

INRS- Armand-Frappier Santé Biotechnologie

## **Modulation de la nécrose régulée des macrophages par le sulfure d'hydrogène mitochondrial**

Par  
Gilbert Claudia

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

Maritza Jaramillo  
INRS- Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Examineur externe

Fabien Touzot  
Département de pédiatrie  
Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

Directeur de recherche

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

## REMERCIEMENTS

---

Il m'a été possible de réaliser ce mémoire grâce au soutien de nombreuses personnes tout au long de ma maîtrise. J'aimerais remercier particulièrement :

Ian-Gaël Rodrigue-Gervais, mon directeur de recherche, pour sa confiance en moi durant mon stage de recherche et tout au long de ma maîtrise ainsi que son aide et ses précieux conseils.

Claudia Champagne, l'agente de recherche de notre laboratoire, pour ses conseils et son aide sur de nombreux aspects expérimentaux.

Tous les étudiant.e.s et stagiaires du laboratoire lors de mon parcours, pour leur aide, de près ou de loin, ayant pu contribuer à mon projet.

Je tiens à remercier l'Institut national de la recherche scientifique pour m'avoir octroyé une bourse lors de mon stage de premier cycle ainsi que pour ma première année de maîtrise.

Je remercie les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour m'avoir offert une bourse de deuxième cycle pour la dernière année de ma maîtrise.

Je veux également remercier les professeurs Maritza Jamarillo et Fabien Touzot pour leur évaluation de mon mémoire.

Finalement, merci beaucoup à toute ma famille et amis pour leur support et encouragements durant mes années d'études.



## RÉSUMÉ

---

Les cellules peuvent initier leur propre mort par nécrose afin d'éliminer les infections virales. La pyroptose est un tel mode de mort, régulée par la formation de l'inflammasome, menant à l'activation de la caspase-1 et à la formation de pores nécrotiques. Mal régulée, la pyroptose peut entraîner des séquelles pathologiques. Ainsi, par des approches de génomique fonctionnelle à haut débit et d'analyse RNAseq, nous avons découvert que l'assemblage de l'inflammasome après une infection virale est régi par plusieurs protéines mitochondriales, dont la sulfurtransférase MPST, qui génère du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) mitochondrial. L'inhibition de son activité catalytique entraîne une augmentation de la pyroptose suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Nous avons également étudié les effets d'un donneur de H<sub>2</sub>S ciblé à la mitochondrie (appelé AP39) sur la fonction de l'inflammasome dans les macrophages. AP39 exerce des effets inhibiteurs dose-dépendants sur l'activité des inflammasomes ASC-dépendants, une viabilité cellulaire accrue, une activité catalytique réduite de la caspase-1 ainsi qu'une diminution du clivage de la protéine gasdermine D. Sur la base de ces résultats, la protéine MPST, via sa production d'H<sub>2</sub>S mitochondrial, est proposé comme un régulateur négatif de la pyroptose médiée par les inflammasomes ASC-dépendants.

Mots-clés : Macrophages ; inflammasome ; pyroptose ; caspase-1 ; gasdermine D ; MPST ; sulfure d'hydrogène ; mitochondrie



## ABSTRACT

---

Cells can initiate their death through necrosis to eliminate viral infections. Pyroptosis is one such mode of death, regulated by the formation of the inflammasome, leading to the activation of caspase-1 and the formation of necrotic pores. Poorly regulated, pyroptosis can lead to pathological sequelae. Thus, through high throughput functional genomics and RNAseq analysis approaches, we have discovered that inflammasome assembly after viral infection is governed by several mitochondrial proteins, including the sulfurtransferase MSPT, which generates mitochondrial hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). Inhibition of its catalytic activity results in increased pyroptosis following activation of the NLRP3 inflammasome. We also investigated the effects of a mitochondrial-targeted H<sub>2</sub>S donor (called AP39) on inflammasome function in macrophages. AP39 exerts dose-dependant inhibitory effects on ASC-dependent inflammasomes activity, increased cell viability, reduced caspase-1 catalytic activity as well as decreased cleavage of gasdermin D protein. Based on these results, the MPST protein, via its mitochondrial H<sub>2</sub>S production, is proposed as a negative regulator of pyroptosis mediated by ASC-dependent inflammasomes.

Keywords : Macrophages; inflammasome; pyroptosis; caspase-1; gasdermin D; MPST; hydrogen sulfur; mitochondria



# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1    REPOSE IMMUNITAIRE INNÉE LORS D'INFECTION VIRALE RESPIRATOIRE.....	1
1.2    INFLAMMASOME : CANONIQUE VERSUS NON-CANONIQUE.....	5
1.2.1 <i>Les senseurs de l'inflammasome</i> .....	6
1.3    PYROPTOSE : MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE NECROTIQUE .....	13
1.4    IMPORTANCE DE LA RÉGULATION DE LA PYROPTOSE : TROP C'EST COMME PAS ASSEZ .....	16
1.5    MITOCHONDRIE ET SON CONTRÔLE SUR LA PYROPTOSE.....	20
1.6    SULFURE D'HYDROGÈNE : PLUS QU'UN GAZ NAUSEABOND.....	23
1.7    HYPOTHÈSE DE RECHERCHE .....	28
<b>2 MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>29</b>
2.1    CULTURE CELLULAIRE ET DIFFÉRENCIATION .....	29
2.2    siRNA ET LENTIVIRUS.....	29
2.3    ACTIVATION DES INFLAMMASOMES .....	30
2.4    MICROSCOPIE ÉPIFLUORESCENCE .....	31
2.5    INHIBITEUR DE LA PROTÉINE MPST ET DONNEURS DE SULFURE D'HYDROGÈNE.....	31
2.6    ACTIVITÉ CATALYTIQUE DE LA CASPASE-1 .....	32
2.7    WESTERN BLOT .....	32
2.8    ANALYSES.....	33
<b>3 RESULTATS</b> .....	<b>35</b>
3.1    IDENTIFICATION DE LA PROTÉINE MPST COMME RÉGULATEUR POTENTIEL DE L'INFLAMMASOME.....	35
3.2    ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3.....	37
3.3    EFFET DE LA PROTÉINE MPST SUR L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3.....	37
3.4    EFFETS DE DONNEURS DE SULFURE D'HYDROGÈNE SUR L'INFLAMMASOME NLRP3 .....	38
3.4.1 <i>Donneur générique lent d'H<sub>2</sub>S : GYY4137</i> .....	39
3.4.2 <i>Donneur lent ciblé à la mitochondrie : AP39</i> .....	40
3.5    SPÉCIFICITÉ DU RÔLE DU SULFURE D'HYDROGÈNE DANS LA VOIE DE LA PYROPTOSE .....	41
3.5.1 <i>Modulation de l'inflammasome CARD8 par le sulfure d'hydrogène mitochondrial</i> .....	41
3.5.2 <i>Modulation de l'inflammasome AIM2 par le sulfure d'hydrogène mitochondrial</i> .....	42



3.5.3	<i>Rôle du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur l'oligomérisation d'ASC</i> .....	43
3.6	MECANISME D'ACTION DU SULFURE D'HYDROGENE MITOCHONDRIAL SUR LES VOIES PRO-INFLAMMATOIRES.....	45
3.6.1	<i>Effet du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur la caspase-1</i> .....	45
3.6.2	<i>Effet du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur la protéine gasdermine D</i> .....	47
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>49</b>
4.1	ROLE DE LA PROTEINE MPST SUR L'INFLAMMASOME.....	49
4.2	IMPACT DE LA LOCALISATION DU SULFURE D'HYDROGENE.....	50
4.3	H <sub>2</sub> S MITOCHONDRIAL ET LES INFLAMMASOME ASC-DEPENDANTS.....	51
4.4	H <sub>2</sub> S MITOCHONDRIAL, CASPASE-1 ET GASDERMINE D .....	53
<b>5</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>59</b>

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1.2	ACTIVATION ET FORMATION DE L'INFLAMMASOME CANONIQUE .....	6
FIGURE 1.2.1	STRUCTURE DE SENSEURS POUVANT FORMER L'INFLAMMASOME ET LEUR LIAISON AVEC LA PROTEINE ADAPTATRICE ASC .....	7
FIGURE 1.3	VOIE CANONIQUE ET NON CANONIQUE DE LA PYROPTOSE .....	14
FIGURE 1.6	VOIE DE LA SYNTHÈSE DU SULFURE D'HYDROGÈNE.....	25
FIGURE 3.1	IDENTIFICATION DE LA PROTEINE MPST COMME MODULATEUR DE LA PYROPTOSE.....	36
FIGURE 3.3	EFFET DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA PROTEINE MPST.....	38
FIGURE 3.4.1	MODULATION DES PORES PYROPTOTIQUES NLRP3-DEPENDANTS VIA LE DONNEUR D'H <sub>2</sub> S GYY4137 .....	39
FIGURE 3.4.2	MODULATION DES PORES PYROPTOTIQUES NLRP3-DEPENDANTS VIA LE DONNEUR D'H <sub>2</sub> S MITOCHONDRIAL AP39 .....	40
FIGURE 3.5.1	INDUCTION DE PORES PYROPTOTIQUES PAR L'INFLAMMASOME CARD8 .....	41
FIGURE 3.5.2	INDUCTION DE PORES PYROPTOTIQUES PAR L'INFLAMMASOME AIM2.....	42
FIGURE 3.5.3	OLIGOMERISATION D'ASC APRES ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3.....	44
FIGURE 3.6.1.1	ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA CASPASE-1 DANS LE LYSAT CELLULAIRE SUITE A L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 .....	46
FIGURE 3.6.1.2	ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA CASPASE-1 DANS LE SURNAGEANT SUITE A L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 .....	47
FIGURE 3.6.2	CLIVAGE DE LA PROTEINE GASDERMINE D LORS DE L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3.....	48
FIGURE 5	MODULATION DE LA PYROPTOSE PAR LE SULFURE D'HYDROGÈNE MITOCHONDRIAL.....	57



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

AEC: *alveolar epithelial cell*

ALR: *absent in melanoma 2-like receptor*

AM: macrophage alvéolaire

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

ARE: *antioxidant response element*

ASC: apoptosis-associated speck-like protein

BAK: *BCL2 antagonist/killer 1*

BAX: *Bcl-2-associated X*

Ca<sup>2+</sup>: calcium

CARD: *caspase activation and recruitment domain*

CAT: cystéine aminotransférase

CBS: cystathionine  $\beta$ -synthase

cGas-STING: *cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes*

CLR: *C-type lectin receptor*

CMH-II: complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CO: monoxyde de carbone

COP: *CARD-only protein*

CoQ: *oxidized coenzyme Q*

CSE: cystathionine  $\gamma$ -lyase

DAMP: *damage associated molecular patterns*

DC: cellule dendritique

DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*

ESCRT: *endosomal sorting complex required for transport*

FBS: fetal bovine serum

G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*

GOT: *glutamic-oxaloacetic transaminase*

GSDMD: gasdermine D

GSH: glutathione

H<sub>2</sub>S: sulfure d'hydrogène

HBSS: *Hanks' balanced salt solution*

HLA-DR: *human leukocyte antigen*

HTRA2: *high temperature requirement protein A2*

IAV: *influenza A virus*

IFN: interféron

IKK: *IκB kinase*

IL: interleukine

IM: macrophage interstitiel

IRF: *interferon regulatory factor*

ISG: *interferon-stimulated gene*

JAK: *Janus kinase*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

K<sup>+</sup>: potassium

KSHV: *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*

L-Glu : L-glutamine

LPS: lipopolysaccharide

LRR: *leucine rich-repeat*

MAM: *mitochondria-associated membrane*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MAV: *mitochondrial anti-viral signaling protein*

MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*

MDA-5: *melanoma differentiation-associated protein 5*

MLKL: *mixed lineage kinase domain-like protein*

MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilization*

MPST: 3-mercaptopyruvate sulfurotransférase

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

mtROS: ROS mitochondrial

NAD<sup>+</sup>: *nicotinamide adenine dinucleotide*

NAIP: *neuronal apoptosis inhibitory protein*

NaPyr: sodium pyruvate

NEAA: *nonessential amino acids*

NEK7: *NIMA-related kinase 7*

NF-κB: *nuclear factor-kappa B*

NLR: *nod-like receptor*

NO: oxide nitrique

Nrf2: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

PAMP: *pathogen associated molecular patterns*

Pen/strep: penicillin/streptomycin

PI: propidium iodide

PINK1: PTEN-induced putative kinase 1

PMA: phorbol 12-myristate-13-acetate

POP: *PYD-only protein*

PRR: *pattern recognition receptor*

PYD: pyrine

RE: réticulum endoplasmique

RET: *reverse electrons transport*

RIG-I: *retinoic acid-inducible gene I*

RIPK: *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase*

RLR: RIG-like receptor

RMPI: *Roswell Park memorial institute*

ROS: reactive oxygen species

RPS3: *ribosomal protein S3*

RSV: *respiratory syncytial virus*

RVs: rhinovirus

SA-AKI: *sepsis-associated acute kidney injury*

siRNA: *small interfering RNA*

SOCS: *suppressor of cytokine signaling*

SQR: sulfide quinone oxydoréductase

STAT1: *signal transducer and activator of transcription 1*

SYK: *spleen tyrosine kinase*

TGF- $\beta$ : *transforming growth factor beta*

TLR: *toll-like receptor*

TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*

ULK1: *Unc-51 like autophagy activating kinase*

VDAC: *voltage-dependent anion channel*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

XO: oxydase xanthine

# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 Réponse immunitaire innée lors d'infection virale respiratoire

Les infections respiratoires sont au cœur des préoccupations de la santé de la population mondiale. Celles-ci représentent la 4<sup>e</sup> cause de mort au niveau mondiale et sont la maladie transmissible la plus mortelle (WHO, 2021). Ces infections peuvent être causées par des bactéries et des virus. Les virus sont les principaux agents infectieux des voies respiratoires supérieures, alors que les bactéries et les virus causent l'infection des voies inférieures (Jain *et al.*, 2001). En outre, les rhinovirus humains (RVs), les coronavirus, les parainfluenza et les adénovirus sont ceux causant la majeure partie des infections chez l'humain (Boncristiani *et al.*, 2009).

Une infection des voies respiratoires par ces virus peut mener à de faibles symptômes, comme une toux, le nez qui coule et de la fièvre. Toutefois, certains virus, par exemple le virus Influenza, ont la capacité de causer des dommages respiratoires plus graves nécessitant une hospitalisation et peuvent même mener à la mort, même chez des individus en santé (Peteranderl *et al.*, 2016). Nous pouvons observer ce phénomène avec la récente pandémie causée par le coronavirus SARS-CoV-2. Ceci met donc en évidence l'importance de l'immunité face aux virus ciblant les voies respiratoires. Notre système immunitaire innée, spécifiquement au niveau pulmonaire, nous permet de se protéger contre ces diverses infections en agissant comme une barrière dynamique. En effet, les poumons sont généralement mieux connus comme l'organe primaire pour effectuer les échanges de gaz avec l'environnement externe, mais ils jouent néanmoins un rôle d'organe immunitaire significatif, puisqu'ils sont la première ligne de défense contre les pathogènes respiratoires. Ils contiennent des cellules du système immunitaire innée et adaptatif, leur permettant d'induire une réponse immunitaire appropriée aux infections (Kumar, 2020). Cette fonction dans l'immunité est cruciale puisque les poumons sont l'organe cible de plusieurs pathogènes dû à leur contact direct avec le milieu extérieur.

Les poumons peuvent être séparés en deux compartiments qui peuvent interagir ensemble. Il y a les voies respiratoires supérieures, servant de muqueuse, et les voies respiratoires périphériques. Il existe plusieurs types de cellules immunitaires situées dans les poumons. La majorité des macrophages dit résident aux poumons sont des macrophages alvéolaires (AMs, *alveolar macrophages*) et se retrouvent dans l'espace alvéolaire (Rubins, 2003). Les macrophages interstitiels (IMs, *interstitial macrophages*) sont une plus petite population qui réside dans le parenchyme pulmonaire (Bowden & Adamson, 1972; Guilliams *et al.*, 2013). Les macrophages alvéolaires participent généralement aux voies anti-inflammatoires. Puisqu'ils se retrouvent dans



le lumen alvéolaire, ils sont constamment exposés à des stimulants. En absence d'inflammation, les AMs jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie des autres types de cellules alvéolaires, comme les cellules épithéliales alvéolaires (AECs), les cellules dendritiques (DCs, *dendritic cells*) et les cellules T. Les AMs peuvent réguler ses cellules en produisant des molécules anti-inflammatoires comme le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor  $\beta$* ) (Lambrecht, 2017). En cas d'inflammation, les AMs vont sécréter des cytokines et chimiokines, incluant l'interleukin-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), la protéine chimiotactique des monocytes 1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*), le ligand de chimiokine 5 (RANTES) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*), permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires inflammatoires au site de l'infection (Dubourdeau *et al.*, 2006; Gersuk *et al.*, 2006). Les AMs peuvent également limiter la réponse immunitaire lors de plusieurs infections pulmonaires (Soroosh *et al.*, 2013). Ils peuvent, entre autres, inhiber l'activation de la kinase Janus (JAK) par la sécrétion des protéines supprimant la signalisation de cytokines (SOCS, *suppressor of cytokine signalling*) 1 et 3 (Bourdonnay *et al.*, 2015). Les AMs ont aussi un rôle important dans les réparations des dégâts tissulaires causés par l'infection (Landsman & Jung, 2007).

Les macrophages interstitiels (IMs), quant à eux, se retrouvent dans le parenchyme des poumons. Il existe plusieurs sous-population de macrophages interstitiels et se différencient selon leur localisation, leur fonction et leur longévité. En autres, il y a les IMs exprimant le récepteur mannose CD206 (CD206+) qui sont péribronchiques et sont impliqués dans l'immunorégulation et la cicatrisation. Il y a également les IMs CD206- impliqués dans la présentation d'antigène et sont associés avec l'interstitium alvéolaire (Schyns *et al.*, 2019). Les IMs sont important dans la régulation de la réponse immunitaire dans le poumon et sont impliqué dans la sécrétion de cytokines immunorégulatrices (Bedoret *et al.*, 2009; Hoppstädter *et al.*, 2010; Kawano *et al.*, 2016; Wizemann & Laskin, 1994). En effet, les IMs expriment l'IL-10 après l'exposition à un stimuli, comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries. Les IMs sont également capable de phagocyter des petites particules et cette capacité phagocytaire est augmentée à la suite de l'exposition au lipopolysaccharide, ainsi que leur chimiotaxie et leur production d'espèces réactives d'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) (Bedoret *et al.*, 2009; Wizemann & Laskin, 1994). Les IMs jouent un rôle potentiel dans la présentation d'antigène, suggéré par l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) chez la souris et les antigènes des leucocytes humains (HLA-DR, *human leukocyte antigen- DR isotype*) chez l'humain (Chakarov *et al.*, 2019; Hoppstädter *et al.*, 2010). Les IMs semblent pouvoir mieux présenter les antigènes que les AMs et peuvent diriger la prolifération des cellules T et la différenciation des cellules T régulatrices (Chakarov *et al.*,

2019). Les macrophages possèdent 2 profils selon l'état inflammatoire cellulaire. Les macrophages M1 sont catégorisés comme pro-inflammatoire et génèrent des cytokines comme TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . Les macrophages de type M2, quant à eux, sont plutôt anti-inflammatoire et sécrètent de l'IL-10 (Gordon & Taylor, 2005; Martinez *et al.*, 2008).

Un type cellulaire important faisant partie de la réponse immunitaire innée et retrouvé au niveau des poumons est les AECs. Celles-ci sont catégorisées en type I, impliquées dans les échanges gazeux et pouvant reconnaître les pathogènes, et en type II, aussi appelées pneumocytes de type II. Les AECs servent de barrière mécanique protectrice contre les pathogènes qui sont inhalés. Les AECs de type II sécrètent des enzymes de réparation, dont la fibrinogène, de manière basolatérale, ce qui leur permet de répondre au changement dans la pression osmotique de la cellule très rapidement et de sentir les toxines formant des pores sécrétées par les bactéries pathogéniques (Guadiz *et al.*, 1997). Le fibrinogène sécrété aide donc dans la réponse cellulaire en réponse au dommage inflammatoire (Simpson Haidaris, 1997). Les AECs servent aussi de régulateurs dans la génération de la réponse immunitaire primaire contre les pathogènes via le relâchement de médiateurs variés, dont des cytokines, et interagissent directement avec les autres cellules immunitaires, comme les macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques (Vlahakis *et al.*, 1999). Ainsi, les AECs sont un type cellulaire très important pour la réponse immunitaire à la suite d'une infection pulmonaire.

Le système immunitaire inné sert donc de première ligne de défense contre des pathogènes via la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), soit des motifs microbiens conservés (Janeway, 1989). De plus, les cellules immunitaires innées reconnaissent les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) générés durant les étapes initiales de l'état pro-inflammatoire (Matzinger, 1994). La réponse immunitaire innée envers les virus requiert donc une détection précoce des PAMPs et DAMPs ainsi qu'une activation efficace de la réponse antivirale afin de bien contrôler l'infection. La reconnaissance des PAMPs et DAMPs implique plusieurs récepteurs de reconnaissance de motif (PRRs, *pattern recognition receptors*), incluant les récepteurs de type Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) et les multiples récepteurs de reconnaissance de forme codés dans la lignée germinale comme les récepteurs de type NOD (NLRs, *nucleotide-binding and oligomerization domain(NOD)-like receptors*), les récepteurs de type RIG-I (RLRs, *retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors*), les récepteurs lectines de type C (CLRs, *C-type lectin receptors*) et plusieurs senseurs d'ADN intracellulaire comme la voie de signalisation cGAS-STING (*cyclic GMP-AMP synthase(cGAS)-stimulator of interferon genes(STING)*) et les récepteurs de type AIM2 (ALRs, *absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors*) (Bawadekar *et al.*,

2015; Inohara *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2020; Poltorak *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2013; Yoneyama *et al.*, 2004).

Ces récepteurs permettent de détecter un vaste ensemble de ligand. Les TLRs sont impliqués dans la reconnaissance des virus à ARN au niveau de la surface cellulaire et des endosomes. Les NLRs, quant à eux, sont un système cytosolique permettant de reconnaître plusieurs PAMPs et DAMPs intracellulaires. Pour ce qui est des RLRs, ceux-ci détectent l'ARN viral simple brin, l'ARN double brin ou l'ARN contenant un 5'-triphosphate (Hornung *et al.*, 2006). Les deux bien connus sont RIG-I et la facteur MDA-5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) et ils détectent différents groupes de virus ARN. MDA-5 peut détecter les picornavirus, tandis que RIG-I détecte les virus ARN à simple brin négatif, comme RSV et Influenza (Kato *et al.*, 2006). Les CLR sont retrouvés à la fois dans l'état soluble et transmembranaire et ils peuvent reconnaître le mannose, le fucose et les structures glucanes carbohydate, permettant de reconnaître les virus, les champignons et les mycobactéries. La voie de signalisation cGAS-STING permet quant à elle la reconnaissance de l'ADN et les ALRs reconnaissent l'ADN cytosolique et sont impliqués dans la modulation de la réponse interféron de type I et les voies des inflammasomes (Gray *et al.*, 2016). L'activation de ces PRRs enclenchent plusieurs cascades de signalisation, qui peuvent être catégorisées en 2 familles de facteurs de transcription; le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) et le facteur régulateur d'interféron (IRF). Ces facteurs de transcription sont relocalisés au noyau une fois activés, où ils augmentent les voies pro-inflammatoire et antivirales, générant différentes cytokines, chimiokines, interférons (IFNs) et d'autres molécules (Liu *et al.*, 2017a). NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription pouvant être activé par plusieurs centaines de stimuli et peut induire la transcription d'autant de gènes. En effet, NF- $\kappa$ B régule l'expression de cytokines inflammatoires, de chimiokines, d'immunorécepteurs et de molécules d'adhésion. En autres, il module l'expression de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-1 $\beta$  (Hiscott *et al.*, 1993; Sica *et al.*, 1997). Ceci en fait donc un médiateur central dans la réponse immunitaire. Le système interféron est essentiel pour l'immunité contre la plupart des virus. Les IFNs sont séparés en trois groupes. Les réponses antivirales innées sont principalement médiées par les interférons de type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) et de type III (IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3), alors que l'interféron de type II (IFN- $\gamma$ ) module la réponse immunitaire innée et adaptative (Bogdan *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 1994; Farrar & Schreiber, 1993; Kotenko *et al.*, 2003). Les IFNs génèrent une réponse via l'induction de plusieurs gènes appelés ISGs.

La caspase-1 est l'une des protéines inflammatoires modulée par ces facteurs et joue un rôle crucial dans la protection des voies respiratoires lors d'infection virale. En effet, la protéase caspase-1 est impliquée dans l'immunité innée et dans plusieurs maladies inflammatoires, où celle-ci permet d'activer les cytokines inflammatoires pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 (Dinarello, 1998). Son

activation permet de générer une protection de la barrière endothéliale des poumons lors d'infection virale, où celle-ci agit comme sentinelle (Alvarez *et al.*, 2016). L'activation des membres de la famille IL-1 par la caspase-1 est une étape importante dans la réponse immunitaire inflammatoire. En effet, les cytokines de la famille de l'interleukine-1 représentent la majeure partie de celles associées à l'immunité innée et à l'inflammation. L'interleukine-1 induit l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules mésenchymateuses et endothéliales, ce qui enclenche l'infiltration de cellules inflammatoires et immunitaires. De plus, IL-1 permet d'induire entre autres la fièvre et la vasodilatation (Fantuzzi *et al.*, 1997). De cette famille, l'IL-1 $\beta$  est la plus étudiée, dû à son implication dans plusieurs maladies auto-inflammatoires (Dinarello, 2011).

## 1.2 Inflammasome : canonique versus non-canonique

La réponse immunitaire innée à la suite d'une infection peut ainsi être très variée. L'une des voies activées importante dans les macrophages est celle de l'inflammasome, un complexe multiprotéique intracellulaire. Les voies JNK, MAP kinases et NF- $\kappa$ B, enclenchées par la reconnaissance des PAMPs et DAMPs, permettent l'assemblage de l'inflammasome et son activation (Broz & Dixit, 2016). Ce complexe protéique a été décrit pour la première fois en 2002 par *Martinon et al.*, comme une plateforme moléculaire intracellulaire qui peut recruter, dimériser et activer la protéase pro-inflammatoire caspase-1 (Martinon *et al.*, 2002).

L'inflammasome est donc un complexe permettant l'activation spécifique des caspases inflammatoires. Celles-ci, contrairement aux caspases apoptotiques, sont des enzymes synthétisées sous forme de zymogènes latents contenant un domaine d'activation et de recrutement des caspases (CARD). Elles sont formées de grandes et petites sous-unités et l'oligomérisation est nécessaire pour leur activation. Les caspases inflammatoires retrouvées chez l'humain sont la caspase-1, -4, et -5 (Martinon *et al.*, 2002).

Ainsi, cette voie est une réponse précoce de la voie de l'immunité innée, initiant la production de cytokines inflammatoires et le recrutement de cellules effectrices au site de l'infection. L'inflammasome est retrouvé au niveau du cytoplasme et peut être activé par divers stimuli qui sont détectés par divers types de senseur. En effet, les inflammasomes sont classés selon la protéine PRR servant de senseur moléculaire. Les mieux connus à ce jour sont les senseurs appartenant à la famille des NLRs, soit NLRP1, NLRP3 et NLRC4, ainsi qu'à la famille des ALRs, soit AIM2. D'autres membres de la famille des NLRs, comme NLRP2, NLRP6, NLRP7 et NLRP12, et le membre de la famille des ALRs IFI16 sont également aptes à former des inflammasomes (Elinav *et al.*, 2011; Kerur *et al.*, 2011; Khare *et al.*, 2012; Vladimer *et al.*, 2012). Dans certains cas, l'inflammasome est également constitué d'un adaptateur appelé protéine

adaptatrice de type spéculum associée à l'apoptose contenant un domaine de recrutement de caspase (ASC, *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*). En effet, après son assemblage, le complexe formé par le récepteur peut recruter l'adaptateur ASC. Ce recrutement de ASC au récepteur mène à l'oligomérisation de ASC en un agrégat macromoléculaire connu sous le nom d'oligomère de ASC (Figure 1.2). La formation de l'inflammasome via l'oligomérisation mène ensuite à une plateforme permettant le recrutement et l'activation de la protéase caspase-1, qui médie par la suite des événements pro-inflammatoires (Mariathasan & Monack, 2007).

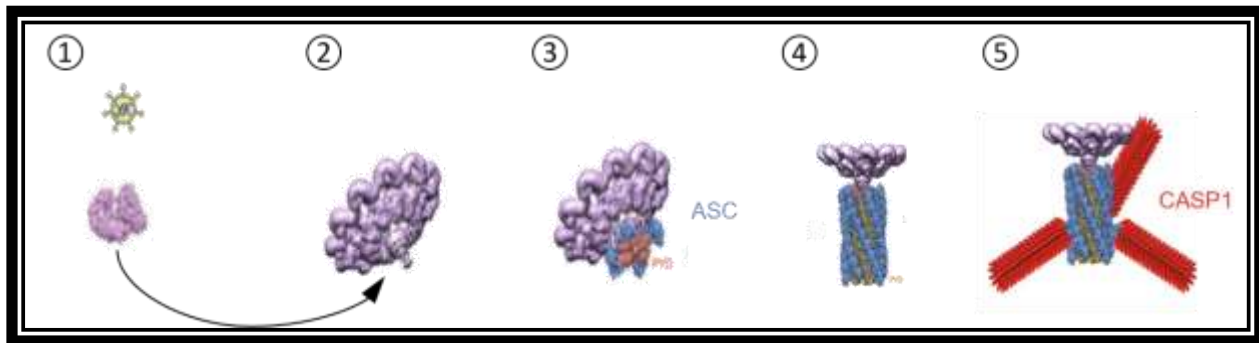


Figure 1.2 Activation et formation de l'inflammasome canonique

La formation de l'inflammasome canonique s'effectue en plusieurs étapes. Dans un premier temps, (1) un stimuli active le senseur, (2) permettant son oligomérisation. Ce dernier peut recruter par la suite (3) la protéine adaptatrice ASC, dépendamment du senseur, qui (4) s'oligomérisse, formant le complexe de l'inflammasome actif. Une fois formé, ce complexe peut ensuite (5) recruter et activer la caspase-1. Créée avec BioRender.

Les interactions du récepteur avec ASC et la pro-caspase-1 se font via des interactions homotypiques PYD-PYD et CARD-CARD, respectivement. En effet, les senseurs possèdent un domaine pyrine (PYD) qui lie ce même domaine retrouvé dans la protéine ASC (Davis *et al.*, 2011). De même, ASC possède un domaine CARD qui lie le domaine CARD de la pro-caspase-1. Cependant, certains récepteurs possèdent un domaine CARD, permettant à ceux-ci de directement recruter la pro-caspase-1, sans la nécessité de la protéine ASC (Zhang *et al.*, 2015).

### 1.2.1 Les senseurs de l'inflammasome.

NLRP1 est le premier senseur découvert ayant la capacité d'activer le complexe protéique de l'inflammasome (Martinon *et al.*, 2002). Ce senseur est formé d'un domaine pyrine (PYD) en position amino-terminale, d'un domaine NACHT, d'un domaine LRR, d'un domaine *function-to-find* FIIND et d'un domaine CARD en position carboxy-terminale (Figure 1.2.1). La fonction générale du domaine pyrine dans la formation de l'inflammasome est le recrutement de la protéine ASC

(Vajjhala *et al.*, 2012). Chez la souris, ce senseur peut toutefois former l'inflammasome de manière indépendante de la protéine ASC, puisqu'il possède un domaine CARD, liant directement la procaspase. Toutefois, la forme humaine est dépendante de la protéine ASC et ne peut lier directement la caspase-1, même si celle-ci possède également un domaine CARD (Ball *et al.*, 2020). Le domaine NACHT permet la liaison et l'oligomérisation de nucléotides et le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance des ligands. Le domaine FIIND, quant à lui, s'auto-clive, permettant la génération de 2 polypeptides nommés NBD-LRR-ZU5 et UPA-CARD. Ce clivage est nécessaire pour rendre actif l'inflammasome NLRP1 (Finger *et al.*, 2012). En effet, le clivage permet à la partie N-terminale de NLRP1 d'être dégradé par le protéasome, l'un des mécanismes proposés par lequel NLRP1 s'active. Ce clivage de FIIND empêche le protéasome de dégrader le domaine CARD et permet de relâcher le segment C-terminal UPA-CARD (Chui *et al.*, 2019; Frew *et al.*, 2012). Ce modèle d'activation par le protéasome est référé à la dégradation fonctionnelle et permet d'expliquer la sensibilité de NLRP1 aux inhibiteurs de protéasome. Le segment UPA-CARD, une fois libéré du segment N-terminal, peut ensuite s'assembler et former la plateforme pour le recrutement de la caspase-1 (Sandstrom *et al.*, 2019). Il a également été démontré que NLRP1 peut être activé par diverses protéases virales, où la fonction enzymatique de celles-ci permet le clivage du senseur en N-terminal (Tsu *et al.*, 2021).

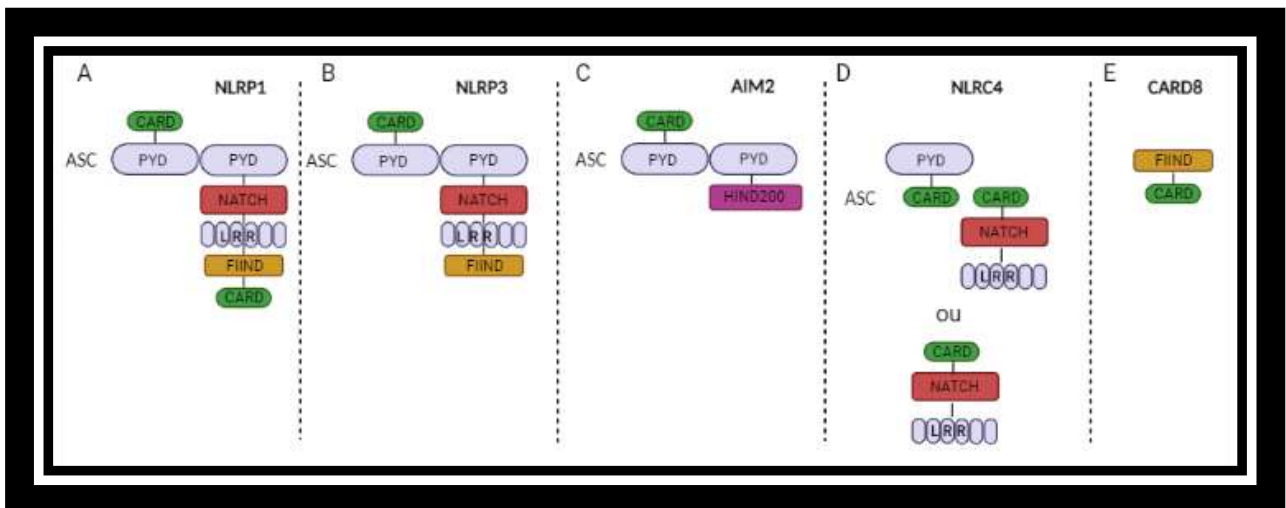


Figure 1.2.1 Structure de senseurs pouvant former l'inflammasome et leur liaison avec la protéine adaptatrice ASC

Différents senseurs pouvant former l'inflammasome et leur dépendance à la protéine adaptatrice ASC. A-C) Les senseurs NLRP1, NLRP3 et AIM2 sont dépendants de ASC et s'y lie via leur domaine pyrine. D) Le senseur NLRC4 peut former l'inflammasome de manière indépendante, mais peut également lier ASC via son domaine CARD. E) Le senseur CARD8 forme l'inflammasome de manière indépendante de la protéine ASC. Créée avec BioRender.

NLRP1 peut être aussi activé par des facteurs bactériens léthaux, dont la toxine *Bacillus anthracis* et le dipeptide muramyl (Boyden & Dietrich, 2006; Faustin *et al.*, 2009). La toxine léthale anthrax est un facteur de virulence important de *Bacillus anthracis*. Cette toxine contient un antigène protecteur (PA) et un facteur léthal (LF). PA se lie à un récepteur à la surface des cellules et s'oligomérisse pour former un pore membranaire où LF va entrer dans le cytoplasme. La toxine a été démontré capable d'induire la pyroptose, un type de mort cellulaire programmée (Fink *et al.*, 2008). De plus, l'activité protéase de LF est importante pour l'activation de NLRP1B, l'un des senseurs NLRP1 chez la souris, impliquant que la liaison du ligand au senseur n'est pas suffisante pour activer l'inflammasome (Klimpel *et al.*, 1994). Le muramyl dipeptide est un fragment de peptidoglycane bactérien permettant d'induire la liaison de l'ATP ainsi que l'oligomérisation et l'activation de l'inflammasome NLRP1 (Faustin *et al.*, 2007). En effet, ce dipeptide permet l'échange de l'ADP pour ATP, menant à l'activation de NLRP1. Ce senseur est également activé par plusieurs picornavirus, des virus impliqués dans des maladies comme la polio, l'hépatite A et le rhume (Tsu *et al.*, 2021). Ce senseur peut être inhiber par les protéines Bcl-2 et Bcl-XL, toutes 2 impliquées dans l'apoptose. En effet, elles permettent de réguler négativement NLRP1, de manière dépendante du domaine LRR, et ce, indépendamment de leur rôle dans l'apoptose (Bruey *et al.*, 2007).

CARD8 est un senseur similaire à NLRP1. Celui-ci est composé cependant de seulement un domaine FIIND et d'un domaine CARD. Ce senseur n'interagit pas avec la protéine ASC pour former l'inflammasome (Figure 1.2.1). En effet, CARD8 peut directement lier la caspase-1 et mener à son activation (Gong *et al.*, 2021). Ce senseur est important pour induire la pyroptose dans les monocytes humains THP-1 qui sont stimulés avec le composé Val-boroPro (Johnson *et al.*, 2018). Ce composé pharmacologique, aussi sous le nom de talabostat, est une petite molécule inhibitrice de protéases pouvant inhiber les dipeptidyl peptidases DPP4, DPP7, DPP8 et DPP9. Le talabostat active la voie CARD8 dans les monocytes humains THP-1, mais peut également activer l'inflammasome NLRP1 dans d'autres modèles cellulaires. Son effet a été démontré *in vivo* dans un modèle de souris, où le traitement avec Val-boroPro induit la production de cytokines et mène à la mort des macrophages en culture (Okondo *et al.*, 2017). L'inhibition des DPP8/9 par ce composé a été démontré comme la source d'activation de la voie de ces inflammasomes. En effet, DPP9 se lie à ces senseurs, empêchant leur activation. Le traitement par Val-boroPro inhibe cette liaison inhibitrice (Zhong *et al.*, 2018a).

L'inflammasome NLRP3 est celui le mieux décrit. NLRP3 est une protéine constituée d'un domaine pyrine en position amino-terminale (PYD), d'un domaine central NACHT ainsi que d'un

domaine riche en répétition leucine (LRR) en position carboxy-terminale (Figure 1.2.1). Le domaine NACHT possède une activité ATPase permettant l'auto-association de NLRP3 (Duncan *et al.*, 2007). Cette activité ATPase peut être modulée pharmacologiquement par l'inhibiteur MCC950 (Coll *et al.*, 2019). Le domaine PYD, quant à lui, permet à NLRP3 de lier la protéine adaptatrice ASC (Vajjhala *et al.*, 2012). Ce senseur reconnaît divers stimuli, dont les cristaux, l'ATP extracellulaire, l'ADN mitochondrial oxydé, la production de ROS et de ROS mitochondrial (mtROS), les dysfonctions mitochondriales, la déstabilisation du lysosome et sa rupture, les fluctuations au niveau du calcium intracellulaire (Ca<sup>2+</sup>), les efflux de potassium (K<sup>+</sup>), les toxines formant des pores, les hybrides ARN-ADN ainsi que plusieurs virus, bactéries, champignons et protozoaires (Cassel & Sutterwala, 2010; Elliott & Sutterwala, 2015; Jo *et al.*, 2016; Latz *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2011). Ce qui pourrait expliquer le fait que ce senseur reconnaît autant de stimuli différents est la proposition que ceux-ci agissent par un intermédiaire commun. Cet intermédiaire pourrait être la mitochondrie. En effet, les agents activant le senseur NLRP3 induisent des dommages mitochondriaux, causant la sécrétion de fragment d'ADN mitochondrial et la production de ROS. Ces derniers permettent entre autres l'oxydation de l'ADN mitochondrial (ox-mtDNA), le ligand proposé de ce senseur (Shimada *et al.*, 2012). La synthèse et l'oxydation de l'ADN mitochondrial ne dépend toutefois pas des mtROS, comme une récente étude l'a démontrée (Xian *et al.*, 2021). De plus, l'augmentation des ROS permet l'interaction entre le senseur NLRP3 et la protéine interagissant avec la thiorédoxine TXNIP, médiant l'activation de l'inflammasome (Zhou *et al.*, 2010). Ce senseur, suite à son activation, est également relocalisé aux membranes du réticulum endoplasmique associées à la mitochondrie, permettant une proximité avec les ROS mitochondriaux (Zhou *et al.*, 2011).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 se fait généralement en 2 étapes, soit l'amorçage et le déclenchement. L'amorçage est induit par un stimulus, comme des ligands de TLRs, de NLRs ou de récepteurs de cytokines, afin d'activer la transcription de NF- $\kappa$ B. Ce dernier permet l'augmentation de l'expression de NLRP3. NF- $\kappa$ B permet également l'augmentation de l'expression de la pro-IL-1 $\beta$ , une cytokine qui n'est pas exprimée de manière constitutive dans les macrophages. L'amorçage apporte également des modifications post-traductionnelles au senseur, comme l'ubiquitination ou la phosphorylation, permettant à celui-ci de former la conformation pour son auto-oligomérisation et son interaction avec ASC (Shim & Lee, 2018). La caspase-8 et FADD, 2 molécules impliquées dans l'apoptose, ont été démontrées étant requise pour l'induction de NLRP3 durant l'étape d'amorçage, et ce, indépendamment de leur fonction dans l'apoptose (Gurung *et al.*, 2014). En effet, la caspase-8 interagit avec le complexe IKK (*I $\kappa$ B kinase*), permettant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Lemmers *et al.*, 2007). L'activation de la voie TLR4 lors de l'étape d'amorçage



permet l'activation du facteur de transcription IRF1, qui induit la synthèse d'ADN mitochondrial, un des signaux requis pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Zhong *et al.*, 2018b). Cette première étape d'amorçage n'est toutefois pas indispensable pour l'activation de l'inflammasome. En effet, les monocytes humains primaires peuvent activer directement l'inflammasome NLRP3, mais de manière dépendante à l'efflux d'ions potassium et aux modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et l'ubiquitination (Gritsenko *et al.*, 2020). Cependant, cette voie ne peut pas activer l'IL-1 $\beta$ . Le deuxième signal, soit le déclenchement, mène à la formation finale de l'inflammasome par la promotion de l'oligomérisation de NLRP3 et le recrutement de la protéine adaptatrice ASC et de la pro-caspase-1 (Elliott & Sutterwala, 2015; Man & Kanneganti, 2015). Cette étape peut être activée par divers stimuli, dont l'ATP, l'efflux de potassium (K<sup>+</sup>), de l'ARN provenant de pathogènes ainsi que des composés et toxines bactériennes (Lee *et al.*, 2016; Mariathasan *et al.*, 2006; Sha *et al.*, 2014). La kinase NEK7 (*NIMA-related kinase 7*) a été démontrée essentielle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, où celle-ci peut lier directement NLRP3 et contrôler son oligomérisation, et ce, indépendamment de son activité kinase. Les divers stimulus de NLRP3 promeut cette interaction de manière dépendante à l'efflux de potassium (He *et al.*, 2016). Cet inflammasome est impliqué dans plusieurs pathogénèses, dont l'athérosclérose, l'ischémie myocardique, la cardiomyopathie, les accidents vasculaires cérébral ischémique, l'hypertension, l'obésité et le diabète (Alishahi *et al.*, 2019; Birnbaum *et al.*, 2019; Hong *et al.*, 2019; Krishnan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Parsamanesh *et al.*, 2019; Salgarello *et al.*, 2013; Takahashi, 2019; Wang *et al.*, 2019a; Zhuang *et al.*, 2019). Il est également activé par plusieurs infections virales, dont les virus Influenza A (IAV) et le virus du Nil occidental (WNV) (Allen *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2012).

NLRC4 est un autre senseur ayant la capacité de formé l'inflammasome. Celui-ci possède un domaine CARD en N-terminal, un domaine central NATCH et un domaine LRR en position C-terminal (Figure 1.2.1). NLRC4 peut lier et activer directement la caspase-1 via son domaine CARD (Zhang *et al.*, 2015). Toutefois, ce senseur peut également recruter ASC afin de former l'inflammasome. En effet, la présence de la protéine ASC dans l'inflammasome NLRC4 est corrélée à une augmentation de l'activité de la caspase-1 (Mariathasan *et al.*, 2004). Cette interaction avec ASC semble être possible via les domines CARD, puisque ce senseur ne possède pas de domaine PYD. L'expression de ce senseur peut être stimulée par les voies pro-inflammatoires, dont TNF- $\alpha$  et p53, même si le niveau basal de NLRC4 est suffisant pour activer l'inflammasome (Gutierrez *et al.*, 2004; Sadasivam *et al.*, 2005). NLRC4 permet à divers types cellulaires, dont les macrophages, de répondre aux infections bactériennes, dont l'infection par *Salmonella typhimurium* (Mariathasan *et al.*, 2004). En effet, la flagelline retrouvée dans le cytoplasme ainsi que la sous-unité rod et needle du système de sécrétion de type III bactérien (T3SS) de plusieurs bactéries à Gram négative

peuvent induire l'inflammasome NLRC4 (Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2014). Cet inflammasome est également important dans la reconnaissance et la protection contre les pathogènes entériques. En effet, il peut être activé non seulement par le pathogène *Salmonella*, mais aussi par les protéines needle du T3SS de *Shigella flexneri* et *E. coli enterohemorragique*, entre autres (Yang *et al.*, 2013b). Il a également été démontré comme étant impliqué dans la protection des poumons contre les infections par *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Cai *et al.*, 2012). Pour mener à l'activation de cet inflammasome, une étape supplémentaire est requise puisque NLRC4 ne peut pas directement lier les ligands. Ainsi, ce senseur utilise les protéines inhibitrices de l'apoptose de la famille NLR (NAIPs) comme récepteur direct afin de reconnaître les stimuli. Chez la souris, différentes protéines NAIPs peuvent lier différents ligands grâce à leur domaine NOD, promouvant la co-oligomérisation du NAIP lié au ligand avec NLRC4, menant au recrutement de ASC. En effet, NAIP5 reconnaît la flagelline et la lie, formant par la suite un complexe avec NLRC4. NAIP6 peut également servir de senseur pour la flagelline et NAIP2 et NAIP1 peuvent enclencher le même mécanisme grâce à la protéine rod et la protéine needle du T3SS, respectivement. Chez l'humain, il existe cependant qu'un seul NAIP et celui-ci active NLRC4 lors de sa liaison avec la protéine needle du T3SS (Rayamajhi *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2011). Néanmoins, de récentes études ont démontré qu'il existe 2 isoformes de NAIP chez l'humain et que l'isoforme *NAIP\**, exprimé dans les macrophages humains primaires dérivés de monocytes, permet de répondre à la flagelline de *Salmonella* (Kortmann *et al.*, 2015). Ainsi, la liaison du ligand change la structure des protéines NAIPs pour permettre à celles-ci d'interagir avec NLRC4 et d'induire son oligomérisation. De plus, la formation de l'inflammasome NLRC4 nécessite qu'une seule NAIP pour mener à l'activation et l'oligomérisation de plusieurs molécules NLRC4 (Zhang *et al.*, 2015). NLRC4 est également apte à recruter la caspase-8 à la suite de l'infection par *Salmonella*. Ce recrutement, qui nécessite la présence de ASC, permet l'activation de la caspase-8, qui peut ensuite cliver la pro-IL-1 $\beta$ , imitant le rôle de la caspase-1 (Man *et al.*, 2013). Ce rôle de la caspase-8 dans les voies des inflammasomes peut aussi être observé lors du signalement de l'inflammasome NLRP3 (Antonopoulos *et al.*, 2015).

Pour ce qui est de l'inflammasome AIM2, un senseur de l'ADN cytoplasmique, celui-ci possède un domaine HIN, permettant la reconnaissance de l'ADN, ainsi qu'un domaine PYD en N-terminal, permettant le recrutement de la protéine ASC (Figure 1.2.1). AIM2 peut ainsi directement lier l'ADN cytoplasmique et le domaine HIN est suffisant pour cette interaction (Hornung *et al.*, 2009). Puisque AIM2 ne possède pas de domaine NACHT permettant l'oligomérisation, cet inflammasome s'assemble différemment des autres décrits plus haut. La liaison de l'ADN au domaine HIN, via une poche hydrophobique, sur le squelette sucre-phosphate des 2 brins d'ADN, sert de

gabarit pour l'oligomérisation (Jin *et al.*, 2012). Cette liaison permet le relâchement de l'interaction de PYD avec le domaine HIN, permettant l'interaction PYD-PYD avec ASC. L'expression de ce senseur peut être induit par les IFNs de type I (Brunette *et al.*, 2012). Cet inflammasome, comme NLRP3, requiert un signal initial pro-inflammatoire qui promeut l'expression des composantes structurelles de la plateforme de l'inflammasome et de ses substrats. Cette étape d'amorçage est médiée par l'activation transcriptionnelle de AIM2 par les IFNs type I et l'IFN- $\gamma$  (Strittmatter *et al.*, 2016). Ainsi, l'activation de l'inflammasome AIM2 est médiée par l'activation des IFNs, une réponse typique des infections virales. L'ADN double brin cytoplasmique, qu'il provienne de l'hôte lors de dommages cellulaires, d'une bactérie ou d'un virus, mène à l'activation de l'inflammasome AIM2 (Muruve *et al.*, 2008). En effet, l'ADN cytosolique peut enclencher le premier signal d'amorçage de AIM2 via cGAS-STING ainsi que le deuxième signal de déclenchement qui mène à l'assemblage de l'inflammasome. AIM2 est impliqué dans la reconnaissance des virus à ADN, dont le cytomégalo virus murin MCVM, le virus vaccinia, le papillomavirus humain et le virus Epstein-Barr (Rathinam *et al.*, 2010; Reinholz *et al.*, 2013; Torii *et al.*, 2017). Cependant, les mécanismes permettant la libération de l'ADN viral et sa subséquente exposition à AIM2 dans le cytoplasme restent encore à être déterminé. L'infection par le virus Influenza A a également été démontré apte à activer la voie AIM2, où l'ADN endogène des tissus endommagés des poumons entraîne l'activation de cet inflammasome (Schattgen *et al.*, 2016).

Les inflammasomes mentionnés plus haut activent tous la voie de l'inflammasome canonique, dans laquelle la caspase-1 devient active et dirige la réponse pro-inflammatoire. Cependant, il existe également une voie de l'inflammasome non-canonique où les caspases 4 et 5 (caspase 11 chez la souris) peuvent répondre directement aux stimuli sans la présence d'un senseur en aval. En effet, ces caspases peuvent reconnaître et lier le lipopolysaccharide bactérien via leurs domaines CARD, les rendant actives (Kayagaki *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2014). Cette voie ne mène toutefois pas au clivage des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18. Ces caspases clivent seulement la protéine gasdermine D, un autre substrat connu de la caspase-1. Toutefois, la caspase 8 peut également activer la voie non-canonique et celle-ci a été démontrée apte à cliver la pro-IL-1 $\beta$  et la protéine gasdermine D (Demarco *et al.*, 2020; Maelfait *et al.*, 2008).

D'autres senseurs sont également connus pour former l'inflammasome. En outre, NLRP6 participe dans la reconnaissance de l'ARN viral (Wang *et al.*, 2015). NLRP9, quant à lui, permet de répondre aux infections par des rotavirus dans l'intestin (Zhu *et al.*, 2017). Un autre senseur membre de la famille des ALRs, IFI16, peut réguler la production d'IFNs lors d'infections virales et bactériennes (Unterholzner *et al.*, 2010). Ce senseur peut interagir avec la protéine ASC et est

requis pour l'activation de la caspase-1 dans les cellules infectées par le virus responsable du sarcome de Kaposi (KSHV) (Kerur *et al.*, 2011). Il peut aussi reconnaître l'ADN viral du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), entraînant la mort des cellules T CD4+ via une mort caspase-1 dépendante (Monroe *et al.*, 2014).

### 1.3 Pyroptose : mort cellulaire programmée nécrotique

À ce jour, il est connu que les cellules peuvent enclencher divers types de mort cellulaire. L'une d'elles est la pyroptose. Cette mort est induite par les caspases inflammatoires et son nom provient du mot grecque *pyro*, signifiant feu, et *ptosis*, pour tomber. La pyroptose est donc une mort cellulaire programmée inflammatoire. L'activation et la formation de l'inflammasome, qui active par la suite les caspases inflammatoires, mène à la mort pyroptotique. Cette mort est caractérisée par le gonflement de la cellule, la formation de pores membranaires et une éventuelle lyse, menant à la sécrétion du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire (Kesavardhana & Kanneganti, 2017). Ce type de mort cellulaire est associé à des dommages mitochondriaux irréversibles et à l'accumulation de ROS. À la suite de l'activation de l'inflammasome, la caspase-1 est dimérisée et clivée, la rendant active. Cette protéase est retrouvée de base sous forme de monomère inactif (p45) qui forme par la suite un hétérodimère et est clivé, résultant à la formation de sous-unités p20 et p10. La sous-unité p20 est liée au domaine CARD, formant un fragment p35 (Broz *et al.*, 2010). Une fois activée, la caspase-1 peut ensuite cliver diverses protéines cibles grâce à son activité protéase. L'une de ces protéines cibles est la protéine gasdermine D (GSDMD), une protéine de 50 kDa. Ce clivage s'effectue au résidu Asp275 et génère 2 segments de gasdermine D, soit le segment N-terminal de 30 kDa et celui C-terminal. Le domaine C-terminal joue un rôle répresseur pour cette protéine. Ainsi, le clivage de gasdermine D par la caspase-1 permet de libérer le domaine N-terminal. Ce domaine va ensuite se translocaliser à la membrane plasmique de la cellule, où il va lier les phosphoinositides (Ding *et al.*, 2016). Il va ensuite s'oligomériser afin de former des pores d'environ 20 nm de diamètre dans la membrane (Liu *et al.*, 2016). Ces pores permettent la sortie d'une partie du contenu cellulaire, comme l'IL-1 $\beta$  et des ions, et si non régulés, la lyse cellulaire médiée par la protéine NINJ1 survient (Kayagaki *et al.*, 2021). Gasdermine D est l'une des 6 protéines de la famille gasdermine chez l'humain et les autres membres ont également été démontré capable de former des pores causant la pyroptose après leur clivage (Kovacs & Miao, 2017). Gasdermine D est ainsi une protéine importante dans l'induction de la pyroptose. Néanmoins, l'absence de celle-ci ne bloque pas totalement la mort pyroptotique. Une stimulation prolongée de la caspase-1 en absence de gasdermine D induit de la pyroptose, soulignant le fait que la caspase-1 possède d'autres substrats pro-pyroptotique (Kayagaki *et al.*, 2015). De plus,

l'activation prolongée de la caspase-1 peut mener à une nécrose secondaire, puisque les cellules n'exprimant pas gasdermine D activent les caspases apoptotiques après la stimulation de l'inflammasome canonique (He *et al.*, 2015). Ceci est consistant avec l'habilité des oligomères de ASC d'activer la caspase-8 en absence de la caspase-1 (Pierini *et al.*, 2012). La pyroptose enclenchée par la caspase-1 est donc médiée par les inflammasomes canoniques. Toutefois, la pyroptose médié par GSDMD peut être activée indépendamment de la caspase-1, où les inflammasomes non canonique vont mener au clivage de gasdermine D (Figure 1.3). En effet, une étude a démontré que l'absence de gasdermine D chez la souris impacte la pyroptose lors de l'activation de l'inflammasome non canonique et de la caspase-11 (Kayagaki *et al.*, 2015).

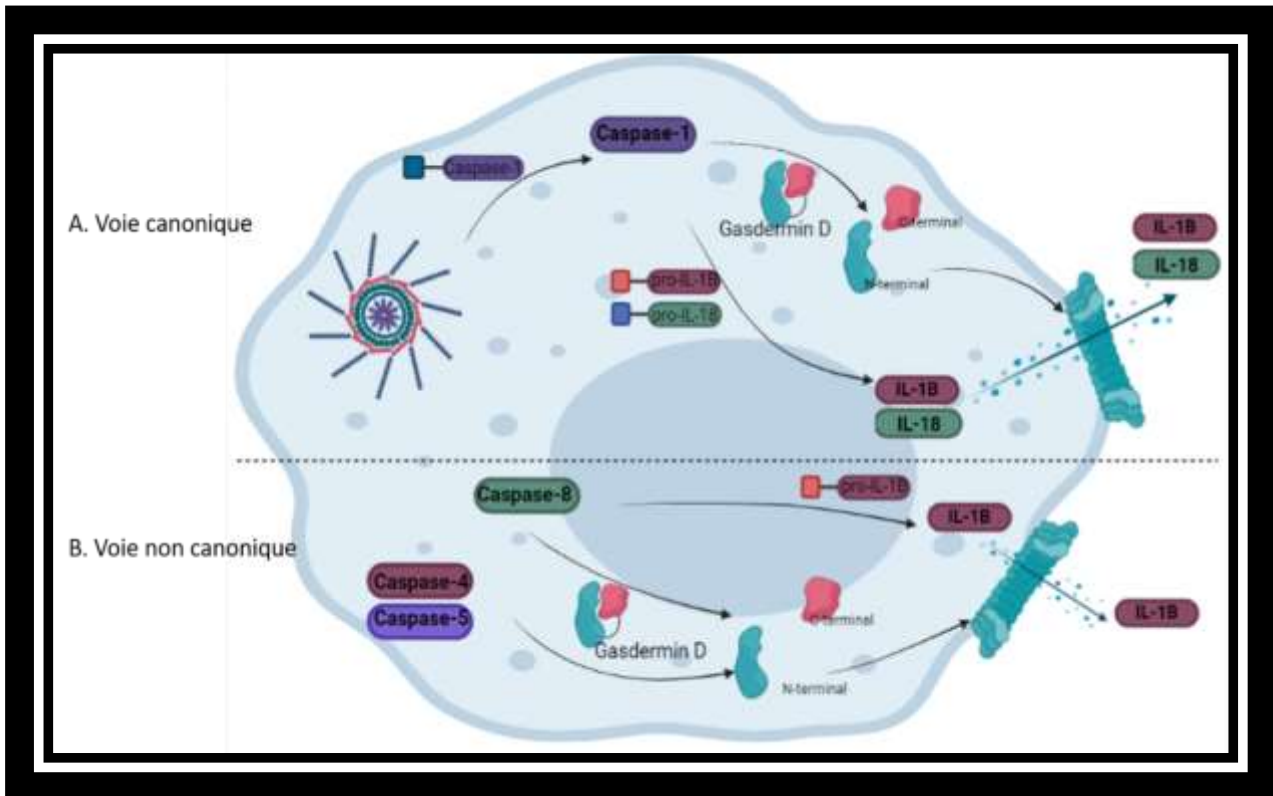


Figure 1.3 Voie canonique et non canonique de la pyroptose

Différence entre les voies de l'inflammasome canonique et non canonique. A) Voie canonique. Une fois activé, l'inflammasome canonique peut activer la caspase-1. Cette protéase peut ensuite cliver la protéine gasdermine D, libérant le fragment N-terminal. Celui-ci va ensuite s'oligomériser à la membrane plasmique, formant des pores permettant la sécrétion du contenu intracellulaire. La caspase-1 active peut également cliver et rendre active les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18, qui sont sécréter via les pores gasdermine D, activant les voies immunitaires pro-inflammatoires. B) Voie non canonique. Les caspases 4, 5 et 8 peuvent directement cliver la protéine gasdermine D, menant à la formation de pores pyroptotiques. La caspase 8 peut également activer la cytokine IL-1 $\beta$ . Créée avec BioRender.

L'activation de la caspase-1 par le complexe de l'inflammasome mène également au clivage et à l'activation de cytokines pro-inflammatoires, dont l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et l'interleukine 18 (IL-18). La caspase-1 permet ainsi de rendre la pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 dans leur forme mature active. Le fragment p35 de la caspase-1 clive l'IL-1 $\beta$  au résidu Asp116, générant la forme mature p17 (Thornberry *et al.*, 1992). La caspase-1 active clive également la pro-IL-18 après le résidu Asp36, générant la forme mature de 17,2 kDa (Ghayur *et al.*, 1997). Ces cytokines engagent par la suite leur récepteur transmembranaire respectif et promeuvent l'inflammation en activant la voie MyD88-NF- $\kappa$ B (Adachi *et al.*, 1998). Toutes deux n'ont pas de séquence signal et sont relâchées de manière indépendante du réticulum endoplasmique (RE) et du Golgi, ce qui est référé à une sécrétion non-conventionnelle. Certaines études suggèrent que la formation de pores cellulaires par la protéine gasdermine D serait la principale voie de sécrétion dans les macrophages, démontré par le fait que l'absence de cette protéine permet quand même un clivage normal de l'IL-1 $\beta$ , mais que celle-ci n'est pas excrétée dans le milieu extracellulaire dû à une absence des pores (He *et al.*, 2015). Le mécanisme peut toutefois varier selon le type cellulaire, comme les neutrophiles qui relâche l'IL-1 $\beta$  sans enclencher la pyroptose (Chen *et al.*, 2014). Une étude a également démontré que la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  peut s'effectuer rapidement de manière dépendante de la gasdermine D, mais également plus lentement, indépendamment des pores gasdermine D (Monteleone *et al.*, 2018). Les voies autophagiques peuvent également être l'une des voies responsable de cette sécrétion (Dupont *et al.*, 2011). Les oligomères de ASC peuvent également être libérés dans l'espace extracellulaire à la suite de la lyse cellulaire lors de la pyroptose et peuvent aider à la formation et à l'activation de l'inflammasome dans des cellules avoisinantes. Ceci est un mécanisme utile permettant d'augmenter la réponse inflammatoire en activant la mort pyroptotique de cellules n'ayant même pas reçu de stimulus engendrant l'activation de l'inflammasome. (Baroja-Mazo *et al.*, 2014; Franklin *et al.*, 2014). Ceci est utile en début d'infection pour augmenter rapidement la réponse immunitaire, mais peut devenir nuisible à long terme, générant une réaction inflammatoire prolongée.

Ce type de mort cellulaire permet ainsi d'augmenter la réponse immunitaire en activant des PRRs via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire, recrutant plus de cellules immunitaires aux sites de l'infection. La pyroptose est donc un moyen efficace d'éliminer la niche répliquative de pathogènes comme les virus. Entre autres, l'absence de la protéine gasdermine D chez les souris les rend plus susceptible à l'infection par les rotavirus (Zhu *et al.*, 2017). Elle est également importante lors d'infection par le virus Influenza. L'absence de composants de la voie NLRP3 augmente la létalité de l'infection chez les souris (Allen *et al.*, 2009). L'activation de l'inflammasome et la mort cellulaire permet également de restreindre la réplication virale, mais

contribue toutefois à l'inflammation des poumons et à la pathogénèse (Kuriakose *et al.*, 2016; Nogusa *et al.*, 2016; Thapa *et al.*, 2016). L'inflammasome est également un complexe activé lors de l'infection par le SARS-CoV-2. En effet, il a été démontré que la protéine N du SARS-CoV-2 augmente l'activation de l'inflammasome NLRP3 et induit une hyper-inflammation. Cette protéine interagit directement avec NLRP3, promeut sa liaison avec ASC et facilite l'assemblage de l'inflammasome et la maturation des cytokines pro-inflammatoires. La protéine N du virus aggrave également les dommages au niveau pulmonaire, accélère la mort par la septicémie et crée une inflammation aiguë dans un modèle murin (Pan *et al.*, 2021). L'activation de l'inflammasome dans ce contexte d'infection est donc associée à la sévérité de la maladie.

#### **1.4 Importance de la régulation de la pyroptose : trop c'est comme pas assez**

La pyroptose est ainsi un mécanisme de défense de la réponse immunitaire innée. Cette réponse permet de limiter les dégâts causés lors de l'infection. Toutefois, celle-ci peut parfois être plus dommageable que bénéfique. En effet, si non contrôlée, la mort nécrotique cellulaire pyroptotique mène à une signalisation pro-inflammatoire exagérée, exacerbant les dommages aux niveaux cellulaires, et même tissulaire. La dérégulation de l'inflammasome ainsi que son activation sur une période prolongée ont été liées à plusieurs maladies chroniques inflammatoires dont l'Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et dans des maladies inflammatoires causées par des bactéries telles que la gastrite causée par *Helicobacter pylori* (Dong *et al.*, 2020; Halle *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2002). La sur-stimulation de la voie pyroptotique peut ainsi contribuer à la pathogénèse au lieu de contrôler l'infection. Par exemple, les complications causées par l'infection avec IAV sont souvent associées à une immunopathologie sévère dans les poumons (Lupfer *et al.*, 2013). Ainsi, le résultat de l'infection par IAV est déterminé non seulement par la vitesse de réplication du virus, mais également par la dynamique de la réponse inflammatoire. De plus, la pathogénèse du virus respiratoire syncytial (RSV) semble être médiée en partie par les effets cytopathiques du virus sur les cellules épithéliales des poumons, mais également par la réponse inflammatoire (Liesman *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Ainsi, la dérégulation de la réponse immunitaire innée durant l'infection peut augmenter la sévérité de l'infection, en augmentant la charge du pathogène à cause d'une clairance inefficace de celui-ci, ou en causant une augmentation des dommages cellulaires. Un contrôle très serré doit ainsi être mis en place afin de limiter les réponses immunitaires de manière adéquate, tant sur le plan spatial que sur le plan temporel.

Ceci met donc en évidence l'importance de comprendre les mécanismes permettant de réguler cette voie immunitaire. En effet, il existe des régulateurs négatifs de la voie de l'inflammasome, comme des substances ayant une structure similaire au domaine PYD ou CARD. Celles-ci peuvent compétitionner avec les senseurs pour interagir avec la protéine adaptatrice ASC et la caspase-1. Ces protéines sont appelées COPs, pour CARD-only, et POPs, pour PYD-only. Il existe 3 COPs chez l'humain, soit CARD16, CARD17 et CARD18 et elles sont similaires au domaine CARD de la caspase-1, avec 91%, 81% et 52% d'homologie, respectivement (Druilhe *et al.*, 2001; Humke *et al.*, 2000; Lamkanfi *et al.*, 2004). Les COPs peuvent séquestrer la caspase-1 en s'y liant, inhibant ainsi l'induction de la pyroptose par l'inflammasome. Il existe aussi 3 POPs chez l'humain, nommés POP1, POP2 et POP3, et ils interfèrent avec la voie de l'inflammasome via des interactions PYD-PYD. POP1 possède une séquence similaire au domaine PYD de la protéine ASC et il a été démontré que sa surexpression inhibe la sécrétion de la cytokine IL-1 $\beta$  suite à l'activation canonique et non-canonique de l'inflammasome (de Almeida *et al.*, 2015). De plus, l'expression de cette protéine peut être induite par le signal de TLR ou IL-1R, démontrant un potentiel mécanisme de boucle de rétroaction négative. POP2 ressemble au domaine PYD du senseur NLRP2 et NLRP3, permettant de réguler ces inflammasomes (Bedoya *et al.*, 2007; Dorfleutner *et al.*, 2007). POP3 est contrôlé par les IFNs de type I et est similaire au domaine PYD du senseur AIM2, faisant de cette protéine un régulateur spécifique de la réponse induite par l'ADN (Khare *et al.*, 2014).

L'inflammasome peut aussi être régulé par la voie autophagique. En effet, il a été démontré que l'absence de Atg16L1, un composé impliqué dans la formation des autophagosomes, mène à une production exagérée d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 suite au traitement avec LPS (Saitoh *et al.*, 2008). La déplétion d'autres protéines autophagiques comme Atg7, LC3B ou Beclin 1, permet aussi l'augmentation de la production des cytokines inflammatoires par les macrophages, indiquant une augmentation de l'activité de l'inflammasome (Nakahira *et al.*, 2011). La modulation de l'autophagie chez les souris mène également à une inflammation sévère au niveau des poumons et à une augmentation de la mortalité (Fattah *et al.*, 2015). L'autophagie est un système intracellulaire permettant de dégrader des macromolécules cellulaires ainsi que des organelles dysfonctionnelles. Des défauts au niveau de cette voie de dégradation mènent donc à l'accumulation d'organelles endommagées, de protéines mal repliées et de ROS, ce qui contribue à l'activation de l'inflammasome. Ainsi, des défauts autophagiques permettent en outre l'accumulation de mitochondries endommagées, menant à la sécrétion de ROS et d'ADN mitochondrial, 2 signaux pouvant activer l'inflammasome NLRP3. La dégradation des mitochondries par la mitophagie est donc un mécanisme potentiel afin de réguler l'activation de l'inflammasome (Nakahira *et al.*, 2011).



Les composés de l'inflammasome peuvent également être des cibles de l'autophagie, de manière dépendante de p62. L'activation de l'inflammasome NLRP3 mène à la reconnaissance de la protéine ASC par p62 et celle-ci colocalise avec les autophagosomes. De plus, la protéine ASC dans le complexe de l'inflammasome AIM2 est polyubiquitinée, ce qui est reconnue par p62 et mène à sa dégradation (Shi *et al.*, 2012). L'autophagie peut aussi directement séquestrer la cytokine pro-IL-1 $\beta$ , menant à sa dégradation et réduisant la possibilité de l'inflammasome à cliver cette cytokine et la rendre mature et active (Harris *et al.*, 2011).

L'activité de l'inflammasome peut également être régulée via des modifications post-traductionnelles. En effet, la phosphorylation et l'ubiquitination de protéines permet de contrôler l'activité des récepteurs et de l'adaptateur ASC. Il est connu que le senseur NLRC4 peut être phosphorylé sur la sérine en position 533 afin de former l'inflammasome en réponse à l'infection par *Salmonella*. Cette modification est médiée par la protéine kinase C $\delta$  et il était proposé qu'elle était requise pour activer la caspase-1, induire la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et la mort des cellules (Qu *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que la kinase LRRK2 (*leucine rich repeat-containing kinase-2*) s'associe au senseur NLRC4 et promouvoir la phosphorylation de la sérine 533 (Liu *et al.*, 2017b). Cependant, une récente étude a démontré que l'inflammasome NLRC4 ne nécessite pas de phosphorylation afin d'être activé par la flagelline (Tenthorey *et al.*, 2020). Également, la phosphorylation n'est pas suffisante pour induire l'activation de l'inflammasome NLRC4. Il semble que cette modification agit plutôt comme un premier signal, permettant au senseur d'interagir avec les NAIPs qui sont liés aux ligands (Matusiak *et al.*, 2015). L'inflammasome NLRP3, quant à lui, nécessite une modification par la déubiquitinase BRCC3 lors de l'étape d'amorçage. Celle-ci modifie spécifiquement la lysine en position 63 dans son domaine LRR (Py *et al.*, 2013). Cette modification est nécessaire puisque l'ubiquitination de ce résidu maintient ce senseur dans un état inactif. Il a également été démontré que NLRP3 est phosphorylé durant cette étape d'amorçage, par JNK1, permettant son auto-association et la subséquente activation de l'inflammasome (Song *et al.*, 2017). La kinase NEK7 est également régulée par phosphorylation de manière dépendante des ROS et cette modification est nécessaire pour son interaction avec NLRP3 (Shi *et al.*, 2016). L'adaptateur ASC, quant à lui, est également modulé par phosphorylation à plusieurs résidus situés dans son domaine CARD. Ces modifications post-traductionnelles sont effectuées par les kinases tyrosine de la rate (SYK, spleen *tyrosine kinase*) et c-Jun N-terminale (JNK) et sont essentielles afin de permettre le clivage et l'activation de la caspase-1 (Hara *et al.*, 2013). La forme précurseur de l'IL-1 $\beta$  est aussi sujette à être ubiquitée, servant de signal pour la dégradation protéasomale et inhibant le clivage potentiel par la caspase-1 et donc son activation (Vijayaraj *et al.*, 2021). Ainsi,

la diminution ou le contrôle de ces modifications post-traductionnelles permet de réguler les inflammasomes, empêchant l'activation spontanée des complexes et leur suractivation.

La voie de signalisation des interférons est également un autre mécanisme régulateur de l'inflammasome. Les IFNs de type I réduisent l'expression de la pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 et répriment l'activité de l'inflammasome NLRP1 et NLRP3. Le facteur de transcription STAT1 médie l'inhibition du clivage de la caspase-1, affectant ainsi le clivage subséquent des pro-cytokines (Guarda *et al.*, 2011).

L'activation de l'inflammasome AIM2 peut également enclencher une boucle de rétroaction négative, dans laquelle l'activation de AIM2 est antagoniste à la voie de STING. Ceci serait médié par le clivage de cGAS par la caspase-1 (Wang *et al.*, 2017b).

La caspase-1 peut également s'auto-réguler, limitant l'activité pyroptotique. Celle-ci peut s'auto-cliver à la suite de son activation par l'inflammasome. En effet, la caspase-1 active est présente sous forme p46 et d'espèce transiente, p35/p10. L'auto-clivage subséquent de p35/p10 arrive après un certain temps, dépendamment de l'inflammasome et du type cellulaire. Ceci entraîne le relâchement de p20/p10 de l'inflammasome, entraînant l'instabilité et la fin de l'activité protéase de la caspase-1. Ceci permet de désactiver la protéase de manière temporel et intrinsèque (Boucher *et al.*, 2018).

Il existe également des mécanismes permettant de réguler des étapes plus tardives de la voie de l'inflammasome. En effet, une fois formée, les pores membranaires peuvent mener à la pyroptose ou la cellule peut encore engager des voies permettant de compenser les effets enclenchés par la gasdermine D. En présence de peu de pores, des mécanismes sont enclenchés afin de contrôler les efflux du contenu intracellulaire, dont l'activation de canaux ioniques, permettant l'export de ces solutés afin de maintenir l'homéostasie ionique. De plus, des événements d'exocytose réparent les dommages membranaires, dont le mécanisme de la protéine ESCRT-III (*endosomal sorting complex required for transport-III*) qui peut enlever les pores membranaires formées. ESCRT est composé de plusieurs sous-unités et entraîne la scission ou le scellement de la membrane et celle-ci est recrutée aux sites endommagés de la membrane plasmique. Ce mécanisme est donc utilisé afin de réparer les pores pyroptotiques GSDMD (Rühl *et al.*, 2018).

## 1.5 Mitochondrie et son contrôle sur la pyroptose

La régulation de l'inflammasome permet ainsi de contrôler et réduire les réponses inflammatoires à un niveau non pathogénique. Les mitochondries sont proposées comme des organelles centrales dans la régulation de l'immunité innée et de l'inflammasome NLRP3 (Shimada *et al.*, 2012; Yoshizumi *et al.*, 2017). Tout d'abord, il est maintenant reconnu que les mitochondries ne sont pas simplement des organelles impliquées dans les processus énergétiques, mais sont également impliquées dans la signalisation, jouant un rôle important dans le métabolisme, la mort cellulaire et l'immunité innée. En effet, ces organelles sont proposées comme étant un point central rassemblant les divers stimuli afin d'ensuite activer les senseurs de l'immunité innée.

Les ROS sont l'un des régulateurs principaux de l'inflammasome NLRP3, en autres via leur induction de modifications post-traductionnelle, et les mitochondries sont la principale source de ceux-ci. En effet, la chaîne de transport des électrons mitochondriale génère une faible concentration de ROS dans des conditions normales, qui peut être régulée par divers antioxydants. Toutefois, lors de conditions de stress, cette production est augmentée. Il a été démontré que tous les potentiels activateurs de l'inflammasome NLRP3 mènent à la production de ROS et que la séquestration de ceux-ci bloque l'activation de l'inflammasome (Dostert *et al.*, 2008; Petrilli *et al.*, 2007). De plus, les ROS mitochondriaux produit par les mitochondries dysfonctionnelles ont été démontrés comme étant la source principale de ROS permettant l'activation de l'inflammasome (Nakahira *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). L'inhibition du complexe I de la chaîne de transport des électrons par la rotenone engendre une perte partielle du potentiel membranaire de la mitochondrie ainsi qu'une forte production de ROS et l'inhibition du complexe III par l'antimycine A mène à un résultat similaire, permettant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Zhou *et al.*, 2011). Les perturbations de la chaîne respiratoire semblent donc affecter la voie de l'inflammasome. En autres, l'induction de l'inflammasome NLRP3 par la nigericine ou l'ATP, ou encore l'activation de AIM2, démontre une dépolarisation de la mitochondrie et induit des mtROS. Ces ROS sont également capables de réguler le clivage de GSDMD via la modulation de l'activité de la caspase-1 (Wang *et al.*, 2019b). En plus d'une augmentation de ROS, une diminution de K<sup>+</sup> cytoplasmique permet l'activation de NLRP3. Les traitements avec de l'ATP ou la nigericine engendrent la diminution de la concentration de potassium dans le cytoplasme, menant à l'activation de l'inflammasome (Mariathasan *et al.*, 2006; Perregaux & Gabel, 1994). Il est connu que la mitochondrie possède plusieurs canaux K<sup>+</sup> importants pour ses fonctions et ceux-ci pourraient être responsables de la fluctuation du potassium intracellulaire lors de l'activation de l'inflammasome (Heinen *et al.*, 2007).

L'autophagie est également un processus important afin de réguler l'inflammasome. En effet, les mitochondries, en réponse à des stimuli de stress, vont produire plus de ROS, qui sont nocifs pour la cellule. Ainsi, l'autophagie des mitochondries endommagées, un processus appelé mitophagie, permet de retirer celles-ci. L'ablation des modulateurs de l'autophagie LC3B ou Beclin 1 résulte en une augmentation de l'activité de l'inflammasome NLRP3 suite au traitement des macrophages avec de l'ATP (Nakahira *et al.*, 2011). Le récepteur NOD2 et l'adaptateur RIPK2 ont également été démontrés dans la promotion de la mitophagie et la régulation de l'inflammasome après l'infection par le virus Influenza, où RIPK2 permet la phosphorylation de ULK1, initiant la formation de l'autophagosome (Lupfer *et al.*, 2013). L'activation de la caspase-1 par l'inflammasome inhibe la mitophagie et augmente les dommages mitochondriaux, agissant ainsi via une boucle de rétroaction positive (Yu *et al.*, 2014). Ces mécanismes autophagiques permettent ainsi de réguler la présence de ligands pour l'inflammasome. Ce rôle de la mitophagie peut également être observé dans plusieurs maladies, dont la maladie de Parkinson, où des mutations de PINK1 et PARKIN peuvent être détectés. PINK1 et PARKIN sont importantes pour l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles via la mitophagie (Geisler *et al.*, 2010b). En effet, PINK1 est une protéine normalement dégradée par les mitochondries saines. Toutefois, un déséquilibre dans le potentiel membranaire mitochondrial mène à l'accumulation de PINK1 à la surface mitochondriale, favorisant le recrutement de PARKIN, qui ubiquitine plusieurs protéines localisées à la membrane mitochondriale externe, dont VDAC1, menant à la mitophagie des mitochondries dysfonctionnelles (Geisler *et al.*, 2010a; Narendra *et al.*, 2008). La modulation des canaux ioniques VDAC (*voltage-dependent anion selective channel*) affecte aussi l'activité de l'inflammasome. Ceux-ci sont des canaux importants pour la génération de ROS et l'échange de métabolites et d'ions entre les mitochondries et d'autres compartiments, dont le réticulum endoplasmique (RE). La diminution des canaux VDAC affecte l'activation de la caspase-1, mais ceci est spécifique à l'inflammasome NLRP3 et n'est pas impliqué pour la voie AIM2 (Zhou *et al.*, 2011).

La mitochondrie semble également être une structure importante lors de l'activation de l'inflammasome. Des évidences démontrent que NLRP3 et ASC co-localisent à la mitochondrie, spécifiquement aux sites associés au réticulum endoplasmique, soit les MAMs (*mitochondria-associated ER membranes*). Les MAMS constituent donc un type de synapse intracellulaire essentielle permettant de lier les fonctions mitochondriales aux signaux de danger (Zhou *et al.*, 2011). Il a également été démontré que l'inflammasome NLRP3 se lie aux cardiolipines, des phospholipides spécifiques à la mitochondrie (Iyer *et al.*, 2013). La translocation de NLRP3 actif à la mitochondrie entraîne la perte de l'intégrité mitochondriale et ceci est une étape importante afin d'induire la mort pyroptotique (Wang *et al.*, 2019b). La protéine GSDMD est également retrouvé à

la mitochondrie et son domaine N-terminale formant des pores a été retrouvé aux sites enrichies de cardiolipines des mitochondries (Ding *et al.*, 2016). Celle-ci peut induire des pores dans la membrane mitochondriale, affectant directement cette organelle et facilitant la sécrétion de plusieurs composés induisant des cascades de signalisation de danger, dont le cytochrome c (Rogers *et al.*, 2019).

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) est un événement classiquement reconnu comme point de non-retour de multiples cascades de signalisation menant à la mort cellulaire, majoritairement dans l'apoptose. Toutefois, cette perméabilisation a également des effets sur la voie de l'inflammasome. MOMP est engendrée par l'oligomérisation des protéines BAX (*B-cell lymphoma 2 associated X*) et BAK (*B-cell lymphoma 2 antagonist killer*) dans la membrane externe de la mitochondrie, formant des pores qui permettent la sécrétion du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c facilite ensuite l'assemblage de l'apoptose, menant à l'activation de la caspase-9 et la subséquente activation de la caspase-3 (Li *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2001). Ce processus est interrelié avec les voies de la pyroptose. En effet, l'oligomérisation de BAX/BAK est initiée lorsque la protéine BID (*BH3 interacting domain death agonist*) est clivée par la caspase-1 et la caspase-8 (Tsuchiya *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2014). Cette perméabilisation entraîne des dommages et la sécrétion de l'ADN mitochondrial, ce qui peut servir de boucle de rétroaction positive afin d'augmenter l'activité de l'inflammasome (Nakahira *et al.*, 2011; Shimada *et al.*, 2012). Le potentiel membranaire mitochondrial est donc important afin de réguler les réponses inflammatoires. Celui-ci peut également être modulé directement par des virus. En effet, la protéine M2 du virus IAV, un canal ionique sélectif pour les protons, mène à la diminution du potentiel membranaire mitochondriale et permet ainsi à la cellule de reconnaître et réagir au virus (Ichinohe *et al.*, 2010; Ilyinskii *et al.*, 2007).

Plusieurs protéines mitochondriales ont également des rôles clés dans la réponse immunitaire. La protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) est une molécule adaptatrice requise pour transmettre les réponses IFN et les événements à la suite de l'activation des senseurs RIG-I et MDA-5. Celle-ci est localisée à la mitochondrie et implique que cette organelle joue un rôle dans l'immunité innée (Seth *et al.*, 2005). MAVS est requise pour le recrutement de l'inflammasome NLRP3 à la mitochondrie en réponse à des stimuli comme l'ATP et la nigericine (Subramanian *et al.*, 2013). Elle peut également lier et inhiber VDAC1 (Guan *et al.*, 2013). Il y a également la protéine HTRA2 (*high temperature requirement protein A2*), démontrée pouvant activer les caspases apoptotiques une fois dans le cytoplasme (Srinivasula *et al.*, 2003). HTRA2 est une sérine protéase mitochondriale qui est relâchée lors de l'apoptose. Des mutations

de cette protéine chez l'humain et chez la souris entraîne une neurodégénérescence infantile fatale (Bogaerts *et al.*, 2008; Plun-Favreau *et al.*, 2007). HTRA2 a également été démontré être impliquée dans la régulation négative des inflammasomes NLRP3 et AIM2 de manière dépendante de son activité protéase. En effet, elle permet d'empêcher l'accumulation d'oligomères de la protéine adaptatrice ASC via l'autophagie (Rodrigue-Gervais *et al.*, 2018).

Ces mécanismes mettent en évidence que les mitochondries sont au cœur des voies pyroptotiques. Ainsi, puisque ces organelles sont importantes dans la régulation et le contrôle de l'activation de l'inflammasome, notre équipe de recherche s'est penché sur l'étude de potentielles protéines mitochondriales comme régulateurs négatifs de l'inflammasome. Pour ce faire, nous avons tout d'abord effectué un criblage sur plus de 7 000 gènes droguables afin de détecter la présence de modulateurs, positifs et négatifs, dans les cellules infectées par le paramyxovirus Sendai, un virus respiratoire murin activant l'inflammasome AIM2. Un séquençage d'ARN a également été effectué après 6 et 18 heures d'infection afin de confirmer la présence basale et la modulation de l'expression des gènes par l'infection (Gilbert *et al.*, En préparation).

De ce criblage, nous avons identifié un régulateur négatif potentiel de l'inflammasome, soit la protéine mitochondriale 3-mercaptopyruvate sulfurotransférase (MPST) (Rodrigue-Gervais *et al.*, 2018).

## 1.6 Sulfure d'hydrogène : plus qu'un gaz nauséabond

La protéine MPST a attiré notre attention principalement car elle est l'une des 3 enzymes cellulaires produisant du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et ce dernier a été démontré comme étant capable de réguler l'inflammasome. Le sulfure d'hydrogène est le 3<sup>e</sup> gasotransmetteur connus, avec l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO). Ce gaz était considéré pendant très longtemps comme une simple molécule toxique avec une odeur nauséabonde d'œuf pourri avant que son implication dans la signalisation cellulaire soit démontrée. Celui-ci est synthétisé à partir de la L-cystéine par 3 enzymes, soit la cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) (codé par le gène CTH), la cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) et la 3-mercaptopyruvate sulfurotransférase (MPST).

L'enzyme CBS est strictement cytoplasmique, alors que les enzymes CSE et MPST peuvent être également retrouvées à la mitochondrie. En effet, en condition de stress, l'enzyme CSE peut se relocaliser à la mitochondrie (Fu *et al.*, 2012). Ce mécanisme permet de promouvoir la production d'H<sub>2</sub>S à la mitochondrie, aidant à la production d'ATP. MPST, quant à elle, possède 2 isoformes, soit un de 297 acides aminés et de 33 kDa situé à la mitochondrie et au cytoplasme et un autre de 317 acides aminés et de 35 kDa situé seulement au cytoplasme. Sa localisation

principale est à la mitochondrie (Nagahara *et al.*, 1998). De plus, les macrophages alvéolaires murins ainsi que les monocytes humains contiennent principalement l'enzyme MPST, versus CBS et CSE, selon la base de données Immgen (Tomita *et al.*, 2016).

L'enzyme MPST requiert la cystéine aminotransférase (CAT), afin de générer du H<sub>2</sub>S. Cette dernière possède 2 isoformes, soit une cytoplasmique codée par le gène *GOT1* (*glutamic-oxaloacetic transaminase*) et une mitochondrial codée par le gène *GOT2*. L'enzyme CAT mitochondriale catalyse la transamination entre la L-cystéine et l' $\alpha$ -kétoglutarate, produisant du 3-mercaptopyruvate et du L-glutamate. MPST transfère ensuite le sulfure du 3-mercaptopyruvate à des acides sulfureux pour produire du pyruvate et du thiosulfate, ce qui est finalement réduit en H<sub>2</sub>S en présence de glutathione réduit (GSH) (Figure 1.6) (Ubuka *et al.*, 1992). MPST requiert la présence d'une substance réductrice afin de produire du H<sub>2</sub>S, comme la thiorédoxine (Mikami *et al.*, 2011). Le H<sub>2</sub>S mitochondrial peut ensuite être utilisé par la sulfide quinone oxydoréductase (SQR), qui va l'oxyder et l'utiliser comme donneur d'électrons pour le complexe de la chaîne de transport d'électrons. Les électrons vont en effet être transférés à la coenzyme oxydée Q (CoQ), puis transféré à l'oxygène par les complexes mitochondriaux III et IV ou transféré à la nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD<sup>+</sup>) par transport d'électrons inverse (RET, *reverse electrons transport*) au complexe mitochondrial I (Lagoutte *et al.*, 2010).

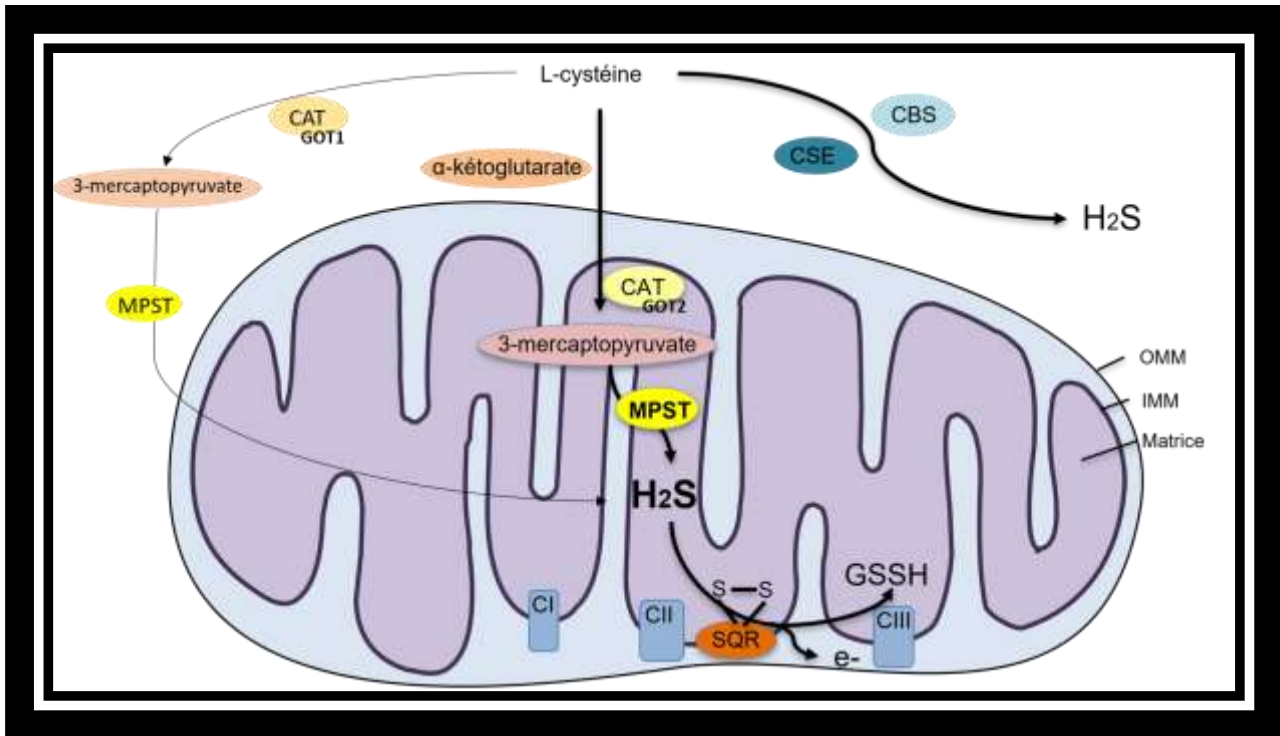


Figure 1.6 Voie de synthèse du sulfure d'hydrogène

La L-cystéine est utilisée par 3 enzymes cellulaires afin de générer du sulfure d'hydrogène. L'enzyme CBS se retrouve strictement au cytoplasme, CSE au cytoplasme, mais peut se relocaliser à la mitochondrie en cas de stress, et MPST est principalement située à la mitochondrie, mais se retrouve aussi au cytoplasme. L'enzyme MPST utilise le 3-mercaptopyruvate comme substrat afin de produire du H<sub>2</sub>S mitochondrial. Le 3-mercaptopyruvate est synthétisé à partir de la L-cystéine et de l' $\alpha$ -kétoglutarate par la cystéine aminotransférase. Le H<sub>2</sub>S mitochondrial peut être utilisé par l'enzyme SQR de chaîne de transport d'électrons afin de générer des polysulfides. Créée avec BioRender.

Le H<sub>2</sub>S est connu comme agent antioxydant. En effet, celui-ci permet d'augmenter le transport de cystine dans les cellules grâce à l'antiport glutamate/cystine. La cystine est réduite dans les cellules en cystéine et peut ensuite s'incorporer dans le glutathione, un tripeptide composé de glutamate, cystéine et glycine. Ainsi, la modulation de l'antiport par le H<sub>2</sub>S augmente la synthèse de glutathione (Kimura & Kimura, 2004). Le glutathione est l'antioxydant intracellulaire principale. Les polysulfides jouent un rôle similaire au H<sub>2</sub>S. Ceux-ci comprennent entre autres la glutathione polysulfide (GSSH), un agent réducteur qui peut être produit par l'addition d'un atome de sulfure provenant du H<sub>2</sub>S au glutathione par l'enzyme SQR de la mitochondrie (Libiad *et al.*, 2014).

Les effets principaux du H<sub>2</sub>S sont modulés par sa capacité à induire la modification post-traductionnelle de protéines cibles. Celui-ci agit par S-sulfhydrylation (aussi référée comme S-persulfhydrylation), une modification caractérisée par l'ajout d'un sulfhydryle au côté thiol d'un résidu cystéine dans la protéine cible. Cette modification médie la plupart des fonctions cellulaires induites par le H<sub>2</sub>S et il est prédit que près du tiers des protéines cellulaires peuvent être S-sulfhydratées



(Mustafa *et al.*, 2009). Ainsi, le H<sub>2</sub>S sert d'agent réducteur et peut affecter les liens cystéine disulfure, changeant la conformation et l'activité d'enzymes, de canaux et de récepteurs.

Ce gaz joue toutefois un rôle à double tranchant. La concentration et la vitesse de sécrétion du H<sub>2</sub>S sont des facteurs clés afin de déterminer si le H<sub>2</sub>S agit comme anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire. En effet, le sulfure d'hydrogène possède des effets variés, où une concentration faible de ce gaz est caractérisée par des effets modulateurs, permettant d'agir comme antioxydant, anti-inflammatoire et augmente la respiration mitochondriale, alors qu'une concentration forte induit des effets inverses, générant des réponses cytotoxiques et un effet pro-oxydant, pouvant inhiber le complexe IV de la chaîne de transport mitochondriale et diminuer la viabilité cellulaire (Groeger *et al.*, 2012; Matallo *et al.*, 2014; Petersen, 1977). Il existe divers donneurs de H<sub>2</sub>S exogène utilisé pour étudier le rôle de ce gaz. D'une part, il y a les donneurs à relâchement rapide, dont les sels de NaHS et Na<sub>2</sub>S, et de l'autre, ceux à relâchement lent comme le GYY4137 (Powell *et al.*, 2018).

Au départ, le H<sub>2</sub>S a été étudié pour son effet vasorelaxant. En effet, il peut entraîner l'ouverture des canaux K<sub>ATP</sub>, engendrant l'hyperpolarisation des membranes des muscles lisses, menant à leur relaxation (Zhao *et al.*, 2001). Le H<sub>2</sub>S peut aussi réguler l'apoptose via la modulation du facteur NF-κB et stimuler la sécrétion d'IL-10 (Du *et al.*, 2014; Lohninger *et al.*, 2015). Le TNF-α permet la liaison d'un facteur de transcription au promoteur de l'enzyme CSE, engendrant la production de H<sub>2</sub>S. Celui-ci peut ensuite sulphydrater la cystéine 38 de la sous-unité p65 de NF-κB, permettant la liaison de ce dernier avec le coactivateur ribosomal S3 (RPS3) (Sen *et al.*, 2012). Ce complexe se lie aux promoteurs de plusieurs gènes anti-apoptotiques, menant à la suppression de l'apoptose (Sen *et al.*, 2012). De plus, il peut sulphydrater la protéine Keap1, qui interagit et entraîne la subséquente translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), qui permet de réguler de nombreux antioxydants, dont la thiorédoxine (Calvert *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013a). Ce facteur est activé en autres lors de stress causé par les ROS et joue un rôle important dans la cytoprotection et la détoxification de ceux-ci (Itoh *et al.*, 1997). La diminution des ROS intracellulaires inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3, puisque les ROS permettent la dissociation de la thiorédoxine de sa protéine TXNIP. Cette dernière est connue pour lier le senseur NLRP3 et participer à son activation (Zhou *et al.*, 2010).

Les effets régulateurs du sulfure d'hydrogène sur les réponses inflammatoires ont également été bien démontrés. Il semble promouvoir la transition du profil M1 des macrophages vers M2, générant un contrôle sur la réponse pro-inflammatoire (Miao *et al.*, 2016). Il joue aussi un rôle dans la protection des neurones lors de stress oxydatif via son contrôle sur le niveau de glutathione (Kimura & Kimura, 2004). Une autre voie probable dans cette protection est l'élimination des ROS par le sulfure d'hydrogène. Effectivement, la mitochondrie est une source majeure de

ROS au niveau cellulaire. Le stress oxydatif engendrée par une forte présence de glutamate peut être modulé par la production de H<sub>2</sub>S. L'expression de l'enzyme mitochondriale MPST est résistante à ce stress, suggérant que la production de H<sub>2</sub>S par cette enzyme permettent de neutraliser les ROS au niveau mitochondrial (Kimura *et al.*, 2010). Le H<sub>2</sub>S exogène affecte aussi le stress oxydatif et l'inflammation au niveau pulmonaire chez la souris (Li *et al.*, 2013). L'inhibition de la synthèse endogène de H<sub>2</sub>S par CSE exacerbe l'inflammation aiguë des poumons, démontrant que le H<sub>2</sub>S joue un rôle protecteur par ces propriétés antioxydante et anti-inflammatoire (Ali *et al.*, 2018). Le rôle du H<sub>2</sub>S est donc proposé provenir en partie de l'atténuation des dommages oxydatifs et des signaux inflammatoires ainsi que de la régulation des fonctions mitochondriales. En effet, le H<sub>2</sub>S peut protéger la mitochondrie en médiant les fonctions de la sulfure quinone oxydoréductase SQR, la chaîne de transport des électrons et la synthèse de l'ATP (Módis *et al.*, 2013).

Le H<sub>2</sub>S a également été étudié dans des contextes de maladie, dont le SA-AKI (*sepsis-associated acute kidney injury*). Il a été démontré que le LPS, un activateur de l'inflammasome NLRP3 et qui est impliqué dans la pathogénèse de SA-AKI, diminue le niveau endogène du H<sub>2</sub>S et réduit l'activité de l'enzyme MPST au niveau du rein. L'ajout de H<sub>2</sub>S exogène améliore cependant les dysfonctions rénales en inhibant la réponse inflammatoire et le stress oxydatif engendré par l'inflammasome. Le H<sub>2</sub>S contribue dans ce modèle à la diminution de l'expression du TLR4, de NLRP3 et de la caspase-1 (Chen *et al.*, 2018). Le H<sub>2</sub>S est donc impliqué dans la voie de l'inflammasome. En effet, le H<sub>2</sub>S est capable d'inhiber la voie TLR4/NF-κB, l'un des mécanismes permettant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Luo *et al.*, 2017). L'activation de l'inflammasome NLRP3 mène à une inhibition de l'autophagie, mais le H<sub>2</sub>S exogène permet de promouvoir l'autophagie via la voie AMPK/mTOR (*AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin*) (Wang *et al.*, 2017a). De plus, le traitement des cellules avec du H<sub>2</sub>S exogène, soit du sulfure de sodium (NaHS), inhibe l'activation de la caspase-1 et la production d'IL-1β suite à l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 par un traitement LPS et ATP (Wu *et al.*, 2019). Ces effets sont dû à la modification post-traductionnelle de la protéine c-Jun par le H<sub>2</sub>S via la S-sulfhydrate de la cystéine 269. Ceci entraîne une diminution de la production de mtROS et donc une diminution de ligand pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lin *et al.*, 2018). Le H<sub>2</sub>S peut aussi réguler l'inflammasome NLRP3 par la voie de l'oxydase xanthine (XO). L'activité de XO est inhibée par le H<sub>2</sub>S exogène, via le donneur GYY4137, menant ainsi à une diminution de la subséquente génération de ROS et à la diminution de l'activité de l'inflammasome. Le rôle du H<sub>2</sub>S endogène dans cette voie de signalisation a été aussi confirmé. Les cellules déficientes pour l'enzyme CSE démontre une activité de XO plus élevée ainsi qu'une augmentation dans la génération de mtROS. Cette déficience mène à une augmentation de l'oligomérisation de ASC et

de l'activité de la caspase-1. Les effets du H<sub>2</sub>S ne sont pas spécifiques à l'inflammasome NLRP3, puisqu'il a aussi été démontré comme régulateur de l'inflammasome AIM2 (Castelblanco *et al.*, 2018).

Les donneurs de H<sub>2</sub>S possèdent également des propriétés antivirales. Le donneur GYY4137, à des concentrations de 5-10 mM, permet d'inhiber la réplication du virus Influenza in vitro. De plus, les souris déficientes pour l'enzyme CSE développent une réponse immunitaire plus sévère à la suite de l'infection par le virus RSV et l'administration de GYY4137 est suffisante pour inhiber la réplication du virus et contrôler l'inflammation pulmonaire (Bazhanov *et al.*, 2018; Ivanciuc *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015). Toutefois, l'utilisation de ce composé nécessite une concentration élevée qui ne serait pas idéal pour des traitements chez l'humain.

Le H<sub>2</sub>S affecte donc plusieurs voies de signalisation, modulant des mécanismes immunologiques et inflammatoires. La régulation simultanée de plusieurs voies d'inflammation ou de mort cellulaire peut être plus efficace que de cibler une seule voie qui pourrait être évité ou remplacé par des mécanismes de compensation. En effet, ces mécanismes de compensation peuvent être retrouvés dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, comme lors de la pyroptose, où l'absence de la caspase-1 mène à l'activation de la caspase-8 par les oligomères d'ASC (Pierini *et al.*, 2012).

## 1.7 Hypothèse de recherche

Sachant que la régulation des inflammasomes, et donc de la mort pyroptotique, est importante dans la survie des macrophages alvéolaires lors d'infection virale et que la protéine mitochondriale MPST a été identifiée comme un régulateur potentiel de la formation d'oligomères de ASC après une infection par un virus ARN, nous proposons que celle-ci, via sa production de sulfure d'hydrogène mitochondriale, peut réguler l'activation de l'inflammasome et agir en tant qu'inhibiteur de la mort cellulaire pyroptotique (Gilbert *et al.*, En préparation). En effet, le H<sub>2</sub>S joue un rôle dans plusieurs cascades de signalisation cellulaire et semble interférer avec la signalisation de l'inflammasome, autant au niveau de protéines comme NF-κB ou c-Jun qu'au niveau du signal d'activation par les ROS. Ce gaz permet également de moduler l'oligomérisation d'ASC et l'absence de l'enzyme CSE, qui produit également du H<sub>2</sub>S et peut se retrouver à la mitochondrie, mène à une augmentation de l'activité de la caspase-1 et de la sécrétion d'IL-1β (Castelblanco *et al.*, 2018)

Mon projet de maîtrise était donc de déterminer si le H<sub>2</sub>S mitochondrial, produit par l'enzyme MPST, peut réguler l'induction de la pyroptose par l'inflammasome et si tel est le cas, par quel mécanisme.

## 2 Matériels et méthodes

---

### 2.1 Culture cellulaire et différenciation

#### *HEK293T-ASC*

Des cellules humaines embryonniques du rein (HEK) 293T possédant une protéine ASC couplée à une GFP ont été utilisées (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complet (10% sérum bovin fœtal (FBS) inactivé, 1% L-glutamine (L-Glu), 1% pénicilline/streptomycine (pen/strep), 1% acides aminés non essentiels (NEAA)) à une concentration de 300 000 cellules/puits dans une plaque de 6 puits prétraitée avec de la poly-lysine (*Sigma, P1399*) (Rodrigue-Gervais *et al.*, 2018). Celles-ci ont été utilisées pour effectuer le criblage et le séquençage d'ARN.

#### *THP-1*

Des monocytes humains THP-1 (*ATCC, TIB-202*) ont été cultivées dans un milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) complet (10% FBS inactivé, 1% pen/strep, 1% NEAA, 1% L-Glu, 1% sodium pyruvate (NaPyr)) à une concentration de 50 000 cellules/puits et ont été différenciées en macrophages avec 25 nM de phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA, *Sigma #P1585*) durant 48 heures dans une plaque noire à fond transparent de 96 puits (Greiner Bio-One CellStar  $\mu$ Clear, 07000061). Le PMA a été resuspendu dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), aliquoté et conservé à -30°C. La dose utilisée a été choisie suite à une optimisation. Après la différenciation, le milieu a été changé pour du HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) complet (10% FBS inactivé, 1% pen/strep, 1% NEAA, 1% NaPyr) avant les différents traitements. Ces cellules ont été utilisées pour observer la formation de pores pyroptotiques en cinétique, l'activité catalytique de la caspase-1 suite à la stimulation d'inflammasome et le clivage de la protéine gasdermine D.

#### *THP-1-ASC*

Des monocytes humains THP-1 possédant une protéine ASC couplée à une GFP ont été utilisés pour l'observation des oligomères d'ASC en microscopie à épifluorescence (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007). Celles-ci ont été cultivées comme les THP-1.

### 2.2 siRNA et lentivirus

Une banque de petits ARN interférents (siRNA) ciblant des gènes droguables connus a été utilisée pour le criblage. Les cellules HEK293T-ASC ont donc été transduites puis infectées 72

heures après avec le virus Sendai. L'observation de la formation de l'inflammasome via une plateforme de microscopie automatisée a été effectuée 18 heures après l'infection.

Les shRNA ciblant MPST proviennent de MISSION Sigma et les clones ID sont : MPST1 : TRCN0000036139, MPST2 : TRCN0000036142 et MPST3 : TRCN0000036141. MPST1 cible la région 3'UTR, alors que MPST2 et MPST3 ciblent la région CBS. Ceux-ci ont été validés dans le modèle cellulaire A549. Les plasmides shRNA ont été transfectés avec du polyéthylèneimine (PEI) à un ratio 3 :1 dans des cellules HEK293T à 2,5 µg d'ADN avec les plasmides psPAX2 (gag/pol) et pMD2.G (VSV-G enveloppe) à un ratio 3 :1 :3. Le surnageant a été récolté à 48h et 72h post-transfection et gardé à -80 °C. Les lentivirus ont ensuite été titrés dans des Hela Kyoto. Les cellules THP-1 ont été transduites à une MOI de 1 et sélectionnées durant 12 jours avec de la puromycine à 2 µg/ml avant d'être utilisées pour les expériences de cinétique.

### 2.3 Activation des inflammasomes

Pour activer l'inflammasome NLRP3, une dose de 20 µM de nigericine (*InvivoGen, tlr1-nig*) a été préparée dans du milieu HBSS complet et administrée à des THP-1 différenciés en macrophages. Des puits contrôles ont reçus l'inhibiteur de NLRP3, MCC950, à 1 µM (*InvivoGen, inh-mcc*) ou l'inhibiteur catalytique de la caspase-1, VX765, à 100 µM (*MedChemExpress, HY-13205*) 30 minutes avant la stimulation de l'inflammasome NLRP3. La nigericine est une toxine microbienne dérivée de la bactérie Gram positive *Streptomyces hygroscopicus*. Celle-ci agit en tant qu'ionophore de potassium, permettant un efflux de K<sup>+</sup> intracellulaire et la subséquente activation de l'inflammasome NLRP3 (Muñoz-Planillo *et al.*, 2013). L'inhibiteur MCC950 interagit directement avec le domaine NACHT de NLRP3, bloquant l'hydrolyse de l'ATP et donc la formation de l'inflammasome NLRP3 (Coll *et al.*, 2019). VX765, quant à lui, agit par modification covalente du résidu catalytique cystéine dans le site actif de la caspase-1 (Wannamaker *et al.*, 2007). L'inflammasome CARD8 a été stimulé par le talabostat (*Cayman, 29007*) à une concentration de 1 µM dans du HBSS complet, alors que l'inflammasome AIM2 a été activé par transfection de 0.625 µg/ml d'un analogue synthétique d'ADN-B (poly(dA:dT), *Sigma, 86834-22-2*) complexé avec 2.5 µl/ml de lipofectamine 2000 (*Invitrogen, P/N52887*) dilué dans du PBS. Le talabostat inhibe les dipeptidyl peptidases DPP8/9, inhibant leur liaison avec le senseur CARD8 et permettant ainsi l'activation de ce dernier (Zhong *et al.*, 2018a). La transfection de l'ADN poly(dA:dT) est reconnue par le senseur cytosolique AIM2.

Ces différents agonistes et le contrôle négatif (milieu sans agoniste) d'inflammasomes canoniques ont été ajoutés dans chaque puit 96 correspondant juste avant l'ajout du marqueur

propidium iodide (PI, *Invitrogen, P1304MP*), à une concentration finale de 5  $\mu\text{M}$ . Ce marqueur fluorescent rouge peut entrer dans la cellule par les pores membranaires et lie l'ADN en s'intercalant entre les bases. Ensuite, la plaque a été centrifugé 5 minutes à 1 200 rpm à 37 °C et a été par la suite mise dans le lecteur de plaque TECAN SPARK durant 5 minutes à 37°C (pour équilibration) avant de lancer la lecture de la fluorescence à une longueur d'onde de 535 nm durant une cinétique de 24 heures à 37°C. La lecture de la fluorescence a été effectuée par-dessous la plaque à toutes les 15 minutes.

Les doses utilisées ont été choisies suite à des optimisations. L'agoniste nigericine a été resuspendu dans de l'éthanol 99%, le poly(dA:dT) dans de l'eau sans endotoxine et le talabostat dans du DMSO. Les inhibiteurs MCC950 et VX765 ont également été resuspendu dans du DMSO. Les composés ont ensuite été aliquotés et ont été conservés à - 30 °C.

## **2.4 Microscopie épifluorescence**

Les THP-1-ASC différenciés en macrophages ont été traitées 1 heure avec l'AP39 ou l'I3MT-3, à 50 et 54,4  $\mu\text{M}$  respectivement, puis avec 20  $\mu\text{M}$  de nigericine durant 30min, 1h ou 2h. Les cellules ont ensuite été fixées avec du formaldéhyde 2,7 % durant 20 minutes. Le milieu a été retiré et une lamelle a été ajouté avant de passer en microscopie épifluorescence (*Nikon Eclipse E800M*).

## **2.5 Inhibiteur de la protéine MPST et donneurs de sulfure d'hydrogène**

L'inhibiteur catalytique de MPST, I3MT-3 (*SelleckChem, 459420-09-8*), a été utilisé à une dose de 54.4  $\mu\text{M}$  1 heure avant l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cette dose a été choisie suite à une optimisation. Ce composé est perméable et cible un résidu cystéine persulfuré dans le site actif de MPST (Hanaoka *et al.*, 2017). Le donneur GYY4137 (*MedChemExpress, HY-107682*) a été ajouté à des doses entre 1  $\mu\text{M}$  et 1 mM 1 heure avant le traitement avec la nigericine. Le donneur mitochondrial AP39 (*Sigma, 1429061-80-2*) a, quant à lui, été ajouté 1 heure avant l'activation de l'inflammasome à des doses de 30 et 60  $\mu\text{M}$ . Toutes ces drogues ont été resuspendu dans du DMSO. Elles ont ensuite été aliquotées et ont été gardées à -80 °C pour l'I3MT-3 et le GYY4137 et à -30 °C pour l'AP39. Les concentrations finales de DMSO pour l'I3MT-3 ne dépasse pas le 0,5 %, alors que l'AP39 utilisé à 50  $\mu\text{M}$  apporte la concentration finale à 1,8 % et le GYY4137 utilisé à 1 mM, à 12,5 %.

## 2.6 Activité catalytique de la caspase-1

L'activité catalytique de la caspase-1 a été détectée dans les lysats cellulaires ainsi que dans le surnageant grâce à l'ensemble Caspase-Glo 1 (*Promega G9951*). Après la différenciation des THP-1, le milieu a été retiré et 50 µl de RPMI a été ajouté aux puits avant le traitement avec 25 µl d'AP39 à 50 µM durant 1 heure ou de VX765 à 100 µM durant 30 minutes, avant la stimulation de l'inflammasome NLRP3 par 25 µl de nigericine à 20 µM durant 30 minutes. Le surnageant a ensuite été retiré et 50 µl de celui-ci a été transféré dans un puit vide, alors que 50 µl de milieu RPMI complet a été ajouté aux puits de cellules. Le mélange de Caspase-Glo 1 a ensuite été ajouté aux puits de cellules et à ceux de surnageant dans un ratio de 1 :1, donc 50 µl/puit, pour un volume final de 100 µl/puit. Ce mélange contient un inhibiteur de protéasome, MG-132, éliminant le clivage non spécifique du substrat par le protéasome. Par la suite, la plaque a été incubée à température ambiante durant 1 heure et puis le contenu des puits a été transféré dans une plaque 96 puits blanche (*Greiner Bio-One LUMITRAC 200, 07000130*) avant de lire la luminescence par le lecteur de plaque TECAN.

## 2.7 Western Blot

Les cellules ont été récoltées dans un eppendorf, centrifugées à 1 200 rpm durant 5 minutes, puis resuspendues dans du tampon SDS (62,6 mM Tris-Cl (pH 6,8), 1% SDS, 10% glycérol, 0,003% bromophénol bleu et 5% β-mercaptoéthanol frais) pour les lyser. Les gels de 10,5% d'acrylamide ont été chargés avec 40 µl d'échantillons, soit environ 5 µg de protéines (chargement des puits de manière égale et vérification par une protéine *loading control* de l'uniformité). Ceux-ci ont ensuite été migrés à 120 V durant 45-60 minutes. Les gels ont ensuite été transférés sur une membrane de nitrocellulose de 0,2 µm (*GE Healthcare Life Science, #10600004*) à 70 V durant 1h30. Les membranes ont été bloquées 1 heure dans du PBS 5% de poudre de lait (*BioShop, SKI400.500*) à température pièce et incubées dans l'anticorps primaire durant la nuit à 4 °C dans du PBS 5% albumine de sérum bovin (BSA) (*BioShop, ALB001.250*). La membrane a ensuite été lavée 4 fois 5 minutes dans du PBS tween 0,05%. L'anticorps secondaire a été mis dans du PBS-5% lait à une concentration de 1/5000 et la membrane a été incubée durant 1 heure. Les anticorps utilisés sont un anti-gasdermine D clivé (Asp275) #36425 de 30 kDa de lapin, clone E7H9G (*Cell Signaling technology*), soit le segment généré par le clivage par la caspase-1, à une concentration de 1/1000, l'anticorps anti-gasdermine D total de lapin monoclonal (*Cell Signaling Technology, E9S1X*) à une concentration de 1/1000, un anticorps MPST monoclonal de souris (H-11) (*Santa Cruz Biotechnology*) utilisé à une concentration de 1/500, ainsi qu'un anti-GAPDH de lapin

polyclonal (*Sigma*, G9545) à une concentration de 1/5000. Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane a été lavée 5 fois 5 minutes avec du PBS tween 0,05%. L'expression des protéines a ensuite été détectée par la chimiluminescence augmentée (ECL) (*Perkin Elmer*, ORT2755, ORT2655) sur un ChemiDoc (*BioRad*).

## 2.8 Analyses

Les analyses bio-informatiques du séquençage d'ARN ont été effectuées selon les pipelines de GenPipes (Bourgey *et al.*, 2019). L'expression différentiel des gènes a été calculée avec les suites de logiciels DEseq2 et edgeR de Bioconductor (v. 3.5) dans R (version 3.5- R Core Team, 2019). L'interprétation des résultats de l'incorporation du PI a été effectuée entre 2 et 5 heures pour la stimulation de l'inflammasome NLRP3, 20 heures pour l'inflammasome CARD8 et 8 heures pour AIM2 sur la cinétique de 24 heures. Ces temps ont été déterminés comme étant les points d'activation optimaux de l'incorporation du PI dans la condition contrôle positive pour l'activation de l'inflammasome et les résultats des traitements ont été normalisés selon cette condition. Les analyses statistiques pour les cinétiques de fluorescence et les lectures de luminescence ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism 9 avec des analyses ANOVA, avec des tests multiples Holm-Sidak's. Les valeurs de p-value sont représentées ainsi : \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$ , \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



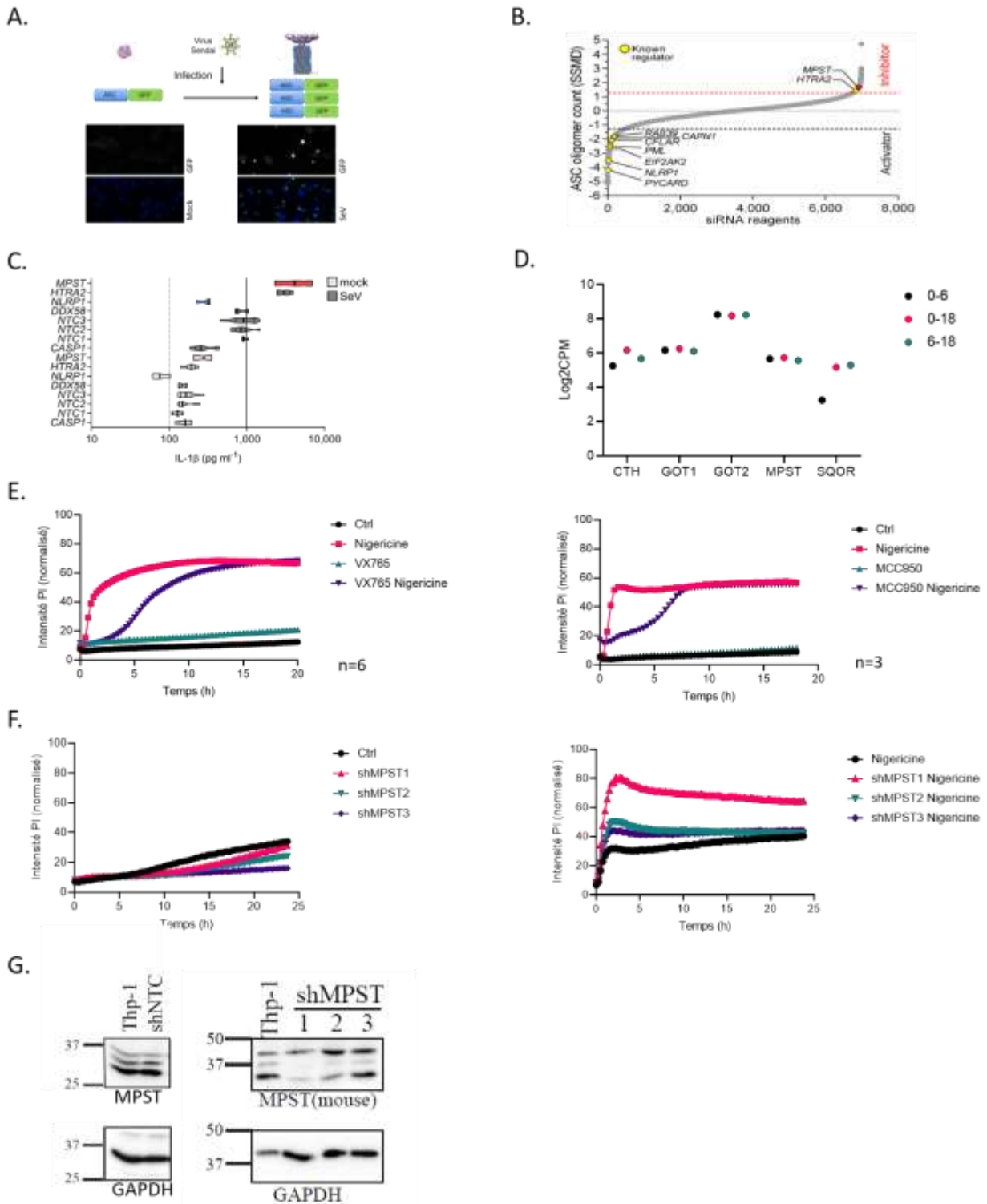


## 3 Résultats

---

### 3.1 Identification de la protéine MPST comme régulateur potentiel de l'inflammasome

Afin d'identifier des régulateurs de la signalisation de l'inflammasome lors d'infection virale, nous avons effectué un criblage sur des cellules HEK293T-ASC infectées par le virus Sendai. Les cellules étaient reconstituées pour exprimer une protéine adaptatrice ASC couplée à une protéine fluorescente verte GFP (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007). Ceci permet d'observer l'oligomérisation de cette protéine par microscopie à fluorescence. Ainsi, en absence d'infection, la protéine se retrouve dispersée dans le cytoplasme, alors que l'infection par le virus Sendai active l'inflammasome AIM2 et mène à l'oligomérisation de ASC, visible par des oligomères GFP dans les cellules (Figure 3a). Le criblage a permis de déterminer quels gènes ont un effet sur la formation de l'inflammasome. Ainsi, si les gènes ciblés par les siRNA régulent de manière négative la formation de l'inflammasome, l'inhibition de leur expression devrait mener à une augmentation des oligomères d'ASC observable à la suite de l'infection virale. De ce criblage, nous avons pu identifier plusieurs régulateurs déjà connus, dont la protéase mitochondriale HTRA2 (Rodrigue-Gervais *et al.*, 2018). Toutefois, la protéine MPST a ressorti comme un nouveau régulateur négatif de l'oligomérisation d'ASC et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  suite à l'infection par un respirovirus de la famille Paramyxoviridae, soit un virus ARN à polarité négative non segmenté (Figure 3b-c). En effet, la régulation négative de l'expression de cette protéine mène à une augmentation du nombre d'oligomères d'ASC et de la sécrétion d'IL-1  $\beta$ . À la suite de ce criblage, nous avons effectué un séquençage d'ARN sur les cellules infectées durant 6 heures ou 18 heures. Ceci nous a permis de déterminer si les gènes identifiés par le criblage sont bien exprimés de manière basal dans le modèle cellulaire et si l'expression de ceux-ci est affectée par l'infection. Entre autres, nous pouvons voir l'expression des différents gènes impliqués dans la production de sulfure d'hydrogène dans les cellules, comme CTH, qui code pour l'enzyme CSE, GOT1 et GOT2, codant pour CAT, ainsi que MPST et SQOR (Figure 3d).



**Figure 3.1** Identification de la protéine MPST comme modulateur de la pyroptose

A) Modèle expérimental pour l'identification de modulateurs potentiels de l'inflammasome. L'utilisation de cellules HEK293T-ASC permet d'observer par microscopie la formation d'oligomères à la suite d'une infection par le virus respiratoire murin Sendai. B) Nombre d'oligomères ASC après infection dans des HEK293T-ASC ciblées par des petits ARN interférents. Différents siRNA démontrent différents profils de modulation sur la formation d'oligomères d'ASC. C) Sécrétion d'IL-1 $\beta$  après infection avec le virus Sendai dans des HEK293T-ASC ciblées par siRNA. D) Modulation de l'expression de gènes mitochondriaux lors d'infection virale. Log2CPM est le niveau d'expression normalisé provenant du séquençage d'ARN à 0, 6 et 18h post-infection. E) Cinétique d'incorporation du PI lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Courbes représentant la moyenne. F) Cinétique d'incorporation du PI lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 en absence de la protéine MPST. Courbes représentant la moyenne. G) Efficacité des lentivirus. Expression de la protéine MPST après transduction de lentivirus.

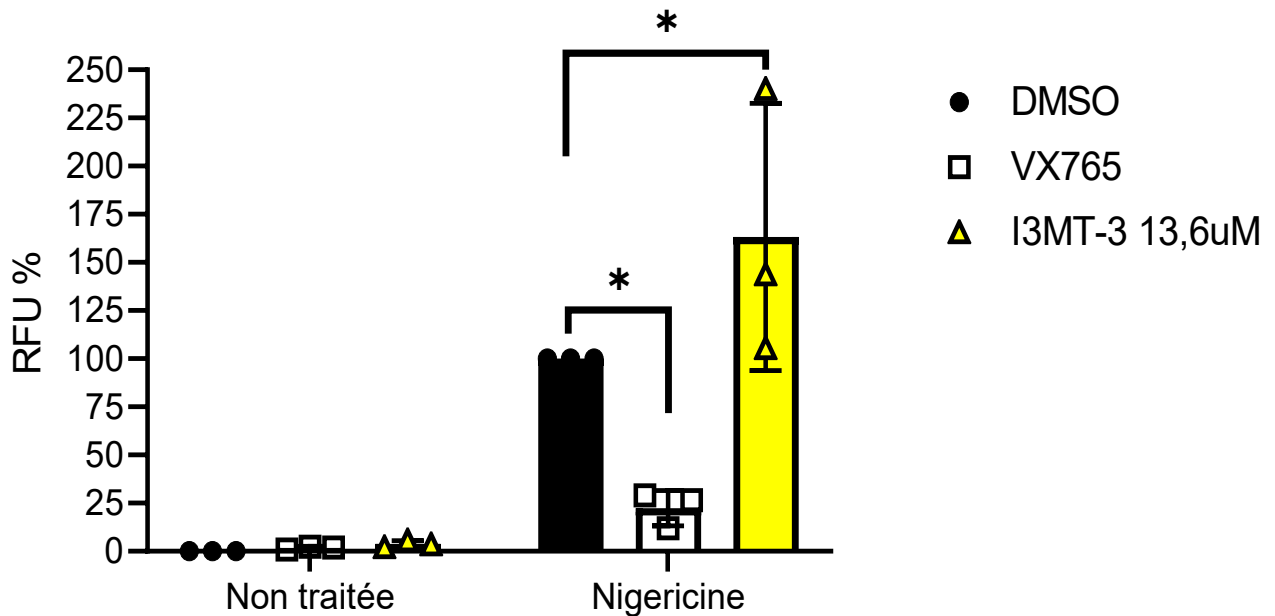
### 3.2 Activation de l'inflammasome NLRP3

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activation de la voie NLRP3 dans notre modèle cellulaire. Pour ce faire, nous avons mesuré en cinétique l'intensité de l'incorporation du PI après stimulation des macrophages humains THP-1 avec la nigericine. Nous pouvons voir que les cellules contrôles, soit non traitées, n'incorpore pas le marqueur fluorescent, alors que la stimulation par la nigericine permet une augmentation de plus de 50% du signal (Figure 3.1e). Ensuite, afin de s'assurer que l'incorporation du PI dans les cellules est bien dû à l'activation de l'inflammasome NLRP3, nous avons utilisé l'inhibiteur spécifique de la caspase-1, soit le VX765, et celui du senseur NLRP3, soit le MCC950. Nous pouvons voir une diminution de l'incorporation du PI lors des traitements avec MCC950 et VX765, indiquant que la formation des pores permettant l'incorporation du PI induite par la nigericine est bien dû à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Figure 3.1e).

### 3.3 Effet de la protéine MPST sur l'activation de l'inflammasome NLRP3

Afin de déterminer le rôle de la protéine MPST dans la pyroptose induite par l'inflammasome NLRP3, nous avons tout d'abord utilisé des lentivirus ciblant cette protéine afin de faire un *knockdown* de son expression. Les 2 lentivirus ciblant MPST mène à une augmentation de l'incorporation du PI dans les macrophages suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigericine (Figure 3.1f). Les *knockdowns* ont été validés par Western Blot, où l'expression de la protéine est bel et bien diminuée par les lentivirus (Figure 3.1g). Le lentivirus MPST1 semble être le plus efficace pour inhiber l'isoforme mitochondrial de la protéine, soit celui à 33 kDa. Ceci concorde avec l'effet observé lors de la cinétique, soit que le lentivirus le plus efficace pour inhiber la protéine entraîne la plus grande augmentation de l'incorporation du PI après l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Par la suite, nous avons utilisé l'inhibiteur pharmacologique de l'activité enzymatique de MPST, soit l'I3MT-3 (Abdollahi Govar *et al.*, 2020; Augsburger *et al.*, 2020; Panagaki *et al.*, 2020).



**Figure 3.3** Effet de l'inhibition de l'activité catalytique de la protéine MPST sur les pores pyroptotiques. Inhibition de l'activité catalytique de la protéine MPST par le composé I3MT-3, utilisé à une dose de 54,4  $\mu\text{M}$ , après traitement avec la nigericine, utilisé à une dose de 20  $\mu\text{M}$ . Le composé VX765, utilisé à 100  $\mu\text{M}$ , est un contrôle positif de l'inhibition de la pyroptose. RFU (relative fluorescence units) normalisé sur cellules stimulées par la nigericine sans prétraitement. N=3 moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

L'inhibition de l'activité de la protéine MPST permet d'augmenter l'incorporation du PI dans les cellules de manière significative et l'utilisation du I3MT-3 seul n'a pas d'effet cytotoxique, représenté par l'absence de l'incorporation du PI dans les cellules prétraitées avec l'I3MT-3 mais pas stimulées à la nigericine (Figure 3.3). En effet, le prétraitement des macrophages avec l'inhibiteur catalytique de MPST augmente de plus de 50% l'incorporation du PI en contraste avec l'activation seule de l'inflammasome NLRP3. L'inhibition de la caspase-1 induit une diminution de près de 75% de l'incorporation du PI suite à l'activation de l'inflammasome, suggérant l'importance de cette protéase dans la voie NLRP3.

### 3.4 Effets de donneurs de sulfure d'hydrogène sur l'inflammasome NLRP3

Des études précédentes ont démontré que le  $\text{H}_2\text{S}$  produit par l'enzyme CSE inhibe l'inflammasome (Castelblanco *et al.*, 2018). Cette enzyme, bien que généralement retrouvé au cytoplasme, est connu pour transloquée à la mitochondrie en réponse au stress (Fu *et al.*, 2012).

Ainsi, suite aux observations des précédents résultats obtenus, soit que la déplétion génétique et l'inhibition de l'activité catalytique de la protéine MPST bloque l'activation de l'inflammasome NLRP3, nous avons voulu tester si cela implique la production de H<sub>2</sub>S mitochondrial. Nous avons donc évalué l'effet de la compartimentalisation d'un donneur d'H<sub>2</sub>S à libération lente soit au cytoplasme ou à la mitochondrie, en traitant des macrophages avec les donneurs GYY4137 et AP39, respectivement.

### 3.4.1 Donneur générique lent d'H<sub>2</sub>S : GYY4137

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord utilisé un donneur d'H<sub>2</sub>S générique à libération lente, le GYY4137, à diverses concentrations, variant entre 0,01 mM jusqu'à 1 mM.

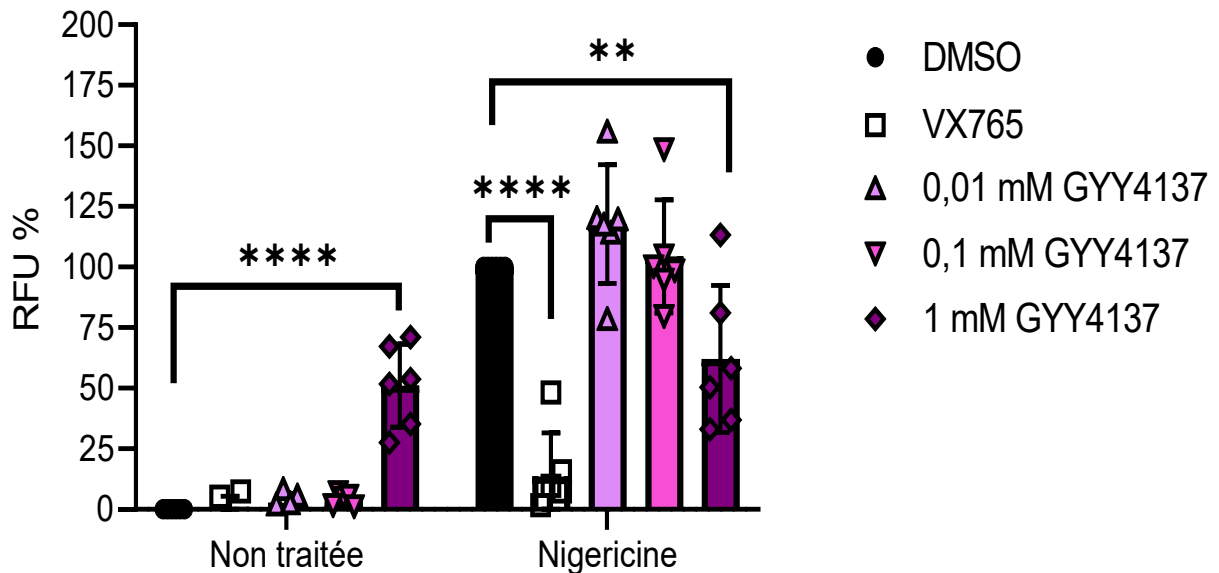


Figure 3.4.1 Modulation des pores pyroptotiques NLRP3-dépendants via le donneur d'H<sub>2</sub>S GYY4137

Effets de différentes doses du donneurs d'H<sub>2</sub>S GYY4137 sur l'incorporation du PI dans les cellules traitées avec la nigericine à 20 µM. Le composé VX765, utilisé à 100 µM, est un contrôle positif de l'inhibition des pores pyroptotiques. RFU (relative fluorescence units) normalisé sur cellules stimulées par la nigericine sans GYY4137. N=6, moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM).

Ce donneur semble être apte à inhiber l'incorporation du PI seulement à une dose de 1mM (Figure 3.4.1). En effet, les doses de 0,01 et 0,1 mM n'affectent pas la formation de pores induits par la stimulation à la nigericine. Toutefois, la dose de 1 mM est cytotoxique, indiqué par une augmentation l'incorporation du PI dans les cellules non traitées à la nigericine de 50%. En effet,

l'intensité du traitement GYY4137 à 1 mM seul n'est pas statistiquement différent du traitement 1mM avec stimulation à la nigericine.

### 3.4.2 Donneur lent d'H<sub>2</sub>S ciblé à la mitochondrie : AP39

Pour imiter le rôle de MPST, nous avons utilisé un donneur possédant une séquence de ciblage à la mitochondrie, AP39, permettant de libérer le H<sub>2</sub>S spécifiquement au niveau de cette organelle (Szczesny *et al.*, 2014).

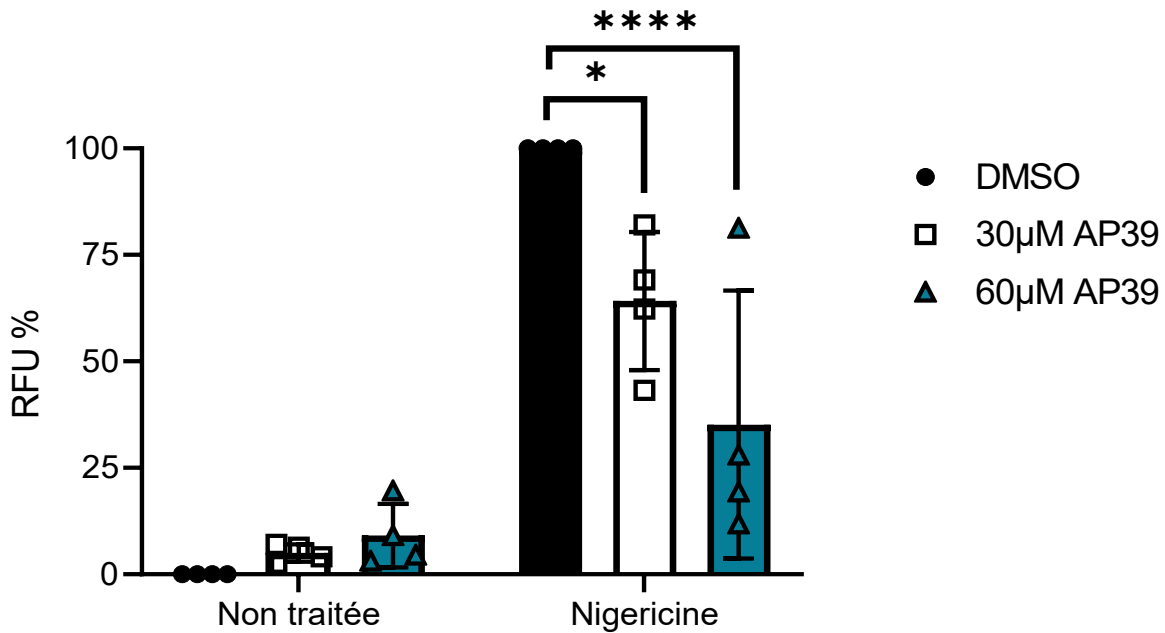


Figure 3.4.2 Modulation des pores pyroptotiques NLRP3-dépendants via le donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial AP39

Effets de différentes doses du donneurs d'H<sub>2</sub>S mitochondrial AP39 sur l'incorporation du PI dans les cellules traitées avec la nigericine à 20 µM. RFU (relative fluorescence units) normalisé sur cellules stimulées par la nigericine sans AP39. N=4 moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM).

Ce donneur mitochondrial peut inhiber l'incorporation du PI de manière significative sans cytotoxicité (Figure 3.4.2). Une dose de 50 µM a été déterminé pour atteindre plus de 50% d'inhibition de la formation des pores pyroptotiques induits par l'inflammasome NLRP3. Ainsi, ces résultats démontrent que le H<sub>2</sub>S mitochondrial, via le donneur AP39, peut inhiber l'incorporation du PI, qui reflète la formation de pores pyroptotiques, à des doses plus faibles que le donneur GYY4137 et ce, sans être cytotoxique.

### 3.5 Spécificité du rôle du sulfure d'hydrogène dans la voie de la pyroptose

Puisque les expériences précédentes ont toutes été effectuées sur la voie NLRP3, nous nous sommes ensuite demandé si l'effet du donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial sur la pyroptose est spécifique à ce senseur d'inflammasome ou s'il peut agir sur plus d'un inflammasome. En effet, il est connu que le sulfure d'hydrogène généré par l'enzyme CSE module l'inflammasome AIM2 (Castelblanco *et al.*, 2018). Ce senseur est également impliqué dans la réponse à l'infection par le virus Sendai, le modèle viral utilisé lors de l'identification de la protéine MPST.

#### 3.5.1 Modulation de l'inflammasome CARD8 par le sulfure d'hydrogène mitochondrial

Pour ce faire, nous avons tout d'abord observé l'effet d'AP39 sur la voie CARD8, activé par le talabostat. Le composé VX765 a été également utilisé comme contrôle pour cette voie.

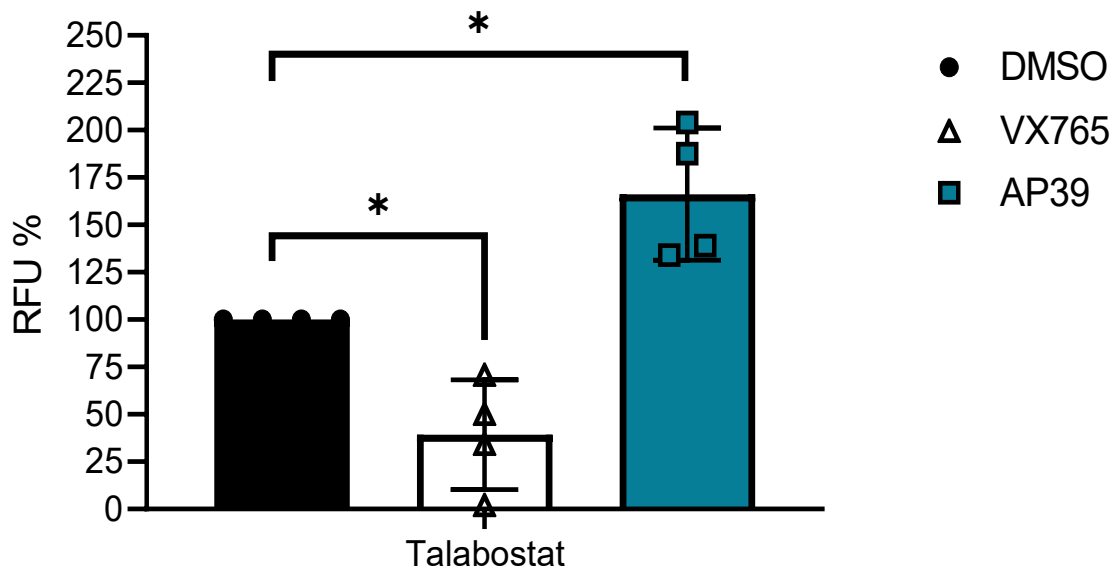


Figure 3.5.1 Induction de pores pyroptotiques par l'inflammasome CARD8

Effet du H<sub>2</sub>S mitochondrial, via le donneur AP39 utilisé à une concentration de 50  $\mu$ M, sur les pores pyroptotiques induits par l'inflammasome CARD8, activé par le composé talabostat utilisé à une concentration de 1  $\mu$ M. Le composé VX765, utilisé à 100  $\mu$ M, est un contrôle positif de l'inhibition de la pyroptose. RFU (relative fluorescence units) normalisé sur cellules stimulées par le talabostat sans prétraitement. N=4 moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

L'inhibition de la caspase-1 par le VX765 affecte l'incorporation du PI engendré par l'activation de l'inflammasome CARD8 de plus de 50% (Figure 3.5.1). Toutefois, le sulfure d'hydrogène mitochondrial ne diminue pas la formation de pores pyroptotiques induite par cette



voie. En effet, AP39 semble plutôt avoir un effet contraire sur cette voie, démontré par une augmentation de l'incorporation du PI à la suite de l'activation de cet inflammasome.

### 3.5.2 Modulation de l'inflammasome AIM2 par le sulfure d'hydrogène mitochondrial

Nous avons également étudié la voie AIM2, un inflammasome reconnaissant l'ADN et nécessitant le recrutement de la protéine ASC, comme l'inflammasome NLRP3.

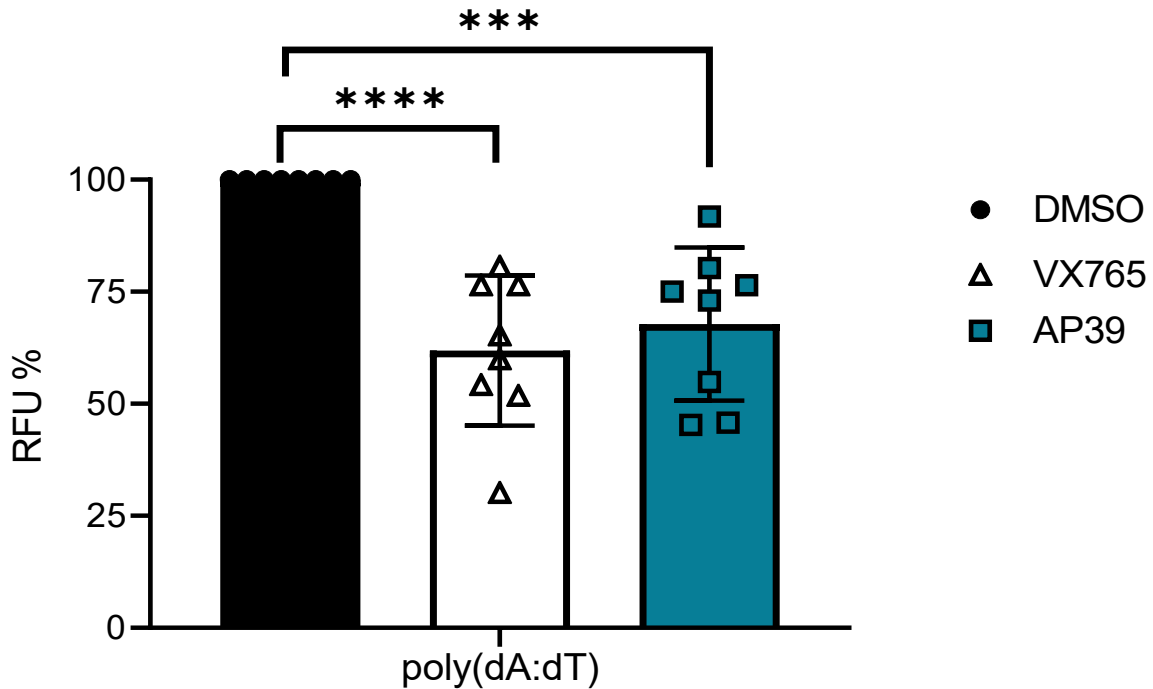


Figure 3.5.2 Induction de pores pyroptotiques par l'inflammasome AIM2

Effet du H<sub>2</sub>S mitochondrial, via le donneur AP39 utilisé à une concentration de 50 µM, sur les pores pyroptotiques induits par l'inflammasome AIM2, activé par le poly(dA:dT), utilisé à une concentration de 0,625 µg/ml. Le composé VX765, utilisé à 100 µM, est un contrôle positif de l'inhibition de la pyroptose. RFU (relative fluorescence units) normalisé sur cellules stimulées par le poly(dA :dT) sans prétraitement. N=8 moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM).

Cette voie de l'inflammasome active bien la formation de pores pyroptotiques de manière caspase-1 dépendante, démontré par la diminution de plus de 30% de l'incorporation du PI suite au traitement avec le VX765 (Figure 3.5.2). De plus, le traitement avec le donneur de sulfure d'hydrogène mitochondrial AP39 diminue significativement l'incorporation du PI dans les cellules, à un niveau similaire à celui engendré par le traitement avec l'inhibiteur VX765.

Ces résultats démontrent que AP39 inhibent les voies des inflammasome NLRP3 et AIM2 spécifiquement, et pas la voie CARD8. Ceci suggère que le H<sub>2</sub>S mitochondrial affecte les voies des inflammasomes ASC-dépendants.

### **3.5.3 Rôle du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur l'oligomérisation d'ASC**

Puisque AP39 semble moduler spécifiquement les inflammasomes ASC-dépendants, nous nous sommes demandé s'il peut moduler cette protéine directement. Ainsi, nous avons regardé l'oligomérisation de cette protéine après une stimulation par la nigericine. Nous avons utilisé l'inhibiteur I3MT-3 et le donneur AP39 afin de déterminer l'implication de la protéine MPST sur cette étape de la formation de l'inflammasome.

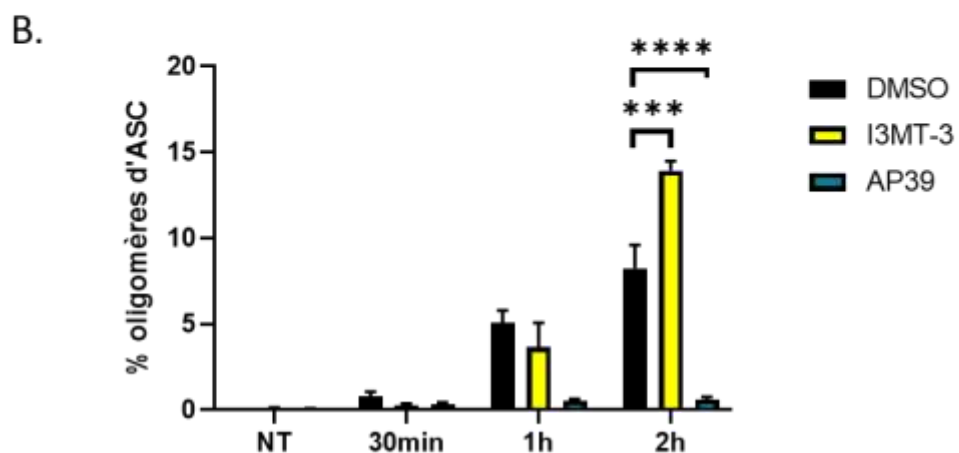
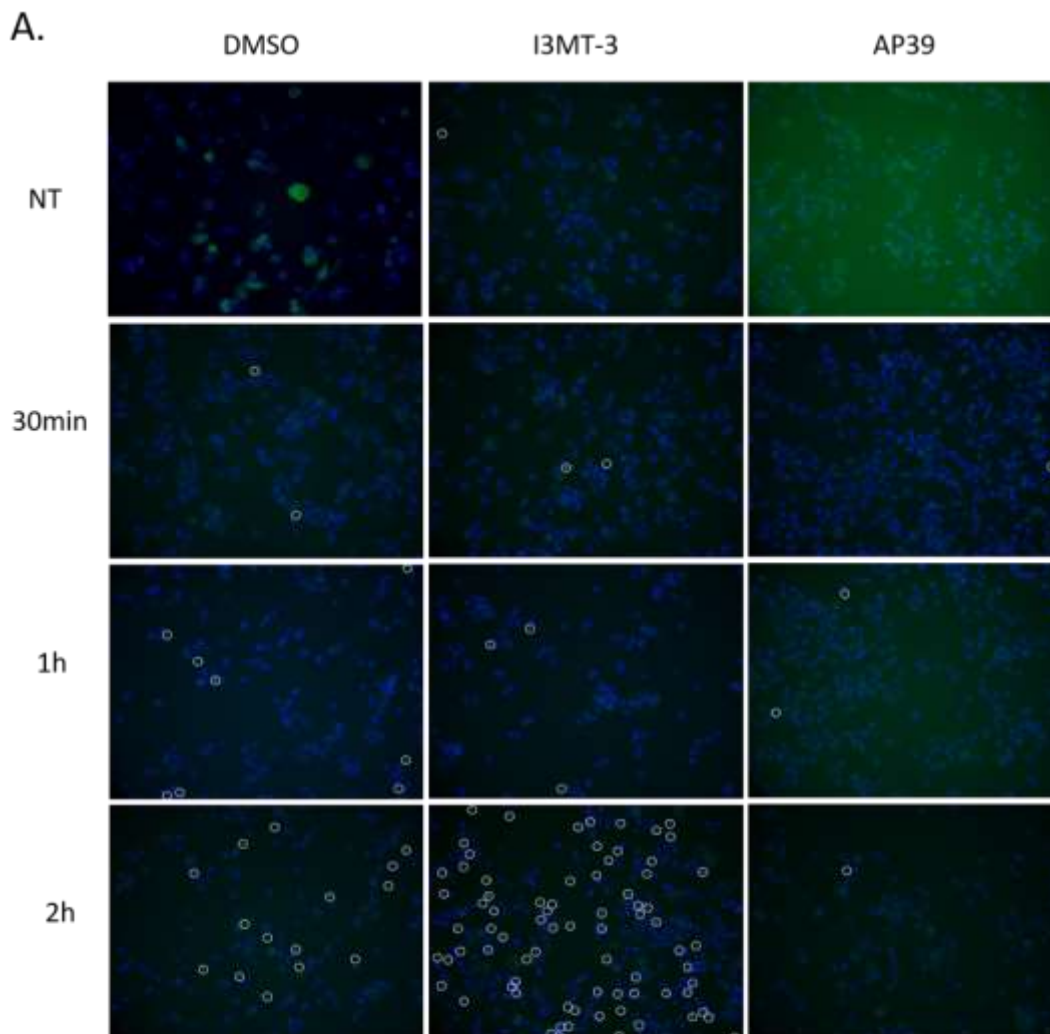


Figure 3.5.3 Oligomérisation d'ASC après activation de l'inflammasome NLRP3

A) Oligomérisation de la protéine adaptatrice ASC après activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigericine, utilisé à 20  $\mu$ M, durant 30min, 1h ou 2h. L'I3MT-T a été utilisé à 54,4  $\mu$ M et l'AP39 à 50  $\mu$ M. Chaque oligomère est encerclé en blanc. Imagerie sur microscope électronique E800 à 20X. B) Pourcentage du nombre d'oligomères d'ASC normalisé sur le nombre de cellules. N=6 moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

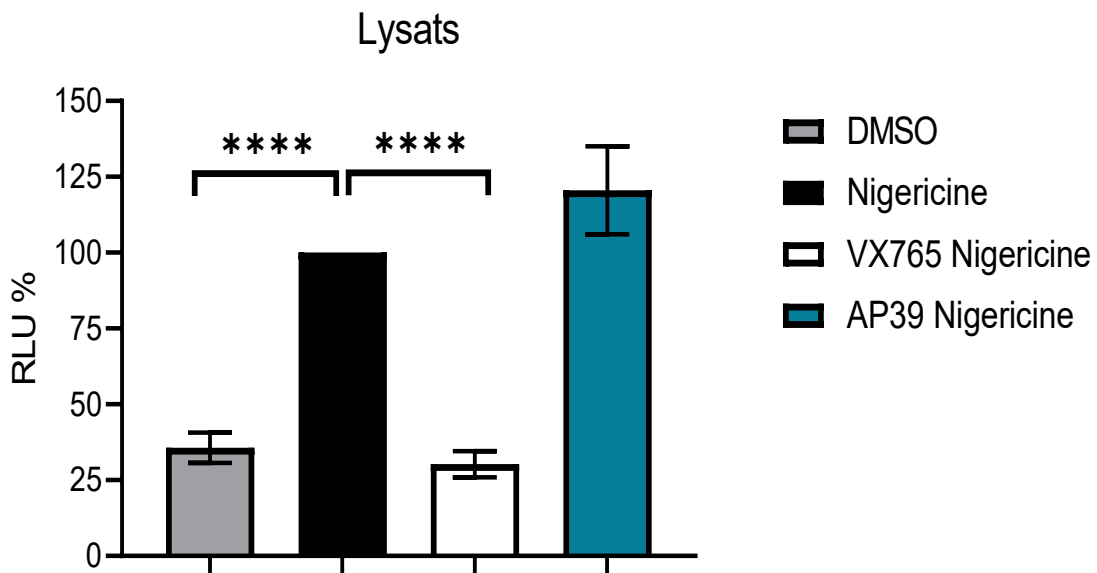
Ces résultats nous indiquent que l'inhibition de l'activité catalytique de la protéine MPST augmente significativement la formation des oligomères d'ASC, alors que l'ajout de sulfure d'hydrogène mitochondrial via AP39 inhibe cette étape (Figure 3.5.3). La stimulation de l'inflammasome NLRP3 durant 2 heures mène à la formation d'oligomères dans près de 10% des cellules, alors que le prétraitement avec l'13MT-3 augmente significativement ce pourcentage, soit de près de 5% (Figure 3.5.3). Le H<sub>2</sub>S mitochondrial est donc capable d'inhiber la formation d'oligomères d'ASC. Ces résultats nous indiquent que l'inhibition de l'activité catalytique de la protéine MPST augmente significativement la formation des oligomères d'ASC, alors que l'ajout du donneur AP39 inhibe cette étape

### **3.6 Mécanisme d'action du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur les voies pro-inflammatoires**

Nous avons ainsi pu démontrer que le H<sub>2</sub>S mitochondrial inhibe l'induction des pores pyroptotiques induite par les inflammasomes ASC-dépendants et affecte l'oligomérisation d'ASC. Cependant, nous avons voulu déterminer si ce gaz peut affecter d'autres étapes de la voie de la pyroptose.

#### **3.6.1 Effet du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur la caspase-1**

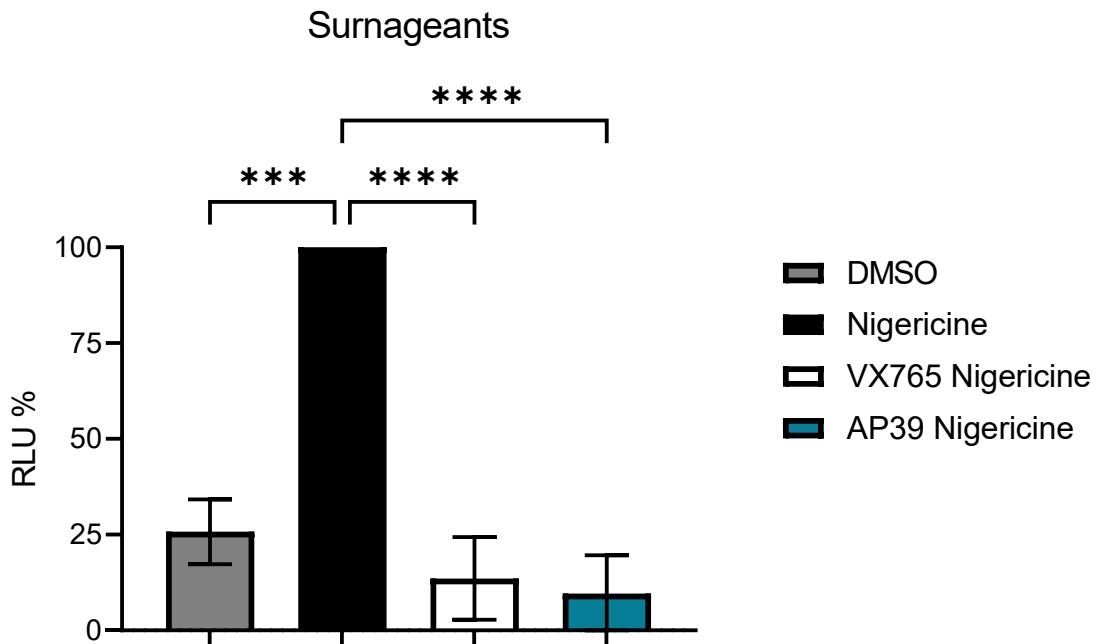
Ainsi, nous nous sommes penchés sur l'activité catalytique de la caspase-1. Nous avons détecté son activité dans les lysats de cellules ayant activées l'inflammasome NLRP3, ainsi que dans le surnageant. En effet, la caspase-1 peut être libérée par les pores membranaires formés lors de la pyroptose (Baroja-Mazo *et al.*, 2014).



**Figure 3.6.1.1**    **Activité catalytique de la caspase-1 dans le lysat cellulaire suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3**

**Effet du donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial AP39, utilisé à une concentration de 50 µM, sur l'activité catalytique de la caspase-1 dans le lysat cellulaire lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par 20 µM de nigericine. RLU (relative luminescence units) normalisé sur cellules stimulées par la nigericine sans prétraitement. N=2 moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM).**

L'activation de l'inflammasome NLRP3 induit bel et bien une augmentation de l'activité de la caspase-1 au niveau intracellulaire et l'ajout de l'inhibiteur pharmacologique spécifique VX765 induit une réduction significative de celle-ci, soit près de 75% (Figure 3.6.1.1). Cependant, le prétraitement avec AP39 ne réussit pas à affecter l'activité catalytique de la caspase-1 au niveau intracellulaire.



**Figure 3.6.1.2** Activité catalytique de la caspase-1 dans le surnageant suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3

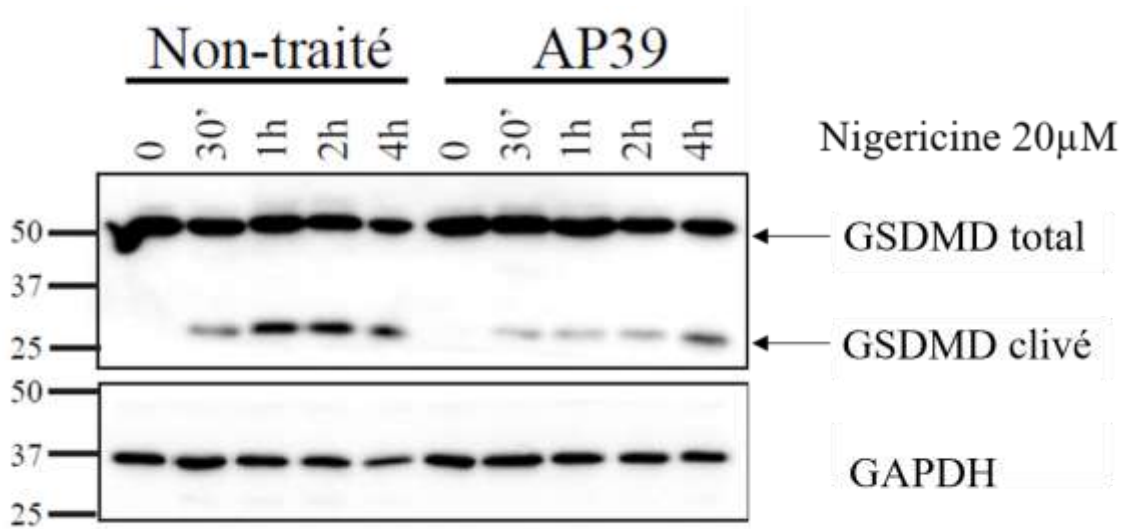
Effet du donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial AP39, utilisé à une concentration de 50 µM, sur l'activité catalytique de la caspase-1 dans le surnageant des cellules lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par 20 µM de nigericine. RLU (relative luminescence units) normalisé sur cellules stimulées par la nigericine sans prétraitement. N=2 moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM).

La nigericine permet également une augmentation de l'activité de la caspase-1 qui est sécrétée dans le surnageant. Les résultats de l'AP39 sur l'activité catalytique de la caspase-1 diffèrent toutefois au niveau extracellulaire. En effet, même si l'activité de la caspase-1 n'est pas affectée au niveau intracellulaire, celle-ci est diminuée dans le surnageant, et ce, de manière significative (Figure 3.6.1.2). En effet, l'inhibiteur spécifique VX765 diminue l'activité catalytique de plus de 75%, et le donneur AP39 permet une inhibition similaire. Ainsi, le sulfure d'hydrogène mitochondrial ne semble pas affecter directement l'activité catalytique de la caspase-1, mais plutôt d'inhiber la sécrétion de la caspase-1 active dans le surnageant des cellules ayant activées l'inflammasome NLRP3.

### 3.6.2 Effet du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur la protéine gasdermine D

Puisque l'ajout du sulfure d'hydrogène mitochondrial semble inhiber la sécrétion de la caspase-1 active, nous nous sommes penchés sur l'une des étapes subséquentes à l'activation de la caspase-1, soit le clivage de la protéine gasdermine D. Nous avons donc activé

l'inflammasome NLRP3 et avons détecté la présence de la protéine gasdermine D clivée dans les cellules après 30 minutes, 1, 2 ou 4 heures après l'activation de l'inflammasome.



**Figure 3.6.2 Clivage de la protéine gasdermine D lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3**

**Effet du donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial AP39, utilisé à une concentration de 50 µM, sur le clivage de la protéine gasdermine D après activation de l'inflammasome NLRP3 par la nigericine, utilisée à 20 µM.**

Ces résultats démontrent, dans un premier temps, que le clivage de la protéine GSDMD semble s'effectuer 30 minutes après l'activation de l'inflammasome, avec un pic d'activation entre 1 et 2 heures (Figure 3.6.1.2). De plus, le sulfure d'hydrogène mitochondrial inhibe le clivage de la protéine gasdermine D après l'activation de l'inflammasome NLRP3, observé par une baisse de la protéine GSDMD clivée après 30 minutes, 1 et 2 heures. L'effet d'AP39 semble être moins significatif après 4 heures d'activation

## 4 Discussion

---

### 4.1 Rôle de la protéine MPST sur l'inflammasome

Nos recherches nous ont donc permis d'identifier une voie de régulation de la mort cellulaire pyroptotique. Nous avons tout d'abord identifié, grâce à un criblage et un séquençage d'ARN, plusieurs régulateurs potentiels de l'inflammasome suite à une infection virale activant la voie AIM2. La sulfurtransférase mitochondriale MPST a été alors identifiée comme un régulateur négatif (Figure 3.1 b-c). Cette protéine a particulièrement attiré notre attention puisque c'est l'une des trois enzymes cellulaires connues produisant du sulfure d'hydrogène, un gazotransmetteur préalablement identifié comme régulateur négatif de la voie de la pyroptose (Castelblanco *et al.*, 2018).

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer l'implication de la protéine MPST sur l'induction de la pyroptose par l'inflammasome NLRP3 dans des macrophages humains. Ce type cellulaire a été choisi puisqu'il possède un rôle majeur comme première ligne de défense lors de diverses infections virales (Schulz *et al.*, 2017). L'utilisation du marqueur PI nous permet d'observer la formation des pores membranaires. Le PI a été préféré à la détection de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  puisque ce marqueur nous permet plus facilement d'observer la pyroptose en cinétique. Celui-ci est également un marqueur plus précoce de la formation des pores pyroptotiques. Le niveau d'IL-1 $\beta$  sécrété est toutefois intéressant et devra être évalué dans de futures expériences. Le choix de ce marqueur implique cependant que la fluorescence détectée ne reflète pas tout à fait la pyroptose. En effet, il est possible que les cellules génèrent des pores, mais des mécanismes de réparation empêchent la lyse cellulaire. Toutefois, l'incorporation du PI est affectée par la présence des inhibiteurs de NLRP3 ou de la caspase-1, soit le MCC950 et le VX765 respectivement (Figure 3.1e). Ceci démontre l'implication de la voie de l'inflammasome NLRP3 sur le signal détecté. L'inhibiteur MCC950 a toutefois un effet partiel sur la pyroptose, comme l'on peut voir durant une stimulation prolongée par la nigericine (Figure 3.1e). La formation de pores pyroptotiques n'est donc pas complètement bloquée et d'autres mécanismes peuvent être enclenchés. Il est également connu que la nigericine peut activer l'inflammasome NLRP1 (Fenini *et al.*, 2018). L'incorporation du PI a des temps plus tardifs suite au traitement avec la nigericine pourrait ainsi être dû à la stimulation de cet inflammasome. Toutefois, l'analyse a été effectuée à des temps précoces après l'ajout de la nigericine, soit entre 2 et 3 heures, et cet intervalle de temps comporte la fenêtre inhibitrice du composé MCC950. De plus, l'inhibiteur VX765 n'est pas le composé le plus spécifique contre la caspase-1. En autres, l'inhibiteur YVAD



est plus efficace à inhiber la caspase-1 (Garcia-Calvo *et al.*, 1998). Néanmoins, les résultats de la figure 3.6.1.1 et 3.6.1.2 démontrent que l'activité catalytique de celle-ci est bel et bien inhibée par le VX765.

L'implication de la protéine MPST dans la voie NLRP3 a été déterminé grâce à l'utilisation de lentivirus induisant un *knockdown* par ARN interférant ainsi qu'à l'aide de l'inhibiteur I3MT-3, qui bloque spécifiquement son activité catalytique. La dose utilisée de cette drogue, soit 54,4  $\mu\text{M}$ , représente près de trois fois plus que l'IC50 calculé chez l'humain. Toutefois, cet IC50 a été déterminé pour l'inhibition de la production d' $\text{H}_2\text{S}$  par une protéine recombinante *in vitro*, et non directement l'activité catalytique de la protéine. De plus, cet inhibiteur est 5 fois plus efficace pour la variante MPST murine que pour celle humaine (Hanaoka *et al.*, 2017). Nous avons toutefois pu démontrer que l'inhibition de l'activité catalytique de la protéine MPST à cette concentration d'I3MT-3, ainsi que par les lentivirus, permet une augmentation de l'induction des pores induits par l'activation de l'inflammasome NLRP3, sans effet cytotoxique de la drogue elle-même (Figure 3.1f et 3.3). En effet, nous pouvons voir que l'I3MT-3 augmente de près de 50% l'incorporation du PI et que le lentivirus permettant la plus forte diminution de l'expression de MPST, soit MPST1, est le plus efficace pour augmenter l'incorporation du PI (Figure 3.1 f-g et 3.3). Il serait intéressant de produire des THP-1 *knockout* via CRISPR-Cas9 et de réintroduire l'expression d'une forme mutante du site catalytique de MPST afin de confirmer l'importance de l'activité catalytique de cette protéine dans la pyroptose.

## 4.2 Impact de la localisation du sulfure d'hydrogène

Par la suite, nous nous sommes demandé si la localisation intracellulaire du sulfure d'hydrogène peut modifier son effet sur la voie pyroptotique. Il a déjà été démontré que sa génération par l'enzyme CSE permet d'inhiber l'inflammasome et que celle-ci peut être retrouvée au niveau mitochondrial lors de stress (Fu *et al.*, 2012). Nous avons donc utilisé le composé GYY4137, permettant la libération lente du  $\text{H}_2\text{S}$ , et l'AP39, également un donneur de  $\text{H}_2\text{S}$  mais possédant une séquence de localisation à la mitochondrie, soit le motif triphenylphosphonium (Szczesny *et al.*, 2014). Ce dernier nous a permis de simuler la génération de sulfure d'hydrogène mitochondrial par l'enzyme MPST. Le composé AP39 s'est avéré plus efficace que le GYY4137 pour réduire la formation des pores pyroptotiques et ce, à des doses plus faibles et sans cytotoxicité (Figure 3.4.1- 3.4.2). En effet, le GYY4137 induit de la cytotoxicité à 1 mM. Ceci pourrait s'expliquer par une trop grande quantité d' $\text{H}_2\text{S}$  non compartimentalisé au niveau intracellulaire. L'effet antiviral du GYY4137 observé dans d'autres études, où celui-ci était utilisé

à des doses plus fortes que celle utilisée dans ces expériences, soit entre 5 et 10 mM, serait possiblement dû à sa toxicité ou au dérèglement de plusieurs fonctions cellulaires (Li *et al.*, 2015).

Ces résultats démontrent que la localisation du sulfure d'hydrogène à la mitochondrie est importante pour sa régulation de l'inflammasome NLRP3. Il est possible que ce rôle mitochondrial de ce gaz est principalement dû à la protéine MPST, car c'est celle-ci qui est principalement exprimée dans le modèle cellulaire utilisé (Tomita *et al.*, 2016). Ceci pourrait également impliquer que le rôle inhibiteur de CSE précédemment démontré serait dû à sa localisation mitochondrial. Afin de déterminer l'implication de chacune de ces 2 protéines mitochondriales sur la pyroptose, des approches génétiques de *knockdown* pour l'enzyme MPST et CSE ainsi qu'un double *knockdown* serait intéressant à produire.

### **4.3 H<sub>2</sub>S mitochondrial et les inflammasome ASC-dépendants**

Suivant ces résultats, nous avons voulu déterminer si les effets du donneur AP39 étaient spécifique à la réponse NLRP3, ou bien si nous pouvons l'observer sur d'autres inflammasomes. Ainsi, nous avons activé la voie CARD8 avec le talabostat. L'activation de cette voie mène bien à une pyroptose caspase-1 dépendante, mesurée après 20 heures de stimulation (Figure 3.5.1). Le talabostat n'active pas aussi vite la voie de l'inflammasome que la nigericine. L'induction de la mort cellulaire pyroptotique par le talabostat peut prendre plusieurs heures, alors que nous avons mesuré l'incorporation du PI sur une cinétique de seulement 24 heures. En effet, une étude a démontré que l'effet du talabostat sur la viabilité cellulaire des THP-1 est détectable après plus de 100 heures (Johnson *et al.*, 2018). Notre cinétique n'était donc pas optimale afin de détecter l'incorporation du PI après l'activation de cet inflammasome. L'ajout du donneur de sulfure d'hydrogène n'inhibe toutefois pas la pyroptose induite par l'inflammasome CARD8 selon notre cinétique. Contrairement à la voie NLRP3, le H<sub>2</sub>S mitochondrial augmente plutôt l'incorporation du PI dans les cellules à la suite de l'activation de l'inflammasome CARD8 (Figure 3.5.1). De plus, le traitement avec l'AP39 seul n'est pas toxique en soit au début, mais nous pouvons observer une légère augmentation de l'incorporation du PI au fil du temps. Cette augmentation est également observable avec le traitement VX765 seul (résultats non montrés). Ceci peut être expliqué par un stress cellulaire engendré par la présence prolongée de la drogue dans le milieu cellulaire, activant des voies de signalisation menant à l'incorporation du marqueur fluorescent de manière indépendante de l'inflammasome. Il est également possible qu'un stress est induit par la phototoxicité des fluorophores lors des lectures en cinétique, qui se font en condition sans

CO<sub>2</sub>. Il serait donc important d'observer l'effet de l'AP39 sur la voie CARD8 à des temps prolongés afin de mieux déterminer son effet sur l'activation de cet inflammasome.

Pour activer la voie de l'inflammasome AIM2, de l'ADN poly(dA:dT) a servi d'agoniste. Cet inflammasome est affecté par le sulfure d'hydrogène mitochondrial. En effet, l'AP39 diminue la formation des pores à un niveau similaire que le VX765 (Figure 3.5.2). Cet inflammasome, contrairement à CARD8, est dépendant de la protéine ASC pour sa formation. Ainsi, nous avons pu démontrer que le H<sub>2</sub>S mitochondrial permet d'inhiber l'induction de pores pyroptotique induite par les inflammasomes dont le senseur nécessite la présence de la protéine adaptatrice ASC, soit NLRP3 et AIM2. Cette inhibition de la voie de l'inflammasome pourrait donc se faire via la protéine adaptatrice ASC. Ceci a été vérifié dans un modèle de THP-1-ASC avec des prétraitements d'I3MT-3 ou d'AP39 avant l'ajout de nigericine. Un prétraitement avec AP39 permet d'inhiber la formation d'oligomères d'ASC, tandis que l'inhibition de la protéine MPST mène à une augmentation suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Figure 3.5.3). Cette expérience a également été reproduite 3 fois sur une plateforme de cinétique Cytation 5 (*BioTek*) par un membre indépendant du laboratoire, confirmant les résultats obtenus. Ces données concordent avec les résultats du criblage, où l'absence de la protéine MPST augmente la formation d'oligomères lors de l'activation de l'inflammasome AIM2 (Figure 3.1b).

L'oligomérisation d'ASC est un mécanisme important pour l'activation de ces inflammasomes et ceci nécessite la phosphorylation de la protéine. Ceci arrive après l'activation des voies Syk et Jnk, 2 voies importantes pour l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2 (Hara *et al.*, 2013). Les ROS peuvent induire la phosphorylation de Syk et activer les subséquentes voies de signalisation (Patterson *et al.*, 2015). L'inhibition des voies Syk et Jnk bloque la formation d'oligomères d'ASC sans toutefois affecter l'interaction avec NLRP3. De plus, il a été démontré que le H<sub>2</sub>S peut inhiber la phosphorylation de Syk (Marino *et al.*, 2016). La modulation des inflammasomes ASC-dépendants par le H<sub>2</sub>S mitochondrial pourrait alors se faire en inhibant la production de mtROS, diminuant la phosphorylation de Syk, et donc la phosphorylation d'ASC, empêchant la formation de l'inflammasome. Il est également possible que cette régulation s'effectue directement sur des cystéines d'ASC. En effet, il a été démontré que la protéine ASC est régulée par déglutathionylation et que cette modification est importante pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Li *et al.*, 2021).

L'effet ASC-dépendant du sulfure d'hydrogène mitochondrial pourrait également s'expliquer par le fait que la formation du complexe de ces inflammasomes a lieu au niveau de la mitochondrie, où le senseur et la protéine ASC peuvent s'oligomériser (Zhou *et al.*, 2011). De

plus, la translocation du senseur NLRP3 actif au niveau de la mitochondrie entraîne la perte de l'intégrité mitochondriale et ceci est important afin d'induire la pyroptose (Wang *et al.*, 2019b). Ainsi, le H<sub>2</sub>S mitochondrial pourrait jouer au niveau de la formation de l'inflammasome à la mitochondrie en affectant l'intégrité mitochondriale. L'observation en microscopie des mitochondries via un marqueur de type MitoTracker suite au prétraitement avec les différents donneurs d'H<sub>2</sub>S et à l'activation des différents inflammasomes pourrait nous permettre de déterminer l'effet de la localisation de ce gaz sur l'intégrité mitochondrial.

#### **4.4 H<sub>2</sub>S mitochondrial, caspase-1 et gasdermine D**

Puisque les données précédentes nous ont permis d'établir le rôle du sulfure d'hydrogène mitochondrial dans la voie de la mort pyroptotique et sa modulation de l'oligomérisation d'ASC, nous nous sommes ensuite demandé s'il pourrait également agir à d'autres étapes de la pyroptose afin d'exercer son rôle de régulateur négatif. Il est connu que le sulfure d'hydrogène peut modifier des cystéines par la modification post-traductionnelle S-sulfhydratation et que la caspase-1 possède une cystéine dans son site actif, soit la Cys163. La modification de celle-ci par le H<sub>2</sub>S mitochondrial pourrait entraîner la modulation de l'activité catalytique de la caspase-1. De plus, il a déjà été démontré que les cystéines 362 et 397 peuvent être oxydées par les ROS, inhibant l'activité de la caspase-1 (Meissner *et al.*, 2008). La modulation de l'état d'oxydoréduction d'une cystéine dans le site actif de la caspase-1 pourrait ainsi affecter son activité.

Nous nous sommes donc penchés sur la caspase-1, l'effecteur de la pyroptose. Pour ce faire, nous avons détecté l'activité catalytique de cette protéase dans les cellules et dans le surnageant, en mesurant la bioluminescence générée par le clivage de Z-WEHD-aminoluciférine par la caspase-1, générant l'aminoluciférine, un substrat de la luciférase. Le traitement avec le VX765 inhibe de manière significative l'activité de la caspase-1 retrouvée dans les cellules et dans le surnageant (Figure 3.6.1.1-3.6.1.2). Le donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial, quant à lui, n'inhibe pas l'activité catalytique de la caspase-1 détectée dans les cellules. Au contraire, il semble y avoir une légère augmentation de l'activité catalytique lors du traitement avec l'AP39. Néanmoins, l'activité mesurée dans le surnageant est diminuée significativement par l'AP39 (Figure 3.6.1.2). Ceci semble indiquer que le sulfure d'hydrogène mitochondrial n'affecte pas directement l'activité de la caspase-1, mais plutôt sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Ainsi, le H<sub>2</sub>S affecterait plutôt la formation des pores membranaires générés par la protéine GSDMD, empêchant la sortie du contenu intracellulaire. Ceci concorde avec l'augmentation de l'activité catalytique détectée dans les cellules, puisque si AP39 bloque la formation de pores, la caspase-1 active ne peut pas

être sécrétée dans le surnageant, générant ainsi une plus grande concentration de caspase-1 active dans le milieu intracellulaire contrairement à la condition de stimulation nigericine où la caspase-1 active est sécrétée.

Nous avons voulu par la suite déterminer le rôle potentiel du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur le clivage, et donc l'activation, de la protéine gasdermine D. Après une stimulation de l'inflammasome de 30 minutes, nous pouvons observer la présence de la protéine GSDMD clivée (Figure 3.6.2). La présence de la protéine GSDMD clivée augmente jusqu'à 2 heures après l'activation de l'inflammasome NLRP3, et nous pouvons observer une baisse de celle-ci après 4 heures. Le donneur AP39 entraîne une diminution significative du clivage de la protéine GSDMD, et ce jusqu'à 2 heures après l'activation de l'inflammasome. L'inhibition du clivage n'est donc pas un mécanisme précoce, mais son effet semble diminuer après 4 heures d'activation.

Nous avons donc pu démontrer que le sulfure d'hydrogène mitochondrial affecte la pyroptose induite par les inflammasomes ASC-dépendants en affectant l'oligomérisation d'ASC et le clivage de la protéine gasdermine D, limitant la formation de pores pyroptotiques. Ceci concorde avec les résultats mesurant l'incorporation du PI en cinétique, où l'intensité de fluorescence a été mesurée via un marqueur nécessitant la formation de pores membranaires.

Cette inhibition du clivage de la protéine gasdermine D pourrait être expliquée par le fait que celle-ci peut être régulée par des modifications d'oxydation. En effet, GSDMD est plus susceptible à être clivée à la suite de ces modifications. Les ROS peuvent induire cette oxydation afin de réguler la signalisation inflammatoire. L'oxydation cible entre autres les cystéines et il a été démontré que la protéine gasdermine D possède 4 cystéines pouvant être oxydées à la suite d'un stress oxydatif. Ces cystéines se retrouvent en position 38, 56, 268 et 467 et leur modification permet d'augmenter l'efficacité du clivage de GSDMD par la caspase-1 (Wang *et al.*, 2019b). La cystéine 191 est également la cible de modification régulant l'activité de la protéine gasdermine D (Humphries *et al.*, 2020). Le sulfure d'hydrogène mitochondrial pourrait ainsi inhiber la génération de mtROS, diminuant ces modifications post-traductionnelles de cystéines, réduisant l'efficacité du clivage de GSDMD et affectant ainsi la formation de pores pyroptotiques. La production de H<sub>2</sub>S par MPST est en effet suggérée pouvoir neutraliser les ROS au niveau des mitochondries (Kimura *et al.*, 2010). Le rôle du H<sub>2</sub>S mitochondrial serait donc d'atténuer les dommages oxydatifs. L'ajout de sulfure d'hydrogène mitochondrial avant l'activation de l'inflammasome pourrait ainsi prévenir ou diminuer la production de mtROS. L'observation du niveau de mtROS via le marqueur MitoSOX (*Thermo #M36008*) permettrait de déterminer le rôle

du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur celles-ci. De plus, l'utilisation de cellules THP-1 ayant une protéine GSDMD comportant des mutations sur les cystéines pouvant être oxydées ou encore la détection de l'état d'oxydation de ces cystéines suite à l'ajout d'H<sub>2</sub>S mitochondrial et la stimulation de l'inflammasome NLRP3 pourrait nous indiquer plus précisément le rôle du H<sub>2</sub>S mitochondrial dans le clivage de la protéine gasdermine D. Ces expériences pourraient également se faire dans un modèle de THP-1 *knockdown* pour MPST, ou encore des THP-1 ayant une protéine MPST catalytique mutante, afin de déterminer si les effets observés sont dû à cette protéine spécifiquement.

Une voie aditionnelle qui serait intéressante d'étudier est le métabolisme mitochondrial à la suite de l'ajout du donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial. Les perturbations de la chaîne respiratoire mitochondriale affectent positivement la voie de la pyroptose via la production de mtROS (Nakahira *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Puisque le H<sub>2</sub>S produit par MPST sert de donneur d'électrons à l'enzyme SQR, qui le transfère au complexe III, aidant au maintien de la chaîne de transport, il serait important d'évaluer la respiration mitochondriale lors du traitement avec l'AP39 (Lagoutte *et al.*, 2010). En effet, si le H<sub>2</sub>S mitochondrial protège contre l'augmentation des ROS mitochondriaux, nous pourrions observer une conservation du métabolisme mitochondrial après l'activation de l'inflammasome. De plus, il a été démontré que le fumarate, un intermédiaire du cycle de Krebs qui est accumulé lors d'un changement métabolique pour la glycolyse aérobie, réagit avec une cystéine de la protéine gasdermine D. La succination de cette protéine l'empêche d'interagir avec les caspases, bloquant ainsi la pyroptose (Humphries *et al.*, 2020). Ces études pourraient être effectuées sur une plateforme de Seahorse, nous permettant d'observer le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) simultanément à la suite du traitement avec le donneur d'H<sub>2</sub>S mitochondrial et après l'activation de l'inflammasome. L'utilisation de THP-1 shMPST pour compléter cette étude serait d'ailleurs une option intéressante afin de déterminer l'implication de cette protéine dans le métabolisme mitochondrial.

Le H<sub>2</sub>S mitochondrial pourrait également inhiber le clivage de GSDMD en bloquant l'oxydation des cystéines en les sulfhydratant. En effet, les cystéines sont la cible de la modification post-traductionnelle S-sulfhydratation par le sulfure d'hydrogène. La détection de mtROS ainsi que l'état d'oxydation des cystéines de la protéine GSDMD seront importantes à étudier pour mieux comprendre le mécanisme d'action du sulfure d'hydrogène mitochondrial sur la protéine gasdermine D.

Les propriétés antioxydantes du H<sub>2</sub>S semblent donc important pour son rôle de régulateur négatif de la voie de l'inflammasome. En effet, il a été démontré qu'en présence de ROS, un stimulus pouvant activer l'inflammasome NLRP3, le sulfure d'hydrogène peut induire l'expression de protéines antioxydantes, en induisant l'expression de Nrf2 et en augmentant sa translocation au noyau, permettant sa liaison avec les éléments de réponse antioxydant (AREs) (Lohninger *et al.*, 2015). Cet effet antioxydant du sulfure d'hydrogène pourrait ainsi permettre de neutraliser les ROS. Le rôle inhibiteur du H<sub>2</sub>S mitochondrial est donc proposé provenir de l'atténuation des dommages oxydatifs ainsi que de la régulation des fonctions mitochondriales.

Finalement, de futures expériences dans un modèle animal infecté pourront confirmer l'implication *in vivo* de la protéine mitochondriale MPST dans la régulation de la mort cellulaire suite à l'activation de l'inflammasome. De plus amples études du sulfure d'hydrogène comme régulateur de la mort pyroptotique permettront d'établir une meilleure compréhension des mécanismes d'inhibition de ces voies cellulaires, aidant aux développements de traitements potentiels pour des infections virales et maladies auto-inflammatoires.

## 5 Conclusion

Cette étude a ainsi permis d'identifier un nouveau régulateur négatif de la pyroptose. En effet, nos données indiquent que la protéine MPST, une sulfurtransférase mitochondriale, régule les inflammasomes ASC-dépendants via sa production d'H<sub>2</sub>S. Cette régulation semble s'effectuer à deux niveaux, soit l'assemblage des oligomères d'ASC ainsi que le clivage de la protéine gasdermine D par la caspase-1.

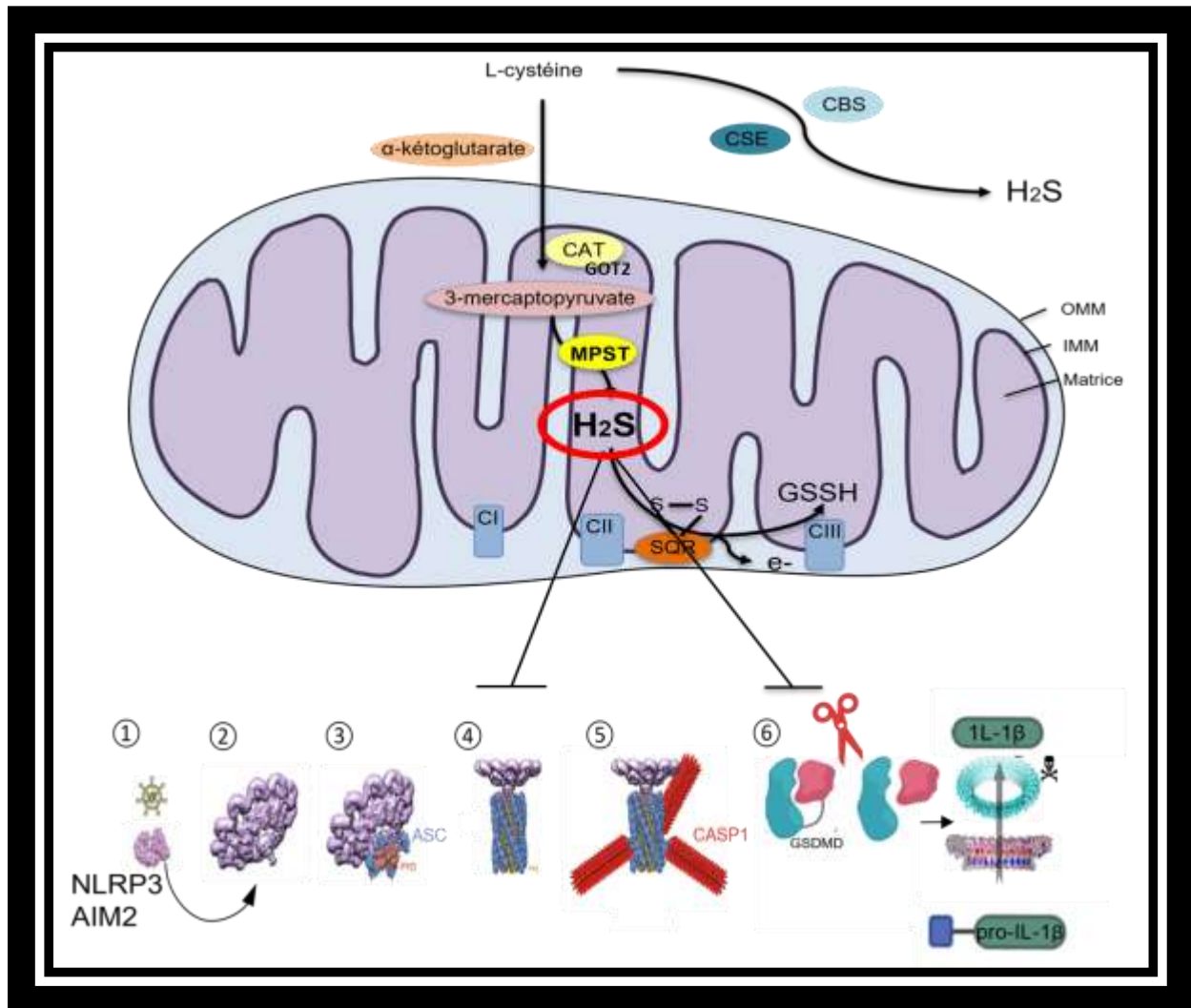


Figure 5 Modulation de la pyroptose par le sulfure d'hydrogène mitochondrial

Le sulfure d'hydrogène d'origine mitochondriale, généré par la sulfurtransférase MPST, inhibe l'oligomérisation d'ASC ainsi que le clivage de la protéine gasdermine D par la caspase-1, entraînant une diminution de la formation de pores membranaires, inhibant la mort pyroptotique des cellules ayant activées l'inflammasome. Ce régulateur négatif agit toutefois spécifiquement sur les inflammasomes ASC-dépendants, soit les inflammasomes NLRP3 et AIM2.



La localisation mitochondriale du sulfure d'hydrogène a également été relevée comme importante pour son rôle inhibiteur de la pyroptose. Ainsi, ceci pourrait impliquer que les précédentes études soulignant le rôle de l'enzyme CSE comme un inhibiteur de l'inflammasome serait dû à sa translocation à la mitochondrie.

L'identification d'un nouveau régulateur de l'inflammasome est importante pour l'élaboration de futurs traitements pour des infections virales et des maladies auto-inflammatoires. En effet, MPST est une cible potentielle afin de moduler l'activation de l'inflammasome et permettre de réduire les dégâts inflammatoires qui ont lieu lors d'une sur-stimulation de la réponse inflammatoire.

En perspective, il serait intéressant de déterminer le mécanisme d'action par lequel le sulfure d'hydrogène mitochondrial peut diminuer le clivage de la protéine gasdermine D et pourquoi son rôle de régulateur négatif semble affecter spécifiquement les inflammasomes ASC-dépendants. De plus, l'importance du H<sub>2</sub>S mitochondrial dans la régulation des voies inflammatoires lors d'infections virales devrait être étudiée pour mieux comprendre son implication dans les voies de signalisation plus complexes.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

---

- Abdollahi Govar A, Törő G, Szaniszló P, Pavlidou A, Bibli SI, Thanki K, Resto VA, Chao C, Hellmich MR, Szabo C (2020) 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase supports endothelial cell angiogenesis and bioenergetics. *British journal of pharmacology* 177(4):866-883.
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9(1):143-150.
- Ali FF, Abdel-Hamid HA, Toni ND (2018) H<sub>2</sub>S attenuates acute lung inflammation induced by administration of lipopolysaccharide in adult male rats. *Gen. Physiol. Biophys* 37(4):421-431.
- Alishahi M, Farzaneh M, Ghaedrahmati F, Nejabatdoust A, Sarkaki A, Khoshnam SE (2019) NLRP3 inflammasome in ischemic stroke: As possible therapeutic target. *International Journal of Stroke* 14(6):574-591.
- Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP-Y (2009) The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30(4):556-565.
- Alvarez DF, Housley N, Koloteva A, Zhou C, O'Donnell K, Audia JP (2016) Caspase-1 activation protects lung endothelial barrier function during infection-induced stress. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 55(4):500-510.
- Antonopoulos C, Russo HM, El Sanadi C, Martin BN, Li X, Kaiser WJ, Mocarski ES, Dubyak GR (2015) Caspase-8 as an effector and regulator of NLRP3 inflammasome signaling. *Journal of Biological Chemistry* 290(33):20167-20184.
- Augsburger F, Randi EB, Jendly M, Ascencao K, Dilek N, Szabo C (2020) Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the regulation of proliferation, migration, and bioenergetics in murine colon cancer cells. *Biomolecules* 10(3):447.
- Ball DP, Taabazuing CY, Griswold AR, Orth EL, Rao SD, Kotliar IB, Vostal LE, Johnson DC, Bachovchin DA (2020) Caspase-1 interdomain linker cleavage is required for pyroptosis. *Life science alliance* 3(3).
- Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, Barberà-Cremades M, Yagüe J, Ruiz-Ortiz E, Antón J (2014) The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature immunology* 15(8):738-748.
- Bawadekar M, De Andrea M, Lo Cigno I, Baldanzi G, Caneparo V, Graziani A, Landolfo S, Gariglio M (2015) The extracellular IFI16 protein propagates inflammation in endothelial cells via p38 MAPK and NF- $\kappa$ B p65 activation. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 35(6):441-453.
- Bazhanov N, Ivanciuc T, Wu H, Garofalo M, Kang J, Xian M, Casola A (2018) Thiol-activated hydrogen sulfide donors antiviral and anti-inflammatory activity in respiratory syncytial virus infection. *Viruses* 10(5):249.
- Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Calvo FQ, Henry E, Closset R, Dewals B, Thielen C, Gustin P (2009) Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *The Journal of clinical investigation* 119(12):3723-3738.

- Bedoya F, Sandler LL, Harton JA (2007) P2Y6 protein 2 modulates NF- $\kappa$ B and disrupts ASC: CLR interactions. *The Journal of Immunology* 178(6):3837-3845.
- Birnbaum Y, Tran D, Bajaj M, Ye Y (2019) DPP-4 inhibition by linagliptin prevents cardiac dysfunction and inflammation by targeting the Nlrp3/ASC inflammasome. *Basic research in cardiology* 114(5):1-22.
- Bogaerts V, Nuytemans K, Reumers J, Pals P, Engelborghs S, Pickut B, Corsmit E, Peeters K, Schymkowitz J, De Deyn PP (2008) Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease. *Human mutation* 29(6):832-840.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological reviews* 173:17-26.
- Boncristiani H, Criado M, Arruda E (2009) Respiratory viruses. *Encyclopedia of Microbiology* :500.
- Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, Gomez GA, Holley CL, Bierschenk D, Stacey KJ (2018) Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *Journal of Experimental Medicine* 215(3):827-840.
- Bourdonnay E, Zaslona Z, Penke LRK, Speth JM, Schneider DJ, Przybranowski S, Swanson JA, Mancuso P, Freeman CM, Curtis JL (2015) Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. *Journal of Experimental Medicine* 212(5):729-742.
- Bourgey M, Dali R, Eveleigh R, Chen KC, Letourneau L, Fillon J, Michaud M, Caron M, Sandoval J, Lefebvre F (2019) GenPipes: an open-source framework for distributed and scalable genomic analyses. *Gigascience* 8(6):giz037.
- Bowden DH & Adamson IY (1972) The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage. *The American journal of pathology* 68(3):521.
- Boyden ED & Dietrich WF (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature genetics* 38(2):240-244.
- Broz P & Dixit VM (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature reviews immunology* 16(7):407-420.
- Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM (2010) Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell host & microbe* 8(6):471-483.
- Bruey J-M, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C, Kress CL, Bailly-Maitre B, Li X, Osterman A (2007) Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 129(1):45-56.
- Brunette RL, Young JM, Whitley DG, Brodsky IE, Malik HS, Stetson DB (2012) Extensive evolutionary and functional diversity among mammalian AIM2-like receptors. *Journal of Experimental Medicine* 209(11):1969-1983.
- Cai S, Batra S, Wakamatsu N, Pacher P, Jeyaseelan S (2012) NLRC4 inflammasome-mediated production of IL-1 $\beta$  modulates mucosal immunity in the lung against gram-negative bacterial infection. *The Journal of Immunology* 188(11):5623-5635.
- Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevelin CG, Lefer DJ (2009) Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circulation research* 105(4):365-374.

- Cassel SL & Sutterwala FS (2010) Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *European journal of immunology* 40(3):607-611.
- Castelblanco M, Lugin J, Ehrchiou D, Nasi S, Ishii I, So A, Martinon F, Busso N (2018) Hydrogen sulfide inhibits NLRP3 inflammasome activation and reduces cytokine production both in vitro and in a mouse model of inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 293(7):2546-2557.
- Chakarov S, Lim HY, Tan L, Lim SY, See P, Lum J, Zhang X-M, Foo S, Nakamizo S, Duan K (2019) Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* 363(6432).
- Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, Schroder K (2014) The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 $\beta$  maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge. *Cell reports* 8(2):570-582.
- Chen Y, Jin S, Teng X, Hu Z, Zhang Z, Qiu X, Tian D, Wu Y (2018) Hydrogen sulfide attenuates LPS-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018.
- Chui AJ, Okondo MC, Rao SD, Gai K, Griswold AR, Johnson DC, Ball DP, Taabazuing CY, Orth EL, Vittimberga BA (2019) N-terminal degradation activates the NLRP1B inflammasome. *Science* 364(6435):82-85.
- Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, Chitty JL, Fraser JA, Jennings MP, Robertson AA (2019) MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nature chemical biology* 15(6):556-559.
- Davis BK, Wen H, Ting JP-Y (2011) The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* 29:707-735.
- de Almeida L, Khare S, Misharin AV, Patel R, Ratsimandresy RA, Wallin MC, Perlman H, Greaves DR, Hoffman HM, Dorfleutner A (2015) The PYRIN domain-only protein POP1 inhibits inflammasome assembly and ameliorates inflammatory disease. *Immunity* 43(2):264-276.
- Demarco B, Grayczyk JP, Bjanec E, Le Roy D, Tonnus W, Assenmacher C-A, Radaelli E, Fettlelet T, Mack V, Linkermann A (2020) Caspase-8-dependent gasdermin D cleavage promotes antimicrobial defense but confers susceptibility to TNF-induced lethality. *Science advances* 6(47):eabc3465.
- Díaz MO, Pomykala HM, Bohlander SK, Maltepe E, Malik K, Brownstein B, Olopade OI (1994) Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* 22(3):540-552.
- Dinarello CA (1998) Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-18, and the Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856(1):1-11.
- Dinarello CA (2011) Blocking interleukin-1 $\beta$  in acute and chronic autoinflammatory diseases. *Journal of internal medicine* 269(1):16-28.
- Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang D-C, Shao F (2016) Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 535(7610):111-116.
- Dong X, Zheng Z, Lin P, Fu X, Li F, Jiang J, Zhu P (2020) ACPAs promote IL-1 $\beta$  production in rheumatoid arthritis by activating the NLRP3 inflammasome. *Cellular & molecular immunology* 17(3):261-271.

- Dorfleutner A, Bryan NB, Talbott SJ, Funya KN, Rellick SL, Reed JC, Shi X, Rojanasakul Y, Flynn DC, Stehlik C (2007) Cellular pyrin domain-only protein 2 is a candidate regulator of inflammasome activation. *Infection and Immunity* 75(3):1484-1492.
- Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320(5876):674-677.
- Druilhe A, Srinivasula S, Razmara M, Ahmad M, Alnemri E (2001) Regulation of IL-1 $\beta$  generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins. *Cell Death & Differentiation* 8(6):649-657.
- Du J, Huang Y, Yan H, Zhang Q, Zhao M, Zhu M, Liu J, Chen SX, Bu D, Tang C (2014) Hydrogen sulfide suppresses oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-stimulated monocyte chemoattractant protein 1 generation from macrophages via the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway. *Journal of Biological Chemistry* 289(14):9741-9753.
- Dubourdeau M, Athman R, Balloy V, Huerre M, Chignard M, Philpott DJ, Latgé J-P, Ibrahim-Granet O (2006) *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *The Journal of Immunology* 177(6):3994-4001.
- Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, Ting JP-Y (2007) Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(19):8041-8046.
- Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *The EMBO journal* 30(23):4701-4711.
- Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, Peaper DR, Bertin J, Eisenbarth SC, Gordon JI (2011) NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145(5):745-757.
- Elliott EI & Sutterwala FS (2015) Initiation and perpetuation of NLRP 3 inflammasome activation and assembly. *Immunological reviews* 265(1):35-52.
- Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Sipe JD, Kuida K, Flavell RA, Dinarello CA (1997) Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice. *The Journal of Immunology* 158(4):1818-1824.
- Farrar MA & Schreiber RD (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual review of immunology* 11(1):571-611.
- Fattah EA, Bhattacharya A, Herron A, Safdar Z, Eissa NT (2015) Critical role for IL-18 in spontaneous lung inflammation caused by autophagy deficiency. *The Journal of Immunology* 194(11):5407-5416.
- Faustin B, Chen Y, Zhai D, Le Negrate G, Lartigue L, Satterthwait A, Reed JC (2009) Mechanism of Bcl-2 and Bcl-XL inhibition of NLRP1 inflammasome: loop domain-dependent suppression of ATP binding and oligomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(10):3935-3940.
- Faustin B, Lartigue L, Bruey J-M, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I, Reed JC (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular cell* 25(5):713-724.

- Fenini G, Grossi S, Contassot E, Biedermann T, Reichmann E, French LE, Beer H-D (2018) Genome editing of human primary keratinocytes by CRISPR/Cas9 reveals an essential role of the NLRP1 inflammasome in UVB sensing. *Journal of Investigative Dermatology* 138(12):2644-2652.
- Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri E (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death & Differentiation* 14(9):1590-1604.
- Finger JN, Lich JD, Dare LC, Cook MN, Brown KK, Duraiswami C, Bertin JJ, Gough PJ (2012) Autolytic proteolysis within the function to find domain (FIIND) is required for NLRP1 inflammasome activity. *Journal of Biological Chemistry* 287(30):25030-25037.
- Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT (2008) Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(11):4312-4317.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti T-D, Özören N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 $\beta$  in salmonella-infected macrophages. *Nature immunology* 7(6):576-582.
- Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A (2014) The adaptor ASC has extracellular and prionoid activities that propagate inflammation. *Nature immunology* 15(8):727-737.
- Frew BC, Joag VR, Mogridge J (2012) Proteolytic processing of Nlrp1b is required for inflammasome activity. *PLoS pathogens* 8(4):e1002659.
- Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R (2012) Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(8):2943-2948.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 273(49):32608-32613.
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010a) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* 12(2):119-131.
- Geisler S, Holmström KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, Fiesel FC, Kahle PJ, Springer W (2010b) The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 6(7):871-878.
- Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA (2006) Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *The Journal of Immunology* 176(6):3717-3724.
- Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M (1997) Caspase-1 processes IFN- $\gamma$ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- $\gamma$  production. *Nature* 386(6625):619-623.
- Gilbert C, Grivart G, Champagne C, Doiron K, Lesage G, Alnemri ES, Rodrigue-Gervais I-G (En préparation) A genome-wide screen uncovers a regulatory role for mitochondrial mercaptopyrivate sulfurtransferase in inflammasome disorders.

- Gong Q, Robinson K, Xu C, Huynh PT, Chong KHC, Tan EYJ, Zhang J, Boo ZZ, Teo DET, Lay K (2021) Structural basis for distinct inflammasome complex assembly by human NLRP1 and CARD8. *Nature communications* 12(1):1-15.
- Gordon S & Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews immunology* 5(12):953-964.
- Gray EE, Winship D, Snyder JM, Child SJ, Geballe AP, Stetson DB (2016) The AIM2-like receptors are dispensable for the interferon response to intracellular DNA. *Immunity* 45(2):255-266.
- Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F, Diaz-del-Olmo I, Nichols E-M, Davis DM, Brough D, Lopez-Castejon G (2020) Priming is dispensable for NLRP3 inflammasome activation in human monocytes in vitro. *Frontiers in immunology* 11:2573.
- Groeger M, Matallo J, McCook O, Wagner F, Wachter U, Bastian O, Gierer S, Reich V, Stahl B, Huber-Lang M (2012) Temperature and cell-type dependency of sulfide effects on mitochondrial respiration. *Shock* 38(4):367-374.
- Guadiz G, Sporn LA, Goss RA, Lawrence SO, Marder VJ, Simpson-Haidaris PJ (1997) Polarized secretion of fibrinogen by lung epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17(1):60-69.
- Guan K, Zheng Z, Song T, He X, Xu C, Zhang Y, Ma S, Wang Y, Xu Q, Cao Y (2013) MAVS regulates apoptotic cell death by decreasing K48-linked ubiquitination of voltage-dependent anion channel 1. *Molecular and cellular biology* 33(16):3137-3149.
- Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, Farlik M, Decker T, Du Pasquier RA, Romero P (2011) Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34(2):213-223.
- Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN (2013) Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine* 210(10):1977-1992.
- Gurung P, Anand PK, Malireddi RS, Walle LV, Van Opdenbosch N, Dillon CP, Weinlich R, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti T-D (2014) FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *The Journal of Immunology* 192(4):1835-1846.
- Gutierrez O, Pipaon C, Fernandez-Luna JL (2004) Ipaf is upregulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human leukemia cells. *FEBS letters* 568(1-3):79-82.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$ . *Nature immunology* 9(8):857-865.
- Hanaoka K, Sasakura K, Suwanai Y, Toma-Fukai S, Shimamoto K, Takano Y, Shibuya N, Terai T, Komatsu T, Ueno T (2017) Discovery and mechanistic characterization of selective inhibitors of H<sub>2</sub>S-producing enzyme: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) targeting active-site cysteine persulfide. *Scientific reports* 7(1):1-12.
- Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y, Mizuguchi J, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mitsuyama M (2013) Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature immunology* 14(12):1247-1255.

- Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, Lambe EM, Creagh EM, Golenbock DT, Tschopp J (2011) Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting pro-IL-1 $\beta$  for degradation. *Journal of Biological Chemistry* 286(11):9587-9597.
- He W-t, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang Z-H, Zhong C-Q, Han J (2015) Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Cell research* 25(12):1285-1298.
- He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G (2016) NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530(7590):354-357.
- Heinen A, Camara AK, Aldakkak M, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF (2007) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-induced K<sup>+</sup> influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292(1):C148-C156.
- Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, D'addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G (1993) Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Molecular and cellular biology* 13(10):6231-6240.
- Hong P, Gu R-N, Li F-X, Xiong X-X, Liang W-B, You Z-J, Zhang H-F (2019) NLRP3 inflammasome as a potential treatment in ischemic stroke concomitant with diabetes. *Journal of neuroinflammation* 16(1):1-13.
- Hopstädter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, Meyerhans A, Gortner L, Lehr C-M, Huwer H (2010) Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respiratory research* 11(1):1-15.
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458(7237):514-518.
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K-K, Schlee M (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *science* 314(5801):994-997.
- Humke EW, Shriver SK, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM (2000) ICEBERG: a novel inhibitor of interleukin-1 $\beta$  generation. *Cell* 103(1):99-111.
- Humphries F, Shmuel-Galia L, Ketelut-Carneiro N, Li S, Wang B, Nemmara VV, Wilson R, Jiang Z, Khalighinejad F, Muneeruddin K (2020) Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science* 369(6511):1633-1637.
- Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A (2010) Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature immunology* 11(5):404-410.
- Ilyinskii PO, Gabai VL, Sunyaev SR, Thoidis G, Shneider AM (2007) Toxicity of influenza A virus matrix protein 2 for mammalian cells is associated with its intrinsic proton-channeling activity. *Cell Cycle* 6(16):2043-2047.
- Inohara N, Koseki T, Del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kB. *Journal of Biological Chemistry* 274(21):14560-14567.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236(2):313-322.



- Ivanciuc T, Sbrana E, Ansar M, Bazhanov N, Szabo C, Casola A, Garofalo RP (2016) Hydrogen sulfide is an antiviral and antiinflammatory endogenous gasotransmitter in the airways. Role in respiratory syncytial virus infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 55(5):684-696.
- Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L (2013) Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39(2):311-323.
- Jain N, Lodha R, Kabra S (2001) Upper respiratory tract infections. *The Indian Journal of Pediatrics* 68(12):1135-1138.
- Janeway CA (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 1-13.
- Jin T, Perry A, Jiang J, Smith P, Curry JA, Unterholzner L, Jiang Z, Horvath G, Rathinam VA, Johnstone RW (2012) Structures of the HIN domain: DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* 36(4):561-571.
- Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C (2016) Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology* 13(2):148-159.
- Johnson DC, Taabazuing CY, Okondo MC, Chui AJ, Rao SD, Brown FC, Reed C, Peguero E, de Stanchina E, Kentsis A (2018) DPP8/DPP9 inhibitor-induced pyroptosis for treatment of acute myeloid leukemia. *Nature medicine* 24(8):1151-1156.
- Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441(7089):101-105.
- Kawano H, Kayama H, Nakama T, Hashimoto T, Umemoto E, Takeda K (2016) IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *International immunology* 28(10):489-501.
- Kayagaki N, Kornfeld OS, Lee BL, Stowe IB, O'Rourke K, Li Q, Sandoval W, Yan D, Kang J, Xu M (2021) NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature* 591(7848):131-136.
- Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT (2015) Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526(7575):666-671.
- Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle LV, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S (2011) Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479(7371):117-121.
- Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, Chandran B (2011) IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell host & microbe* 9(5):363-375.
- Kesavardhana S & Kanneganti T-D (2017) Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *International Immunology* 29(5):201-210.
- Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L, Rojanasakul Y, Stehlik C (2012) An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 36(3):464-476.

- Khare S, Ratsimandresy RA, De Almeida L, Cuda CM, Rellick SL, Misharin AV, Wallin MC, Gangopadhyay A, Forte E, Gottwein E (2014) The PYRIN domain-only protein POP3 inhibits ALR inflammasomes and regulates responses to infection with DNA viruses. *Nature immunology* 15(4):343-353.
- Kimura Y, Goto Y-I, Kimura H (2010) Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants & redox signaling* 12(1):1-13.
- Kimura Y & Kimura H (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB journal* 18(10):1165-1167.
- Klimpel KR, Arora N, Leppla SH (1994) Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Molecular microbiology* 13(6):1093-1100.
- Kortmann J, Brubaker SW, Monack DM (2015) Cutting edge: inflammasome activation in primary human macrophages is dependent on flagellin. *The Journal of Immunology* 195(3):815-819.
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP (2003) IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology* 4(1):69-77.
- Kovacs SB & Miao EA (2017) Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends in cell biology* 27(9):673-684.
- Krishnan SM, Ling YH, Huuskes BM, Ferens DM, Saini N, Chan CT, Diep H, Kett MM, Samuel CS, Kemp-Harper BK (2019) Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovascular research* 115(4):776-787.
- Kumar V (2020) Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury. *Frontiers in immunology* :1722.
- Kuriakose T, Man SM, Malireddi RS, Karki R, Kesavardhana S, Place DE, Neale G, Vogel P, Kanneganti T-D (2016) ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways. *Science immunology* 1(2).
- Lagoutte E, Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Blachier F, Bouillaud F (2010) Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797(8):1500-1511.
- Lai J-J, Cruz FM, Rock KL (2020) Immune sensing of cell death through recognition of histone sequences by C-type lectin-receptor-2d causes inflammation and tissue injury. *Immunity* 52(1):123-135. e126.
- Lambrecht BN (2017) TGF- $\beta$  gives an air of exclusivity to alveolar macrophages. *Immunity* 47(5):807-809.
- Lamkanfi M, Denecker G, Kalai M, D'hondt K, Meeus A, Declercq W, Saelens X, Vandenabeele P (2004) INCA, a novel human caspase recruitment domain protein that inhibits interleukin-1 $\beta$  generation. *Journal of Biological Chemistry* 279(50):51729-51738.
- Landsman L & Jung S (2007) Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *The Journal of Immunology* 179(6):3488-3494.

- Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews immunology* 13(6):397-411.
- Lee M-S, Kwon H, Lee E-Y, Kim D-J, Park J-H, Tesh VL, Oh T-K, Kim MH (2016) Shiga toxins activate the NLRP3 inflammasome pathway to promote both production of the proinflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  and apoptotic cell death. *Infection and Immunity* 84(1):172-186.
- Lemmers B, Salmena L, Bidère N, Su H, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Ohashi PS, Jurisicova A, Lenardo M, Hakem R (2007) Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NF $\kappa$ B signaling. *Journal of Biological Chemistry* 282(10):7416-7423.
- Li H-D, Zhang Z-R, Zhang Q-X, Qin Z-C, He D-M, Chen J-S (2013) Treatment with exogenous hydrogen sulfide attenuates hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *European journal of applied physiology* 113(6):1555-1563.
- Li H, Ma Y, Escaffre O, Ivanciuc T, Komaravelli N, Kelley JP, Coletta C, Szabo C, Rockx B, Garofalo RP (2015) Role of hydrogen sulfide in paramyxovirus infections. *Journal of virology* 89(10):5557-5568.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4):479-489.
- Li S, Wang L, Xu Z, Huang Y, Xue R, Yue T, Xu L, Gong F, Bai S, Wu Q (2021) ASC deglutathionylation is a checkpoint for NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Experimental Medicine* 218(9):e20202637.
- Li X, Li Z, Li B, Zhu X, Lai X (2019) Klotho improves diabetic cardiomyopathy by suppressing the NLRP3 inflammasome pathway. *Life sciences* 234:116773.
- Libiad M, Yadav PK, Vitvitsky V, Martinov M, Banerjee R (2014) Organization of the Human Mitochondrial Hydrogen Sulfide Oxidation Pathway\* $\diamond$ . *Journal of Biological Chemistry* 289(45):30901-30910.
- Liesman RM, Buchholz UJ, Luongo CL, Yang L, Proia AD, DeVincenzo JP, Collins PL, Pickles RJ (2014) RSV-encoded NS2 promotes epithelial cell shedding and distal airway obstruction. *The Journal of clinical investigation* 124(5).
- Lin Z, Altaf N, Li C, Chen M, Pan L, Wang D, Xie L, Zheng Y, Fu H, Han Y (2018) Hydrogen sulfide attenuates oxidative stress-induced NLRP3 inflammasome activation via S-sulfhydrating c-Jun at Cys269 in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1864(9):2890-2900.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017a) NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy* 2(1):1-9.
- Liu W, Liu Xn, Li Y, Zhao J, Liu Z, Hu Z, Wang Y, Yao Y, Miller AW, Su B (2017b) LRRK2 promotes the activation of NLRC4 inflammasome during Salmonella Typhimurium infection. *Journal of Experimental Medicine* 214(10):3051-3066.
- Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J (2016) Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535(7610):153-158.
- Lohninger L, Tomasova L, Praschberger M, Hintersteiner M, Erker T, Gmeiner BM, Laggner H (2015) Hydrogen sulphide induces HIF-1 $\alpha$  and Nrf2 in THP-1 macrophages. *Biochimie* 112:187-195.

- Luo Z-l, Ren J-d, Huang Z, Wang T, Xiang K, Cheng L, Tang L-j (2017) The role of exogenous hydrogen sulfide in free fatty acids induced inflammation in macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry* 42(4):1635-1644.
- Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, Vogel P, Milasta S, Martinez J, Huang G, Green M, Kundu M, Chi H (2013) Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nature immunology* 14(5):480-488.
- Maelfait J, Vercaemmen E, Janssens S, Schotte P, Haegman M, Magez S, Beyaert R (2008) Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 $\beta$  maturation by caspase-8. *The Journal of experimental medicine* 205(9):1967-1973.
- Man SM & Kanneganti TD (2015) Regulation of inflammasome activation. *Immunological reviews* 265(1):6-21.
- Man SM, Toulomousis P, Hopkins L, Monie TP, Fitzgerald KA, Bryant CE (2013) Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1 $\beta$  production. *The Journal of Immunology* 191(10):5239-5246.
- Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, He Z, Zeng Y, Hu Y, Sun S (2013) Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell research* 23(2):201-212.
- Mariathasan S & Monack DM (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature reviews immunology* 7(1):31-40.
- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430(6996):213-218.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440(7081):228-232.
- Marino A, Martelli A, Citi V, Fu M, Wang R, Calderone V, Levi R (2016) The novel H<sub>2</sub>S donor 4-carboxy-phenyl isothiocyanate inhibits mast cell degranulation and renin release by decreasing intracellular calcium. *British journal of pharmacology* 173(22):3222-3234.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front biosci* 13(1):453-461.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular cell* 10(2):417-426.
- Matallo J, Vogt J, McCook O, Wachter U, Tillmans F, Groeger M, Szabo C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E (2014) Sulfide-inhibition of mitochondrial respiration at very low oxygen concentrations. *Nitric oxide* 41:79-84.
- Matusiak M, Van Opdenbosch N, Walle LV, Sirard J-C, Kanneganti T-D, Lamkanfi M (2015) Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAI5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(5):1541-1546.
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12(1):991-1045.
- Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A (2008) Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nature immunology* 9(8):866-872.

- Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, Leaf IA, Aderem A (2010) Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(7):3076-3080.
- Miao L, Xin X, Xin H, Shen X, Zhu Y-Z (2016) Hydrogen sulfide recruits macrophage migration by integrin  $\beta$ 1- $\text{Src}$ -FAK/Pyk2-Rac pathway in myocardial infarction. *Scientific reports* 6(1):1-10.
- Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H (2011) Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochemical Journal* 439(3):479-485.
- Ming X, Li W, Maeda Y, Blumberg B, Raval S, Cook SD, Dowling PC (2002) Caspase-1 expression in multiple sclerosis plaques and cultured glial cells. *Journal of the neurological sciences* 197(1-2):9-18.
- Módos K, Coletta C, Erdélyi K, Papapetropoulos A, Szabo C (2013) Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *The FASEB Journal* 27(2):601-611.
- Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, Greene WC (2014) IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science* 343(6169):428-432.
- Monteleone M, Stanley AC, Chen KW, Brown DL, Bezbradica JS, von Pein JB, Holley CL, Boucher D, Shakespear MR, Kapetanovic R (2018) Interleukin-1 $\beta$  maturation triggers its relocation to the plasma membrane for gasdermin-D-dependent and-independent secretion. *Cell reports* 24(6):1425-1433.
- Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G (2013) K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38(6):1142-1153.
- Muruve DA, Pétrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J (2008) The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452(7183):103-107.
- Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH (2009) H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration. *Science signaling* 2(96):ra72-ra72.
- Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T (1998) Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and cell biology* 110(3):243-250.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP (2011) Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release. *Nature immunology* 12(3):222.
- Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *Journal of cell biology* 183(5):795-803.
- Nogusa S, Thapa RJ, Dillon CP, Liedmann S, Oguin III TH, Ingram JP, Rodriguez DA, Kosoff R, Sharma S, Sturm O (2016) RIPK3 activates parallel pathways of MLKL-driven necroptosis and FADD-mediated apoptosis to protect against influenza A virus. *Cell host & microbe* 20(1):13-24.

- Okondo MC, Johnson DC, Sridharan R, Go EB, Chui AJ, Wang MS, Poplawski SE, Wu W, Liu Y, Lai JH (2017) DPP8 and DPP9 inhibition induces pro-caspase-1-dependent monocyte and macrophage pyroptosis. *Nature chemical biology* 13(1):46-53.
- Pan P, Shen M, Yu Z, Ge W, Chen K, Tian M, Xiao F, Wang Z, Wang J, Jia Y (2021) SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nature communications* 12(1):1-17.
- Panagaki T, Randi EB, Szabo C (2020) Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the regulation of proliferation and cellular bioenergetics in human Down syndrome fibroblasts. *Biomolecules* 10(4):653.
- Parsamanesh N, Moossavi M, Bahrami A, Fereidouni M, Barreto G, Sahebkar A (2019) NLRP3 inflammasome as a treatment target in atherosclerosis: a focus on statin therapy. *International immunopharmacology* 73:146-155.
- Patterson HC, Gerbeth C, Thiru P, Vögtle NF, Knoll M, Shahsafaei A, Samocha KE, Huang CX, Harden MM, Song R (2015) A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(42):E5679-E5688.
- Perregaux D & Gabel CA (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. *Journal of Biological Chemistry* 269(21):15195-15203.
- Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C (2016) Human influenza virus infections. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. Thieme Medical Publishers, p 487-500.
- Petersen LC (1977) The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *Biochimica et biophysica acta* 460(2):299-307.
- Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death & Differentiation* 14(9):1583-1589.
- Pierini R, Juruj C, Perret M, Jones C, Mangeot P, Weiss D, Henry T (2012) AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in Francisella-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell Death & Differentiation* 19(10):1709-1721.
- Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D, Harvey K, Deas E, Harvey RJ, McDonald N (2007) The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nature cell biology* 9(11):1243-1252.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *science* 282(5396):2085-2088.
- Powell CR, Dillon KM, Matson JB (2018) A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical pharmacology* 149:110-123.
- Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J (2013) Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Molecular cell* 49(2):331-338.
- Qu Y, Misaghi S, Izrael-Tomasevic A, Newton K, Gilmour LL, Lamkanfi M, Louie S, Kayagaki N, Liu J, Kömüves L (2012) Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature* 490(7421):539-542.

- Ramos HJ, Lanteri MC, Blahnik G, Negash A, Suthar MS, Brassil MM, Sodhi K, Treuting PM, Busch MP, Norris PJ (2012) IL-1 $\beta$  signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. *PLoS pathogens* 8(11):e1003039.
- Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E (2010) The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature immunology* 11(5):395-402.
- Rayamajhi M, Zak DE, Chavarria-Smith J, Vance RE, Miao EA (2013) Cutting edge: Mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *The Journal of Immunology* 191(8):3986-3989.
- Reinholz M, Kawakami Y, Salzer S, Kreuter A, Dombrowski Y, Koglin S, Kresse S, Ruzicka T, Schaubert J (2013) HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Archives of dermatological research* 305(8):723-732.
- Rodrigue-Gervais IG, Doiron K, Champagne C, Mayes L, Leiva-Torres GA, Vanié P, Douglas T, Vidal SM, Alnemri ES, Saleh M (2018) The mitochondrial protease HtrA2 restricts the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *Scientific reports* 8(1):1-11.
- Rogers C, Erkes DA, Nardone A, Aplin AE, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2019) Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nature communications* 10(1):1-17.
- Rubins JB (2003) Alveolar macrophages: wielding the double-edged sword of inflammation. (American Thoracic Society), p 103-104.
- Rühl S, Shkarina K, Demarco B, Heilig R, Santos JC, Broz P (2018) ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* 362(6417):956-960.
- Sadasivam S, Gupta S, Radha V, Batta K, Kundu TK, Swarup G (2005) Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis. *Oncogene* 24(4):627-636.
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* 456(7219):264-268.
- Salgarello M, Visconti G, Barone-Adesi L (2013) Interlocking circumareolar suture with undyed polyamide thread: a personal experience. *Aesthetic plastic surgery* 37(5):1061-1062.
- Sandstrom A, Mitchell PS, Goers L, Mu EW, Lesser CF, Vance RE (2019) Functional degradation: A mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes. *Science* 364(6435).
- Schattgen SA, Gao G, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA (2016) Cutting edge: DNA in the lung microenvironment during influenza virus infection tempers inflammation by engaging the DNA sensor AIM2. *The Journal of Immunology* 196(1):29-33.
- Schulz C, Lai X, Bertrams W, Jung AL, Sittka-Stark A, Herkt CE, Janga H, Zscheppang K, Stielow C, Schulte L (2017) THP-1-derived macrophages render lung epithelial cells hyporesponsive to *Legionella pneumophila*—a systems biology study. *Scientific reports* 7(1):1-15.
- Schyns J, Bai Q, Ruscitti C, Radermecker C, De Schepper S, Chakarov S, Farnir F, Pirottin D, Ginhoux F, Boeckxstaens G (2019) Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nature communications* 10(1):1-16.

- Sen N, Paul BD, Gadalla MM, Mustafa AK, Sen T, Xu R, Kim S, Snyder SH (2012) Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- $\kappa$ B mediates its antiapoptotic actions. *Molecular cell* 45(1):13-24.
- Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell* 122(5):669-682.
- Sha W, Mitoma H, Hanabuchi S, Bao M, Weng L, Sugimoto N, Liu Y, Zhang Z, Zhong J, Sun B (2014) Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(45):16059-16064.
- Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH (2012) Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature immunology* 13(3):255-263.
- Shi H, Wang Y, Li X, Zhan X, Tang M, Fina M, Su L, Pratt D, Bu CH, Hildebrand S (2016) NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nature immunology* 17(3):250-258.
- Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F (2014) Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514(7521):187-192.
- Shim D-W & Lee K-H (2018) Posttranslational regulation of the NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome. *Frontiers in immunology* 9:1054.
- Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36(3):401-414.
- Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA (1997) Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the interferon- $\gamma$  promoter. *Journal of Biological Chemistry* 272(48):30412-30420.
- Simpson Haidaris PJ (1997) Induction of fibrinogen biosynthesis and secretion from cultured pulmonary epithelial cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 89(3):873-882.
- 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 (2017) NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation. *Molecular cell* 68(1):185-197. e186.
- Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, Mikulski Z, Khorram N, Rosenthal P, Broide DH (2013) Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 210(4):775-788.
- Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, Zhang Z, Hegde R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2003) Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *Journal of Biological Chemistry* 278(34):31469-31472.
- Strittmatter GE, Sand J, Sauter M, Seyffert M, Steigerwald R, Fraefel C, Smola S, French LE, Beer H-D (2016) IFN- $\gamma$  primes keratinocytes for HSV-1-induced inflammasome activation. *Journal of Investigative Dermatology* 136(3):610-620.
- Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN (2013) The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153(2):348-361.



- Suzuki S, Franchi L, He Y, Muñoz-Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C, Núñez G (2014) Shigella type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation independently of Pkc $\delta$ . *PLoS pathogens* 10(2):e1003926.
- Szczesny B, Módis K, Yanagi K, Coletta C, Le Trionnaire S, Perry A, Wood ME, Whiteman M, Szabo C (2014) AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric oxide* 41:120-130.
- Takahashi M (2019) Cell-specific roles of NLRP3 inflammasome in myocardial infarction. *Journal of cardiovascular pharmacology* 74(3):188-193.
- Tenthorey JL, Chavez RA, Thompson TW, Deets KA, Vance RE, Rauch I (2020) NLRC4 inflammasome activation is NLRP3- and phosphorylation-independent during infection and does not protect from melanoma. *Journal of Experimental Medicine* 217(7).
- Thapa RJ, Ingram JP, Ragan KB, Nogusa S, Boyd DF, Benitez AA, Sridharan H, Kosoff R, Shubina M, Landsteiner VJ (2016) DAI senses influenza A virus genomic RNA and activates RIPK3-dependent cell death. *Cell host & microbe* 20(5):674-681.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* 356(6372):768-774.
- Tomita M, Nagahara N, Ito T (2016) Expression of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the mouse. *Molecules* 21(12):1707.
- Torii Y, Kawada J-i, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y (2017) Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PloS one* 12(4):e0175053.
- Tsu BV, Beierschmitt C, Ryan AP, Agarwal R, Mitchell PS, Daugherty MD (2021) Diverse viral proteases activate the NLRP1 inflammasome. *Elife* 10:e60609.
- Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, Hori O, Mahib MR, Yamaguchi Y, Miura M (2019) Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nature communications* 10(1):1-19.
- Ubuka T, Ohta J, Yao W-B, Abe T, Teraoka T, Kurozumi Y (1992) L-Cysteine metabolism via 3-mercaptopyruvate pathway and sulfate formation in rat liver mitochondria. *Amino Acids* 2(1-2):143-155.
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* 11(11):997-1004.
- Vajjhala PR, Mirams RE, Hill JM (2012) Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *Journal of Biological Chemistry* 287(50):41732-41743.
- Vijayaraj SL, Feltham R, Rashidi M, Frank D, Liu Z, Simpson DS, Ebert G, Vince A, Herold MJ, Kueh A (2021) The ubiquitylation of IL-1 $\beta$  limits its cleavage by caspase-1 and targets it for proteasomal degradation. *Nature communications* 12(1):1-16.
- Vladimer GI, Weng D, Paquette SWM, Vanaja SK, Rathinam VA, Aune MH, Conlon JE, Burbage JJ, Proulx MK, Liu Q (2012) The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity* 37(1):96-107.

- Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD (1999) Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 277(1):L167-L173.
- Wang P, Zhu S, Yang L, Cui S, Pan W, Jackson R, Zheng Y, Rongvaux A, Sun Q, Yang G (2015) Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. *Science* 350(6262):826-830.
- Wang SS, Chen YH, Chen N, Wang LJ, Chen DX, Weng HL, Dooley S, Ding HG (2017a) Hydrogen sulfide promotes autophagy of hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Cell death & disease* 8(3):e2688-e2688.
- Wang Y, Li H, Li Y, Zhao Y, Xiong F, Liu Y, Xue H, Yang Z, Ni S, Sahil A (2019a) Coriolus versicolor alleviates diabetic cardiomyopathy by inhibiting cardiac fibrosis and NLRP3 inflammasome activation. *Phytotherapy Research* 33(10):2737-2748.
- Wang Y, Ning X, Gao P, Wu S, Sha M, Lv M, Zhou X, Gao J, Fang R, Meng G (2017b) Inflammasome activation triggers caspase-1-mediated cleavage of cGAS to regulate responses to DNA virus infection. *Immunity* 46(3):393-404.
- Wang Y, Shi P, Chen Q, Huang Z, Zou D, Zhang J, Gao X, Lin Z (2019b) Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. *Journal of molecular cell biology* 11(12):1069-1082.
- Wannamaker W, Davies R, Namchuk M, Pollard J, Ford P, Ku G, Decker C, Charifson P, Weber P, Germann UA (2007) (S)-1-((S)-2-[[1-(4-amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino]-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R, 3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydrofuran-3-yl)-amide (VX-765), an orally available selective interleukin (IL)-converting enzyme/caspase-1 inhibitor, exhibits potent anti-inflammatory activities by inhibiting the release of IL-1 $\beta$  and IL-18. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321(2):509-516.
- Wei MC, Zong W-X, Cheng EH-Y, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517):727-730.
- WHO (2021) *Global Health estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability*. World Health Organization
- World Health Organization, <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates> (Consulté le 2021)
- Wizemann TM & Laskin DL (1994) Enhanced phagocytosis, chemotaxis, and production of reactive oxygen intermediates by interstitial lung macrophages following acute endotoxemia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 11(3):358-365.
- Wu D, Zhong P, Wang J, Wang H (2019) Exogenous hydrogen sulfide mitigates LPS+ ATP-induced inflammation by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and promoting autophagy in L02 cells. *Molecular and cellular biochemistry* 457(1):145-156.
- Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ (2013) Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339(6121):826-830.
- Xian H, Liu Y, Nilsson AR, Gatchalian R, Crother TR, Tourtellotte WG, Zhang Y, Aleman-Muench GR, Lewis G, Chen W (2021) Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation. *Immunity* 54(7):1463-1477. e1411.

- Yang G, Zhao K, Ju Y, Mani S, Cao Q, Puukila S, Khaper N, Wu L, Wang R (2013a) Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. *Antioxidants & redox signaling* 18(15):1906-1919.
- Yang J, Zhao Y, Shi J, Shao F (2013b) Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(35):14408-14413.
- Yang P, Zheng J, Wang S, Liu P, Xie M, Zhao D (2015) Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. *Virology* 485:223-232.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 5(7):730-737.
- Yoshizumi T, Imamura H, Taku T, Kuroki T, Kawaguchi A, Ishikawa K, Nakada K, Koshiba T (2017) RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. *Scientific reports* 7(1):1-12.
- Yu J, Nagasu H, Murakami T, Hoang H, Broderick L, Hoffman HM, Horng T (2014) Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(43):15514-15519.
- Zhang L, Chen S, Ruan J, Wu J, Tong AB, Yin Q, Li Y, David L, Lu A, Wang WL (2015) Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science* 350(6259):404-409.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO journal* 20(21):6008-6016.
- Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong Y-N, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F (2011) The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477(7366):596-600.
- Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan K-Y, Lim C, Harapas CR, Yu C-H, Xie WH, Sobota RM, Au VB (2018a) Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *Journal of Biological Chemistry* 293(49):18864-18878.
- Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, He F, Shalpour S, Lin X-j, Wong J, Ding S, Seki E, Schnabl B (2018b) New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 560(7717):198-203.
- Zhou L, Li P, Zhang M, Han B, Chu C, Su X, Li B, Kang H, Ning J, Zhang B (2020) Carbon black nanoparticles induce pulmonary fibrosis through NLRP3 inflammasome pathway modulated by miR-96 targeted FOXO3a. *Chemosphere* 241:125075.
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology* 11(2):136-140.
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469(7329):221-225.
- Zhu S, Ding S, Wang P, Wei Z, Pan W, Palm NW, Yang Y, Yu H, Li H-B, Wang G (2017) Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells. *Nature* 546(7660):667-670.

Zhuang T, Liu J, Chen X, Zhang L, Pi J, Sun H, Li L, Bauer R, Wang H, Yu Z (2019) Endothelial Foxp1 suppresses atherosclerosis via modulation of Nlrp3 inflammasome activation. *Circulation research* 125(6):590-605.