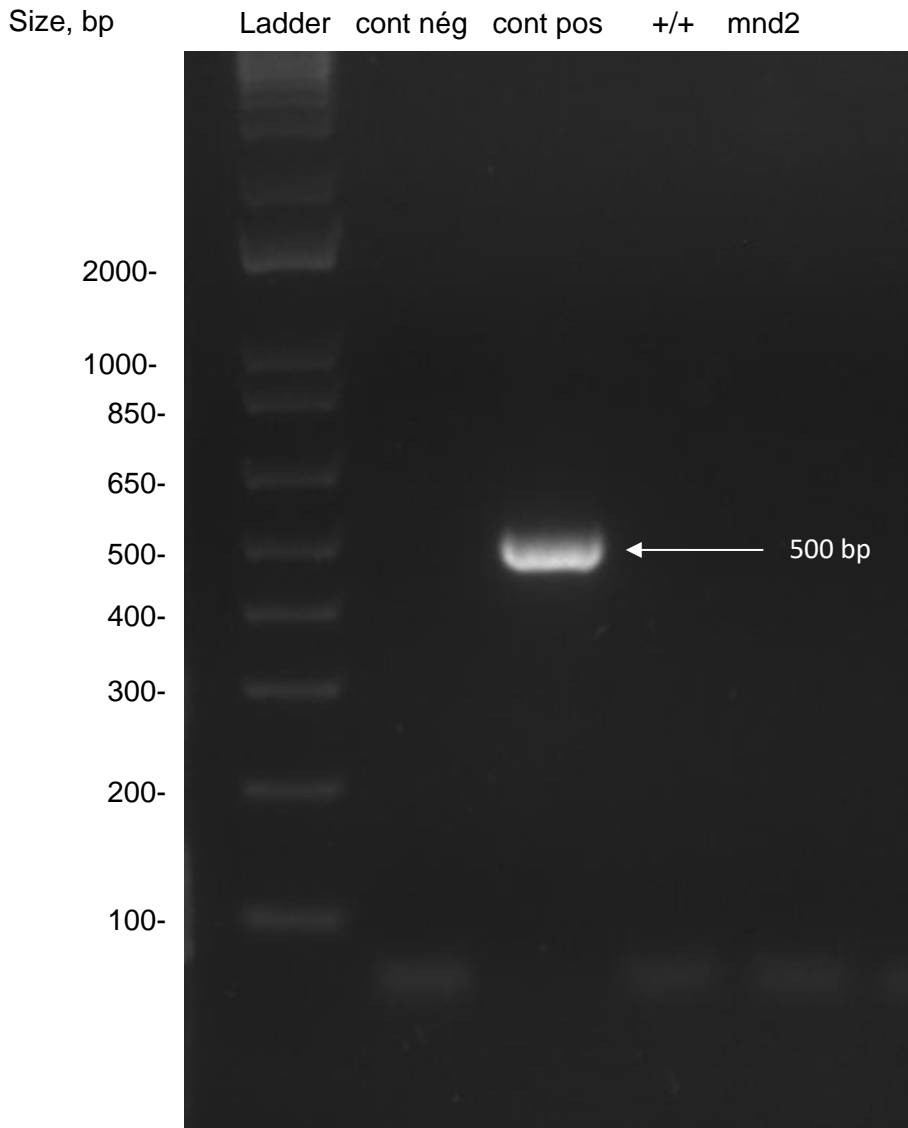


Figure 11. Test de mycoplasme des BMDMs provenant de souris C57BL/6 avec HTRA2 sauvage (+/+) et avec le mutant (mnd2).

Exemple de détection du produit de PCR amplifié par la Taq MasterMix du kit de détection de mycoplasme (ABM) sur un gel d'agarose de 2% migré à 90V pendant 1.5 heures. Les contrôles négatifs (cont nég) et positifs (cont pos) sont illustrés. Le contrôle positif présente une bande à 500 bp signe de contamination au mycoplasme. L'échelle moléculaire (Ladder) est le Trackit 1kb (Invitrogen).

3.2. Typage génétique de la mutation mnd2 de souris

Le typage génétique de la mutation mnd2 a été effectué par PCR suivi d'une analyse par enzyme de restriction selon un protocole adapté de (Shin et al., 2012). La mutation mnd2 (S276C) résulte d'un changement de A à T dans l'exon 3 dans la séquence nucléique de la protéine HTRA2 murine localisé sur le chromosome 2 chez l'humain et sur le chromosome 6 chez la souris (Fig.

12a, c). De ce fait, les souris *wild-type* ont la séquence AGCT (Fig. 12b) environnant le codon 276 et cela s'avère être un site de clivage pour l'enzyme de restriction AluI, tandis que la séquence TGCT des cellules contenant la mutation *mnd2* n'est pas clivable par AluI (Fig. 13a). Le profil de digestion avec AluI du génotype *wild-type* (WT) présente des bandes à -175 bp et -51 bp alors que celle pour le mutant a une bande à -175 bp. Les bandes digérées de -35 bp ne sont pas visibles pour les deux génotypes. Les bandes non digérées ont une taille de -260 bp pour les deux génotypes (Fig. 13b).

1 millions de cellules par échantillon ou un *ear punch* de souris ont été placés dans un eppendorf de 1.5 ml, centrifugé 1 minute à 21°C à 13 000 rpm dans un Sorvall Legend Micro 21R Microcentrifuge de Thermo Scientific, puis le culot a été resuspendu dans 150 µl de tampon de lyse (0.2% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) contenant de la protéinase K (à 0.2 mg/ml) et digéré à 56 °C pendant 16 heures à 68 rpm dans un TempMaster de Fisherbrand. À la suite de l'étape de digestion à la protéinase K, cette dernière fut désactivée en transférant le lysat d'ADN génomique à 95°C pendant 10 minutes dans un bloc chauffant Dry Heat Multi-blok de Thermo Scientific. 1 µl du lysat fut amplifié par PCR avec 0.5 µM des amorces 5'-CACACTGAGGATTCAAACCA-3' et 5'-CCACGTTGTTTTGAGGGAGT-3' (Tableau 2) en présence d'une unité de Phusion Flash High-Fidelity PCR de Thermo Fisher pour 30 cycles sur un T3000 Thermocycler de Biometria selon le programme suivant : 98°C pendant 1 sec, 60°C pendant 5 sec, 72°C pendant 30 sec (Tableau 2). 50 µl de la réaction de PCR fut utilisés pour amplifier -260 pb environnant le codon 276 du gène HTRA2 et digérés par 0.02 unités d'AluI à 37°C pendant 1.5 heures, suivi d'une inactivation à 80°C pendant 20 minutes et une migration sur gel d'agarose 2%. Les ADN ont été séquencés chez Eurofins Genomics Canada.

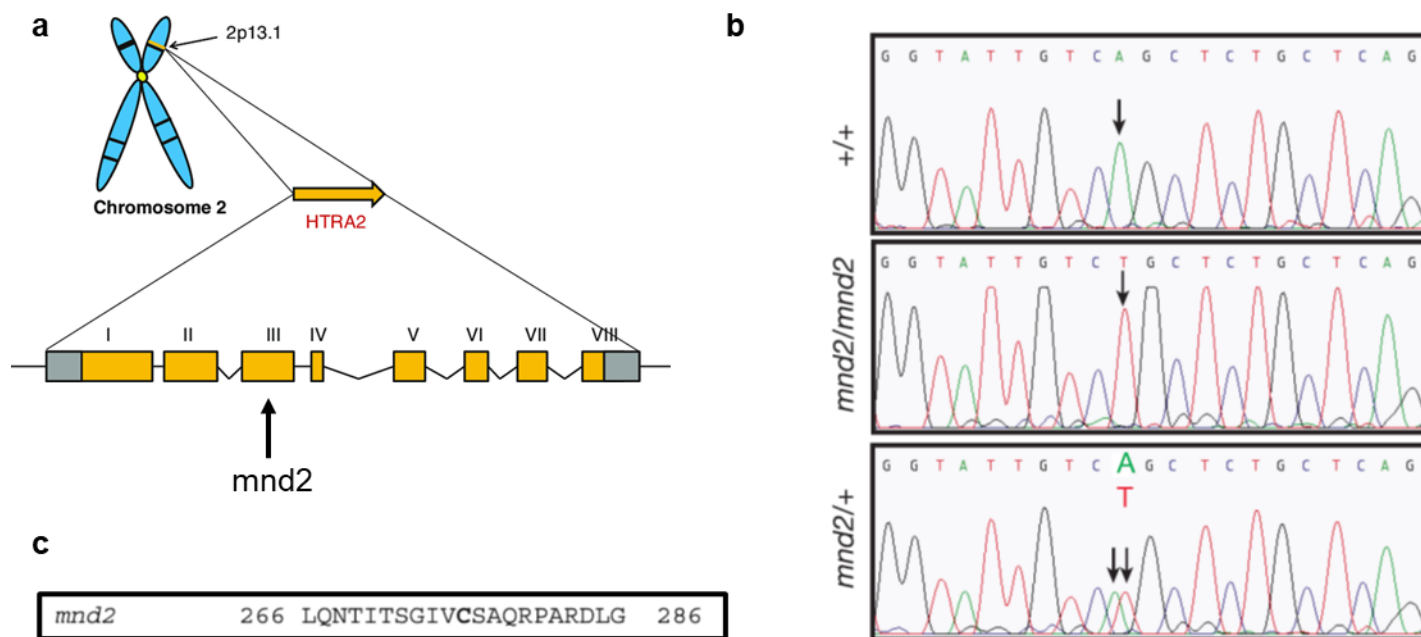


Figure 12. La mutation mnd2 (S276C).

Changement de A à T dans l'exon 3 dans la séquence nucléique de la protéine HTRA2 murine localisé sur le chromosome 2 chez l'humain et sur le chromosome 6 chez la souris.

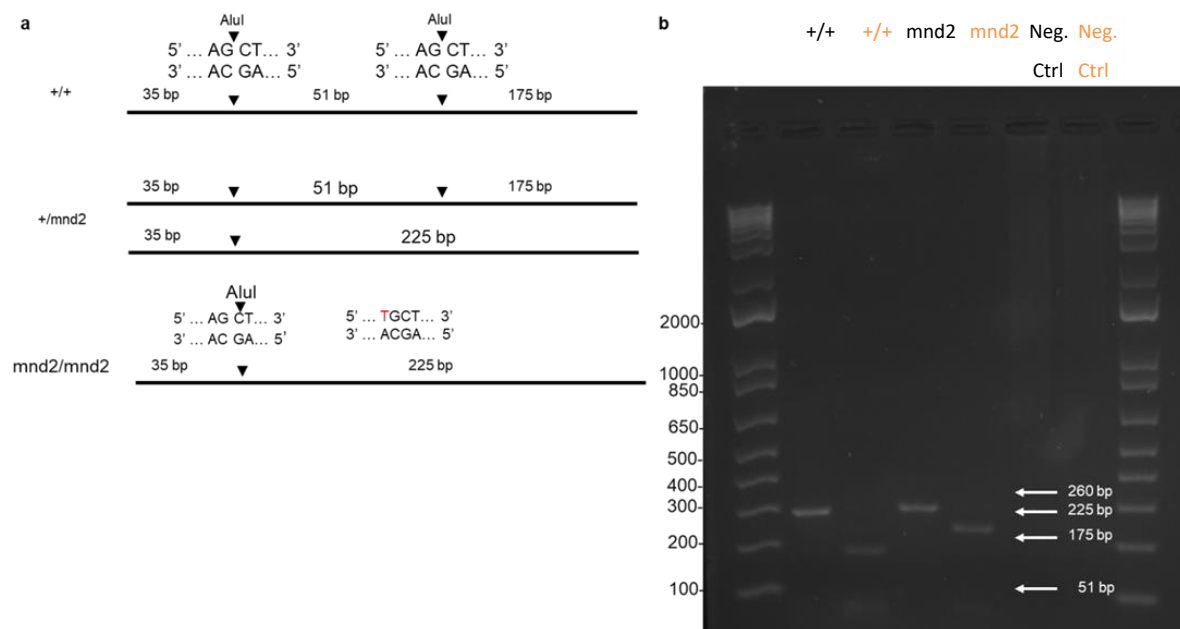


Figure 13. Profil de digestion avec AluI des BMDM.

Les échantillons furent digérés avec AluI indiqués en orange à la suite du PCR avec Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix. Gel de 2%, 90V, 1.5 heures. L'échelle est le Trackit 1kb (Invitrogen).

Tableau 2. Séquence des amorces pour le génotypage.

OLIGO	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	1	20	55.58	45.00	0.00	0.00	31.69	
CACACTGAGGATTCAAACCA								
RIGHT PRIMER	277	20	58.32	50.00	0.00	0.00	0.00	
CCACGTTGTTTTGAGGGAGT								
SEQUENCE SIZE: 277					INCLUDED REGION SIZE: 277			

Tableau 3. Conditions de PCR génotypage.

Cycle step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	98°C	10sec	1
Denaturation	98°C	1sec	30
Annealing	60°C	5sec	
Extension	72°C	30sec	
Final extension	72°C	1min	1
	4°C	hold	

Les cellules furent testées à chaque décongélation avec la Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix de Thermo Fisher dans une réaction de 50 µl sur le T3 000 Thermocycler de Biometria.

3.3. Stimulations cellulaires et mesure de la formation des pores nécrotiques en temps réel

Les BMDM C57BL/6 et mnd2 ont été ensemencés entre $0.5-0.75 \times 10^5$ cellules par puits dans une plaque de 96 puits noir à fond plat transparent de Greiner, cultivés 16 heures à 37°C 5% CO₂, puis activés soit pendant 4 heures avec 500 ng ml⁻¹ de LPS d'E. coli O111: B4 ultrapurifié dans du milieu OPTI-MEM (1 mM Sodium Pyruvate, 10 mM HEPES, 1% PS, 1% NEAA) pour les études sur l'inflammasome ou stimulées en présence de 20 ng ml⁻¹ de LPS pour ce qui est de l'étude de la nécroptose. Pour les stimulations de l'inflammasome NLRP3 canonique ou de la voie caspase-11 non canonique, les cellules préalablement traitées au LPS ont été stimulées soit avec 5 mM d'ATP ou par l'ajout de la toxine B de choléra (à 20 µg ml⁻¹) dans du HBSS (10% FBS, 1 mM Sodium Pyruvate, 10 mM HEPES, 1% PS, 1% NEAA) pendant les périodes indiquées dans les légendes de figures. Pour la nécroptose, les cellules furent prétraitées 30 minutes avec 50 µM de ZVAD (Sigma), un inhibiteur pan-caspase qui se lie de manière irréversible au site catalytique de ces dernières afin de les inactiver avant le début de la stimulation avec le LPS. Pour l'apoptose, les BMDM ont été traités avec des concentrations variables (0.25-1 µM) de staurosporine. Pour les infections avec influenza, les cellules sont infectées avec des souches PR8 ou X31 d'influenza

à une *Multiplicity of infection* (MOI) de 10 pendant 1 heure dans du HBSS sans FBS dans un incubateur humide à 37°C, 5% v/v de CO₂ avec des agitations aux 15 minutes.

À la suite de l'addition des fluorochromes (PI, NucBlue (Hoechst 33342) et CellEvent Green (Caspase-3/7)), la plaque est équilibrée dans un incubateur humide à 37°C pendant 10 minutes, puis centrifugée pendant 5 minutes à 21°C à 400 g avant d'être transférée dans un lecteur de microplaque SPARK de la compagnie TECAN. La cytotoxicité a été mesurée par incorporation de PI (5 µM), le dénombrement de cellules par marquage avec NucBlue (2 gouttes ml⁻¹) (tous deux de Life Technologies) et l'activité des caspases-3/7 par le CellEvent Green (4 µM) de Thermo Fisher Scientific. Le PI est mesuré à Ex 530 nm ± 9 nm, Em 617 nm ± 20 nm, le NucBlue à Ex 340 nm ± 10 nm, Em 430 nm ± 20 nm et le CellEvent à Ex 485 nm ± 20 nm, Em 535 nm ± 25 nm aux 15 minutes pendant 24 heures avec les paramètres suivants : 25 flashes, intégration (20 µs) et *lag* ou *settle time* (0 µs) avec 70% de gain sur le signal maximal déterminé à partir d'un puit traité avec du triton X-100 (0.5% final). Le lecteur SPARK est maintenu à 37°C, 0% v/v de CO₂ durant la période couvrant les mesures.

3.3.1. Normalisation pour le nombre de cellules

Compte tenu du fait que notre essai mesure la mort à l'échelle populationnelle, il était important de s'assurer que le nombre de cellules dans la plaque ne varie pas lors de l'essai. Pour ce faire, nous avons normalisé pour le nombre de cellules en colorant les noyaux avec du Hoechst 33342. Pour calculer le ratio nucléaire c'est-à-dire la normalisation, nous avons divisé la fluorescence du noyau (Hoechst 33342) par le nombre de cellules. Nous constatons que le nombre de noyau reste constant lors de notre cinétique même lorsque les cellules incorporent le PI et meurent à la suite de l'activation de l'inflammasome NLRP3 avec les agonistes (ATP ou Nigericine) (Fig.14).

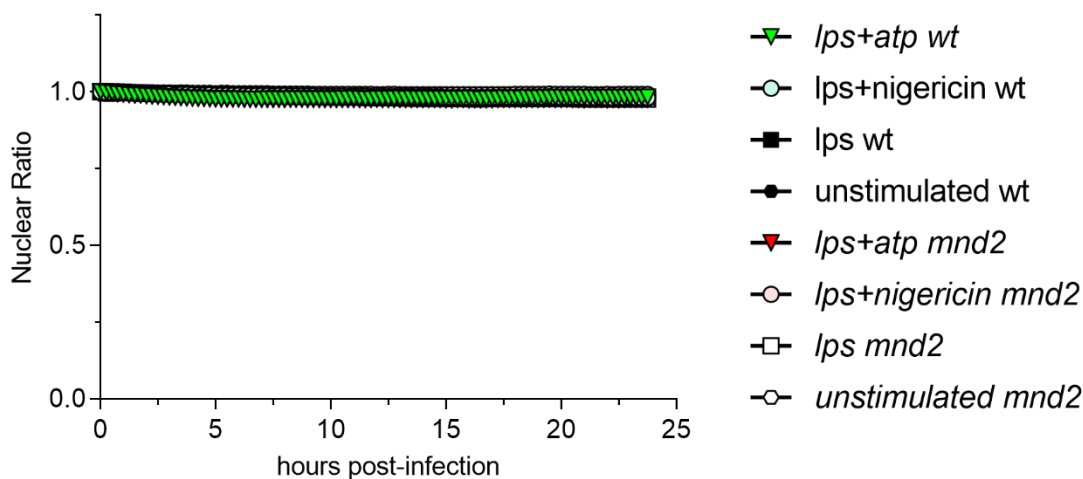


Figure 14. Mesure du ratio nucléaire durant l'essai de mort cellulaire.

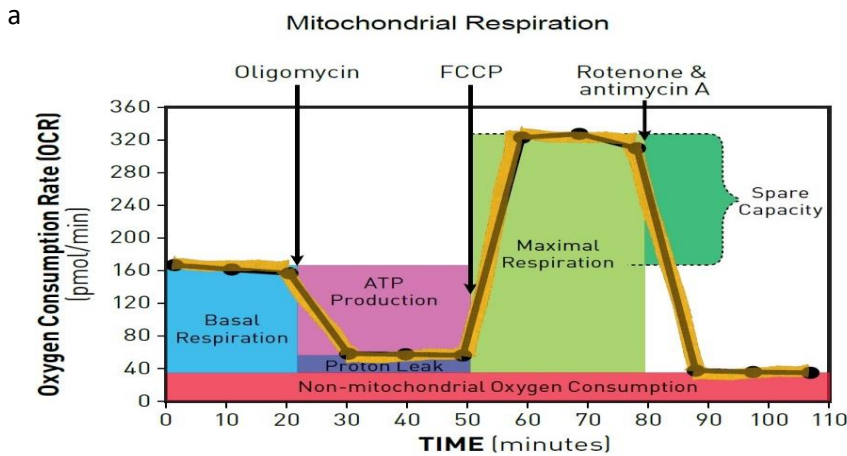
Les noyaux ont été mesurés 24 hrs sur le Tecan avec le NucBlue Live ready Probes (Hoechst 33342) (22 μ l/puit). Le ratio nucléaire = la fluorescence du Hoeschst/ le nombre de cellules. Les données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes avec l'erreur standard de la moyenne (SEM). Chaque expérience avait des triplicatas techniques.

3.4. Mesure de l'activité mitochondriale sur le Seahorse XFe96

Pour les mesures de l'activité mitochondriale, l'OPTI-MEM des cellules traitées au LPS est remplacé à la suite des 4 heures de stimulation avec du RPMI supplémenté en pyruvate (1 mM), glutamate (2 mM) et glucose (10 mM). Ensuite, les cellules sont placées pendant 1 heure dans un incubateur sans CO₂ à 37°C avant d'être transférées dans le Seahorse XFe96. Une première série de mesure est effectuée pour l'activité basale de la mitochondrie avant l'ajout de 5 mM d'ATP à 18 minutes pour l'activation de l'inflammasome. Pour chaque paramètre mesuré, l'appareil effectue systématiquement trois mesures aux six minutes. Le Seahorse XFe96, muni d'injecteur, ajoute automatiquement 1 μ M d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase à 36 minutes, puis 1 μ M de FCCP, un agent dépolarisant, est injecté à 54 minutes, et enfin 0.5 μ M de roténone, un inhibiteur du complexe-I et 0.5 μ M d'antimycine A, un inhibiteur du complexe-III sont ajoutés en même temps à 72 minutes. Le taux de consommation d'oxygène (OCR) mesuré par le Seahorse est un indicateur de l'OXPLOS. Lorsque couplé avec l'effet de chacun des composés ajoutés par l'appareil, il est possible de quantifier en détail la respiration basale, la respiration maximale, la production d'ATP et la capacité respiratoire de réserve traité (Fig.15).

3.5. Mesure de la mort cellulaire et de l'activité lysosomale par cytométrie en flux

Pour les mesures de la mort cellulaire mesurées par cytométrie en flux, les cellules ont été centrifugées et re-suspendues dans du OPTI-MEM avant d'être marquées pendant 20 min à 37°C avec une dilution 1 :10 pour 1×10^6 cellules de Ghost Dye Red 780 (Cell Signaling), un marqueur de l'intégrité membranaire, et $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ d'annexine V CF405M (Biotium) pour 1×10^6 cellules. Pour les mesures de l'activité lysosomale mesurées par cytométrie en flux, les cellules ont été marqués pendant 30 min à 37°C avec $1 \mu\text{M}$ de pepstatine A conjugué au Bodipy (Thermo Fisher Scientific), un inhibiteur fluorescent spécifique de la forme active de la cathepsine D, puis fixées pendant 10 min protégées de la lumière avec 2% de formaldéhyde à 21°C avant l'acquisition des mesures sur le LSR Fortessa (BD) équipé de 4 lasers et l'analyse ainsi que les figures ont été réalisées avec le programme FlowJo version 10 (BD) (Tableau 4).



b

Parameter Value	Equation
Non-mitochondrial Oxygen Consumption	Minimum rate measurement after Rotenone/antimycin A injection
Basal Respiration	(Last rate measurement before first injection) – (Non-Mitochondrial Respiration Rate)
Maximal Respiration	(Maximum rate measurement after FCCP injection) – (Non-Mitochondrial Respiration)
H ⁺ (Proton) Leak	(Minimum rate measurement after Oligomycin injection) – (Non-Mitochondrial Respiration)
ATP Production	(Last rate measurement before Oligomycin injection) – (Minimum rate measurement after Oligomycin injection)
Spare Respiratory Capacity	(Maximal Respiration) – (Basal Respiration)
Spare Respiratory Capacity as a %	(Maximal Respiration) / (Basal Respiration) × 100
Acute Response	(Last rate measurement before oligomycin Injection) – (Last rate measurement before acute injection)
Coupling Efficiency	ATP Production Rate) / (Basal Respiration Rate) × 100

Figure 15. Profile théorique du taux de consommation d'oxygène (OCR).

(a) OCR mesuré à l'aide du kit MitoStress sur un instrument Seahorse de la compagnie Agilent. Visualisation et ajout des composés permettant les mesures des différents paramètres, (b) définitions et calculs pour déterminer les valeurs des paramètres. Les données du Seahorse ont été traitées avec le logiciel Wave d'Agilent.

Tableau 4. Réactifs utilisés.

Réactifs	Source	Identifiant
Culture cellulaire		
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific	11875093
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	15140122
Sodium Pyruvate	Thermo Fisher Scientific	11360070
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Thermo Fisher Scientific	11140050
HEPES	Thermo Fisher Scientific	15630080
EDTA 0.5M	Thermo Fisher Scientific	AM9260G
OptiMEM	Thermo Fisher Scientific	31985088
PBS	Wisent	cat.311-425-CL
FBS	Wisent	cat.085-150, lot.176703
Typage génétique et PCR		
Sodium dodecyl sulfate	Sigma	436143-100G
TRIS HCl	Sigma	T3253-1KG
EDTA	Life Technologies	AM9260G
Sodium chloride	Sigma	S9888-500G
AluI	NEB	R0137S
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	F548S
Mycoplasma PCR Detection Kit	ABM	G238
Trackit 1kb plus	Invitrogen	10488085
Induction mort cellulaire		
LPS ultrapure E.coli O111:B4	Invivogen	t1rl-eb1ps
ATP	Sigma	A3377-5g
Nigericin	Sigma	N7143-5mg
Cholera toxin B	Sigma	C9903
Staurosporine (STS)	Sigma	S5921-.1MG
ZVAD	Sigma	V116-2MG
Souches virales		
A/Puerto Rico/8/34(H1N1) (PR8)	Charles River	
A/Hong Kong/8/68 (H3N2) (x31)	Charles River	
Mesure de PI et autres paramètres sur le Tecan		

SYTOX Orange	Life Technologies	S-11368
Propidium iodide	Life Technologies	P3566-10ml
CellEvent	Thermo Fisher Scientific	C10423
NucBlue	Life Technologies	R37605
Hank's Balanced Salt Solution	Thermo Fisher Scientific	14025092
96 WELL, PS, V-BOTTOM μ CLEAR	Greiner	655097
Mesure métabolique		
XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent	103015-100
Glucose Solution	Agilent	103577-100
Glutamine Solution	Agilent	103579-100
Pyruvate Solution	Agilent	103578-100
Cytométrie en flux		
Annexin V, CF405M Conjugate	Thermo Fisher Scientific	NC1127599
Ghostdye Red780	Cell Signaling	18452S
BODIPY FL pepstatin A	Thermo Fisher Scientific	P12271
Produits chimiques, peptides et protéines recombinantes		
Triton X-100	Sigma	T9284-500ML
Logiciels		
GraphPad Prism 8	GraphPad Software	https://www.graphpad.com
FlowJo	BD	https://www.flowjo.com

CHAPITRE 4 Résultats

4.0. HTRA2 ne régule pas l'inflammasome non-canonique

Dans le papier, nous avons mesuré l'effet de HTRA2 sur l'inflammasome canonique (caspase-1), en mesurant par ELISA l'IL-1 β (fonction inflammatoire de la caspase-1) et le LDH (lyse, fonction de mort de la caspase-1 suite au clivage de GSDMD), mais il est pertinent de se poser la question à savoir si HTRA2 régule aussi l'inflammasome non-canonique (caspase-11). Dans le but de compléter les résultats du papier, nous avons mesuré l'activité de la caspase-1 et de la caspase-11 par l'intégration de PI par les pores GSDMD. À noter que la formation de ces pores précède la lyse et il est maintenant démontré qu'une cellule peut rester en vie après avoir formé les pores GSDMD. Pour ce faire, nous avons traité des macrophages immortalisés avec du LPS pour le *priming*. Le LPS a pour rôle d'augmenter l'expression des gènes NLRP3 et pro-IL-1 β , processus qui passe par la voie NF-KB et ERK (Ghonime et al., 2014). Les cellules furent ensuite traitées avec de l'ATP qui agit comme signal 2 pour favoriser la formation de l'inflammasome canonique via le récepteur P2X7R (Mariathasan et al., 2006; Pelegrin et al., 2008; Pelegrin and Surprenant, 2006). Pour l'inflammasome non-canonique, la choléra toxine B est employée afin de permettre l'internalisation du LPS dans la cellule. Dans la deuxième partie de cette expérience, nous avons voulu montrer que lors de l'activation de l'inflammasome, la lyse observée dans le papier était due à la nécrose (pyroptose) et non à la l'apoptose puisque les cellules apoptotiques deviennent nécrotiques (nécrose secondaire). Pour ce faire, nous avons activé l'inflammasome canonique avec l'ATP et regarder la distribution de la mort par cytométrie.

À la suite de l'activation de l'inflammasome canonique (caspase-1) via NLRP3 et de l'inflammasome non-canonique (caspase-11) dans des macrophages dérivés de souris C57BL/6 sauvages ou mutantes pour l'activité protéase de HTRA2 (modèle *mnd2*), nous avons quantifié la cinétique de formation des pores nécrotiques GSDMD en mesurant l'incorporation du PI. Les résultats de la Figure 16a montrent que dans les cellules où l'activité protéase de HTRA2 est non-fonctionnelle (*mnd2*) incorpore plus rapidement et avec une plus grande amplitude le PI que les macrophages de génotype sauvage (+/+). Ce phénomène n'est pas accompagné d'une augmentation des cellules Annexin V+ intactes (Ghostdye-négative) par cytométrie, indicatif des stades précoces de l'apoptose (Fig.16 b, c). De plus, les macrophages *mnd2* passent d'un état doublement négatif à un état Ghostdye+ et acquièrent une positivité à l'annexine V plus rapidement que les cellules du génotype sauvage après activation de l'inflammasome canonique NLRP3 (Fig.16b).

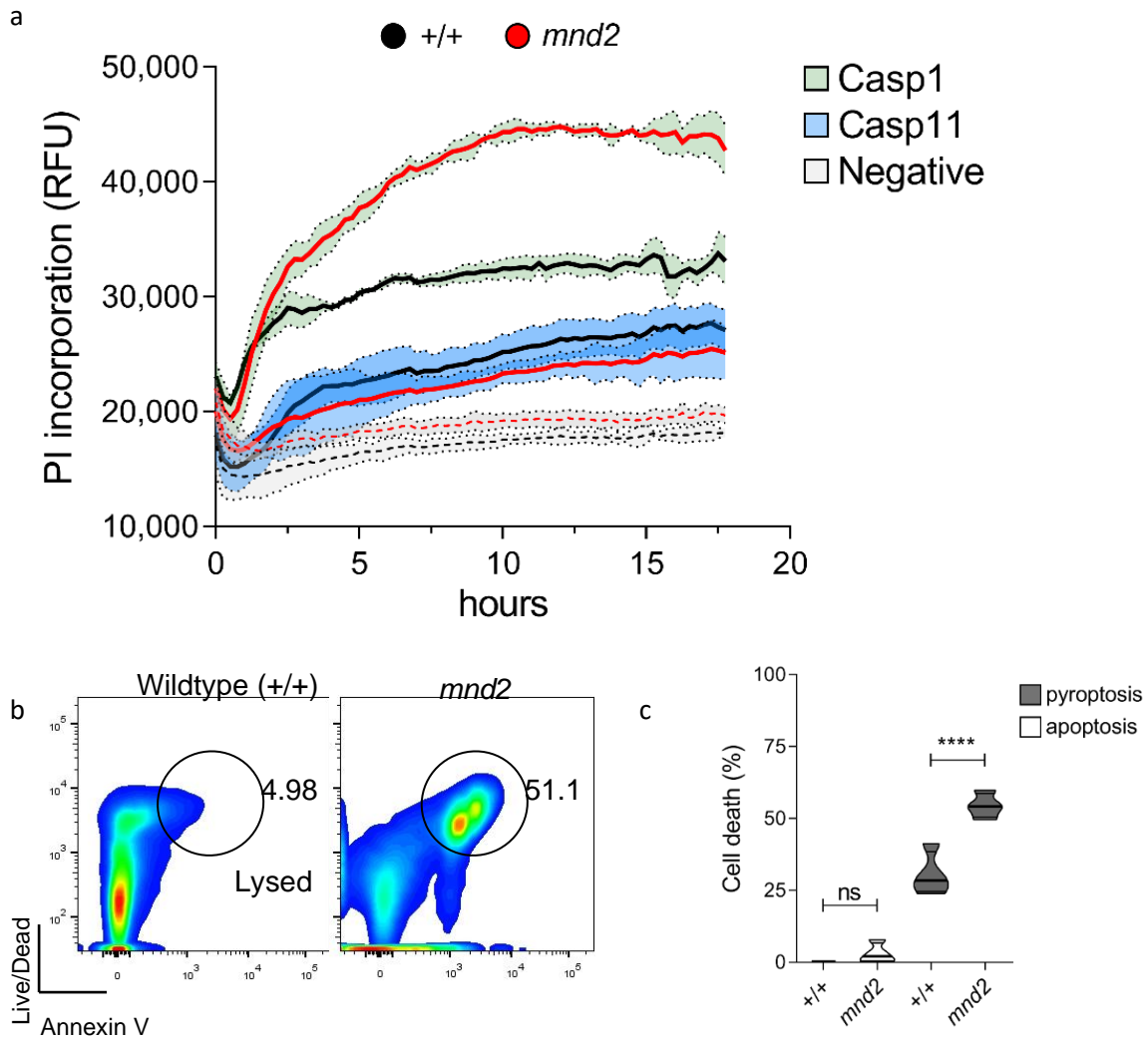


Figure 16. La perte de l'activité protéolytique de HTRA2 accélère la lyse pyroptotique induite par la caspase-1 des macrophages, mais pas celle induite par la caspase-11, et ce, sans impliquer l'apoptose lors de l'activation de l'inflammasome.

(a) Unités de fluorescence relative (RFU). Les BMDM ont été stimulés 4 heures avec 0.50 $\mu\text{g/ml}$ de LPS *E. coli* ultrapure O111 : B4 avant d'activer la caspase-1 ou la caspase-11 par l'addition de 5mM d'ATP et de 20 $\mu\text{g/ml}$ de choléra toxine B pour transférer le LPS, respectivement. La perméabilisation de la membrane a été mesurée par lecture du PI (5 μM) en temps réel à des intervalles de 15 minutes pour une durée totale de 24 heures dans une chambre environnementale du lecteur de microplaque Spark réglé à 37°C sans CO_2 . Les données pour la caspase-11 sont représentatives de deux expériences indépendantes avec chacune des triplicatas techniques tandis que les données pour la caspase-1 ont été reproduites dans au moins une dizaine d'expériences indépendantes avec chacune des triplicatas techniques. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance 95%. Les données de PI ont été normalisées pour le nombre de cellules (voir ratio nucléaire dans *Méthodologie*). (b) Illustration représentative du marquage cytométrique Live/DEAD et Annexin V dans les macrophages après stimulation de la voie NLRP3. La pyroptose a été induite avec de l'ATP (5 mM) pendant 45 minutes dans des BMDM. Un mélange 1 : 1 de BMDM vivantes et de BMDM mortes après induction de l'inflammasome après fixation et marquage a été employé pour le graphique. La partie en bas à gauche (Dead⁻AnnexinV⁻) correspond aux cellules vivantes. Les cellules ont été co-marquées avec un marqueur de viabilité, le Ghostdye Red780 (perte d'intégrité membranaire par formation de pore) et l'Annexine V-CF405M (lyse cellulaire). Le pourcentage indique la fréquence de cellules ayant subi une lyse (Dead⁺AnnexinV⁺). (c) Tracé de violon correspondant à la quantification de la fréquence cumulative de mort cellulaire (pyroptose : Dead⁺ (perméabilisées par formation de pores GSDMD) et Dead⁺AnnexinV⁺ (lysées) ; apoptose : négative pour colorant Dead et AnnexinV⁺). Les données représentent trois expériences indépendantes regroupées (moyenne \pm s.e.m, n = 3 réplicata biologiques par expérience). ****p < 0.0001 Tukey one-way ANOVA post-test.

Ces résultats soutiennent l'idée que la coloration PI identifie les cellules intactes qui contiennent des pores GSDMD (Evavold et al., 2018) et que le marquage Dead+Annexin V⁺ identifie les cellules dont les membranes plasmiques se sont rompues/lysées (Sarhan et al., 2018), ce qui indique une pyroptose. Ces observations concordent avec nos résultats publiés sur le rôle suppresseur de HTRA2 sur la pyroptose caspase-1-dépendante induites par les inflammasomes canoniques (Rodrigue-Gervais et al., 2018). À l'opposé, nous n'observons pas de différence entre les deux génotypes pour la pyroptose caspase-11-GSDMD dépendante (Fig.16a). Cette différence s'expliquerait par le fait que l'activation de la capase-11 ne nécessite pas ASC puisqu'elle s'active directement en liant son ligand, suggérant que la fonction mitochondriale qui régule la pyroptose via HTRA2 est spécifique à la classe d'inflammasomes canoniques ASC-dépendant et ne fait pas intervenir une mort lytique secondaire à l'apoptose (ex. via la voie caspase-3-GSDME).

4.1. Perte de fonctions mitochondriales et lysosomales par le mutant mnd2 de HTRA2

Dans le papier, nous avons montré que l'absence de l'activité protéase de HTRA2 affectait l'autophagie et le lysosome à certains égards. Il existe maintenant plusieurs évidences de la communication entre la mitochondrie et le lysosome (Wong et al., 2018) et du fait qu'un défaut de fonction à la mitochondrie puisse entraîner une perte de la fonction dégradative des lysosomes. Dans ce contexte nous avons voulu tester quel effet la perte de l'activité de HTRA2 pourrait avoir sur les fonctions énergétiques de la mitochondrie et sur l'activité du lysosome. Nous avons mesuré les fonctions mitochondriales à l'aide du Seahorse avec ou en absence de *priming* (LPS). Nous avons aussi fait des mesures avec l'ATP seul ou avec l'activation de l'inflammasome (LPS+ATP). Finalement, afin de déterminer les fonctions mitochondriales affectées en l'absence de l'activité protéase de HTRA2, nous avons injecter différents inhibiteurs de la respiration mitochondriale. Brièvement, nous avons utilisé l'oligomycine, inhibiteur du complexe V plus précisément la sous-unité F₀, qui provoque une accumulation de protons à l'extérieur de la mitochondrie en bloquant le canal à protons sans nuire au bon fonctionnement de la pompe à protons (Penefsky, 1985). Nous avons aussi utilisé le FCCP qui interfère avec le gradient de protons en transportant des protons à travers la membrane interne de la mitochondrie (Park et al., 2002; To et al., 2010), puis la roténone qui inhibe le transfert d'électrons des centres fer-soufre du complexe I vers l'ubiquinone (Palmer et al., 1968) et l'antimycine A qui se lie au site Q_i de la cytochrome c réductase, inhibant l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone dans le site Q_i (Huang et al., 2005). En plus de calculer le taux de respiration mitochondrial (OCR), le Seahorse prend

aussi des mesures du taux d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR), un indicateur dans une certaine mesure de la glycolyse.

Nous avons analysé les conséquences de la perte de fonction de HTRA2 sur la fonction mitochondriale des macrophages en mesurant directement le taux de consommation d'oxygène (OCR) des cellules sur l'analyseur de flux extracellulaire Seahorse XFe96. Les cellules sauvages ont le profil attendu des cellules lors d'un essai de respirométrie sur le Seahorse. Brièvement, l'ajout d'oligomycine, inhibiteur du complexe V abaisse la respiration mitochondriale. Puis, l'ajout de FCCP augmente la respiration jusqu'à la valeur maximale en accord avec son rôle d'agent dépolarisant. Finalement, la roténone et l'antimycine A, inhibiteurs respectifs du complexe I et III abolissent l'OXPPOS. La perte de la protéolyse de HTRA2 (*mnd2*) donne lieu à une diminution de trois fois dans le taux de consommation d'oxygène (OCR) qui est un indicateur de l'OXPPOS comparativement au génotype sauvage (+/+) se traduisant plus précisément en une perte de la respiration maximale et de la capacité respiratoire de réserve (Fig.17a). Ce résultat montre un défaut mitochondrial en l'absence de l'activité protéolytique de HTRA2 avant même l'induction de l'inflammasome. Lors du *priming* de l'inflammasome (LPS), la respiration basale augmente chez le génotype sauvage comparativement au contrôle non-traité tel que déjà décrit (Cameron et al., 2019; Tannahill et al., 2013) tout comme la respiration maximale et la capacité respiratoire de réserve (Fig.17a). Dans le mutant *mnd2*, l'ajout de LPS ne module pas à la hausse la respiration mitochondriale basale, la respiration maximale et la capacité respiratoire de réserve comparativement au contrôle non-traité (Fig.17b). L'ajout d'ATP diminue la respiration maximale et la capacité respiratoire de réserve dans les deux génotypes par rapport au non-traité (Fig.17c) concordant avec le rôle dépolarisant de l'ATP extracellulaire à la mitochondrie précédemment rapporté (Martinez-Garcia et al., 2019). Lors de l'activation de l'inflammasome (LPS+ATP), la respiration mitochondriale basale augmente légèrement dans les deux génotypes comparativement au contrôle non-traité. De plus, on peut voir une diminution de la respiration maximale et de la capacité respiratoire de réserve dans le sauvage par rapport au contrôle non-traité ce qui n'est pas le cas pour le mutant où ces deux paramètres sont quasi-inexistants (Fig.17d). En somme, ces résultats suggèrent que le mutant *mnd2* présente un défaut mitochondrial basal important qui correspond à celui observé après activation de l'inflammasome dans des macrophages sauvages. En examinant le ratio ECAR/OCR, on peut voir que dans les conditions basales sans traitement, le ratio ECAR/OCR est plus élevé en absence de l'activité protéase de HTRA2, ce qui suggère possiblement une utilisation anaérobie du glucose (Tableau 5).

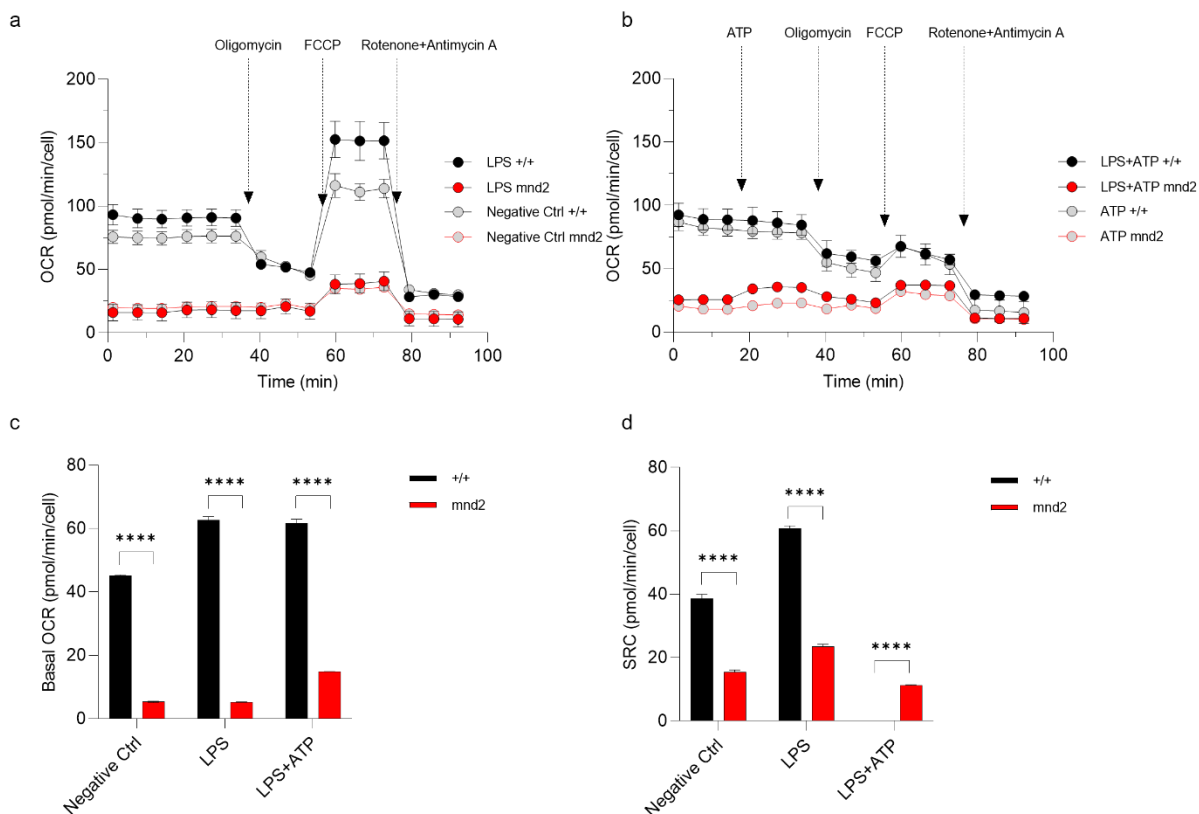


Figure 17. L'ablation de l'activité protéolytique de HTRA2 induit un déficit d'OXPPOS dans les macrophages.

Les BMDM ont soit été pré-stimulés avec du milieu contenant du PBS ou 0.020 µg/ml de LPS) pendant 3 heures, puis la pyroptose a été induite avec l'addition automatisé de 5mM d'ATP à partir de 18 minutes dans l'instrument Seahorse XFe96 Analyzer. Par la suite, l'oligomycine (1 µM), le FCCP (1 µM), la roténone/l'antimycine A (0.5 µM) ont été ajoutés à 36, 54 et à 72 minutes respectivement. Le profil du taux de consommation d'oxygène pour les deux génotypes de macrophage (rouge: mnd2; noir: sauvage) (a) non traités (PBS: negative ctrl); stimuler avec LPS; (b) suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (LPS+ATP), (c) comparaison de la respiration basale (Basal OCR) et (d) la capacité respiratoire de réserve (SRC). La figure provient d'une expérience représentative d'une série de trois expériences indépendantes avec chacune des quintuplicatas techniques. Les données sont normalisées sur le nombre de cellules et représentent la moyenne ± s.e.m. ****p < 0.0001 ANOVA unidirectionnelle avec test de comparaisons multiple de Sidak (c) ou de Tukey (d).

Tableau 5. La protéolyse de HTRA2 augmente le ratio ECAR/OCR.

ECAR/OCR Ratio (Mean ± SEM)	Negative Ctrl	LPS	ATP	LPS+ATP
+/+	0.37 (± 0.01)	0.46 (± 0.01)	0.19 (± 0.06)	0.15 (± 0.06)
mnd2	0.54 (± 0.04)	1.04 (± 0.06)	0.66 (± 0.29)	0.44 (± 0.11)

Dans le papier, nous avons démontré que l'absence de l'activité protéase de HTRA2 donnait lieu à une diminution de LysoTracker, un marqueur d'organelles acides de près de 50% chez le mutant. Lors de la publication du papier, nous pouvions seulement conclure que le nombre d'organelles acides (lysosomes) était réduit, mais nous ne savions pas si l'activité des

lysosomes était aussi affectée. Nous avons donc cherché à savoir si l'absence de l'activité protéase de HTRA2 affectait aussi l'activité lysosomale.

La Cathepsine D est une endopeptidase de type aspartique soluble présente dans les lysosomes où elle participe à la dégradation des protéines (Benes et al., 2008). Pour commencer à évaluer si l'activité de HTRA2 a un impact sur la fonctionnalité du lysosome, nous avons incubé des macrophages avec Bodipy-FL-pepstatine A qui se lie uniquement à la Cathepsine D active dans le lysosome et est utilisée comme indicateur de l'activité enzymatique de cette dernière. La perte de l'activité protéolytique de HTRA2 réduit l'activité lysosomale comme le montre la baisse de près de 40% de l'activité de la cathepsine D chez le mutant *mnd2* comparativement au génotype *sauvage* (Fig.18). Nos résultats sont en accord avec ce qui a déjà été rapporté dans la littérature au sujet du fait qu'un défaut mitochondrial respiratoire résultait en une perte de l'activité des cathepsines au sein des lysosomes (Baixauli et al., 2015; Demers-Lamarche et al., 2016; Fernandez-Mosquera et al., 2019).

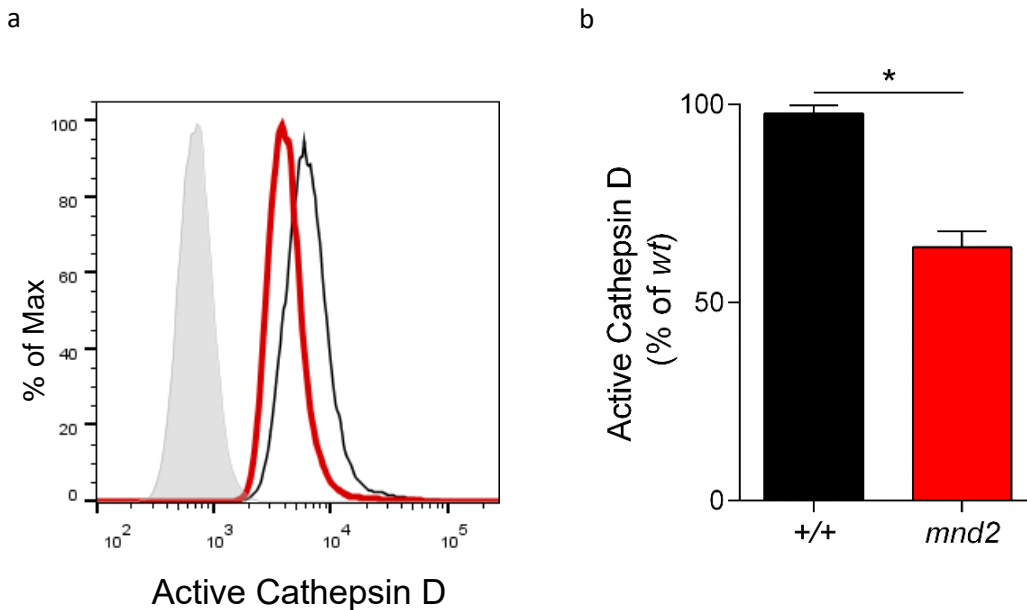


Figure 18. La perte de l'activité protéase de HTRA2 réduit l'activité de la cathepsine D lysosomale.

(a) Illustration représentative du marquage cytométrique de la cathepsine D active dans les macrophages par le Bodipy-FL-pepstatine A (gris pâle : contrôle non-marqué ; rouge : mutant *mnd2* ; noir : sauvage). (b) Quantification de l'activité de la cathepsine D selon le génotype. Les données représentent trois expériences indépendantes regroupées (moyenne \pm s.e.m, $n = 3$ réplicatas biologiques par expérience). * $p < 0.05$ Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

4.2. HTRA2 est nécessaire pour la survie des macrophages exposés au virus de la grippe

L'apoptose, la nécroptose et la pyroptose sont génétiquement distinctes les unes des autres et sont toutes induites à des degrés divers par l'infection des macrophages par le virus influenza. De par le rôle pro-survie de HTRA2 dans les macrophages contre plusieurs formes de mort programmée, nous avons envisagé la possibilité que les macrophages puissent exprimer des facteurs de pro-survie (tels que HTRA2) qui permettraient aux cellules de survivre à l'infection avec le virus influenza. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons infecté des macrophages avec différentes souches de virus influenza A et évalué la viabilité des cultures par un suivi en temps réel de l'incorporation de PI et de l'activation des caspases apoptotiques en utilisant un substrat fluorogénique pour les caspases-3 et -7 actives. Lorsque les macrophages mutants *mnd2* sont infectés, nous avons pu détecter la mort cellulaire lytique particulièrement avec le virus H3N2 dans le mutant (pic à 5 heures) (Fig.19a, b) ainsi que l'activation de la caspase-3/7 dans les 24 premières heures post-infection (Fig.19c, d). Il se pourrait que les cellules qui meurent en premier (pic à 5 heures) aient un défaut mitochondrial plus accru ce qui les pousse plus facilement à la mort après infection avec IAV. En revanche, les macrophages avec une activité HTRA2 normale ne présentent pas de processus de mort cellulaire lors de l'infection, quelle que soit la dose infectieuse testée (données non publiées) ou les différentes souches virales utilisées (Fig.19). Le virus influenza infecte et se réplique dans les macrophages et ce dans la même mesure indépendamment du génotype HTRA2 des macrophages (données non publiées, C. Champagne, IG Rodrigue-Gervais). Ces données suggèrent que les facteurs de pro-survie médiés par HTRA2 pourraient être capables de contourner la mort induite par le virus influenza dans les macrophages dans les 24 premières heures de l'infection.

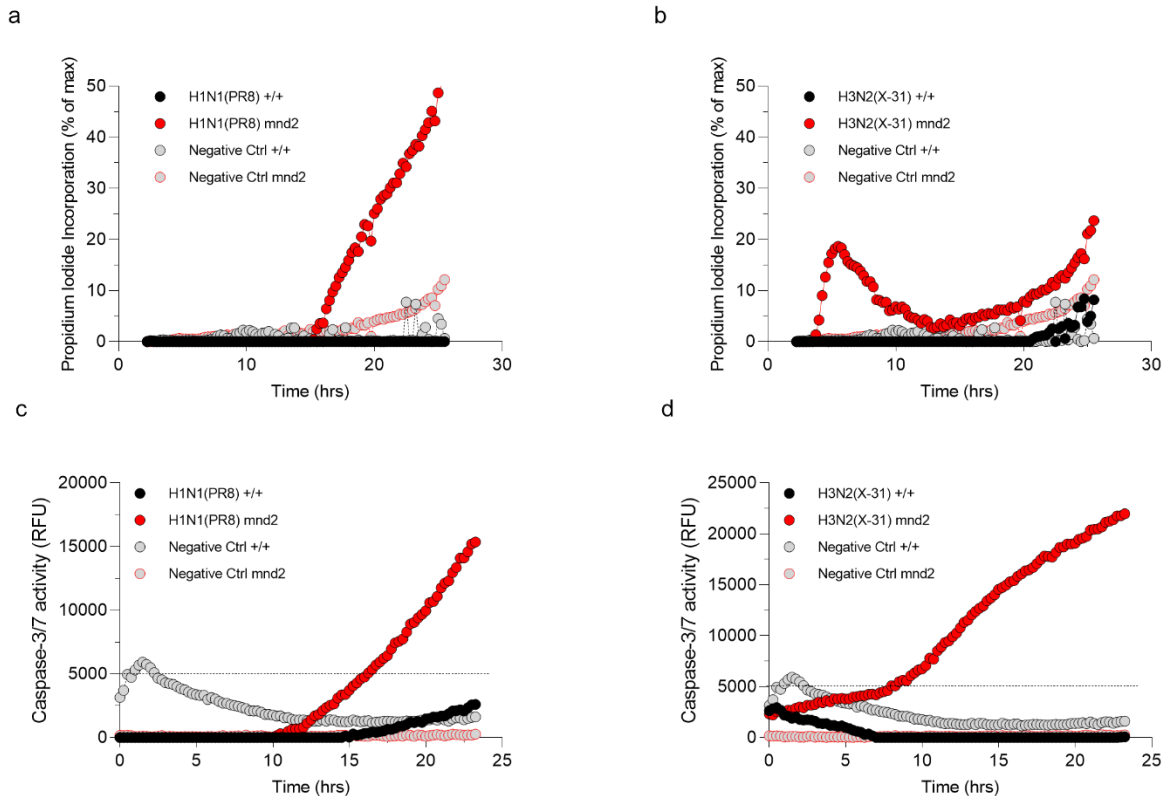


Figure 19. HTRA2 est un facteur de pro-survie dans les macrophages infectés avec le virus Influenza.

Les BMDM ont été infectés avec une MOI de 10 pour les virus influenza A de H1N1 (PR8) (a) Puerto Rico/8/34/H1N1 (PR8) (b) Aichi/2/1968/H3N2 (X-31) puis la perméabilisation de la membrane a été mesurée en temps-réel par du PI. Les valeurs normalisées sur le nombre de cellules sont rapportées par rapport aux valeurs de fluorescence maximale fixée par les puits de cellules non traitées lysées avec 0.5% de Triton X. L'apoptose a été mesurée en temps réel du CellEvent Caspase3/7 Green pour des macrophages infectés à une MOI de 10 de (c) PR8 (d) X-31. Les données représentent la moyenne de (a,b) trois et (c,d) deux expériences indépendantes avec chacune des triplicatas techniques.

4.3. L'activité protéase HTRA2 régule différemment d'autres modalités de mort programmée chez les macrophages

Pour savoir si la perte de l'activité protéolytique de HTRA2 impactait d'autres formes de mort programmées, nous avons induit l'apoptose intrinsèque en utilisant la staurosporine (un inhibiteur non-sélectif de la kinase PKC) (Ward and O'Brian, 1992) et la nécroptose via le TLR4 tout en bloquant l'activité des caspases avec ZVAD, un inhibiteur pan-caspase qui se lie de manière irréversible à leur site catalytique (Van Opdenbosch and Lamkanfi, 2019). En ce qui a trait à l'apoptose, les macrophages de type sauvage traités avec 1 μ M de staurosporine pendant 24h ont montré une augmentation de 1.5 fois plus élevée pour l'activité de la caspase-3/7 par rapport aux cellules témoins (Fig.20a). Ce résultat confirme que les protéases caspase-3/7 sont activées

suite à l'apoptose des macrophages induite par la staurosporine. En revanche, les cellules mutantes *mnd2* traitées par la staurosporine présentaient des niveaux d'activité caspase-3/7 supérieurs à ceux détectés dans les cellules sauvages. Par ailleurs, concernant la nécroptose, dans le génotype sauvage la proportion de la population qui a perdu son intégrité membranaire atteint 23% comparativement à 13% pour le mutant *mnd2* à 5h post-induction de la nécroptose (Fig.20b). Également, les macrophages *mnd2* dépourvus d'activité HTRA2 présentent un retard significatif dans l'incorporation de PI à la suite d'un traitement avec ZVAD/LPS. Avec l'ajout de l'inhibiteur de RIPK3, GSK872, les macrophages sont protégés de la mort nécroptotique induite par le TLR4. Ces résultats concordent avec le rôle pro-nécroptotique déjà rapporté pour HTRA2 (Sosna et al., 2013; Zhang et al., 2019) et suggèrent que contrairement au rôle suppresseur sur la pyroptose et l'apoptose, l'activité protéase de HTRA2 est nécessaire pour la nécroptose induite via le TLR4 dans les macrophages.

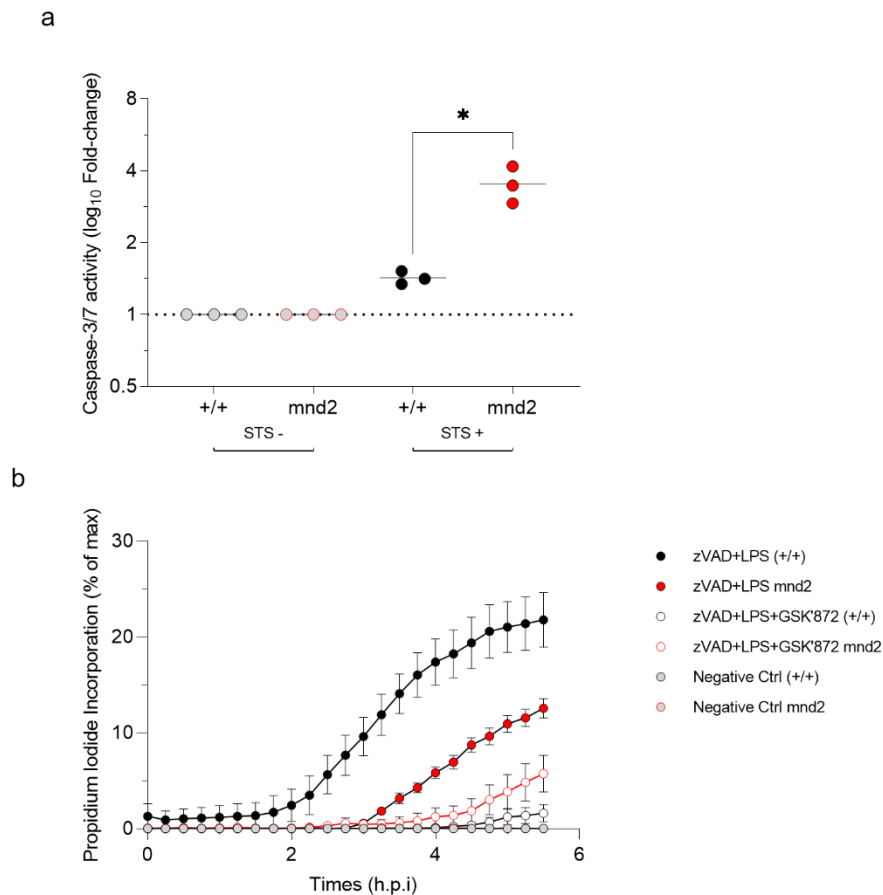


Figure 20. La perte de l'activité protéase HTRA2 sensibilise à l'apoptose intrinsèque mais est requise pour la nécroptose induite par la voie TLR4.

(a) L'apoptose a été induite avec de la staurosporine (STS), puis l'activité des caspases-3/7 a été mesurée après 24 heures sur un lecteur microplaque Spark. Les valeurs sont rapportées par rapport aux valeurs des contrôles non-traités du génotype sauvage (+/+). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec chacune des triplicatas techniques avec l'erreur standard de la moyenne (SEM). * $p < 0.05$ One-Way Repeated Measures ANOVA with Geisser–Greenhouse correction. **(b)** Les BMDM ont été prétraités avec l'inhibiteur pan-caspase zVAD (50 μM) pendant 30 minutes, suivi d'une stimulation avec du LPS *E. coli* ultrapure O111 : B4 (0.020 $\mu\text{g/ml}$) pendant 4 heures pour induire la nécroptose après traitement avec GSK'872(5 μM) l'inhibiteur de RIPK3 avant la lecture du PI aux 15 minutes sur 5 heures. Les données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes avec chacune des triplicatas techniques \pm SEM.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Nous avons identifié dans ce mémoire que la protéase HTRA2 agissait comme un inhibiteur de l'activation d'inflammasomes ASC-dépendant en contexte d'infections virales (Rodrigue-Gervais et al., 2018) et confirmer par des approches de mesures de la viabilité cellulaire en temps réel l'importance de HTRA2 en tant que régulateur de la survie cellulaire en réponse au virus de la grippe. À l'aide du mutant catalytique, *mnd2*, nous avons montré dans des macrophages que l'activité protéase de HTRA2 plutôt que sa fonction chaperonne était nécessaire pour réguler l'inflammasome. Nous avons aussi montré que l'effet de HTRA2 était senseur indépendant et qu'il régulait que les inflammasomes canoniques qui utilisent l'adaptateur ASC pour leur assemblage (ex. NLRP3 et AIM2). De plus, tant (1) l'augmentation de la sécrétion de LDH extracellulaire (mesure terminale de pyroptose), (2) l'apparition plus rapide et soutenue de la forme clivée et active de la caspase-1 (fragment p20), (3) une formation plus rapide et intense des pores GSDMD pro-nécrotiques à la surface membranaire plasmique (Fig.16) et (4) d'une sécrétion accrue de l'IL-1 β , nous permettent de conclure que l'activité catalytique de HTRA2 est requise pour maintenir la survie des macrophages lors de l'activation de l'inflammasome ou après infection par un virus ARN. Finalement, l'inactivation de HTRA2 favorise une déficience de l'OXPPOS ainsi qu'une fonction mitochondriale compromise (Fig.17). En effet, l'altération de la fonction de HTRA2 semble induire une reprogrammation métabolique, mais il faudrait mesurer l'utilisation des différents substrats et le lactate afin de confirmer que l'absence de HTRA2 donne lieu à une consommation accrue de glucose en anaérobiose.

Les effets de HTRA2 dans la mort cellulaire sont multiples et semble être différents selon la voie de mort qui est enclenchée et de la localisation de HTRA2. À titre d'exemple, lors de l'apoptose intrinsèque, HTRA2 est délocalisé de l'espace intramembranaire de la mitochondrie au cytosol suite au MOMP (Suzuki et al., 2001). Dans ce contexte, HTRA2 a un rôle pro-apoptotique en clivant les IAP. En effet, par le clivage des IAP, les caspases apoptotiques sont libérées de l'inhibition des IAP ce qui favorise l'apoptose (Sekine et al., 2005; Yang et al., 2003). Nous avons récemment démontré que lors de l'activation de l'inflammasome, HTRA2 restait localisé à l'IMS et avait un rôle pro-survie en régulant négativement les inflammasomes ASC dépendant et particulièrement l'activité de la caspase-1 (Rodrigue-Gervais et al., 2018). L'inflammasome non-canonique caspase-11 activé par le LPS peut cliver GSDMD (Kayagaki et al., 2015) tout comme l'inflammasome canonique caspase-1. Toutefois, à la lumière de nos résultats, contrairement à la caspase-1, la caspase-11 ne semble pas être régulée par l'activité protéase de HTRA2 (Fig.16). Une possible explication serait le fait que cet inflammasome est directement activé par le LPS qui se lie au domaine CARD de la caspase-11 par l'intermédiaire de son fragment lipidique A (Hagar et al., 2013), et ce, sans nécessiter le complexe ASC. Cette observation concorde avec

l'effet inhibiteur spécifique de HTRA2 sur les inflammasomes ASC-dépendant aussi bien rapporté dans le papier (Rodrigue-Gervais et al., 2018) que dans ce mémoire et suggère que les perturbations des fonctions mitochondriales que supervisent HTRA2 ne mènent pas à une perte de survie généralisée, notamment contre les formes de mort dites lytiques et pro-inflammatoires.

Avant l'activation de l'inflammasome, le taux de consommation d'oxygène (OCR) est plus bas dans le génotype *mnd2* que le sauvage ce qui suggère que le clivage d'un/plusieurs substrats par HTRA2 est nécessaire pour maintenir les fonctions mitochondriales particulièrement celles en lien avec la respiration (Fig. 17a, c). Ce résultat est en accord avec l'observation d'une réduction de la respiration mitochondriale, des dommages avec accumulation de lipides peroxydés et de protéines non repliées à la mitochondrie dans les neurones dans lesquels HTRA2 n'est pas exprimé par délétion génique (Moisoï et al., 2009). Une explication possible de ce phénotype serait le fait que l'absence de HTRA2 nuirait au processus de contrôle de la qualité des protéines à la mitochondriale phénomène se traduisant par une augmentation de la production de ROS et en l'accumulation de lipides peroxydés et de protéines mal repliées. L'accumulation de ROS pourrait aussi jouer sur les protéines de la membrane interne et compromette la chaîne de transport des électrons ce qui expliquerait la diminution de la respiration mitochondriale observée en absence de HTRA2. Lors du *priming* de l'inflammasome, il y a une augmentation de la capacité respiratoire maximale et de la capacité respiratoire de réserve (SRC) dans les cellules sauvages (+/+) ce qui n'est pas le cas dans les cellules *mnd2* (Fig. 17a, d). Il a été montré que dans les conditions normales, le SRC reste inutilisée (Wust et al., 2015), mais qu'elle était importante lorsque la consommation d'oxygène est découplée de la production d'ATP ou lorsque la demande énergétique augmente comme lors de processus de mort ou d'infection virale (Pfleger et al., 2015). La modulation du SRC est type cellulaire dépendante et semble être modulable par chacun des complexe-I à IV de la chaîne de transport des électrons (Chen et al., 2001a; Sriskanthadevan et al., 2015). À titre d'exemple, dans les cellules souches embryonnaires pluripotentes de souris, la modulation à la hausse de l'activité du complexe-I de la chaîne respiratoire via STAT3 augmente le SRC (Carbognin et al., 2016) tandis que dans les cardiomyocytes, la modulation du SRC s'effectue par une augmentation de l'activité du complexe II via AMPK ou en inhibant les pyruvate déshydrogénase kinases (Pfleger et al., 2015). La disponibilité des substrats mitochondriaux et de l'activité du cycle de Krebs (Pfleger et al., 2015), la biogénèse de la mitochondrie (Yamamoto et al., 2016) et la mitophagie par l'élimination des mitochondries endommagées (Costa et al., 2013; Stevens et al., 2015) sont d'autres facteurs qui contribuent à la modulation du SRC. Le calcul du ratio de la respiration mitochondrial (OCR) et du taux d'acidification du milieu extracellulaire, indicateur de la glycolyse

(ECAR) montre une diminution du ratio ECAR/OCR dans le mutant ce qui révèle une possible augmentation de l'utilisation de la glycolyse (tableau 5), mais compte tenu du fait que l'OCR diminue aussi dans le mutant alors que l'ECAR reste sensiblement pareille, des mesures plus approfondies devraient être effectuées sur le sujet. Pour ce faire, il est possible de faire un essai de phénotypage sur le Seahorse. On s'attend à voir pour le mutant un ECAR élevé par rapport à un faible OCR autrement dit un profile glycolytique. Compte tenu du rôle QC de HTRA2, il est possible que le faible taux de respiration basale et de SRC dans le mutant puisse s'expliquer par de multitudes de facteurs, mais chose certaine cela reste dépendant de l'activité protéase de HTRA2.

Il a été montré qu'HTRA2 clive Mic60/mitofiline une sous-unité de MICOS (*Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*) qui fait partie du complexe MIB (Botham et al., 2019a). MIC60 est une protéine ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie, mais la majeure partie de la protéine se retrouve dans l'IMS (Gieffers et al., 1997) tout comme HTRA2. Sachant que la délétion des composantes de MICOS par RNAi perturbe la morphologie des crêtes mitochondriales (Botham et al., 2019a), il est possible que le défaut mitochondrial présent dans le mutant puisse être attribuable à l'effet de HTRA2 sur MIC60. Pour démontrer l'hypothèse selon laquelle la diminution de la respiration mitochondriale est attribuable au clivage de MIC60 par HTRA2, il faudrait employer une approche de génétique fonctionnelle. Pour ce faire, il faudrait réintroduire un mutant non-clivable de MIC60 dans les macrophages sauvages et regarder l'activité mitochondriale par le Seahorse, la morphologie des crêtes par microscopie électronique et la sensibilité aux agonistes de mort en plus d'une infection IAV par cytométrie en flux. Selon la présente hypothèse, compte tenu du rôle de contrôle-qualité de HTRA2, on s'attend à ce que le clivage de MIC60 le stabilise. Par conséquent, dans le mutant non-clivable, on s'attend à une dégradation de MIC60. Dans ce contexte, des mitochondries fragmentées, une diminution de la respiration mitochondriale et du SRC, une augmentation de l'activité de l'inflammasome et une augmentation de la mort cellulaire sont des observations auxquelles on s'attend. Dans des cellules neuronales humaines différenciées SH-SY5Y et des cellules dopaminergiques de rat PC12, il a été montré que l'absence de MIC60 par invalidation génique donnait lieu à une augmentation de la fission (la fusion n'étant pas impactée) résultant en des mitochondries fragmentées (Van Laar et al., 2016; Yang et al., 2012). Mécanistiquement, on s'attendrait à ce que la dégradation de MIC60 donne lieu à un phénotype semblable à lorsqu'il est absent. Parallèlement, dans les neurones humains en provenance de cellules souches pluripotentes induites, il a été montré que PINK1 phosphorylait Mic60 pour le stabiliser. Lorsque stabilisé, MIC60 favorise la formation de jonctions plus étroites dans les crêtes de la membrane interne de la

mitochondrie. À l'opposé, l'absence de MIC60 résulte en des jonctions plus perméables et donne lieu à des mitochondries ayant des crêtes semblables à des pelures d'oignons (Tsai et al., 2018). Dans l'étude de Van Laar et al., (2016), il a été aussi montré que l'absence de Mic60 sensibilisait à la mort causée par la dopamine et la roténone. Ce phénotype s'expliquerait par le fait que Mic60 en contrôlant le remodelage des crêtes mitochondriales favorise la rétention de Cyt C dans la membrane interne de la mitochondrie. L'absence de Mic60 donne lieu à un relâchement des jonctions des crêtes et favorise la libération de Cyt C hors de la mitochondrie sensibilisant ainsi à l'apoptose intrinsèque (Yang et al., 2012). Bref, selon la présente hypothèse, la perte des jonctions serrées des crêtes en absence de MIC60 compromettrait la chaîne de transports des électrons et résulterait en une diminution de la respiration mitochondriale et du SRC. Dans un contexte où la respiration mitochondriale est compromise, on s'attend à ce que l'inflammasome persiste plus longtemps. Dans l'expérience suggérée, si le défaut mitochondrial est attribuable à Mic60, alors l'ajout de Mic60 sauvage (c'est-à-dire la forme clivable par HTRA2 à l'opposé du mutant de MIC60 non-clivable par HTRA2) dans les macrophages *wild-type* permettra de restaurer la respiration mitochondriale et on observera moins de mitochondries fragmentées.

La voie autophago-lysosomale est perturbée dans les macrophages *mnd2* ((Rodrigue-Gervais et al., 2018) et Fig. 18) et cela empêche la dégradation autophagique de ASC. Les mécanismes par lequel la mitochondrie contrôle l'activité lysosomale semblent être multiples. Une délétion du facteur de transcription *TFAM* résulte en une diminution du nombre de copies de l'ADN mitochondrial et à une baisse de l'OXPPOS se traduisant en un défaut de stockage au niveau des lysosomes. Ce défaut lysosomal se manifeste au niveau du complexe-I et à un déséquilibre du ratio $NAD^+/NADH$ (Baixauli et al., 2015). Selon une autre étude, une délétion de certains gènes mitochondriaux tels que AIF, OPA1 ou PINK ou le blocage des chaînes respiratoires donne lieu à la génération de ROS ce qui se traduit par des lysosomes vacuolisés comme le démontre le sauvetage après traitement avec Q10, un antioxydant ciblé à la mitochondrie (Demers-Lamarche et al., 2016). Dans la même étude, il a été suggéré que la production mitochondriale d'ATP freinait la formation de ces vacuoles (Demers-Lamarche et al., 2016). Dans un modèle cellulaire et de cellules de cerveau de souris déficience en chaîne respiratoire et sous-unités du complexe III, il a été montré qu'un stress chronique à la mitochondrie entraînait une augmentation de l'activité de la folliculine (FLCN), une protéine suppressive de tumeur, résultant en une régulation négative de la signalisation d'AMPK, une baisse de l'activité des canaux Ca^{2+} mucopolipine 1 (MCOLN1), une accumulation de Ca^{2+} dans le lysosome, un élargissement du lysosome et une diminution de l'activité lysosomale (Fernandez-Mosquera et al., 2019). À partir de nos résultats actuels, il n'est pas possible de déterminer le mécanisme par lequel la protéolyse

de HTRA2 impacte le lysosome, mais compte tenu de son rôle de contrôle-qualité dans la mitochondrie, il ne serait pas étonnant de voir plus d'un mécanisme y contribuer. Nos résultats suggèrent que la régulation de l'inflammasome par HTRA2 passerait par le lysosome. En somme, la protéolyse de HTRA2 a un effet sur la fonction hydraulique des lysosomes observable par la diminution de la Cathepsine D dans le *mnd2* (Fig.18b). Afin de donner encore plus de poids aux données du lysosome, il est suggéré en plus de la Cathepsine D de mesurer un autre marqueur lysosomal comme le *lysosomal associated membrane protein 1* (LAMP1 ou LAMP2). Il a été montré que l'autophagie et par extension le lysosome inhibait l'inflammasome. Au vu de nos données, nous croyons que le mécanisme de régulation de l'inflammasome par HTRA2 fait intervenir un substrat mitochondrial inconnu et passe par le lysosome (Fig.21). Dans le futur, il serait pertinent de déterminer le substrat mitochondrial de HTRA2 qui permet la régulation de l'inflammasome. De même, il serait important de trouver le mécanisme exact par lequel ce substrat affecte l'activité lysosomale. Afin de déterminer le substrat de HTRA2 nécessaire pour la régulation de l'inflammasome, on pourrait utiliser le *Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates* (TAILS) (Doucet et al., 2011; Kleifeld et al., 2011) couplé à une analyse des protéines qui sont co-immunopurifiées (Co-IP) sélectivement avec le mutant catalytique HTRA2 S306A par rapport à la forme sauvage. Le TAILS est une technique de spectrométrie de masse (MS) pour l'identification de nouveaux N-terminaux générés suite au clivage d'une protéine par une protéase. Expérimentalement, on prendrait des mitochondries avec HTRA2 actif et le mutant catalytique HTRA2^{S306A}. Les mitochondries avec HTRA2 actif vont générer de nouveaux N-terminaux suite au clivage de HTRA2 comparativement au mutant. Les sites de clivage seront ensuite déterminés après une analyse par spectrométrie de masse. Les protéines co-purifiées avec la forme S306A ne seront catégorisées comme substrats que si celles-ci sont enrichies relativement au niveau d'interactions que ces protéines développent avec la forme sauvage. Les substrats de HTRA2 se lieront à la protéase, mais ne seront pas clivés dans le mutant catalytique (S306A) et seront enrichis contrairement au génotype sauvage où les substrats seront clivés. Une analyse par spectrométrie de masse permettra de détecter l'enrichissement en substrats. L'utilisation combinée de ces deux approches permettra de déterminer les substrats de HTRA2 ainsi que leurs sites de clivage. Finalement, l'implication de ces substrats dans la régulation de l'inflammasome pourra être validée avec des mutants non clivables.

Dans les macrophages infectés avec IAV, on observe une incorporation de PI et une activation de la caspase-3/7 (Fig.19) ce qui suggère une mort lytique (pyroptose ou nécroptose) et apoptotique. L'activation de la caspase-3/7 est non compatible avec la nécroptose, car la nécroptose est une voie de mort enclenchée par défaut lorsque les caspases apoptotiques (en

particulier la caspase-8) sont inhibées (Kaiser et al., 2011; Oberst et al., 2011). Toutefois, puisque nous mesurons la mort à l'échelle populationnelle, il est possible de détecter les trois modalités de mort. L'induction de l'apoptose par IAV est supportée dans la littérature. En effet, il a été montré que la protéine PB1-F2 pouvait interagir avec VDAC1 et ANT3 pour favoriser la perméabilisation des membranes externe et interne des mitochondries et la libération de molécules pro-apoptotiques (Chen et al., 2001b; Zamarin et al., 2005). Il aussi été montré que la protéine NS1 d'IAV induisait l'apoptose extrinsèque en augmentant l'expression des ligands des récepteurs de la mort, notamment FasL et TRAIL (Wang et al., 2014b; Wurzer et al., 2004). Basé sur ces données, on ne s'attend pas à ce que IAV active la nécroptose via l'inhibition des caspases apoptotiques. Dans les cellules épithéliales infectées avec IAV, il a été montré que ces dernières mourraient par apoptose suite à la formation du complexe RIPK1-FADD-Caspase-8 initié par FasL. Toutefois, en absence de cIAP2 dans ces cellules, RIPK3 est recruté au complexe RIPK1-FADD-Caspase-8 tandis que cFLIP_s inhibe l'apoptose résultant en l'activation de la nécroptose et à la mort de ces cellules (Rodrigue-Gervais et al., 2014). L'activation de la nécroptose par IAV pourrait se faire pendant la réplication du virus lorsque l'ARN-Z est détecté par ZBP1 ce qui mène à l'activation de RIPK1/3 (Lee et al., 2019; Shubina et al., 2020; Zhang et al., 2020).

La PANoptose (Pyroptose Apopptose Nécroptose) est une forme de mort lytique qui englobe la pyroptose, la nécroptose et l'apoptose. Il n'est pas impensable qu'IAV induise les trois modalités de mort (Fig. 21). Selon la présente hypothèse, HTRA2 clive un substrat mitochondrial spécifique qui maintient l'activité lysosomale pour contrôler le niveau d'activité de l'inflammasome et la résistance à la mort induite par le virus d'influenza. Il n'est pas exclu que le substrat agit sur les modalités de mort sans passer par le lysosome. De plus, il se pourrait que les substrats qui contrôlent chaque voie de mort soit différent. Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle IAV induit la PANoptose, on peut mesurer dans la même expérience les effecteurs de ces trois morts en utilisant un phospho-MLKL pour la nécroptose, la caspase-3/7 pour l'apoptose, et la forme clivée de GSDMD pour la pyroptose. Cette expérience se ferait en cytométrie afin d'avoir la contribution relative de chaque modalité de mort et nous permettrait de savoir si HTRA2 contrôle la PANoptose.

Dans une récente étude, il a été démontré que IAV tuait les macrophages par PANoptose et que cela nécessitait la formation de l'inflammasome ZBP1-NLRP3 ou PANoptosome (Christgen et al., 2020). Cette interdépendance et le complexe PANoptosome permettrait de contourner l'inhibition des voies de mort individuelles que peuvent exercer les pathogènes. De nombreux détails

moléculaires régulant le PANoptosome ne sont pas clairs, mais à ce jour, nous savons que ce super complexe comprend l'inflammasome (NLRP3 et ASC), la caspase-8 (Christgen et al., 2020) (Malireddi et al., 2020), ZBP1, RIPK1, RIPK3 et la caspase-6 qui en se liant à RIPK3 favoriserait l'assemblage de ZBP1, RIPK1, RIPK3 en vue de l'activation de la caspase-8 qui va ensuite activer l'inflammasome (Zheng et al., 2020). Nos données suggèrent que HTRA2 joue un rôle dans l'activation de la PANoptose par des virus ARN, car l'infection des macrophages par le virus de l'influenza A entraîne une mort cellulaire définie par les caractéristiques de l'activation de la PANoptose (apoptose, pyroptose; engagement de nombreuses voies de mort cellulaire). Seule la délétion combinée des composants de la PANoptose protège les macrophages de la mort cellulaire induite par IAV, tandis que la délétion des composants individuels offre une protection réduite (Christgen et al., 2020).

Tout comme pour la pyroptose, la perte de l'activité protéase de HTRA2 sensibilise les macrophages à l'apoptose intrinsèque induit par la staurosporine (Fig. 20a). Une raison possible qui pourrait expliquer cette sensibilité est le fait que dans le *mnd2*, il y a une diminution du SRC, or il a été montré que le SRC augmente la résistance des cellules à la mort cellulaire (Pfleger et al., 2015). La nécroptose est une mort immunitaire RIPK1-RIPK3-MLKL qui, comme la pyroptose, mène à la lyse cellulaire pour défendre l'organisme contre les infections intracellulaires. Selon la littérature, l'activité protéolytique de HTRA2 serait nécessaire pour l'activation de la nécroptose. Dans un modèle de colite induite par le *dextran sodium sulfate* (DSS) chez la souris, il a été montré que l'activité protéase de HTRA2 était nécessaire pour réguler à la hausse la nécroptose TNF-dépendante des cellules épithéliales de l'intestin (Zhang et al., 2019a). Dans une autre étude, il a été montré que l'activité protéase de HTRA2 était requise pour réguler à la hausse l'activité d'UCH-L1, une déubiquitinase qui contrôle la nécroptose TNF-dépendante dans un modèle cellulaire de podocytes. Vu qu'HTRA2 reste localisé dans l'IMS durant la nécroptose et ne clive pas directement UCH-L1, l'étude suggère qu'HTRA2 clive un substrat mitochondrial qui facilite la mono-ubiquitination de UCH-L1 (Sosna et al., 2013). Une autre étude supporte aussi l'idée que l'activité protéase de HTRA2 est nécessaire pour la régulation de la nécroptose tout en restant localisé à l'IMS dans les neutrophiles (Blink et al., 2004). Les trois études qui viennent d'être citées utilisent le TNF pour l'induction de la nécroptose alors que nous avons utilisé le LPS pour engager la nécroptose en aval de la signalisation par le TLR4. En accord avec cette littérature, nous avons trouvé qu'à la suite de l'induction de la nécroptose par la voie du TLR4 dans des macrophages, le mutant *mnd2* avait une plus faible incorporation de PI par rapport au génotype sauvage (Fig.20). Nos résultats suggèrent donc qu'HTRA2 via son activité protéase faciliterait la nécroptose, et ce indépendamment du signal d'activation. Le MOMP se produit

pendant la nécroptose (Karch et al., 2015), donc HTRA2 se retrouve probablement en dehors de la mitochondrie. Des études de localisation de HTRA2 pendant la nécroptose devraient être faites afin d'éclaircir cette question. En somme, la divergence de l'effet de HTRA2 dans la pyroptose et la nécroptose pourrait s'expliquer par le fait qu'HTRA2 clive des substrats différents possiblement mitochondrial et cytosolique qui pourraient avoir des rôles sur le lysosome. De plus, il a été montré que les IAP particulièrement XIAP inhibait la nécroptose (Yabal et al., 2014). Il ne serait pas impensable qu'HTRA2 se retrouve dans le cytosol via le MOMP pour cliver les IAP et lever l'inhibition sur la nécroptose.

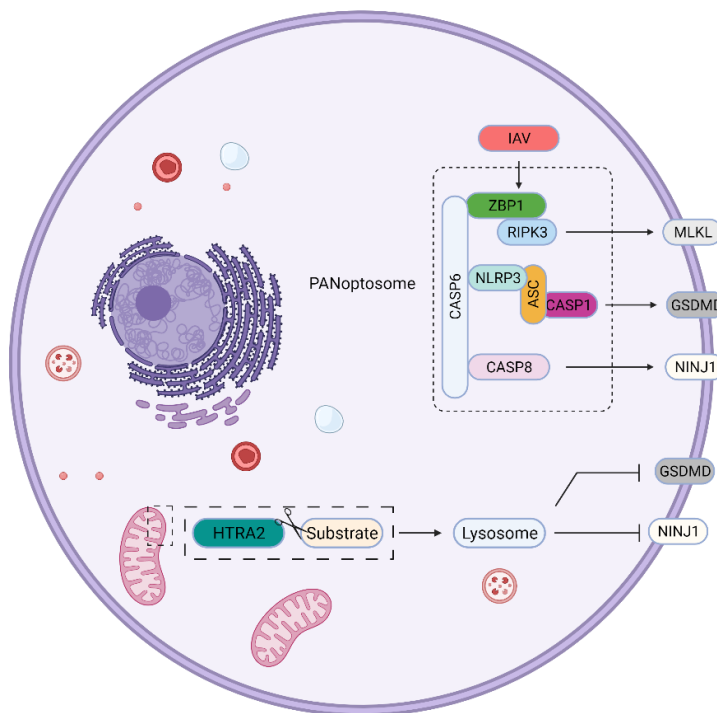


Figure 21. Mécanisme proposé pour la régulation de l'inflammasome par HTRA2.

HTRA2 clive un substrat mitochondrial spécifique qui maintient l'activité lysosomale pour contrôler le niveau d'activité de l'inflammasome et la résistance à la mort induite par le virus d'influenza. L'image a été faite avec BioRender.com

CHAPITRE 6 CONCLUSION

Nos résultats confirment le rôle central de HTRA2 dans l'intégration des signaux de stress provenant d'une infection virale dans la régulation de la signalisation de l'inflammasome et révèlent HTRA2 comme un effecteur non redondant dans ce processus. Nous avons montré dans les macrophages que HTRA2 est un point de contrôle de la pyroptose qui est déclenchée par les virus à ARN, sans toutefois compromettre la réponse immunitaire antiviral *in vivo*. Ceci est cohérent avec l'idée émergente que les protéases mitochondriales ont des fonctions anti-inflammatoires importantes.

En raison du peu d'options thérapeutiques spécifiques disponibles, le traitement des maladies virales respiratoires graves est notoirement difficile et les cliniciens s'en remettent principalement aux soins de soutien. Il a été proposé que l'activation de la mort inflammatoire des macrophages joue un rôle central dans la pathogenèse des infections virales aiguës des voies respiratoires. Notamment, la niche des macrophages résidents des voies respiratoires est épuisée par la mort lytique induite par le virus de la grippe ou par l'infection par le SARS-CoV-2 (qui provoque la Covid-19), et le niveau de déplétion a été associé avec la gravité de la maladie. Ainsi, que cette mort se produise directement par l'infection des macrophages ou par la détection indirecte de signaux générés dans le microenvironnement inflammatoire pulmonaire, nous proposons que des régulateurs négatifs de l'hôte sélectifs de l'inflammasome comme HTRA2 pourraient être manipulés pour servir de bloqueurs clés de l'immunopathogénèse virale et de sa progression en maladie sévère. Jusqu'à présent, il n'est pas facile de cibler les signaux de l'inflammasome qui se comportent mal dans les infections, car il existe de nombreuses preuves du rôle antiviral des inflammasomes. Or, une compréhension approfondie de la façon dont les produits de clivage générés par HTRA2 dans les mitochondries transmettent des signaux de survie essentiels aux macrophages, de la façon dont ces signaux contrôlent la voie de l'inflammasome et des conséquences sur la pathogenèse virale et la santé lorsque la voie HTRA2 échoue pourrait contourner cet obstacle. De telles études futures sont importantes pour nous aider à concevoir des stratégies de traitement pan viral pouvant être utilisées lorsque les vaccins ne sont pas encore disponibles.

BIBLIOGRAPHIE

Agard, N.J., Maltby, D., and Wells, J.A. (2010). Inflammatory stimuli regulate caspase substrate profiles. *Mol Cell Proteomics* 9, 880-893.

Agence de la santé publique du Canada.

Aglietti, R.A., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, M.G., Liu, P.S., Kayagaki, N., Ciferri, C., Dixit, V.M., and Dueber, E.C. (2016). GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 7858-7863.

Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., and Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9745-9750.

Baixauli, F., Acin-Perez, R., Villarroya-Beltri, C., Mazzeo, C., Nunez-Andrade, N., Gabande-Rodriguez, E., Ledesma, M.D., Blazquez, A., Martin, M.A., Falcon-Perez, J.M., *et al.* (2015). Mitochondrial Respiration Controls Lysosomal Function during Inflammatory T Cell Responses. *Cell Metab* 22, 485-498.

Baroja-Mazo, A., Martin-Sanchez, F., Gomez, A.I., Martinez, C.M., Amores-Iniesta, J., Compan, V., Barbera-Cremades, M., Yague, J., Ruiz-Ortiz, E., Anton, J., *et al.* (2014). The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* 15, 738-748.

Bauernfried, S., Scherr, M.J., Pichlmair, A., Duderstadt, K.E., and Hornung, V. (2021). Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA. *Science* 371.

Blink, E., Maianski, N.A., Alnemri, E.S., Zervos, A.S., Roos, D., and Kuijpers, T.W. (2004). Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils. *Cell Death Differ* 11, 937-939.

Boal-Carvalho, I., Mazel-Sanchez, B., Silva, F., Garnier, L., Yildiz, S., Bonifacio, J.P., Niu, C., Williams, N., Francois, P., Schwerk, N., *et al.* (2020). Influenza A viruses limit NLRP3-NEK7-complex formation and pyroptosis in human macrophages. *EMBO Rep* 21, e50421.

Botham, A., Coyaud, E., Nirmalanandhan, V.S., Gronda, M., Hurren, R., Maclean, N., St-Germain, J., Mirali, S., Laurent, E., Raught, B., *et al.* (2019a). Global Interactome Mapping of Mitochondrial Intermembrane Space Proteases Identifies a Novel Function for HTRA2. *Proteomics* 19, e1900139.

Botham, A., Coyaud, E., Nirmalanandhan, V.S., Gronda, M., Hurren, R., Maclean, N., St-Germain, J., Mirali, S., Laurent, E., Raught, B., *et al.* (2019b). Global Interactome Mapping of Mitochondrial Intermembrane Space Proteases Identifies a Novel Function for HTRA2. *Proteomics*, e1900139.

Broz, P., Pelegrin, P., and Shao, F. (2020). The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* 20, 143-157.

Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q.X., Halfmann, R., and Chen, Z.J. (2014). Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell* 156, 1207-1222.

Cameron, A.M., Castoldi, A., Sanin, D.E., Flachsmann, L.J., Field, C.S., Puleston, D.J., Kyle, R.L., Patterson, A.E., Hassler, F., Buescher, J.M., *et al.* (2019). Inflammatory macrophage dependence on NAD(+) salvage is a consequence of reactive oxygen species-mediated DNA damage. *Nat Immunol* 20, 420-432.

- Carbognin, E., Betto, R.M., Soriano, M.E., Smith, A.G., and Martello, G. (2016). Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J* 35, 618-634.
- Carty, M., Kearney, J., Shanahan, K.A., Hams, E., Sugisawa, R., Connolly, D., Doran, C.G., Munoz-Wolf, N., Gurtler, C., Fitzgerald, K.A., *et al.* (2019). Cell Survival and Cytokine Release after Inflammasome Activation Is Regulated by the Toll-IL-1R Protein SARM. *Immunity* 50, 1412-1424 e1416.
- Cavaillès, P., Flori, P., Papapietro, O., Bisanz, C., Lagrange, D., Pilloux, L., Massera, C., Cristinelli, S., Jublot, D., Bastien, O., *et al.* (2014). A highly conserved Toxo1 haplotype directs resistance to toxoplasmosis and its associated caspase-1 dependent killing of parasite and host macrophage. *PLoS Pathog* 10, e1004005.
- Chao, J.R., Parganas, E., Boyd, K., Hong, C.Y., Opferman, J.T., and Ihle, J.N. (2008). Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature* 452, 98-102.
- Chavarria-Smith, J., and Vance, R.E. (2013). Direct proteolytic cleavage of NLRP1B is necessary and sufficient for inflammasome activation by anthrax lethal factor. *PLoS Pathog* 9, e1003452.
- Chen, J., Henderson, G.I., and Freeman, G.L. (2001a). Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1919-1927.
- Chen, K.W., Demarco, B., Heilig, R., Shkarina, K., Boettcher, A., Farady, C.J., Pelczar, P., and Broz, P. (2019). Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP3 inflammasome assembly. *EMBO J* 38.
- Chen, K.W., Gross, C.J., Sotomayor, F.V., Stacey, K.J., Tschopp, J., Sweet, M.J., and Schroder, K. (2014). The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 β maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge. *Cell Rep* 8, 570-582.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., *et al.* (2001b). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7, 1306-1312.
- Chen, X., He, W.T., Hu, L., Li, J., Fang, Y., Wang, X., Xu, X., Wang, Z., Huang, K., and Han, J. (2016). Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res* 26, 1007-1020.
- Christgen, S., Zheng, M., Kesavardhana, S., Karki, R., Malireddi, R.K.S., Banoth, B., Place, D.E., Briard, B., Sharma, B.R., Tuladhar, S., *et al.* (2020). Identification of the PANoptosome: A Molecular Platform Triggering Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). *Front Cell Infect Microbiol* 10, 237.
- Chui, A.J., Griswold, A.R., Taabazuing, C.Y., Orth, E.L., Gai, K., Rao, S.D., Ball, D.P., Hsiao, J.C., and Bachovchin, D.A. (2020). Activation of the CARD8 Inflammasome Requires a Disordered Region. *Cell Rep* 33, 108264.
- Chui, A.J., Okondo, M.C., Rao, S.D., Gai, K., Griswold, A.R., Johnson, D.C., Ball, D.P., Taabazuing, C.Y., Orth, E.L., Vitimberga, B.A., *et al.* (2019). N-terminal degradation activates the NLRP1B inflammasome. *Science* 364, 82-85.
- Chung, W.C., Kang, H.R., Yoon, H., Kang, S.J., Ting, J.P., and Song, M.J. (2015). Influenza A Virus NS1 Protein Inhibits the NLRP3 Inflammasome. *PLoS One* 10, e0126456.

- Cilenti, L., Ambivero, C.T., Ward, N., Alnemri, E.S., Germain, D., and Zervos, A.S. (2014). Inactivation of Omi/HtrA2 protease leads to the deregulation of mitochondrial Mulan E3 ubiquitin ligase and increased mitophagy. *Biochim Biophys Acta* 1843, 1295-1307.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., *et al.* (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163-175.
- Compan, V., Baroja-Mazo, A., Lopez-Castejon, G., Gomez, A.I., Martinez, C.M., Angosto, D., Montero, M.T., Herranz, A.S., Bazan, E., Reimers, D., *et al.* (2012). Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 37, 487-500.
- Cookson, B.T., and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 9, 113-114.
- Costa, A.C., Loh, S.H., and Martins, L.M. (2013). *Drosophila* Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis* 4, e467.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282, 2871-2879.
- Davis, B.K., Wen, H., and Ting, J.P. (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 29, 707-735.
- de Alba, E. (2009). Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *J Biol Chem* 284, 32932-32941.
- de Vasconcelos, N.M., Van Opdenbosch, N., Van Gorp, H., Parthoens, E., and Lamkanfi, M. (2019). Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death Differ* 26, 146-161.
- Demarco, B., Grayczyk, J.P., Bjanec, E., Le Roy, D., Tonnus, W., Assenmacher, C.A., Radaelli, E., Fettlelet, T., Mack, V., Linkermann, A., *et al.* (2020). Caspase-8-dependent gasdermin D cleavage promotes antimicrobial defense but confers susceptibility to TNF-induced lethality. *Sci Adv* 6.
- Demers-Lamarche, J., Guillebaud, G., Tlili, M., Todkar, K., Belanger, N., Grondin, M., Nguyen, A.P., Michel, J., and Germain, M. (2016). Loss of Mitochondrial Function Impairs Lysosomes. *J Biol Chem* 291, 10263-10276.
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem* 86, 193-224.
- Dinarello, C.A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 281, 8-27.
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.C., and Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 535, 111-116.
- Doitsh, G., Galloway, N.L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Munoz-Arias, I., *et al.* (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505, 509-514.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674-677.

- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *EMBO J* 30, 4701-4711.
- Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., and Flavell, R.A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122-1126.
- Evans, S.S., Repasky, E.A., and Fisher, D.T. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol* 15, 335-349.
- Evavold, C.L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., and Kagan, J.C. (2018). The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* 48, 35-44 e36.
- Faccio, L., Fusco, C., Chen, A., Martinotti, S., Bonventre, J.V., and Zervos, A.S. (2000). Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* 275, 2581-2588.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513.
- Fernandez-Mosquera, L., Yambire, K.F., Couto, R., Pereyra, L., Pabis, K., Ponsford, A.H., Diogo, C.V., Stagi, M., Milosevic, I., and Raimundo, N. (2019). Mitochondrial respiratory chain deficiency inhibits lysosomal hydrolysis. *Autophagy* 15, 1572-1591.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* 8, 1812-1825.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., *et al.* (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7, 576-582.
- Franklin, B.S., Bossaller, L., De Nardo, D., Ratter, J.M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S.R., Al-Amoudi, A., *et al.* (2014). The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15, 727-737.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., *et al.* (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177-189.
- Gambin, Y., Giles, N., O'Carroll, A., Polinkovsky, M., Hunter, D., and Sierrecki, E. (2018). Single-Molecule Fluorescence Reveals the Oligomerization and Folding Steps Driving the Prion-like Behavior of ASC. *J Mol Biol* 430, 491-508.
- Ghonime, M.G., Shamaa, O.R., Das, S., Eldomany, R.A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., Gavrilin, M.A., and Wewers, M.D. (2014). Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. *J Immunol* 192, 3881-3888.
- Gieffers, C., Koriath, F., Heimann, P., Ungermann, C., and Frey, J. (1997). Mitofilin is a transmembrane protein of the inner mitochondrial membrane expressed as two isoforms. *Exp Cell Res* 232, 395-399.
- Goldmacher, V.S., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Dionne, C.A., Kedersha, N.L., Vater, C.A., Han, J.W., Lutz, R.J., Watanabe, S., Cahir McFarland, E.D., *et al.* (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12536-12541.

- Goo, H.G., Jung, M.K., Han, S.S., Rhim, H., and Kang, S. (2013). HtrA2/Omi deficiency causes damage and mutation of mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1866-1875.
- Goo, H.G., Rhim, H., and Kang, S. (2014). HtrA2/Omi influences the stability of LON protease 1 and prohibitin, proteins involved in mitochondrial homeostasis. *Exp Cell Res* 328, 456-465.
- Gray, C.W., Ward, R.V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K.G., West, A., *et al.* (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* 267, 5699-5710.
- Gupta, S., Singh, R., Datta, P., Zhang, Z., Orr, C., Lu, Z., Dubois, G., Zervos, A.S., Meisler, M.H., Srinivasula, S.M., *et al.* (2004). The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity. *J Biol Chem* 279, 45844-45854.
- Hagar, J.A., Powell, D.A., Aachoui, Y., Ernst, R.K., and Miao, E.A. (2013). Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341, 1250-1253.
- Hall, K., Cruz, P., Tinoco, I., Jr., Jovin, T.M., and van de Sande, J.H. (1984). 'Z-RNA'--a left-handed RNA double helix. *Nature* 311, 584-586.
- Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S.G., O'Shea, A., Sharp, F.A., Lambe, E.M., Creagh, E.M., Golenbock, D.T., Tschopp, J., *et al.* (2011). Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem* 286, 9587-9597.
- He, W.T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z.H., Zhong, C.Q., and Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res* 25, 1285-1298.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., *et al.* (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., and Kolodner, R.D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29, 301-305.
- Hu, S.I., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D., and Crowl, R.M. (1998). Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 273, 34406-34412.
- Huang, L.S., Cobessi, D., Tung, E.Y., and Berry, E.A. (2005). Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol* 351, 573-597.
- Humphries, F., Bergin, R., Jackson, R., Delagic, N., Wang, B., Yang, S., Dubois, A.V., Ingram, R.J., and Moynagh, P.N. (2018). The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun* 9, 1560.
- Humphries, F., Shmuel-Galia, L., Ketelut-Carneiro, N., Li, S., Wang, B., Nemmara, V.V., Wilson, R., Jiang, Z., Khalighinejad, F., Muneeruddin, K., *et al.* (2020). Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science* 369, 1633-1637.
- Hur, W., Kang, B.Y., Kim, S.M., Lee, G.W., Kim, J.H., Nam, M.K., Rhim, H., and Yoon, S.K. (2019). Serine Protease HtrA2/Omi Deficiency Impairs Mitochondrial Homeostasis and Promotes Hepatic Fibrogenesis via Activation of Hepatic Stellate Cells. *Cells* 8.

- Huynen, M.A., Muhlmeister, M., Gotthardt, K., Guerrero-Castillo, S., and Brandt, U. (2016). Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochim Biophys Acta* 1863, 91-101.
- Ichimiya, T., Yamakawa, T., Hirano, T., Yokoyama, Y., Hayashi, Y., Hirayama, D., Wagatsuma, K., Itoi, T., and Nakase, H. (2020). Autophagy and Autophagy-Related Diseases: A Review. *Int J Mol Sci* 21.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., and Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 11, 404-410.
- Jin, S., Kalkum, M., Overholtzer, M., Stoffel, A., Chait, B.T., and Levine, A.J. (2003). CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Dev* 17, 359-367.
- Jones, J.M., Albin, R.L., Feldman, E.L., Simin, K., Schuster, T.G., Dunnick, W.A., Collins, J.T., Chrisp, C.E., Taylor, B.A., and Meisler, M.H. (1993). *mnd2*: a new mouse model of inherited motor neuron disease. *Genomics* 16, 669-677.
- Jones, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., Zhang, Z., Davies, E., Hajnoczky, G., Saunders, T.L., Van Keuren, M.L., *et al.* (2003). Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of *mnd2* mutant mice. *Nature* 425, 721-727.
- Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., and Alnemri, E.S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* 287, 36617-36622.
- Kaiser, W.J., Upton, J.W., Long, A.B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L.P., Hakem, R., Caspary, T., and Mocarski, E.S. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* 471, 368-372.
- Kang, S., Louboutin, J.P., Datta, P., Landel, C.P., Martinez, D., Zervos, A.S., Strayer, D.S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2013). Loss of HtrA2/Omi activity in non-neuronal tissues of adult mice causes premature aging. *Cell Death Differ* 20, 259-269.
- Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Whitfield, J., Franchi, L., Taraporewala, Z.F., Miller, D., Patton, J.T., Inohara, N., *et al.* (2006a). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 281, 36560-36568.
- Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., *et al.* (2006b). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440, 233-236.
- Karch, J., Kanisicak, O., Brody, M.J., Sargent, M.A., Michael, D.M., and Molkenin, J.D. (2015). Necroptosis Interfaces with MOMP and the MPTP in Mediating Cell Death. *PLoS One* 10, e0130520.
- Karki, R., Sharma, B.R., Tuladhar, S., Williams, E.P., Zalduondo, L., Samir, P., Zheng, M., Sundaram, B., Banoth, B., Malireddi, R.K.S., *et al.* (2021). Synergism of TNF-alpha and IFN-gamma Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell* 184, 149-168 e117.
- Karmakar, M., Minns, M., Greenberg, E.N., Diaz-Aponte, J., Pestonjamas, K., Johnson, J.L., Rathkey, J.K., Abbott, D.W., Wang, K., Shao, F., *et al.* (2020). N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1beta release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. *Nat Commun* 11, 2212.

- Kayagaki, N., Kornfeld, O.S., Lee, B.L., Stowe, I.B., O'Rourke, K., Li, Q., Sandoval, W., Yan, D., Kang, J., Xu, M., *et al.* (2021). NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature* 591, 131-136.
- Kayagaki, N., Stowe, I.B., Lee, B.L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q.T., *et al.* (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526, 666-671.
- Kieper, N., Holmstrom, K.M., Ciceri, D., Fiesel, F.C., Wolburg, H., Ziviani, E., Whitworth, A.J., Martins, L.M., Kahle, P.J., and Kruger, R. (2010). Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp Cell Res* 316, 1213-1224.
- Klupsch, K., and Downward, J. (2006). The protease inhibitor Ucf-101 induces cellular responses independently of its known target, HtrA2/Omi. *Cell Death Differ* 13, 2157-2159.
- Kofoed, E.M., and Vance, R.E. (2011). Innate immune recognition of bacterial ligands by NALPs determines inflammasome specificity. *Nature* 477, 592-595.
- Koodathingal, P., Jaffe, N.E., Kraut, D.A., Prakash, S., Fishbain, S., Herman, C., and Matouschek, A. (2009). ATP-dependent proteases differ substantially in their ability to unfold globular proteins. *J Biol Chem* 284, 18674-18684.
- Kovacs-Nagy, R., Morin, G., Nouri, M.A., Brandau, O., Saadi, N.W., Nouri, M.A., van den Broek, F., Prokisch, H., Mayr, J.A., and Wortmann, S.B. (2018). HTRA2 Defect: A Recognizable Inborn Error of Metabolism with 3-Methylglutaconic Aciduria as Discriminating Feature Characterized by Neonatal Movement Disorder and Epilepsy-Report of 11 Patients. *Neuropediatrics* 49, 373-378.
- Lachmann, A., Torre, D., Keenan, A.B., Jagodnik, K.M., Lee, H.J., Wang, L., Silverstein, M.C., and Ma'ayan, A. (2018). Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse. *Nat Commun* 9, 1366.
- Lampert, F., Stafa, D., Goga, A., Soste, M.V., Gilberto, S., Olieric, N., Picotti, P., Stoffel, M., and Peter, M. (2018). The multi-subunit GID/CTLH E3 ubiquitin ligase promotes cell proliferation and targets the transcription factor Hbp1 for degradation. *Elife* 7.
- Lee, A.C.Y., Zhang, A.J.X., Chu, H., Li, C., Zhu, H., Mak, W.W.N., Chen, Y., Kok, K.H., To, K.K.W., and Yuen, K.Y. (2019). H7N9 influenza A virus activation of necroptosis in human monocytes links innate and adaptive immune responses. *Cell Death Dis* 10, 442.
- Lee, B.L., Stowe, I.B., Gupta, A., Kornfeld, O.S., Roose-Girma, M., Anderson, K., Warming, S., Zhang, J., Lee, W.P., and Kayagaki, N. (2018). Caspase-11 auto-proteolysis is crucial for noncanonical inflammasome activation. *J Exp Med* 215, 2279-2288.
- Lee, G.S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., Germain, R.N., Kastner, D.L., and Chae, J.J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* 492, 123-127.
- Lee, J.S., Seo, T.W., Yi, J.H., Shin, K.S., and Yoo, S.J. (2013). CHIP has a protective role against oxidative stress-induced cell death through specific regulation of endonuclease G. *Cell Death Dis* 4, e666.
- Li, W., Srinivasula, S.M., Chai, J., Li, P., Wu, J.W., Zhang, Z., Alnemri, E.S., and Shi, Y. (2002). Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol* 9, 436-441.

- Linder, A., Bauernfried, S., Cheng, Y., Albanese, M., Jung, C., Keppler, O.T., and Hornung, V. (2020). CARD8 inflammasome activation triggers pyroptosis in human T cells. *EMBO J* 39, e105071.
- Lipinska, B., Fayet, O., Baird, L., and Georgopoulos, C. (1989). Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171, 1574-1584.
- Lipinska, B., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1990). The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J Bacteriol* 172, 1791-1797.
- Liu, D., Wu, L., Wu, Y., Wei, X., Wang, W., Zhang, S., Yi, M., Li, J., Liu, H., and Ma, X. (2019). Heat shock factor 1-mediated transcription activation of Omi/HtrA2 induces myocardial mitochondrial apoptosis in the aging heart. *Aging (Albany NY)* 11, 8982-8997.
- Liu, T., Tang, Q., Liu, K., Xie, W., Liu, X., Wang, H., Wang, R.F., and Cui, J. (2016a). TRIM11 Suppresses AIM2 Inflammasome by Degrading AIM2 via p62-Dependent Selective Autophagy. *Cell Rep* 16, 1988-2002.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V.G., Wu, H., and Lieberman, J. (2016b). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535, 153-158.
- Lu, A., Magupalli, V.G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M.K., Vos, M.R., Schroder, G.F., Fitzgerald, K.A., Wu, H., and Egelman, E.H. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 156, 1193-1206.
- Lupfer, C., Thomas, P.G., Anand, P.K., Vogel, P., Milasta, S., Martinez, J., Huang, G., Green, M., Kundu, M., Chi, H., *et al.* (2013). Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat Immunol* 14, 480-488.
- Malireddi, R.K.S., Gurung, P., Kesavardhana, S., Samir, P., Burton, A., Mummareddy, H., Vogel, P., Pelletier, S., Burgula, S., and Kanneganti, T.D. (2020). Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity-independent pyroptosis, apoptosis, necroptosis, and inflammatory disease. *J Exp Med* 217.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228-232.
- Martin-Sanchez, F., Diamond, C., Zeitler, M., Gomez, A.I., Baroja-Mazo, A., Bagnall, J., Spiller, D., White, M., Daniels, M.J., Mortellaro, A., *et al.* (2016). Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation. *Cell Death Differ* 23, 1219-1231.
- Martinez-Garcia, J.J., Martinez-Banaclocha, H., Angosto-Bazarra, D., de Torre-Minguela, C., Baroja-Mazo, A., Alarcon-Vila, C., Martinez-Alarcon, L., Amores-Iniesta, J., Martin-Sanchez, F., Ercole, G.A., *et al.* (2019). P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *Nat Commun* 10, 2711.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* 10, 417-426.
- Martins, L.M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G.P., *et al.* (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 24, 9848-9862.

- Maruzuru, Y., Ichinohe, T., Sato, R., Miyake, K., Okano, T., Suzuki, T., Koshiba, T., Koyanagi, N., Tsuda, S., Watanabe, M., *et al.* (2018). Herpes Simplex Virus 1 VP22 Inhibits AIM2-Dependent Inflammasome Activation to Enable Efficient Viral Replication. *Cell Host Microbe* 23, 254-265 e257.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T., and Sagara, J. (1999). ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 274, 33835-33838.
- McAuley, J.L., Tate, M.D., MacKenzie-Kludas, C.J., Pinar, A., Zeng, W., Stutz, A., Latz, E., Brown, L.E., and Mansell, A. (2013). Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. *PLoS Pathog* 9, e1003392.
- McCormick, A.L., Roback, L., and Mocarski, E.S. (2008). HtrA2/Omi terminates cytomegalovirus infection and is controlled by the viral mitochondrial inhibitor of apoptosis (vMIA). *PLoS Pathog* 4, e1000063.
- Merski, M., Moreira, C., Abreu, R.M., Ramos, M.J., Fernandes, P.A., Martins, L.M., Pereira, P.J.B., and Macedo-Ribeiro, S. (2017). Molecular motion regulates the activity of the Mitochondrial Serine Protease HtrA2. *Cell Death Dis* 8, e3119.
- Moisoi, N., Klupsch, K., Fedele, V., East, P., Sharma, S., Renton, A., Plun-Favreau, H., Edwards, R.E., Teismann, P., Esposti, M.D., *et al.* (2009). Mitochondrial dysfunction triggered by loss of HtrA2 results in the activation of a brain-specific transcriptional stress response. *Cell Death Differ* 16, 449-464.
- Moriyama, M., Chen, I.Y., Kawaguchi, A., Koshiba, T., Nagata, K., Takeyama, H., Hasegawa, H., and Ichinohe, T. (2016). The RNA- and TRIM25-Binding Domains of Influenza Virus NS1 Protein Are Essential for Suppression of NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1beta Secretion. *J Virol* 90, 4105-4114.
- Morrone, S.R., Matyszewski, M., Yu, X., Delannoy, M., Egelman, E.H., and Sohn, J. (2015). Assembly-driven activation of the AIM2 foreign-dsDNA sensor provides a polymerization template for downstream ASC. *Nat Commun* 6, 7827.
- Mortimer, L., Moreau, F., MacDonald, J.A., and Chadee, K. (2016). NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. *Nat Immunol* 17, 1176-1186.
- Munoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martinez-Colon, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Nunez, G. (2013). K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38, 1142-1153.
- Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., *et al.* (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12, 222-230.
- Nanduri, P., Hao, R., Fitzpatrick, T., and Yao, T.P. (2015). Chaperone-mediated 26S proteasome remodeling facilitates free K63 ubiquitin chain production and aggresome clearance. *J Biol Chem* 290, 9455-9464.
- Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G.S., and Green, D.R. (2011). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471, 363-367.
- Olahova, M., Thompson, K., Hardy, S.A., Barbosa, I.A., Besse, A., Anagnostou, M.E., White, K., Davey, T., Simpson, M.A., Champion, M., *et al.* (2017). Pathogenic variants in HTRA2 cause an

early-onset mitochondrial syndrome associated with 3-methylglutaconic aciduria. *J Inherit Metab Dis* 40, 121-130.

Orning, P., Weng, D., Starheim, K., Ratner, D., Best, Z., Lee, B., Brooks, A., Xia, S., Wu, H., Kelliher, M.A., *et al.* (2018). Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science* 362, 1064-1069.

Palazon-Riquelme, P., Worboys, J.D., Green, J., Valera, A., Martin-Sanchez, F., Pellegrini, C., Brough, D., and Lopez-Castejon, G. (2018). USP7 and USP47 deubiquitinases regulate NLRP3 inflammasome activation. *EMBO Rep* 19.

Palmer, G., Horgan, D.J., Tisdale, H., Singer, T.P., and Beinert, H. (1968). Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 243, 844-847.

Park, H.J., Seong, Y.M., Choi, J.Y., Kang, S., and Rhim, H. (2004). Alzheimer's disease-associated amyloid beta interacts with the human serine protease Htra2/Omi. *Neurosci Lett* 357, 63-67.

Park, H.S., Liu, G., Thulasi Raman, S.N., Landreth, S.L., Liu, Q., and Zhou, Y. (2018). NS1 Protein of 2009 Pandemic Influenza A Virus Inhibits Porcine NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 Beta Production by Suppressing ASC Ubiquitination. *J Virol* 92.

Park, K.S., Jo, I., Pak, K., Bae, S.W., Rhim, H., Suh, S.H., Park, J., Zhu, H., So, I., and Kim, K.W. (2002). FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na⁺ currents in bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch* 443, 344-352.

Patterson, V.L., Zullo, A.J., Koenig, C., Stoessel, S., Jo, H., Liu, X., Han, J., Choi, M., DeWan, A.T., Thomas, J.L., *et al.* (2014). Neural-specific deletion of Htra2 causes cerebellar neurodegeneration and defective processing of mitochondrial OPA1. *PLoS One* 9, e115789.

Pelegri, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008). P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* 180, 7147-7157.

Pelegri, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25, 5071-5082.

Penefsky, H.S. (1985). Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1589-1593.

Perregaux, D., and Gabel, C.A. (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269, 15195-15203.

Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14, 1583-1589.

Pfleger, J., He, M., and Abdellatif, M. (2015). Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis* 6, e1835.

Pinar, A., Dowling, J.K., Bitto, N.J., Robertson, A.A., Latz, E., Stewart, C.R., Drummond, G.R., Cooper, M.A., McAuley, J.L., Tate, M.D., *et al.* (2017). PB1-F2 Peptide Derived from Avian

Influenza A Virus H7N9 Induces Inflammation via Activation of the NLRP3 Inflammasome. *J Biol Chem* 292, 826-836.

Pizzuto, M., and Pelegrin, P. (2020). Cardiolipin in Immune Signaling and Cell Death. *Trends Cell Biol* 30, 892-903.

Plun-Favreau, H., Burchell, V.S., Holmstrom, K.M., Yao, Z., Deas, E., Cain, K., Fedele, V., Moiso, N., Campanella, M., Miguel Martins, L., *et al.* (2012). HtrA2 deficiency causes mitochondrial uncoupling through the F(1)F(0)-ATP synthase and consequent ATP depletion. *Cell Death Dis* 3, e335.

Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., *et al.* (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 9, 1243-1252.

Pohl, C., and Dikic, I. (2019). Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science* 366, 818-822.

Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2001). Identification of Ipafl, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 276, 28309-28313.

Py, B.F., Kim, M.S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell* 49, 331-338.

Radke, S., Chander, H., Schafer, P., Meiss, G., Kruger, R., Schulz, J.B., and Germain, D. (2008). Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi. *J Biol Chem* 283, 12681-12685.

Rathke-Hartlieb, S., Schlomann, U., Heimann, P., Meisler, M.H., Jockusch, H., and Bartsch, J.W. (2002). Progressive loss of striatal neurons causes motor dysfunction in MND2 mutant mice and is not prevented by Bcl-2. *Exp Neurol* 175, 87-97.

Rathkey, J.K., Benson, B.L., Chirieleison, S.M., Yang, J., Xiao, T.S., Dubyak, G.R., Huang, A.Y., and Abbott, D.W. (2017). Live-cell visualization of gasdermin D-driven pyroptotic cell death. *J Biol Chem* 292, 14649-14658.

Ren, G., Zhang, X., Xiao, Y., Zhang, W., Wang, Y., Ma, W., Wang, X., Song, P., Lai, L., Chen, H., *et al.* (2019). ABRO1 promotes NLRP3 inflammasome activation through regulation of NLRP3 deubiquitination. *EMBO J* 38.

Ren, G.M., Li, J., Zhang, X.C., Wang, Y., Xiao, Y., Zhang, X.Y., Liu, X., Zhang, W., Ma, W.B., Zhang, J., *et al.* (2021). Pharmacological targeting of NLRP3 deubiquitination for treatment of NLRP3-associated inflammatory diseases. *Sci Immunol* 6.

Ren, T., Zamboni, D.S., Roy, C.R., Dietrich, W.F., and Vance, R.E. (2006). Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* 2, e18.

Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M.R., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2011). IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol* 187, 4835-4843.

Robinson, K.S., Teo, D.E.T., Tan, K.S., Toh, G.A., Ong, H.H., Lim, C.K., Lay, K., Au, B.V., Lew, T.S., Chu, J.J.H., *et al.* (2020). Enteroviral 3C protease activates the human NLRP1 inflammasome in airway epithelia. *Science* 370.

Rodrigue-Gervais, I.G., Doiron, K., Champagne, C., Mayes, L., Leiva-Torres, G.A., Vanie, P., Jr., Douglas, T., Vidal, S.M., Alnemri, E.S., and Saleh, M. (2018). The mitochondrial protease HtrA2 restricts the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *Sci Rep* 8, 8446.

Rodrigue-Gervais, I.G., Labbe, K., Dagenais, M., Dupaul-Chicoine, J., Champagne, C., Morizot, A., Skeldon, A., Brincks, E.L., Vidal, S.M., Griffith, T.S., *et al.* (2014). Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival. *Cell Host Microbe* 15, 23-35.

Rogers, C., Erkes, D.A., Nardone, A., Aplin, A.E., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2019). Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nat Commun* 10, 1689.

Ross, C., Chan, A.H., Von Pein, J., Boucher, D., and Schroder, K. (2018). Dimerization and auto-processing induce caspase-11 protease activation within the non-canonical inflammasome. *Life Sci Alliance* 1, e201800237.

Ruan, J., Xia, S., Liu, X., Lieberman, J., and Wu, H. (2018). Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. *Nature* 557, 62-67.

Ruhl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J.C., and Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* 362, 956-960.

Russo, H.M., Rathkey, J., Boyd-Tressler, A., Katsnelson, M.A., Abbott, D.W., and Dubyak, G.R. (2016). Active Caspase-1 Induces Plasma Membrane Pores That Precede Pyroptotic Lysis and Are Blocked by Lanthanides. *J Immunol* 197, 1353-1367.

Saeki, N., Kuwahara, Y., Sasaki, H., Satoh, H., and Shiroishi, T. (2000). Gasdermin (Gsdm) localizing to mouse Chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mamm Genome* 11, 718-724.

Sagulenko, V., Vitak, N., Vajjhala, P.R., Vince, J.E., and Stacey, K.J. (2018). Caspase-1 Is an Apical Caspase Leading to Caspase-3 Cleavage in the AIM2 Inflammasome Response, Independent of Caspase-8. *J Mol Biol* 430, 238-247.

Sahillioglu, A.C., Sumbul, F., Ozoren, N., and Haliloglu, T. (2014). Structural and dynamics aspects of ASC speck assembly. *Structure* 22, 1722-1734.

Saita, S., Nolte, H., Fiedler, K.U., Kashkar, H., Venne, A.S., Zahedi, R.P., Kruger, M., and Langer, T. (2017). PARL mediates Smac proteolytic maturation in mitochondria to promote apoptosis. *Nat Cell Biol* 19, 318-328.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., *et al.* (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456, 264-268.

Sandstrom, A., Mitchell, P.S., Goers, L., Mu, E.W., Lesser, C.F., and Vance, R.E. (2019). Functional degradation: A mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes. *Science* 364.

Sarhan, J., Liu, B.C., Muendlein, H.I., Li, P., Nilson, R., Tang, A.Y., Rongvaux, A., Bunnell, S.C., Shao, F., Green, D.R., *et al.* (2018). Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E10888-E10897.

Savopoulos, J.W., Carter, P.S., Turconi, S., Pettman, G.R., Karran, E.H., Gray, C.W., Ward, R.V., Jenkins, O., and Creasy, C.L. (2000). Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2. *Protein Expr Purif* 19, 227-234.

- Sborgi, L., Ruhl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C.J., Muller, D.J., Broz, P., and Hiller, S. (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J* 35, 1766-1778.
- Sekine, K., Hao, Y., Suzuki, Y., Takahashi, R., Tsuruo, T., and Naito, M. (2005). HtrA2 cleaves Apollon and induces cell death by IAP-binding motif in Apollon-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 279-285.
- Semino, C., Carta, S., Gattorno, M., Sitia, R., and Rubartelli, A. (2018). Progressive waves of IL-1 β release by primary human monocytes via sequential activation of vesicular and gasdermin D-mediated secretory pathways. *Cell Death Dis* 9, 1088.
- Seong, Y.M., Choi, J.Y., Park, H.J., Kim, K.J., Ahn, S.G., Seong, G.H., Kim, I.K., Kang, S., and Rhim, H. (2004). Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *J Biol Chem* 279, 37588-37596.
- Shi, C.S., Shenderov, K., Huang, N.N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* 13, 255-263.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., and Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660-665.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., and Shao, F. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514, 187-192.
- Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A.J., Vergnes, L., Ojcius, D.M., *et al.* (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36, 401-414.
- Shin, H.-A., Kim, G.-Y., Nam, M.-K., Goo, H.-G., and Rhim, H. (2012). A Simple and Accurate Genotype Analysis of the motor neuron degeneration 2 (mnd2) Mice: an Easy-to-Follow Guideline and Standard Protocol Applicable to Mutant Mouse Models. *Interdisciplinary Bio Central Korean Society for Bioinformatics and Systems Biology* 4, 8.1-8.7.
- Shubina, M., Tummers, B., Boyd, D.F., Zhang, T., Yin, C., Gautam, A., Guo, X.J., Rodriguez, D.A., Kaiser, W.J., Vogel, P., *et al.* (2020). Necroptosis restricts influenza A virus as a stand-alone cell death mechanism. *J Exp Med* 217.
- Song, H., Zhao, C., Yu, Z., Li, Q., Yan, R., Qin, Y., Jia, M., and Zhao, W. (2020). UAF1 deubiquitinase complexes facilitate NLRP3 inflammasome activation by promoting NLRP3 expression. *Nat Commun* 11, 6042.
- Song, N., Liu, Z.S., Xue, W., Bai, Z.F., Wang, Q.Y., Dai, J., Liu, X., Huang, Y.J., Cai, H., Zhan, X.Y., *et al.* (2017). NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol Cell* 68, 185-197 e186.
- Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Kabelitz, D., Trad, A., Janssen, O., Meyer-Schwesinger, C., Schutze, S., and Adam, D. (2013). The proteases HtrA2/Omi and UCH-L1 regulate TNF-induced necroptosis. *Cell Commun Signal* 11, 76.
- Spieß, C., Beil, A., and Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-347.
- Srinivasula, S.M., Poyet, J.L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z., and Alnemri, E.S. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 277, 21119-21122.

Sriskanthadevan, S., Jeyaraju, D.V., Chung, T.E., Prabha, S., Xu, W., Skrtic, M., Jhas, B., Hurren, R., Gronda, M., Wang, X., *et al.* (2015). AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* 125, 2120-2130.

Stevens, D.A., Lee, Y., Kang, H.C., Lee, B.D., Lee, Y.I., Bower, A., Jiang, H., Kang, S.U., Andrabi, S.A., Dawson, V.L., *et al.* (2015). Parkin loss leads to PARIS-dependent declines in mitochondrial mass and respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11696-11701.

Stiburek, L., Cesnekova, J., Kostkova, O., Fornuskova, D., Vinsova, K., Wenchich, L., Houstek, J., and Zeman, J. (2012). YME1L controls the accumulation of respiratory chain subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. *Mol Biol Cell* 23, 1010-1023.

Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., *et al.* (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14, 2099-2111.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.

Swanson, K.V., Deng, M., and Ting, J.P. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19, 477-489.

Taabazuing, C.Y., Okondo, M.C., and Bachovchin, D.A. (2017). Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chem Biol* 24, 507-514 e504.

Tan, J.M., Wong, E.S., Kirkpatrick, D.S., Pletnikova, O., Ko, H.S., Tay, S.P., Ho, M.W., Troncoso, J., Gygi, S.P., Lee, M.K., *et al.* (2008). Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 17, 431-439.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., *et al.* (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* 496, 238-242.

To, M.S., Aromataris, E.C., Castro, J., Roberts, M.L., Barritt, G.J., and Rychkov, G.Y. (2010). Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca(2+) current in liver cells. *Arch Biochem Biophys* 495, 152-158.

Torii, Y., Kawada, J.I., Murata, T., Yoshiyama, H., Kimura, H., and Ito, Y. (2017). Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PLoS One* 12, e0175053.

Trencia, A., Fiory, F., Maitan, M.A., Vito, P., Barbagallo, A.P., Perfetti, A., Miele, C., Ungaro, P., Oriente, F., Cilenti, L., *et al.* (2004). Omi/HtrA2 promotes cell death by binding and degrading the anti-apoptotic protein ped/pea-15. *J Biol Chem* 279, 46566-46572.

Tsai, P.I., Lin, C.H., Hsieh, C.H., Papakyrikos, A.M., Kim, M.J., Napolioni, V., Schoor, C., Couthouis, J., Wu, R.M., Wszolek, Z.K., *et al.* (2018). PINK1 Phosphorylates MIC60/Mitofilin to Control Structural Plasticity of Mitochondrial Crista Junctions. *Mol Cell* 69, 744-756 e746.

Tsu, B.V., Beierschmitt, C., Ryan, A.P., Agarwal, R., Mitchell, P.S., and Daugherty, M.D. (2021). Diverse viral proteases activate the NLRP1 inflammasome. *Elife* 10.

- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., *et al.* (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* *347*, 1260419.
- Van Laar, V.S., Berman, S.B., and Hastings, T.G. (2016). Mic60/mitofilin overexpression alters mitochondrial dynamics and attenuates vulnerability of dopaminergic cells to dopamine and rotenone. *Neurobiol Dis* *91*, 247-261.
- Van Opdenbosch, N., and Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity* *50*, 1352-1364.
- Vande Walle, L., Van Damme, P., Lamkanfi, M., Saelens, X., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., and Vandenabeele, P. (2007). Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates. *J Proteome Res* *6*, 1006-1015.
- Vande Walle, L., Wirawan, E., Lamkanfi, M., Festjens, N., Verspurten, J., Saelens, X., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2010). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi cleaves RIP1 during apoptosis of Ba/F3 cells induced by growth factor withdrawal. *Cell Res* *20*, 421-433.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., *et al.* (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* *277*, 445-454.
- Wai, T., Garcia-Prieto, J., Baker, M.J., Merkwirth, C., Benit, P., Rustin, P., Ruperez, F.J., Barbas, C., Ibanez, B., and Langer, T. (2015). Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science* *350*, aad0116.
- Wang, L.J., Huang, H.Y., Huang, M.P., Liou, W., Chang, Y.T., Wu, C.C., Ojcius, D.M., and Chang, Y.S. (2014a). The microtubule-associated protein EB1 links AIM2 inflammasomes with autophagy-dependent secretion. *J Biol Chem* *289*, 29322-29333.
- Wang, Q., Gao, H., Clark, K.M., Mugisha, C.S., Davis, K., Tang, J.P., Harlan, G.H., DeSelm, C.J., Presti, R.M., Kutluay, S.B., *et al.* (2021). CARD8 is an inflammasome sensor for HIV-1 protease activity. *Science* *371*.
- Wang, X., Tan, J., Zoueva, O., Zhao, J., Ye, Z., and Hewlett, I. (2014b). Novel pandemic influenza A (H1N1) virus infection modulates apoptotic pathways that impact its replication in A549 cells. *Microbes Infect* *16*, 178-186.
- Ward, N.E., and O'Brian, C.A. (1992). Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates. *Mol Pharmacol* *41*, 387-392.
- Weber, J.S., Jang, W., Simin, K., Lu, W., Yu, J., and Meisler, M.H. (1998). High-resolution genetic, physical, and transcript map of the mnd2 region of mouse chromosome 6. *Genomics* *54*, 107-115.
- Wong, Y.C., Ysselstein, D., and Krainc, D. (2018). Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature* *554*, 382-386.
- Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., Planz, O., and Ludwig, S. (2004). NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem* *279*, 30931-30937.

- Wust, R.C., Helmes, M., and Stienen, G.J. (2015). Rapid changes in NADH and flavin autofluorescence in rat cardiac trabeculae reveal large mitochondrial complex II reserve capacity. *J Physiol* 593, 1829-1840.
- Xia, S., Zhang, Z., Magupalli, V.G., Pablo, J.L., Dong, Y., Vora, S.M., Wang, L., Fu, T.M., Jacobson, M.P., Greka, A., *et al.* (2021). Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1. *Nature*.
- Xue, Y., Enosi Tuipulotu, D., Tan, W.H., Kay, C., and Man, S.M. (2019). Emerging Activators and Regulators of Inflammasomes and Pyroptosis. *Trends Immunol* 40, 1035-1052.
- Yabal, M., Muller, N., Adler, H., Knies, N., Gross, C.J., Damgaard, R.B., Kanegane, H., Ringelhan, M., Kaufmann, T., Heikenwalder, M., *et al.* (2014). XIAP restricts TNF- and RIP3-dependent cell death and inflammasome activation. *Cell Rep* 7, 1796-1808.
- Yamamoto, H., Morino, K., Mengistu, L., Ishibashi, T., Kiriya, K., Ikami, T., and Maegawa, H. (2016). Amla Enhances Mitochondrial Spare Respiratory Capacity by Increasing Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Systems in a Murine Skeletal Muscle Cell Line. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 1735841.
- Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., Ding, C., Tian, Z., and Zhou, R. (2015). Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 160, 62-73.
- Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., and Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487-1496.
- Yang, R.F., Zhao, G.W., Liang, S.T., Zhang, Y., Sun, L.H., Chen, H.Z., and Liu, D.P. (2012). Mitofilin regulates cytochrome c release during apoptosis by controlling mitochondrial cristae remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 428, 93-98.
- Yoshioka, H., Katsu, M., Sakata, H., Okami, N., Wakai, T., Kinouchi, H., and Chan, P.H. (2013). The role of PARL and HtrA2 in striatal neuronal injury after transient global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1658-1665.
- Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., and Koshiba, T. (2014). Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun* 5, 4713.
- You, H., Jin, Y., Kang, J., Mao, Y., Su, J., Sun, L., Wang, L., and Meng, H. (2020). Mitochondrial serine protease Omi/HtrA2 accentuates brain ischemia/reperfusion injury in rats and oxidative stress injury in vitro by modulating mitochondrial stress proteins CHOP and ClpP and physically interacting with mitochondrial fusion protein OPA1. *Bioengineered* 11, 1058-1070.
- Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., and Palese, P. (2005). Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 1, e4.
- Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Broggi, A., Ruan, J., Shi, J., Donado, C.A., Shao, F., Wu, H., Springstead, J.R., *et al.* (2016). An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science* 352, 1232-1236.
- Zhang, C., He, A., Liu, S., He, Q., Luo, Y., He, Z., Chen, Y., Tao, A., and Yan, J. (2019). Inhibition of HtrA2 alleviated dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis by preventing necroptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Death Dis* 10, 344.
- Zhang, M., Kenny, S.J., Ge, L., Xu, K., and Schekman, R. (2015). Translocation of interleukin-1beta into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *Elife* 4.

- Zhang, T., Yin, C., Boyd, D.F., Quarato, G., Ingram, J.P., Shubina, M., Ragan, K.B., Ishizuka, T., Crawford, J.C., Tummers, B., *et al.* (2020). Influenza Virus Z-RNAs Induce ZBP1-Mediated Necroptosis. *Cell* 180, 1115-1129 e1113.
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., and Shao, F. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477, 596-600.
- Zheng, M., and Kanneganti, T.D. (2020). The regulation of the ZBP1-NLRP3 inflammasome and its implications in pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis). *Immunol Rev* 297, 26-38.
- Zheng, M., Karki, R., Vogel, P., and Kanneganti, T.D. (2020). Caspase-6 Is a Key Regulator of Innate Immunity, Inflammasome Activation, and Host Defense. *Cell* 181, 674-687 e613.
- Zhong, Z., Liang, S., Sanchez-Lopez, E., He, F., Shalapour, S., Lin, X.J., Wong, J., Ding, S., Seki, E., Schnabl, B., *et al.* (2018). New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 560, 198-203.
- Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalapour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S.R., *et al.* (2016). NF-kappaB Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* 164, 896-910.
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11, 136-140.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221-225.
- Zumbrunn, J., and Trueb, B. (1996). Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett* 398, 187-192.

ANNEXE I

Le lien pour l'article se trouve ci-dessous :

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29855523/>