



**HAL**  
open science

# Etude de l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 ainsi que de la Gasdermine D dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone

Sarah Huot-Marchand

## ► To cite this version:

Sarah Huot-Marchand. Etude de l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 ainsi que de la Gasdermine D dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone. Immunologie. Université d'Orléans, 2023. Français. NNT : 2023ORLE1047 . tel-04522556

**HAL Id: tel-04522556**

**<https://theses.hal.science/tel-04522556>**

Submitted on 26 Mar 2024

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

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

**UNIVERSITÉ D'ORLÉANS**  
**ÉCOLE DOCTORALE**  
**SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT**

Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires (INEM)  
UMR 7355 - CNRS

**THÈSE** présentée par :

**Sarah HUOT-MARCHAND**

Soutenue le : **03 Février 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Etude de l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 ainsi que de la Gasdermine D dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone**

**Président du jury :**

**Dr. Catherine Mura**

Professeure, Université d'Orléans

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. Isabelle Couillin**

Directrice de recherche CNRS UMR7355, Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Dr. Etienne Meunier**

Chercheur CNRS, IPBS Université de Toulouse

**Dr. François Huaux**

Professeur, Université Catholique de Louvain

---

**JURY :**

**Dr. Catherine Mura**

Professeure, Université d'Orléans

**Dr. Etienne Meunier**

Chercheur CNRS, IPBS Université de Toulouse

**Dr. François Huaux**

Professeur, Université Catholique de Louvain

**Dr. Sylvie Gazzeri**

Directrice de recherche Inserm, IAB Grenoble

**Dr. Benoit Briard**

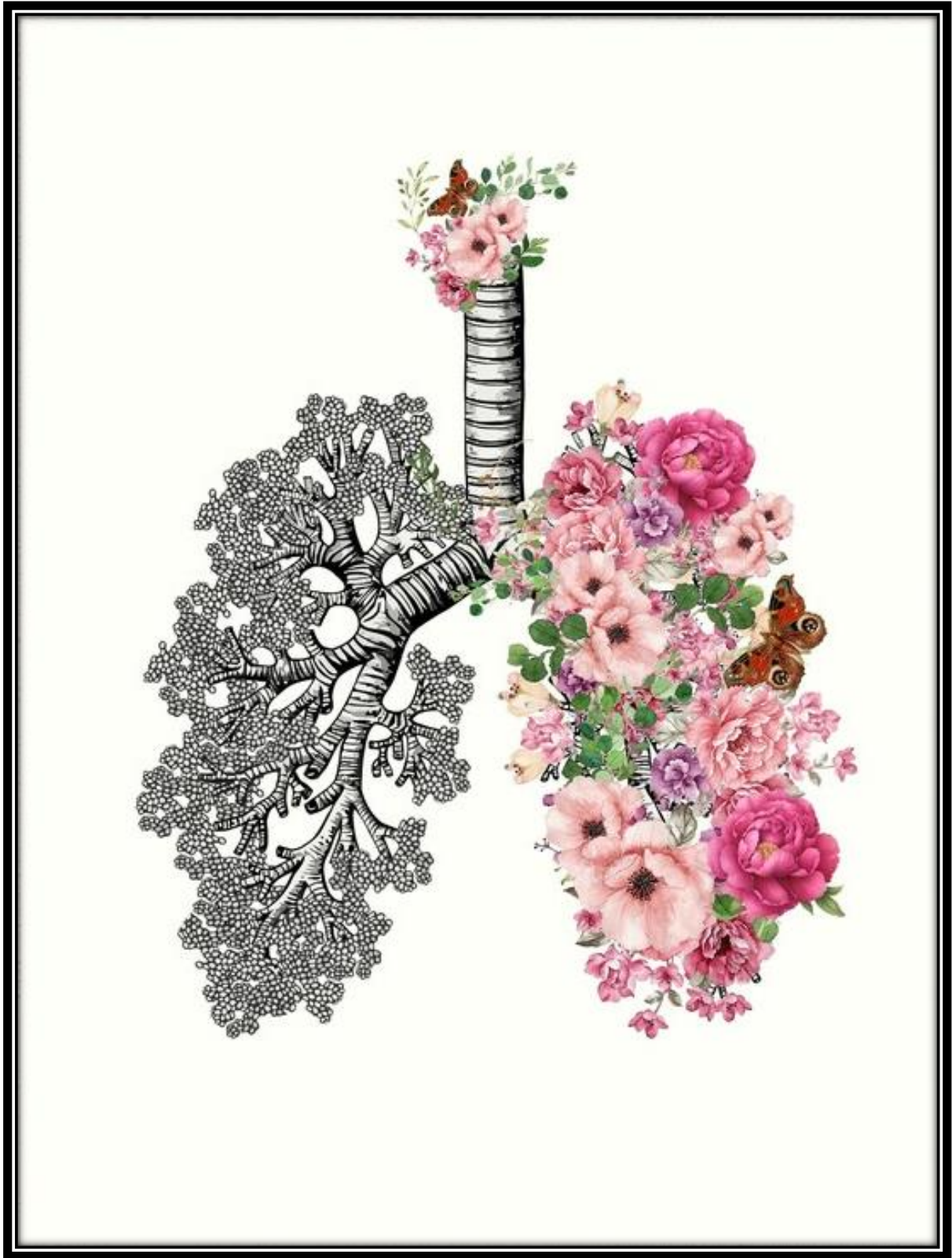
Chercheur Inserm UMR1100, Université de Tours

**Dr. Isabelle Couillin**

Directrice de recherche CNRS, Orléans







## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres du jury pour le temps pris et le soin qu'ils ont accordé à examiner mes travaux de thèse, c'est un honneur pour moi.

Ensuite, je remercie la directrice du laboratoire le Dr Valérie Quesniaux pour son accueil ainsi que le Dr Bernhard Ryffel pour son aide, l'ensemble de nos discussions et son soutien.

Merci à ma directrice de thèse, le Dr Isabelle Couillin ainsi que les Dr Nicolas Riteau et Aurélie Gombault pour leur aide dans la rédaction de l'ensemble de ces travaux.

Merci encore à celles qui ont travaillé à mes côtés pour accomplir ce travail et qui m'ont soutenue quoi qu'il arrive, elles sauront se reconnaître, à mes stagiaires pour leur motivation sans faille et leur travail de qualité. Je remercie les doctorantes pour le partage et le soutien. Je remercie tout particulièrement Florence pour ton aide dans la rédaction de mon manuscrit. Et bien sûr, mes parents et Julien, pour tout.

Pour finir, je tiens à remercier l'expérience qu'a été cette thèse car ces trois ans ont été des plus enrichissants pour la suite de ma vie, me permettant d'abord de découvrir réellement le monde de la recherche, d'acquérir bon nombre de compétences allant au-delà de la science ainsi que de savoir ce que je souhaite et ne souhaite plus.

## RESUME

La bronchopneumopathie chronique obstructive (**BPCO**) est aujourd'hui au 3ème rang des maladies mortelles dans le monde. Principalement due à la consommation de tabac, elle peut être exacerbée par des infections virales, bactériennes, fongiques ou par des polluants comme l'ozone et d'autres. Aujourd'hui, la pollution par l'ozone devient un problème de santé publique majeur, exacerbant bon nombre de pathologies pulmonaires préexistantes et pourrait en être à l'origine dans un futur proche. Etudier les effets de la cigarette ainsi que ceux de l'ozone, les mécanismes inflammatoires qui régissent les phases précoces de la mise en place de l'inflammation pulmonaire prend donc tout son sens. Les symptômes que présentent les patients atteints de BPCO sont pris en charge afin d'améliorer leur qualité de vie, en revanche il n'existe pas de réels traitements.

La première partie de mon projet de thèse repose sur l'étude de l'implication du NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) et de la Gasdermine D (GSDMD) dans l'inflammation pulmonaire provoquée par une exposition à la fumée de cigarette (CS) chez la souris, en utilisant un modèle de 6 semaines (modèle sub-chronique) et de 4 jours (modèle aigu). Les résultats de cette étude montrent que l'inflammation pulmonaire induite par la CS est médiée par NLRP3. En effet, les souris déficientes pour NLRP3 (*Nlrp3<sup>-/-</sup>*) et les souris sauvages (WT) traitées avec un inhibiteur de NLRP3 : le MCC950 exposées à la CS, montrent une diminution de l'inflammation pulmonaire qui se traduit par une diminution du nombre de neutrophiles recrutés dans l'espace bronchoalvéolaire, une baisse d'expression et de sécrétion des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les poumons et l'espace bronchoalvéolaire.

Par ailleurs, l'activation de la GSDMD après exposition à la CS est dépendante de NLRP3 dans les cellules épithéliales bronchiques et dans les macrophages recrutés au niveau l'espace bronchoalvéolaire.

La seconde partie de mes travaux de thèse est axée sur l'étude de l'implication du NOD-like receptor family, pyrin domain containing 6 (NLRP6) et de la GSDMD dans l'inflammation provoquée par une exposition à l'ozone chez la souris, en utilisant un modèle d'exposition de 6 semaines (modèle chronique). Les résultats de ces travaux montrent que l'inflammation pulmonaire induite par l'ozone dépend de l'activation de NLRP6. Dans ce modèle, NLRP6 est exprimé au niveau des pneumocytes de type 1 (AT1) ainsi que dans les cellules épithéliales bronchiques et dans quelques macrophages recrutés au niveau du liquide bronchoalvéolaire. Les souris déficientes pour NLRP6 (*Nlrp6<sup>-/-</sup>*) exposées à l'ozone, montrent une large diminution de l'ensemble des paramètres inflammatoires, ainsi que des paramètres attestant d'un début de fibrose et d'emphysème.

Dans cette partie du travail, nous avons démontré que le clivage de la caspase 11 est dépendant de l'expression de NLRP6 dans les AT1 ainsi que dans une population réduite des macrophages alvéolaires. De plus, le clivage de la GSDMD dépend de l'expression de NLRP6 et de la caspase 11

dans les cellules AT1. Dans les macrophages recrutés au niveau du tissu pulmonaire et au niveau de l'espace bronchoalvéolaire, nous observons une activation de la GSDMD indépendante de NLRP6/Caspase 11. Les résultats indiquant que l'expression de NLRP6 au niveau des AT1 orchestre l'inflammation pulmonaire dans ce modèle d'exposition chronique à l'ozone, sont confortés par le phénotype observé chez les souris déficientes pour NLRP6 au niveau des AT1 (*Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>+/+</sup>*) puisqu'elles montrent une diminution de l'inflammation après exposition à l'ozone par rapport à leur contrôle relatif (*Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acide<sup>+/+</sup>*).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse montre l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 ainsi que de la GSDMD dans la mise en place de l'inflammation pulmonaire provoquée par d'exposition à la CS ou à l'ozone.

**Mots-clés** : Inflammasome, NLRP3, NLRP6, Gasdermine D, Pneumocytes de Type 1 (AT1), Macrophages, Fumée de Cigarette, Ozone, Souris



## ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (**COPD**) is now the third leading cause of death in the world. Mainly due to tobacco consumption, the disease could be exacerbated by viral, bacterial, fungal infections or pollution like ozone and many others. Moreover, ozone pollution becomes a major public health problem, through exacerbate diseases and maybe in the future also directly causes lung diseases. To study smoke cigarette and ozone effects as well as their associated inflammatory mechanisms involved in pulmonary inflammation appears like an evidence. COPD patient's symptoms are managed to improve their life quality however there are no real treatments.

The first part of my PhD project is to study NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (**NLRP3**) and Gasdermin D (**GSDMD**) implication in pulmonary cigarette smoke (CS) induced inflammation in mice, using a 6 weeks (sub-chronic) and 4 days (acute) models. Results showed that CS induced pulmonary inflammation is dependent on NLRP3. Indeed, NLRP3 deficient mice (*Nlrp3<sup>-/-</sup>*) and wild type (WT) treated with an NLRP3 inhibitor: MCC950 exposed to CS, displayed a decrease of lung inflammation parameters as recruited neutrophils number in bronchoalveolar space and pro-inflammatory cytokines and chemokines expression and secretion in lungs and bronchoalveolar space.

The second part of my PhD is to study of NOD-like receptor family, pyrin domain containing 6 (**NLRP6**) and GSDMD implication in pulmonary ozone induced inflammation in mice, using a 6 weeks (chronic) exposure model. Results showed that pulmonary inflammation induced by chronic ozone exposure is dependent on NLRP6 activation. We first, demonstrated NLRP6 is expressed in type 1 pneumocytes de type 1 (AT1), bronchial epithelial cells and lung as well as bronchoalveolar recruited macrophages. Mice deficient for NLRP6 (*Nlrp6<sup>-/-</sup>*) chronically exposed to ozone display an important reduction of inflammatory parameters, fibrosis and emphysema parameters.

We further demonstrated Caspase 11 cleavage is dependent on NLRP6 in AT1 cells and in a part of bronchoalveolar recruited macrophages. Moreover, GSDMD cleavage is dependent on NLRP6 and Caspase 11 in AT1 cells. In both, lung and bronchoalveolar space recruited macrophages, we observed NLRP6/Caspase 11 independent GSDMD cleavage. These results which indicate that NLRP6 expression in AT1 cells orchestrate pulmonary inflammation in ozone exposure model were confirmed thanks to NLRP6 deficient mice in AT1 cells (*Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>+/+</sup>*) that display a decrease of inflammation after ozone exposure compared to their relative controls (*Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acide<sup>+/+</sup>*).

All together, these results showed that NLRP3, NLRP6 and GSDMD implication in pulmonary inflammation induced by CS or ozone.

**Key words** : Inflammasome, NLRP3, NLRP6, Gasdermin D, Type 1 Pneumocytes (AT1), Macrophages, Smoke Cigarette, Ozone, Mice

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	5
RESUME.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	17
INTRODUCTION.....	19
A- Les poumons.....	20
1) Mise en place de l'arborescence pulmonaire de l'embryon humain.....	20
2) Organisation des poumons chez l'Homme.....	21
a) Structure :.....	21
b) L'épithélium pulmonaire :.....	21
c) Le surfactant :.....	23
d) Le mucus :.....	23
e) Le microbiote pulmonaire :.....	24
B- Qualité de l'air, le tabagisme et pollution par l'ozone.....	25
1) La qualité de l'air au quotidien.....	25
2) Le tabagisme.....	26
a) Composition :.....	26
b) Epidémiologie :.....	26
c) Pathologies associées :.....	27
3) La pollution par l'ozone (O <sub>3</sub> ).....	27

<b>C- Cas de la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)</b> .....	<b>30</b>
1) Qu'est-ce que la BPCO .....	30
2) Epidémiologie .....	31
3) Diagnostic et prise en charge.....	31
<b>D- La réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette ou par l'ozone</b> .....	<b>33</b>
1) Les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire pulmonaire.....	33
2) Rôle des senseurs de l'immunité .....	35
a) Les signaux de dangers après exposition à des polluants et/ou à la CS :.....	35
b) Les senseurs d'Acides Nucléiques .....	36
c) Les Toll Like Receptors (TLR) .....	37
d) Les RIG Like Receptors (RLR).....	38
e) Les NOD Like Receptors (NLR).....	39
3) Les paramètres solubles de l'inflammation : les cytokines.....	45
a) Les chimiokines .....	45
b) Les Interleukines.....	46
c) La famille des TNF (Tumor Necrosis Factors).....	46
4) Les facteurs de remodelage tissulaire .....	47
a) Les protéases et métalloprotéases (MMP-X) .....	47
b) Les inhibiteurs de protéases (TIMP-X).....	48
5) Le microbiote intestinal et l'axe poumon intestin : .....	48
<b>E- Implication des différentes morts cellulaires</b> .....	<b>50</b>
1) La nécrose.....	51
2) L'apoptose .....	51
3) La pyroptose.....	53
4) La nécroptose.....	56

F- Objectifs d'études et modèles d'expositions à la cigarette ou à l'ozone utilisés au laboratoire .....	58
RESULTATS.....	59
A- Etude de l'implication du récepteur NLRP3 et de la GSDMD en réponse à la fumée de cigarette. ....	60
B- Etude de l'implication du récepteur NLRP6 et de la GSDMD en réponse à l'ozone.....	86
DISCUSSION .....	120
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES.....	128
MATERIEL et METHODES.....	132
ANNEXES.....	139
BIBLIOGRAPHIE .....	141

# LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

## • Figures

### Dans l'introduction

**Figure 1 :** Schéma du tractus pulmonaire (A) et de l'épithélium bronchique (B) (*Adapté de Sun et al., 2007 & Reid et al., 2019*).

**Figure 2 :** Schéma de l'épithélium pulmonaire au niveau des alvéoles pulmonaires (*Adapté de Sun et al., 2007 & Bennet et al., 2021*).

**Figure 3 :** Diagramme représentant les causes de décès prématurés liées à la pollution de l'air extérieur et intérieur.

**Figure 4 :** Prévalence du tabagisme quotidien en pourcentage selon le sexe parmi les 18-75 ans en France, de 2000 à 2020.

**Figure 5 :** Processus de formation de l'ozone dans la troposphère, issue des polluants primaires de l'activité humaine.

**Figure 6 :** Schéma représentant les lésions bronchiques et alvéolaires dans la pathologie de la BPCO.

**Figure 7 :** Schéma résumé de l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette ou l'ozone. (*Brusselle et al., 2011 & Riteau et al., 2022*).

**Figure 8 :** Schéma de la réponse immunitaire dépendante des TLRs (*O'Neil et al., 2013*).

**Figure 9 :** Schéma représentant les inflammasomes NLRPs (NLRP1 et NLRP3), NLRCs (NLRC4) et AIM2 aboutissant à la sécrétion d'interleukines ou l'activation de la protéine Gasdermine D (*Adapted from Vanaja et al., 2015 et Stutz et al., 2009*).

**Figure 10 :** Schéma de l'activation de NLRP3 impliquant un signal 1 dit de « priming », suivi du signal 2 dit « d'activation » qui est la formation du complexe lui-même (*McKee et al., 2020*).

**Figure 11 :** Rôle de l'inflammasome NLRP6 dans le maintien de l'homéostasie intestinale via la régulation de sécrétion de mucus (A) (*Adapté de Li & Zhu, 2020*) et dans la réponse antivirale au niveau de l'intestin de manière indépendante de l'inflammasome (B) (*Levy et al., 2017*).

**Figure 12 :** Formation de l'inflammasome NLRP6 dépendant de la caspase 1 ou caspase 11 après infection chez *Listeria monocytogens* ou *S.aureus* (*Ghimire et al., 2020*).

**Figure 13 :** Schéma de la mort cellulaire par PANoptose. (*Christgen et al., 2020*).

**Figure 14 :** Schéma représentant les voies intrinsèque (dépendante du cytochrome C et la caspase 9) et extrinsèque (dépendante des Fas-L/R et de la caspase 8) de l'apoptos (*Adapté de Inserm, 2002*).

**Figure 15 :** Rôle de la GSDMD dans l'activation de la voie canonique de l'inflammasome dépendante de la caspase 1 (A) et non canonique dépendante de la caspase 11 (B) (*Broz et al., 2020*).

**Figure 16 :** Représentation schématique montrant un lien entre l'activation de la caspase 11 et l'activation de l'inflammasome NLRP3/caspase 1 dans un modèle d'infection à *B. abortus* (*Cerqueira et al., 2018*).

**Figure 17 :** Schéma représentant la mort cellulaire par nécroptose (*Dhuriya and Sharma, 2018*).

**Figure 18 :** Schéma représentant la régulation entre apoptose et nécroptose (*Gautheron., 2017*).

## Dans les résultats

### Parties 1: Etude de l'implication du récepteur NLRP3 et de la GSDMD en réponse à la fumée de cigarette.

**Figure 1 :** *Nlrp3* deficiency (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) impairs inflammation to subchronic cigarette smoke (CS) exposure in mice.

**Figure 2 :** *Nlrp3* deficiency decreases remodeling factor expression and lung tissue inflammation upon subchronic cigarette smoke (CS) exposure.

**Figure 3 :** The NLRP3 inhibitor MCC950 impairs pulmonary inflammation upon acute cigarette smoke (CS) exposure.

**Figure 4 :** *Caspase1/11*-deficient mice (*caspase1/11*<sup>-/-</sup>) have reduced pulmonary inflammation after acute cigarette smoke (CS) exposure.

**Figure 5 :** Cigarette Smoke (CS) exposure promotes caspase-1 cleavage in BAL macrophages and neutrophils in an NLRP3-dependent manner.

**Figure 6 :** Cigarette Smoke (CS) exposure induces GSDMD cleavage in bronchial epithelial cells in an NLRP3-dependent manner.

**Figure 7 :** Cigarette Smoke (CS) exposure promotes GSDMD expression and cleavage in BAL alveolar macrophages dependently of NLRP3.

**Figure 8 :** *Gasdermin d*-deficient mice (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) have reduced pulmonary inflammation and remodeling after acute smoke cigarette (CS) exposure.

**Figure S1 :** *Nlrp3*-deficient mice (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) have reduced pulmonary inflammation after acute cigarette smoke (CS) exposure.

### Parties 2: Etude de l'implication du récepteur NLRP6 et de la GSDMD en réponse à l'ozone.

**Figure 1 :** NLRP6 is increased by chronic ozone exposure in lungs and in a part of BAL recruited macrophages.

**Figure 2 :** *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) reduces cell recruitment in lungs and BAL after chronic ozone exposure in mice.

**Figure 3 :** *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) decrease cytokines and chemokines parameters involved in neutrophils and eosinophils recruitment after chronic ozone exposure in mice.

**Figure 4 :** *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) decreases remodeling factor production in BAL and lung, collagen deposition in lung and release in BAL and lung fibrosis in of mice exposed to chronic ozone.

**Figure 5 :** *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) decreases mucus production by airway epithelial cells induced in mice by chronic ozone exposure.

**Figure 6 :** Apoptosis is reduced in lung epithelial cells and infiltrated cells upon chronic ozone exposure in *Nlrp6* deficient (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) mice.

**Figure 7 :** GSDMD, caspase 1 and caspase 11 expression and cleavage are reduced in *Nlrp6* deficient (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) mice.

**Figure 8 :** GSDMD is cleaved through an NLRP6/Casp11 dependent manner in Type 1 pneumocytes cells but not in lung macrophages.

**Figure 9 :** GSDMD is cleaved through an NLRP6/Casp11 dependent manner in a part of BAL recruited macrophages.

**Figure 10 :** *Gasdermin D* deficiency (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) reduces cell recruitment in lungs and BAL after chronic ozone exposure in mice.

**Figure 11 :** *Gasdermin D* deficiency (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) decrease cytokines and chemokines parameters involved in neutrophils and eosinophils recruitment after chronic ozone exposure in mice.

**Figure 12 :** *Nlrp6* deficiency in type 1 pneumocytes (*Nlrp6*<sup>lox/lox x Acid Cre/+</sup>) reduces cell recruitment in lungs and BAL after chronic ozone exposure in mice

**Figure 13 :** *Nlrp6* deficiency type 1 pneumocytes (*Nlrp6*<sup>lox/lox x Acid Cre/+</sup>) decreases cytokines and chemokines parameters involved in neutrophils and eosinophils recruitment after chronic ozone exposure in mice.

**Figure 14 :** *Nlrp6* deficiency in type 1 pneumocytes (*Nlrp6*<sup>lox/lox x Acid Cre/+</sup>) leads to a decrease of GSDMD, caspase 3, caspase 1 and caspase 11 expression and cleavage in lungs.

**Figure S1 :** NLRP6 is increased by chronic ozone exposure in lungs.

**Figure S2 :** FACS used gating for lung and BAL cell count and lung cell count.

### Dans la conclusion

**Figure de conclusion :** Schéma représentant les types cellulaires où NLRP3 et NLRP6 sont activés aboutissant au clivage de la GSDMD

- **Tableaux**

**Tableau 1 :** Récepteurs impliqués dans la réponse à la fumée de cigarette et polluants.

**Tableau 2 :** Table récapitulative des anticorps utilisés pour l'analyse FACS, leur référence et leurs dilutions.

- **Annexes**

**Annexe 1 :** Liste des composés chimiques identifiés par la FDA comme constituants dangereux et potentiellement nocifs dans les produits de tabac et la fumée de cigarette.

## LISTE DES ABREVIATIONS

A1AT : Alpha 1 anti-trypsine  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNdb / dsDNA : ADN double brin  
ADNmt / mtDNA : ADN mitochondrial  
AEE : Agence Européenne pour l'Environnement  
AIM2 : Absent In Melanoma 2  
Apaf1 : Apoptotic peptidase activating factor 1  
ARN : Acide RiboNucléique  
ASC : Apoptosis-Associated Speck-like protein containing a CARD  
ATG5/7 : Autophagy related 5/7  
ATP : Adenosine Tri-Phosphate  
BAFF : B Cell Activating Factor  
BAL (LBA): Lavage BronchoAlvéolaire  
BPCO/COPD : Bronchopneumopathie chronique obstructive  
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domains  
Casp : Caspase  
cGAMP : cyclic GMP-AMP  
cGAS : Cyclic G/AMP Synthase  
CH<sub>4</sub> : Méthane  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
COV : Composés Organiques Volatils  
CS : Cigarette Smoke  
CSC : Cigarette Smoke Condensate  
CSE : Cigarette Smoke Extract  
CVF : Capacité vitale expiratoire forcée  
DAMPs : Damage-associated molecular patterns  
DD : Death Domain  
DISC : Death-Inducing Signaling Complex  
DNase : DésoxyriboNucléase  
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain  
Fas-L : Fas Ligand  
Fas-R : Fas Receptor  
FDA : Food and Drug Administration  
FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique  
GDMD : Gasdermin D  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HDM : House Dust Mite  
HPV : Human Papilloma Virus  
IFN : Interféron  
Ig : Immunoglobuline  
IL : Interleukine  
IRF : IFN-Regulatory transcription Factors  
kDa : Kilodalton  
LC3 : Light Chain 3  
LCN2 : lipocalin-2



LPS : Lipopolysaccharide  
LRR : Région riche en leucine  
LTA : Lipoteichoic Acid  
M1 : Macrophages de type 1  
M2 : Macrophages de type 2  
MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein  
MEC : Matrice extracellulaire  
MLKL : Mixed lineage kinase domain-like protein  
MMP : Metalloproteinase X  
MPO : Myelopéroxidase  
MUC: mucine  
Myd88 : Myeloid differentiation primary response gene 88  
NE : Neutrophile élastase  
NETs : Neutrophils Extracellular Traps  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor kappa B  
NLR : NOD like receptor  
NLRP : NACHT, LRR, PYD domains containing Proteins  
NO : Monoxyde d'azote  
NO<sub>2</sub> : dioxyde d'azote  
NO<sub>x</sub> : Oxydes d'azote  
O<sub>2</sub> : Oxygène  
O<sub>3</sub> : Ozone  
OMS (WHO) : Organisme mondial de la Santé  
PAMP : Pathogen associated molecular patterns  
PANoptose : Pyroptose Apoptose Nécroptose complexe  
PM : matière particulaire  
PNEC : Pulmonary NeuroEndocrine Cells  
PRR : Pathogen recognition receptors  
PYD : Domaine Pyrin  
RIPK3 : Receptor-Interacting serine/threonine-protein kinase 3  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
SO<sub>2</sub> : dioxyde de soufre  
SP : Surfactant protein  
STING : stimulator of interferon genes  
TGF-  $\beta$  : Tissue growth factor  $\beta$   
TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase  
TLR : Toll like receptor  
TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor  
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
TVO : trouble ventilatoire obstructif  
UVs : Ultraviolets  
VEMS : Volume expiré maximal en une seconde  
WT : Wild Type (Souris sauvages)  
ZBP1 : Z-DNA Binding Protein 1

# PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

- **Publications scientifiques**

**2022: Chronic ozone induces lung inflammation through NLRP6/Caspase-1/Caspase-11/Gasdermin D activation in type 1 pneumocytes.**

**Sarah Huot-Marchand**, Elodie Culerier, Chloé Véront, Florence Savigny, Sandra Carignon, Cindy Serdjebi, Marc Le Bert, Valérie F. J. Quesniaux, Bernhard Ryffel, Petr Broz, Aurélie Gombault, Nicolas Riteau, Isabelle Couillin. (In preparation).

**2022: NLRP6 controls pulmonary inflammation to cigarette smoke in a gut microbiota dependent manner.**

Mégane Nascimento, **Sarah Huot-Marchand**, Manoussa Fanny, Marjolène Straube, Corinne Panek, Marc Le Bert, Florence Savigny, Lionel Apetoh, Mathias Chamaillard, Jacques Van Snick, Fabrice Trovero, Valérie F.J. Quesniaux, Philippe Gosset, Aurélie Gombault, Bernhard Ryffel, Nicolas Riteau, Harry Sokol, Isabelle Couillin (Submitted).

**2022: Inflammasomes in cigarette smoke- or ozone-induced lung diseases.**

Nicolas Riteau, **Sarah Huot-Marchand** and Isabelle Couillin Book chapter in Inflammasome Biology Fundamentals, Role in Disease States, and Therapeutic Opportunities, 1st Edition - Editor: Pablo Pelegrin, Paperback ISBN: 9780323918022. November 23, 2022.

**2022: Cigarette smoke-induced Gasdermin D activation in bronchoalveolar macrophages and bronchial epithelial cells dependently on NLRP3.**

**Sarah Huot-Marchand**, Mégane Nascimento, Elodie Culerier, Mélissa Bourenane, Florence Savigny, Corinne Panek, Cindy Serdjebi, Marc Le Bert, Valérie F J Quesniaux, Bernhard Ryffel, Petr Broz, Nicolas Riteau, Aurélie Gombault, Isabelle Couillin. Front. Immunol.2022, DOI:10.3389/fimmu.2022.918507

**2021: Protective Role of the Nucleic Acid Sensor STING in Pulmonary Fibrosis.**

Florence Savigny, Corinne Schricke, Norinne Lacerda-Queiroz, Mélanie Meda, Mégane Nascimento, **Sarah Huot-Marchand**, Felipe Da Gama Monteiro, Bernhard Ryffel, Aurélie Gombault, Marc Le Bert, Isabelle Couillin, Nicolas Riteau. Front. Immunol. 2021, DOI: 10.3389/fimmu.2020.588799

**2020: B-Cell Activating Factor Secreted by Neutrophils Is a Critical Player in Lung**

## **Inflammation to Cigarette Smoke Exposure.**

Mégane Nascimento, **Sarah Huot-Marchand**, Aurélie Gombault, Corinne Panek, Manon Bourinet, Manoussa Fanny, Florence Savigny, Pascal Schneider, Marc Le Bert, Bernhard Ryffel, Nicolas Riteau, Valérie F J Quesniaux, Isabelle Couillin. Front. Immunol. 2020, DOI: 10.3389/fimmu.2020.01622

### • **Communications scientifiques**

#### **2022: Cigarette smoke-induced Gasdermin D activation bronchoalveolar macrophages and bronchial epithelial cells dependently on NLRP3.**

**Huot-Marchand S**, Nascimento M, Broz P, Ryffel B, Riteau N, Gombault A, Couillin I. Symposium Immunology of Pattern Recognition Receptors, au Muséum Olympique de Lausanne, Suisse (**Présentation Poster**).

#### **2021: Cigarette smoke (CS)-induced pulmonary inflammation depends on NLRP3 inflammasome and Gasdermin D activation.**

**Huot-Marchand S**, Nascimento M, Fanny M, Bourenane M, Panek C, Savigny F, Le Bert M, Gombault A, Ryffel B, Riteau and Couillin I. World Immune Regulation Meeting (WIRM en présentation en distanciel (**Présentation orale**)).

#### **2020: Innate immune receptors, NLRP3 and NLRP6, are involved in lung inflammation to cigarette smoke exposure.**

**Huot-Marchand S**, Nascimento M, Panek C, Savigny F, Le Bert M, Ryffel B, Quesniaux VF, Riteau N, Gombault A and Couillin I. 33ème colloque Biotechnocentre, Les Hauts de Bruyère (**Présentation Poster**).

#### **2020: B-Cell Activating Factor Secreted by Neutrophils Is a Critical Player in Lung Inflammation to Cigarette Smoke Exposure.**

**Huot-Marchand S**, Nascimento M, Gombault A, Panek C, Bourinet M, Fanny M, Savigny F, Schneider P, Le Bert M, Ryffel B, Riteau N, Quesniaux VFJ and Couillin I. Congrès des Journées de Recherche Respiratoires (J2R), présentation en distanciel (**Présentation orale**).

#### **2020: NOD-like receptor family pyrin domain 6 (NLRP6) involvement in lung inflammatory response after smoke cigarette exposure.**

**Huot-Marchand S**, Riteau N, Savigny F, Lacerda Queiroz N, Ryffel B, Quesniaux VF, Le Bert M, Gombault A and Couillin I. Colloque ITMO Immunologie, Inflammation, Infectiologie, Microbiologie (I3M), à l'Institut Pasteur de Lille (**2 slides**).

# INTRODUCTION

## A- Les poumons

Chez les mammifères le poumon est un organe indispensable à la vie. Il a pour fonction principale d'approvisionner l'organisme en oxygène (O<sub>2</sub>) présent dans l'atmosphère et de rejeter le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) issu de la respiration cellulaire. La respiration pulmonaire consiste en des cycles d'inspiration et d'expiration réflexes permis grâce à la contraction du diaphragme. Chez l'Homme, environ 4,3 litres d'air sont expirés par minute. L'épithélium pulmonaire présente une interface avec l'extérieur de 70m<sup>2</sup> pour 0,1µm d'épaisseur qui permet les échanges gazeux participant au maintien de l'homéostasie (c'est-à-dire l'état d'équilibre) de l'organisme. Le sang en provenance des organes pauvre en dioxygène (O<sub>2</sub>) normalement lié à l'hémoglobine et riche en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dissout, se verra être ré-oxygéné au niveau des alvéoles pulmonaires. L'O<sub>2</sub> sera ensuite acheminé jusqu'à l'ensemble des organes par les hématies pour être utilisé en majorité dans la chaîne respiratoire mitochondriale (*Livre d'embryologie Humaine de Larsden., 2017*).

Chez l'ensemble des mammifères et donc chez l'Homme, grâce à son épithélium, le poumon joue aussi un rôle primordial en tant que première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes opportunistes, les allergènes et les polluants. Un endommagement de cet épithélium conduit à une cascade inflammatoire. Cette dernière a pour but de restaurer la structure et fonction physiologique du poumon, (c'est la régénération tissulaire), ainsi que d'induire la stabilisation du tissu (*Harrell et al., 2019*). Chez l'adulte, un endommagement dû à une inflammation chronique peut conduire à des pathologies telles que la fibrose (épaississement et rigidification du tissu) ou l'emphysème (destruction des alvéoles) (*Morse et al., 2013*).

Il est cependant rassurant de constater qu'exceptés les cas où l'inflammation est chronique, les poumons chez l'adulte ont une excellente capacité de régénération suite à de graves dommages (*Basil et al., 2019*).

### 1) Mise en place de l'arborescence pulmonaire de l'embryon humain

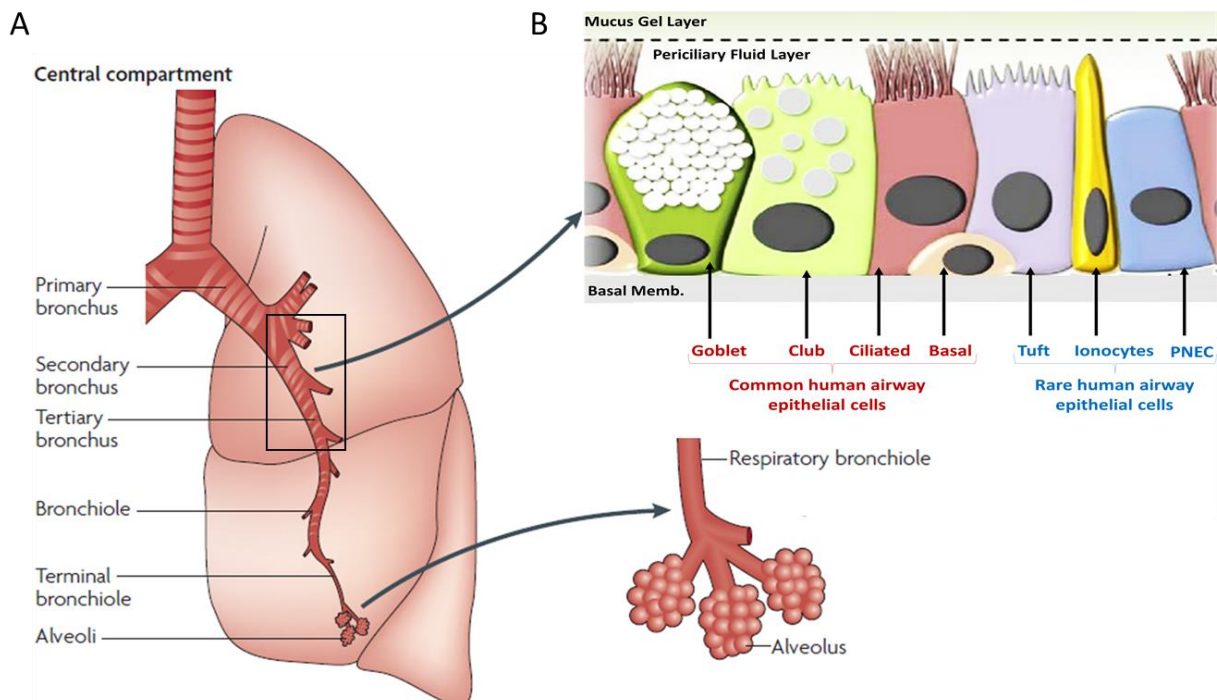
Les cellules pulmonaires dérivent de deux feuilletts embryonnaires : l'endoderme et le mésoderme (*Livre d'embryologie Humaine de Larsden., 2017*). Pendant la phase embryonnaire (4 à 7 semaines de gestation), l'endoderme se divisera par dichotomie pour former l'arbre bronchial. Puis ce dernier prend sa forme finale lors de la phase pseudo glandulaire (7 à 16 semaines) et les voies respiratoires se mettent en place à la fin de la phase caniculaire (16 à 24 semaines). Vient ensuite une phase de dilatation des voies respiratoires, une vascularisation de ces dernières ainsi que la différenciation de l'épithélium pulmonaire (*Livre d'embryologie Humaine de Larsden., 2017*). Les cellules non ciliées contenant des granules de sécrétion ainsi que des glandes sub-mucosales se développent dans la partie cartilagineuse de la trachée, tandis que les cellules ciliées se différencient peu à peu le long des muscles lisses de la trachée. Lors de la dernière phase (24 semaines jusqu'au terme),

les boutons terminaux se développent en conduits alvéolaires matures et en alvéoles (*Livre d'embryologie Humaine de Larsden., 2017*).

## 2) Organisation des poumons chez l'Homme

### a) Structure :

L'arborescence pulmonaire est composée de la partie haute de la trachée qui se subdivise plus bas en bronches primaires, secondaires, tertiaires, en bronchioles puis en bronchioles terminales. Succédant aux bronchioles terminales, les alvéoles pulmonaires qui permettent les échanges gazeux, terminent la structure (**Fig. 1A**).



**Figure 1 :** Schéma du tractus pulmonaire (A) et de l'épithélium bronchique (B) (*Adapté de Sun et al., 2007 & Reid et al., 2019*).

### b) L'épithélium pulmonaire :

L'épithélium des bronches et bronchioles contient des cellules dites communes (**notées en rouge sur la Fig. 1B**) : les cellules Caliciformes, de Clara, ciliées et basales ainsi que des cellules rares (**notées en bleu sur la Fig. 1B**) : les cellules tuft, les ionocytes et les cellules neuroendocrines.

**Les cellules caliciformes (ou Goblet cells)** sont impliquées dans la production et la sécrétion de mucus. Ce dernier forme un gel protecteur pour l'épithélium, impliqué aussi dans la régulation de l'homéostasie pulmonaire.

**Les cellules de Clara (ou Club cells)** sont retrouvées en nombre important dans l'épithélium pulmonaire (*Fays et al., 2022*). Ces cellules possèdent un caractère de cellules souches, puisqu'elles

sont capables de se différencier en cellules basales, caliciformes ou ciliées. Les cellules de Clara sont impliquées dans la réparation de l'épithélium pulmonaire, ainsi que dans le maintien de l'homéostasie via la sécrétion de surfactant et de protéines jouant un rôle immunomodulateur, comme l'utéroglobine et d'autres protéines antiinflammatoires et immunosuppressives (*Coraux et al., 2005 & Davis et al., 2022*).

**Les cellules ciliées (ou ciliated cells)** aussi présentes dans l'épithélium pulmonaire, contiennent des cils à leur pôle apical, en mouvements perpétuels qui permettent la remontée du mucus dans le tractus respiratoire. De plus, les cils pourront agir comme des pièges pour les microorganismes, débris et polluants, permettant ainsi la clairance pulmonaire (*Davis et al., 2022*).

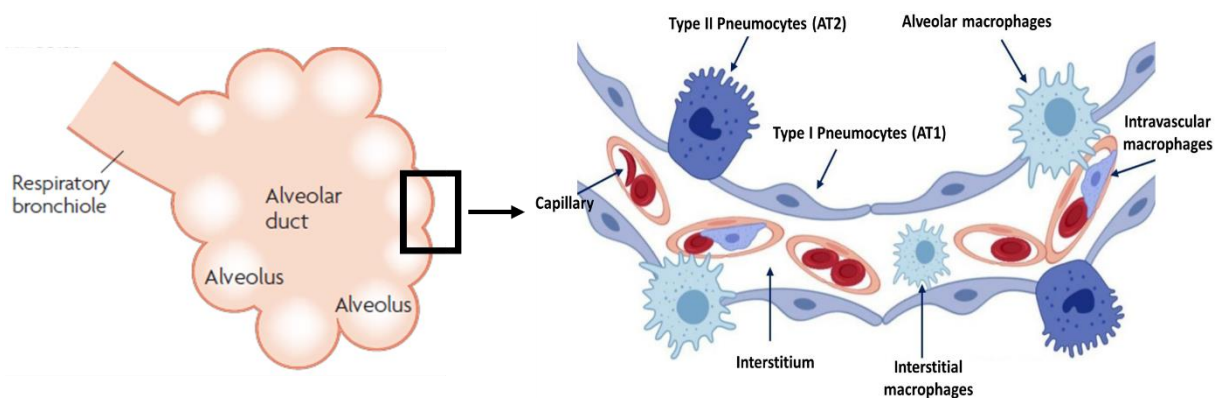
**Les cellules basales (ou basal cells)** sont présentes au niveau de l'épithélium bronchique (bronches et bronchioles) et sont les principales cellules souche du tissu, impliquées dans sa régénération après un quelconque dommage. Elles peuvent se différencier à la fois en type cellulaire dit commun et rare (*Davis et al., 2022*).

**Les cellules tuft (ou tuft cells)** décrites plus récemment et peu étudiées dans les poumons, jouent un rôle dans l'immunité et notamment dans l'asthme chronique.

**Les ionocytes** ont comme précurseur les cellules basales ou les cellules tuft. Ces cellules participent à la régulation de l'homéostasie en générant des mouvement d'ions via le canal CFTR qui permet la production d'un mucus normal. Il semblerait d'ailleurs que les ionocytes soient l'un des types cellulaires principalement impliqué dans la mucoviscidose (*Davis et al., 2022*).

**Les cellules neuroendocrines (ou Pulmonary NeuroEndocrine Cells : PNEC)** sont peu décrites et peu abondantes dans l'épithélium. Elles jouent cependant un rôle dans la vasoconstriction et la dilatation des artérioles et vaisseaux présents au sein du tissu. Ces cellules peuvent être impliquées dans la réparation tissulaire et possèdent un caractère de cellules souches ainsi qu'un rôle neuro-immuno-modulateur via la sécrétion de neuropeptides stimulant la réponse inflammatoire (*Davis et al., 2022*).

Les **pneumocytes de type I et de type II** composent l'épithélium des alvéoles pulmonaires où se font les échanges gazeux (**Fig. 2**).



**Figure 2 :** Schéma de l'épithélium pulmonaire au niveau des alvéoles pulmonaires (*Adapté de Sun et al., 2007 & Bennet et al., 2021*).

**Les pneumocytes de type I** sont des cellules allongées en étroit contact avec les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires, puisqu'elles sont séparées simplement par la membrane basale : ce qui permet les échanges gazeux. Les pneumocytes de type I expriment une protéine caractéristique, l'aquaporine 5 (**AQP-5**), qui est un canal hydrique transmembranaire permettant une régulation de l'osmolarité au niveau de l'épithélium (*Gravelle et al., 2013*).

**Les pneumocytes de type II** sont des cellules cubiques arrondies possédant des microvillosités en leur pôle apical et qui ont pour fonction principale de sécréter et de recycler le surfactant indispensable au maintien de la tension de surface des alvéoles pulmonaires évitant leur collapsus. C'est d'ailleurs via la protéine Pro-Surfactant C (**ProSC**) que l'on peut les caractériser (**Fig. 1**). Les pneumocytes de type 2 sont capables de s'auto-générer mais également de se différencier en pneumocytes de type 1 (*Aspal et al., 2020*).

### **c) Le surfactant :**

Comme définit ci-dessus, le surfactant est produit par les pneumocytes de type II mais aussi par les cellules de Clara dans le but d'éviter le collapsus des alvéoles. Le surfactant est composé à 90% de phospholipides et 10% de protéines (nommées Surfactant Protéine (SP)-A, -B, -C et -D) (*Veldhuizen et al., 2000*). Le SP-B étant essentiel à la réduction de la tension superficielle, sa mutation est létale. Les SP-A, SP-C et SP-D, confèrent au surfactant des propriétés de défense face à un nombre important de pathogènes en se liant au lipopolysaccharide (LPS) de ces derniers (*Han et al., 2015*). SP-A et SP-D appartenant à la famille des collectines et possèdent un domaine de liaison aux lectines calcium-dépendantes. La formation d'agrégats collectine-pathogène de type bactérie, virus ou fongique permet d'augmenter la phagocytose de ces derniers (*Han et al., 2015*).

### **d) Le mucus :**

Le mucus pulmonaire tapisse le tractus respiratoire d'une couche d'environ 10µm afin de protéger les cellules. C'est un fluide visqueux qui contient des électrolytes, des lipides, des glycoprotéines telles que les mucines transmembranaires (MUC1, MUC3A) ou solubles (MUC2, MUC5AC) (*Ridley et al., 2018*). A l'état physiologique, le mucus est évacué grâce aux cils présents au pôle apical des cellules ciliées, ce qui permet son renouvellement ainsi que l'évacuation des particules contenues en son sein, c'est la clairance muco-ciliaire (*Bustamante-Marin et al., 2017*). Dans des pathologies comme l'asthme, la bronchite chronique, la mucoviscidose ou encore chez les fumeurs, il y a une accumulation de mucus résultant d'un défaut de clairance muco-ciliaire qui est due à une hyperproduction et une augmentation de la viscosité du mucus et une dégradation des cils (*Leopold et al., 2009*). Chez des patients atteints de mucoviscidose par exemple, la colonisation par des pathogènes opportunistes sera favorisée par l'accumulation anormale de ce mucus (*Folkesson et al., 2012*).



### e) Le microbiote pulmonaire :

Le microbiote est défini par l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, levures, eucaryotes...) non pathogènes (dits : commensaux) présents dans un écosystème donné. Celui-ci est très important pour le maintien de l'homéostasie de l'hôte et réciproquement l'hôte permet la survie du micro-organisme, on a finalement une symbiose entre les deux.

Chez l'Homme, il existe différents microbiotes notamment au niveau de la peau, de l'appareil digestif, respiratoire, génital...

Le microbiote pulmonaire présente bien moins, en quantité et en diversité de micro-organismes que le microbiote intestinal cependant il semble n'en être pas moins important.

Sa mise en place est très rapide en comparaison à celle du microbiote intestinal. Son équilibre repose sur l'âge gestationnel auquel le nourrisson viendra au monde ainsi que le mode d'accouchement (**Pattaroni et al., 2018**). Par exemple, une naissance à terme induira un microbiote riche et diversifié, comprenant *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* ainsi que des organismes fongiques et viraux. En revanche, une naissance prématurée engendrera souvent à l'âge adulte une dysbiose pulmonaire avec par exemple une large diminution de la bactérie *Prevotella*. Cette dysbiose pourra être impliquée dans l'apparition d'allergies ou encore une sensibilité plus importante à certaines infections bactériennes ou virales (**Rofael et al., 2019**).

Son rôle dans l'homéostasie pulmonaire ainsi que l'immunité sont encore mal compris. Cependant, grâce aux progrès dans des techniques de séquençage à haut débit et de métabolomique, le microbiote pulmonaire est de plus en plus étudié. Il est important de noter que pour un même individu, la charge bactérienne et la proportion en bactérie varie selon la région pulmonaire (**Erb-Downward et al., 2011**).

Certaines études montrent son rôle dans la mise en place de l'architecture pulmonaire. En effet, des souris axéniques après colonisation développent un épaississement de la paroi alvéolaire, augmentant la surface d'échange gazeux (**Yun et al., 2014**). Lors d'infections bactériennes il joue aussi un rôle dans la barrière en entrant en compétition avec les pathogènes opportunistes. Il a donc un rôle important dans l'immunité innée et adaptative (**Brown et al., 2017 & Karmarkar et al., 2013**).

Le microbiote pulmonaire est affecté chez les patients fumeurs ou atteints de BPCO par rapport à des non-fumeurs (**Erb-Downward et al., 2011**). De manière très intéressante, une étude a montré que des enfants d'environ un an grandissant dans un milieu aseptisé, sont plus à risques de développer un asthme allergique à cause d'un microbiote pulmonaire peu riche et peu diversifié (**Fujimura et al., 2015**).

## B- Qualité de l'air, le tabagisme et pollution par l'ozone

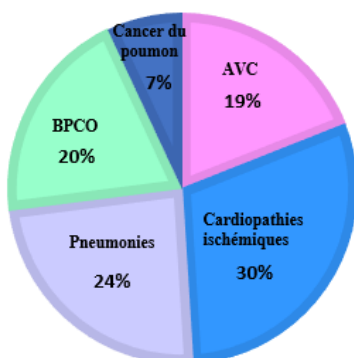
### 1) La qualité de l'air au quotidien

Au quotidien nous sommes exposés à des polluants extérieurs et intérieurs, dont une partie est due à notre environnement naturel (pollens, gaz rejetés lors de phénomènes naturels...) mais la pollution la plus importante est d'origine anthropique (industries, agriculture, transport, activités domestiques...). En effet, l'activité humaine engendre des polluants primaires émis dans l'air ainsi que des polluants secondaires formés à partir de ces polluants primaires par des réactions physicochimiques dans l'atmosphère, comme c'est le cas de l'ozone.

La pollution atmosphérique comprend l'ensemble des gaz : ozone (O<sub>3</sub>), dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) et dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) ..., présents dans l'air ainsi que des particules (Matière particulaire (PM)) : des sulfates, des nitrates, de l'ammoniaque ou encore du carbone en suspension nuisant à l'environnement et la santé humaine. Les matières particulaires sont utilisées pour surveiller la qualité de l'air au quotidien et tout particulièrement au moment de pics de pollution. On retrouvera les particules grossières (PM<sub>10</sub>) et les particules fines (PM<sub>2,5</sub>) (*Falcon-Rodriguez et al., 2016*).

La pollution atmosphérique a un réel impact sur l'environnement et la santé humaine en aggravant et contribuant au développement de maladies respiratoires, cardiovasculaires et de cancers (*Thurston et al, 2016*). En 2019, la pollution de l'air a engendré plus de 40 000 décès prématurés en France (*Santé publique France, 2022*) et a provoqué la mort de 9 millions de personnes dans le monde (**Fig. 3**) (*Ouest-France, 2022*).

La pollution intérieure est non négligeable puisqu'elle est responsable d'environ 20 000 décès prématurés par an en France (*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)*). Dans la majeure partie des cas, elle est liée aux chauffages, appareils de cuisson, acariens, produits ménagers, ainsi qu'aux phtalates contenus dans les plastiques, aux composés organiques contenus dans les peintures et solvants. Ces chiffres prennent également en compte les décès liés à l'environnement de travail où on retrouvera des polluants chimiques, de la poussière de bois, des goudrons ... (*ANSES*).



**Figure 3 :** Diagramme représentant les causes de décès prématurés liés à la pollution de l'air extérieur et intérieur (*Adapté de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2018*).

La qualité de l'air respiré a donc une importance primordiale car elle peut être responsable de décès prématurés (**Fig. 2**). Un affaiblissement immunitaire au niveau de la barrière pulmonaire peut aussi être induit par une qualité médiocre de l'air. Par exemple, une exposition à des polluants environnementaux (aérosols, composés inorganiques, produits de combustions, nanoparticules...), amoindrit la capacité des macrophages à phagocyter des pathogènes bactériens ou viraux en raison de leur surcharge en particules. Par ailleurs, la présence de particules polluantes dans le milieu extracellulaire engendrera aussi bon nombre de dégâts pouvant induire une inflammation ou dans certain cas des réactions allergiques (*Lewis et al., 2013*).

## 2) Le tabagisme

### a) Composition :

Une cigarette avant combustion contient près de 2500 composés toxiques et après combustion, ce n'est pas moins de 4000 substances toxiques sont retrouvées dans la fumée de cigarette (*OMS 2022*) (**Annexe 1**). Bien que ces composés varient en nombres ainsi qu'en quantités suivant le fabricant, la Food and Drug Administration (FDA) a caractérisé plus de 90 composés chimiques comme étant des toxiques respiratoires, cardiovasculaires, des carcinogènes, des additifs et agents de textures ainsi que des composés reprotoxiques (*FDA & 2015 & Borgerding et al., 2005*).

La fumée de cigarette est composée de deux phases : **une phase particulaire** contenant les goudrons qui sont majoritairement retenus dans le filtre de la cigarette et une **phase gazeuse** qui entre directement dans les voies respiratoires, où l'on trouve tous les composés toxiques tels que de l'arsenic, du monoxyde de carbone, de l'ammoniaque, de l'acrylamide... (*Annexe 1*) (*Borgerding et al., 2005*).

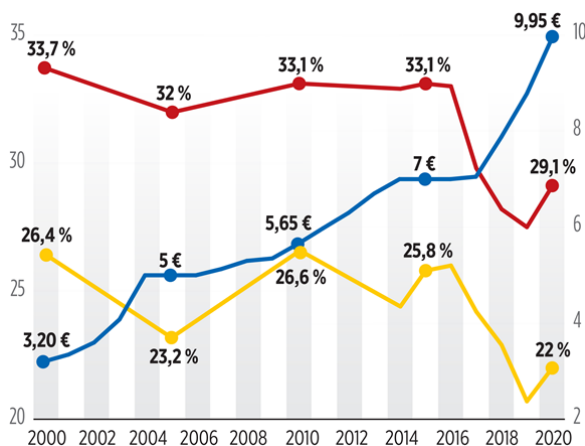
Un composé important est aussi retrouvé dans cette phase gazeuse est la nicotine, un alcaloïde retrouvé naturellement dans la plante de tabac qui agit directement sur le cerveau. Il est impliqué dans le circuit de récompense en agissant sur les récepteurs nicotiniques qui vont induire une libération de dopamine dans les aires du cerveau concernées. Petit à petit, la nicotine va détourner le circuit de récompense pour mettre en place l'addiction (*Swan et al., 2007 & Benowitz, 2009*). Il a récemment été montré qu'en parallèle de l'activation de ce circuit d'addiction, la nicotine peut avoir un effet opposé sur les neurones dopaminergiques situés dans d'autres aires du cerveau. La résultante sera une induction d'un état anxigène pouvant se traduire par une augmentation de la consommation de tabac ou alors une diminution de sa consommation dans certains cas (*Addy., 2021*).

### b) Epidémiologie :

En 2021 on comptait environ 1,3 milliard de fumeurs dans le monde où 82% étaient des hommes. Le nombre de fumeurs dans les pays développés diminue, tandis que la tendance inverse est

observée dans les pays à faible revenu. Le nombre de décès engendrés par la consommation de tabac reste encore très élevé, on compte en effet 8 millions de morts par an (*OMS*).

En France en 2020, parmi les 18-75 ans 30% sont des hommes et 22% sont des femmes et parmi les 18-34 ans, près d'une personne sur deux fume. En 2022, bien que le nombre de fumeurs reste élevé puisqu'il avoisine 15 millions il est en baisse depuis 2015 (**Fig. 4**). Cette diminution pourrait être expliquée par l'augmentation des campagnes anti-tabac comme celle proposée par l'OMS : « MPOWER », l'aide apportée aux fumeurs souhaitant arrêter et par l'augmentation des prix du paquet de cigarette. De manière importante et alarmante, on estime qu'1,2 millions de non-fumeurs (dits passifs), sont exposés à la fumée avec des conséquences sur leur santé (*OMS*).



**Figure 4 :** Prévalence du tabagisme quotidien en pourcentage selon le sexe parmi les 18-75 ans en France, de 2000 à 2020. En rouge les hommes, en jaune les femmes, en bleu le prix du paquet (Etude du Parisien, corrélant baisse de la prévalence et augmentation du prix du tabac basé sur les chiffres de l'OMS 2021).

### c) Pathologies associées :

La corrélation entre consommation régulière de tabac et apparition de pathologies respiratoires (BPCO, fibrose, emphysème, asthme allergique) et cardio-vasculaires (Accident Vasculaire Cérébral, trouble de la circulation, insuffisance cardiaque) a été démontrée.

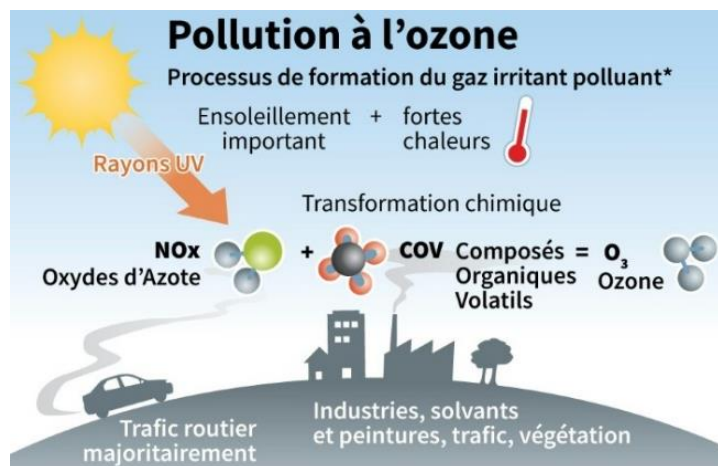
Concernant le cancer du poumon, 90% des cas sont attribuables à la consommation de tabac (*Santoro et al., 2019*). Le cancer de la vessie et du tube digestif sont eux aussi très répandus chez les fumeurs et chez la femme fumeuse, le cancer du col de l'utérus bien que déclenché par une infection au HPV, sera aggravé par une consommation de tabac. Ce dernier contient de nombreux agents cancérogènes qui engendrent des dommages de l'ADN à l'origine de mutations qui favorisent l'apparition et la croissance de l'ensemble de ces cancers (*Hecht, 2012*).

Pour finir, des problèmes de reproduction, des défaillances immunitaires, des aggravations des maladies métaboliques comme le diabète sont aussi des conséquences d'une consommation régulière de tabac (*Stämpfli et al., 2009*).

### 3) La pollution par l'ozone (O<sub>3</sub>)

La pollution par l'ozone (O<sub>3</sub>) devient un problème de santé majeur puisque sa concentration a augmentée de 19% entre 2000 et 2020. Bien que les polluants atmosphériques de manière générale

soient en baisse ces 20 dernières années, les pics de pollution à l’ozone sont de plus en plus nombreux à cause des épisodes de forte chaleur (*Agence Européenne de l’Environnement AEE, 2022*).



**Figure 5 :** Processus de formation de l’ozone dans la troposphère, issu des polluants primaires de l’activité humaine (*AirParif 2021*).

L’ozone est présent naturellement dans la stratosphère, haute couche de l’atmosphère (*données issues du site de l’Institut royal d’Aéronomie Spatiale de Belgique IASB*). Sa présence est d’ailleurs indispensable à la vie car il protège les organismes vivants des rayonnements solaires ultraviolets (UV) en formant la couche « d’ozone ». Malheureusement, lorsqu’il se retrouve à basse altitude dans la troposphère, l’ozone représente un danger pour l’environnement et la santé humaine (*Santé publique France, 2022*).

Cet ozone retrouvé dans la partie basse de l’atmosphère est issu d’une réaction photochimique entre les oxydes d’azote (NOx) et des composés organiques volatils (COV : comme le monoxyde d’azote (CO), méthane (CH<sub>4</sub>)) provenant de l’industrie et du trafic routier en présence de rayons UV du soleil (**Fig. 5**) (*IASB*).

Selon l’Agence Européenne pour l’Environnement (AEE), l’exposition à l’ozone a été responsable de près de 24.000 décès prématurés à l’échelle de l’Union européenne en 2020, contre environ 16.000 en 2009, soit une augmentation de près de 25 %. Concernant l’environnement, les dégâts ne sont pas des moindres, en effet, il a été montré par une étude de l’Ademe menée en France que l’ozone engendre une perte de rendement dans la culture de céréales ou encore induit des anomalies de développement de la végétation.

Chez l’Homme, une exposition à l’ozone provoque des maux de tête, des irritations oculaires et cutanées mais également des difficultés respiratoires (*France info, 2015*). Elle est responsable d’une aggravation des maladies inflammatoires pulmonaires chroniques telles que la BPCO, la FPI (Fibrose Pulmonaire Idiopathique), l’asthme allergique ou le cancer du poumon (*Michaudel et al., 2018*). Les lésions et l’inflammation pulmonaire induites par l’ozone sont dépendantes de la dose et de la fréquence d’exposition (*Triantaphyllopoulos et al., 2011*).

Concernant la dose et la durée d’exposition, il a été établi par AEE un seuil d’exposition à l’ozone maximum par jour qui doit rester inférieur à 120µg/m<sup>3</sup>/h (soit 0,060ppm). La concentration seuil d’alerte est définie à 180µg/m<sup>3</sup>/h (0,090 ppm) avec un maximum d’exposition d’une heure pour les

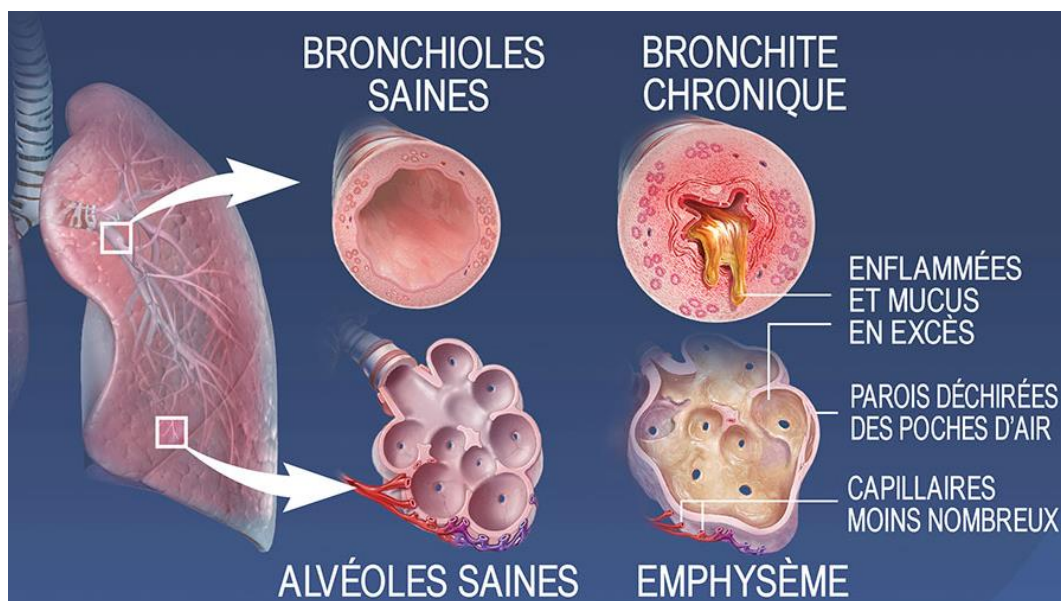
populations sensibles comme les personnes atteintes de maladies respiratoires, âgées et femmes enceintes. Enfin, lors de pics de pollution présentant une concentration en ozone par heure de  $240\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{h}$  (0,120 ppm), l'AEE insiste sur le fait qu'une heure d'exposition maximum doit être respectée, car à de telles concentrations l'ozone présente un risque élevé de toxicité pour l'ensemble de la population et malheureusement aussi pour l'environnement (*AEE, 2022*).

## C- Cas de la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

### 1) Qu'est-ce que la BPCO

Cette pathologie inflammatoire chronique des voies respiratoires, est caractérisée par une obstruction lente et progressive des bronches qui est engendrée par une infiltration des cellules du système immunitaire dans le tissu pulmonaire, un remodelage tissulaire excessif, un épaississement de la paroi bronchique par atrophie des muscles lisses ainsi qu'une production excessive de mucus (**Fig. 6**).

Dans certains cas, la BPCO peut aboutir à un emphysème pulmonaire c'est à dire la dégradation des parois des sacs alvéolaires et alvéoles. Le déséquilibre de la balance métallo-protéases (MMP) et inhibiteurs des métallo-protéases (TIMP) en est en partie à l'origine. S'ensuit alors une fusion des alvéoles et donc une diminution de leur capacité à effectuer les échanges gazeux et ce, de manière irréversible.



**Figure 6 :** Schéma représentant les lésions bronchiques et alvéolaires dans la pathologie de la BPCO. On constate le rétrécissement des bronches avec surproduction de mucus qui peut dans certains cas être aggravé par un emphysème ([www.visiblebody.com](http://www.visiblebody.com)).

Le tabagisme actif et passif est le facteur principal qui est à l'origine de la BPCO puisqu'il représente à lui seul 80% des cas (*INSERM 2020*). L'exposition sur le long terme à la pollution de l'air contenant des particules toxiques et/ou irritantes est un facteur non négligeable, puisqu'il représente la quasi-totalité des 20% restant. Par ailleurs, des infections des voies respiratoires inférieures fréquentes au cours de l'enfance peuvent aussi créer un terrain propice au développement ultérieur de la pathologie.

A ces facteurs s'ajoute le facteur génétique de déficience du gène de l'alpha 1-antitrypsine (enzyme impliquée dans la régulation de l'activité élastase des neutrophiles) (*Brode et al., 2012*).

La BPCO est souvent associée à d'autres troubles d'origine cardio-vasculaire, gastro-intestinales, musculaires, métaboliques, psychiques, on parle de facteurs de comorbidités (*Putcha et al., 2015 & Ojha et al., 2018*). Ces derniers sont souvent corrélés à un mauvais pronostic, augmentant le risque de décès si bien que la plupart des patients ne décèdent pas d'insuffisance respiratoire.

## 2) Epidémiologie

Selon l'OMS, 64 millions de personnes souffrent de BPCO modérée à sévère ce qui hisse la pathologie à la 3ème place des causes de mortalité dans le monde. En 2019, chez les moins de 70 ans, 3,23 millions de décès sont liés à la pathologie. Ces chiffres semblent se stabiliser chez l'homme et augmenter chez la femme.

En France en 2020 chez les plus de 40 ans, on dénombrait entre 1,7 et 3 millions de cas, soit 7.5% de la population. Cette large fourchette atteste du sous-diagnostic de la pathologie induisant donc des prises en charges tardives. En effet, souvent détectée lors de phase d'exacerbation, la chronicité de la pathologie est souvent avancée. Par an en France, 16 500 décès sont liés à la BPCO, ce qui représente 5% de l'ensemble des décès survenus en moyenne chaque année (*INSERM 2020*).

## 3) Diagnostic et prise en charge

La non-spécificité des symptômes de la BPCO comme la toux chronique, les expectorations et la dyspnée (essoufflement) apparaissent progressivement, ce qui engendre un diagnostic tardif. La pathologie chronique est ponctuée de phase d'exacerbation c'est-à-dire d'épisodes d'aggravation des symptômes (pouvant être lié à des infections bactériennes ou virales). En cas de persistance de ces derniers et si le patient est fumeur ou exposé à des facteurs favorisants, une spirométrie est réalisée. Cet examen mesurant les volumes pulmonaires ainsi que les débits bronchiques du patient permettent la mise en évidence d'une éventuelle obstruction de l'arbre bronchique.

La mesure de la sévérité du trouble respiratoire chez les patients atteints de BPCO est rendue possible grâce à la création de la « Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease », établissant 4 stades pathologiques. Ces derniers sont définis par des signes cliniques : la toux, les expectorations, capacité de résistance à l'effort, l'insuffisance cardiaque dans les cas les plus avancés, accompagné de deux mesures d'exploration respiratoire :

- Le Volume Expiré Maximal en une Seconde (VEMS) : volume d'air expiré durant la première seconde d'une expiration dite « forcée » est un indicateur de la sévérité de l'obstruction bronchique.
- La Capacité Vitale expiratoire Forcée (CVF) : volume d'air expiré durant une expiration dite « forcée ».



Du rapport  $VEMS/CVF*100$  sera déduit le coefficient de Tiffeneau permettant d'évaluer le degré d'obstruction bronchique. Si ce rapport est inférieur à 70%, ceci suppose la présence d'une obstruction bronchique

- Stade I : léger, VEMS supérieur ou égale à 80%
- Stade II : modéré, VEMS comprise entre 50 et 80%
- Stade III : sévère, VEMS comprise entre 30 et 50%
- Stade IV : très sévère, VEMS inférieur à 30%

Après le diagnostic, une prise en charge permettra de ralentir l'évolution de la pathologie voire parfois inverser la tendance de certains symptômes. Une oxygénothérapie sera proposée avec bronchodilatateurs avec ou sans ventilation ainsi que des séances de kinésithérapie pour aider à l'expectoration. Dans les phases d'exacerbation majoritairement dues à des infections une prise en charge avec hospitalisation est relativement efficace dans les stades les plus légers (*Haute Autorité de Santé (HAS), 2021*).

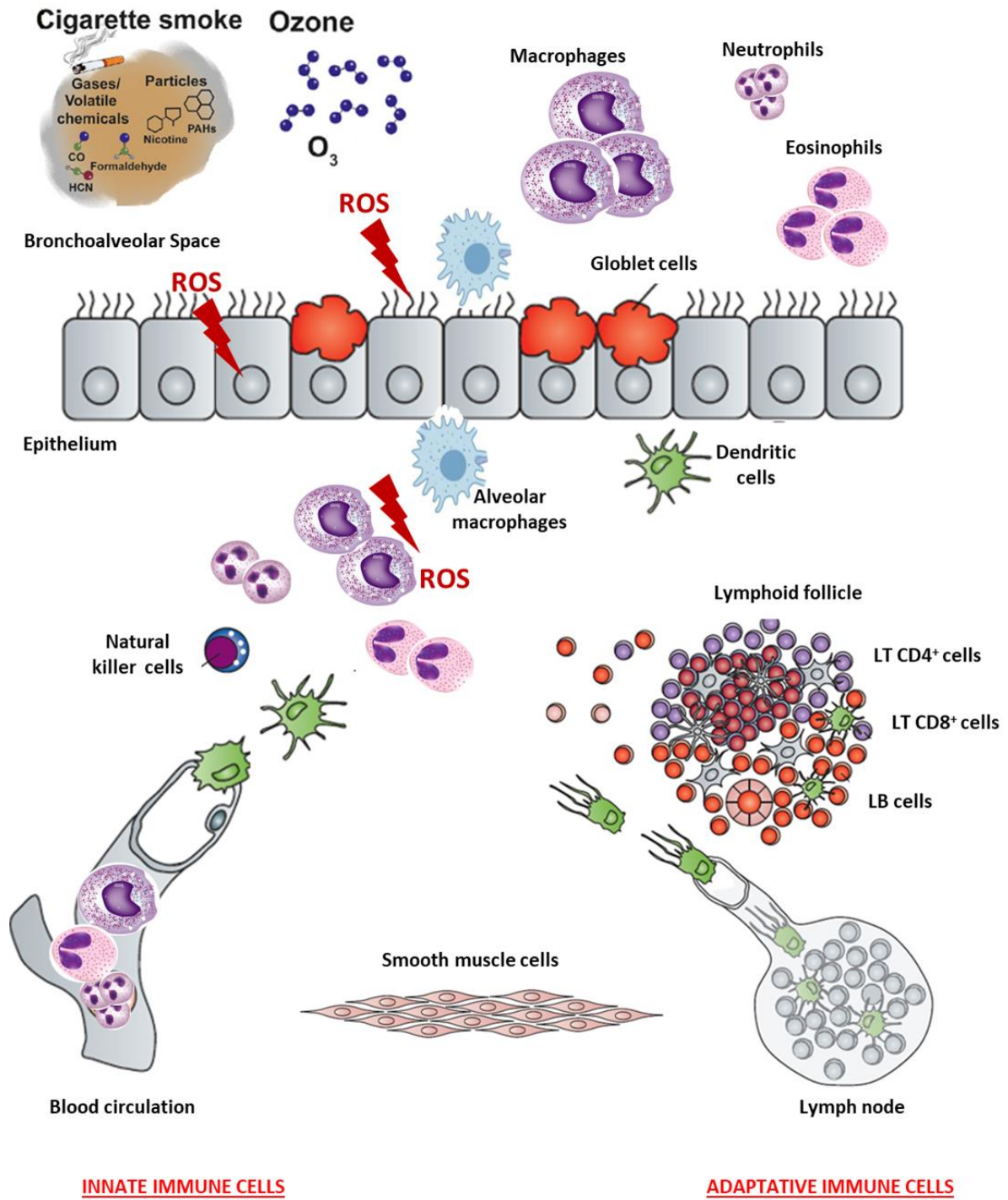
## D- La réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette ou par l'ozone

### 1) Les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire pulmonaire

Une exposition à la fumée de cigarette et/ou à des polluants (de type ozone), va induire des signaux de dangers : des **DAMPs** (Danger-Associated Molecular Patterns), des ROS (Reactive Oxygen Species), pouvant conduire à l'activation des **PRRs** (Pattern-Recognition Receptors). Les cellules résidentes du poumon (épithéliales, macrophages alvéolaire, cellules dendritiques...) vont sécréter des médiateurs de l'immunité pour recruter les cellules inflammatoires par phénomène de chimiotactisme (*Faiz et al., 2018*).

Une inflammation pulmonaire chronique associée à une réparation excessive du tissu peut conduire à une BPCO couplée parfois à un emphysème. Bien que l'ensemble de l'épithélium soit impliqué dans cette inflammation pulmonaire, certains types cellulaires sont plus dérégulés que d'autres. Il a par exemple été montré chez des patients BPCO une hyperplasie des cellules basales avec une diminution de leur caractère de cellules souches. Ces cellules comportent aussi un taux plus élevé de cytokines pro-inflammatoires et des protéines impliquées dans l'apoptose (*David et al., 2021*). Chez les fumeurs et les patients BPCO la production de mucus par les cellules caliciformes est augmentée ainsi que sa viscosité. Une dégradation des cils des cellules ciliées chez les fumeurs a été constatée et corrélée à une clairance difficile (*David et al., 2021*). Une grande majorité des patients ont un recrutement de cellules immunitaires dans le tissu pulmonaire et le lavage bronchoalvéolaire de type macrophages et neutrophiles (*Bruselle et al., 2011 & Barnes, 2016*) et dans certains cas particuliers, des éosinophiles sont également recrutés (*Zysman et al., 2017*) (**Fig. 7**). Sur un court terme, ces cellules recrutées ont un rôle bénéfique à la clairance pulmonaire. Cependant, sur le long terme elles aggraveront la pathologie en entretenant l'inflammation et en induisant une dégradation du tissu, à cause de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire et de ROS. A terme, il y aura une perte de fonction irréversible.

S'ajoute au recrutement des cellules de l'immunité innée, la mise en place de la réponse immunitaire adaptative qui exacerbe la pathologie chez les patients BPCO. On retrouve d'ailleurs ce que l'on appelle des nœuds lymphoïdes secondaires contenant des lymphocytes T et B, souvent associés à un mauvais pronostic (*Seys et al., 2015*).



**Figure 7 :** Schéma résumé de l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette ou l'ozone. (Adapté de *Brusselle et al., 2011 & Riteau et al., 2022*).

## 2) Rôle des senseurs de l'immunité

### a) Les signaux de dangers après exposition à des polluants et/ou à la CS :

L'immunité innée joue un rôle important dans la défense de l'hôte puisqu'il s'agit de la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes. Cette réponse immunitaire est régulée par différents récepteurs exprimés par la majorité des cellules immunitaires innées qui sont les récepteurs **PRRs**. Elle a pour but d'éliminer les infections microbiennes, virales ou fongiques ou encore dans notre cas d'étude, de réparer les tissus endommagés lorsque l'inflammation est dite « stérile » c'est à dire non-pathogène (**Table. 1**).

Les PRRs seront capables de reconnaître les **PAMPs** ainsi que les **DAMPs**. Ces derniers peuvent être générés par un stress quelconque induisant l'activation d'une signalisation intracellulaire pro-inflammatoire voire une mort cellulaire. S'ensuit la libération du contenu cellulaire pro-inflammatoire comme par exemple l'ATP qui va activer le récepteur purinergique P2X7 et l'inflammasome NLRP3 (*Nuka et al., 2018*) ou encore l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire fortement immunogènes qui vont activer la voie des **IFNs** (Interférons) de type 1 (*Zhang et al., 2010 & Nascimientto et al., 2019*).

	Récepteurs
<u>Composants de la fumée de cigarette et pollution</u>	
Endotoxine (LPS)	TLR4 et CD14
Nicotine	nAChR, TRPA1
Esp. Réactive de l'oxygène (ROS)	NLRP3
Radicaux libres (issus de l'O <sub>3</sub> )	NLRP3
Acroléine	TRPA1
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	AhR
<u>DAMPs libérés par les cellules mourantes</u>	
ATP	P2XR, P2YR
Acide urique	NLRP3
HMGB1	TLR-2,4,9, RAGE, CD24
« Heat shock proteins »	TLR-2,4, CD91, CD24, CD14, CD40
β-defensins	TLR4, CCR6
ADN (Mt. nucléaire)	TLR9, cGAS-STING, ZPB1
Peptide formyle	FPR1
<u>DAMPs libérés par dégradation de la Matrice Extra Cellulaire (MEC)</u>	
Acide Hyaluronique	TLR-2,4, CD44
Fibronectine	TLR4, Intégrines
Heparane sulfates	TLR4
Versican	TLR2
Biglycans	TLR2,4 P2XR
N-acetyl-proline-glicine-proline	CXCR1, CXCR2
TLR=Toll-like receptor. CD=cluster of differentiation. nAChR=nicotinic acetylcholine receptor. TRPA1=transient receptor potential A1. AhR=aryl hydrocarbon receptor. P2XR=purinergic receptor P2XR. P2YR=purinergic receptor P2YR. NLRP3=NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3. RAGE=receptor for advanced glycation end products; FPR1=formyl peptide receptor 1. CXCR=chemokine (c-x-c motif) receptor.	

**Tableau 1 :** Récepteurs actuellement caractérisés pour être impliqués dans la réponse à la fumée de cigarette et à des polluants (*Adapté de Brusselle et al., 2011 & Nascimientto et al., 2020*).

## **b) Les senseurs d'Acides Nucléiques**

J'ai choisi tout d'abord de présenter quelques senseurs d'acides nucléiques qui ont été étudiés dans des cas d'inflammations pulmonaires virales ou bactériennes ou en réponse à la fumée de cigarette.

D'une part, les senseurs d'acides nucléiques sont capables de reconnaître les ARNs doubles ou simples brins, sens ou anti-sens et les ADN doubles-brins (ADNdb) issus de pathogènes. D'autre part, les acides nucléiques issus du « soi » (ADN mitochondrial et/ou nucléaire) libérés par les cellules mourantes après un dommage cellulaire.

La voie **cGAS-STING** est impliquée dans la reconnaissance des acides nucléiques notamment de l'ADNdb. Le senseur **cGAS** (Cyclic G/AMP Synthase) qui se trouve dans le cytoplasme va induire la synthèse d'un di-nucléotide cyclique combinant une guanosine et une adenosine monophosphate (cyclic GMP-AMP : cGAMP aussi trouvée chez les bactéries) (*Vance et al., 2016 & Nascimento et al., 2019*). Ce dernier va conduire à l'activation de la protéine **STING** (Stimulator of Interferon Genes), qui se trouve soit dans le cytoplasme, soit à la membrane du réticulum endoplasmique. L'interaction entre cGAMP et STING permet de dimériser STING et d'activer le facteur de transcription **NF-κB** conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (comme le TNFs). De plus, dans la réponse antivirale ou antibactérienne STING induit l'activation de **IRF3** (Interferon Regulatory Factor 3) permettant la production d'IFN de type 1 (*Ishikawa et al., 2009*).

De précédant travaux ont montré l'implication de la voie cGAS-STING en réponse à une exposition aigüe à la fumée de cigarette chez la souris, démontrant ainsi la capacité de la voie cGAS-STING à reconnaître l'ADN du soi, issu des dommages induits par la fumée de cigarette (*Nascimento et al., 2019*).

La protéine **MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein)** se trouve associée à la membrane externe de la mitochondrie ou au peroxyosome et est impliquée dans la réponse antivirale grâce à l'induction de cytokine par les cellules infectées, ce qui permet la clairance virale. Cette protéine possède un domaine **CARD** (Caspase Activation and Recruitment Domains) qui lui permet d'interagir avec des récepteurs de la famille des RLR (RIG Like Receptors) et NLR (NOD Like Receptors) (décrits plus bas) (*Chen et al., 2021 & Sun et al., 2006*). Par exemple, via son interaction avec NLRP6 de manière indépendante de la formation de inflammasome, la protéine MAVS est impliquée dans la réponse antivirale au niveau de l'intestin (*Ghimire et al., 2020*).

Le senseur **ZBP1 (Z-DNA Binding Protein 1)** est impliqué dans la reconnaissance de l'ADN viral présent dans le cytoplasme. Une fois l'association ZBP1 de l'ADNdb, il y aura activation des protéines TKB1 et IRF3 activant la voie des IFNs (*Kuriakose et al., 2018*). ZBP1 est impliqué dans la détection du virus de la grippe A ce qui conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la mort cellulaire (*Kuriakose et al., 2016*).

De plus, ZBP1 est capable de reconnaître l'ADNmt libéré lors de stress oxydatif ce qui conduit

à la formation du complexe nécrosome composé de RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3) et de MLKL (Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase) et donc à une mort cellulaire par nécroptose (*Morsch et al., 2019*). Nous nous sommes intéressés à ce senseur dans notre modèle d'exposition à l'ozone (décrit plus bas) car il semble être activé par un stress oxydatif et il est également capable d'activer les inflammasomes.

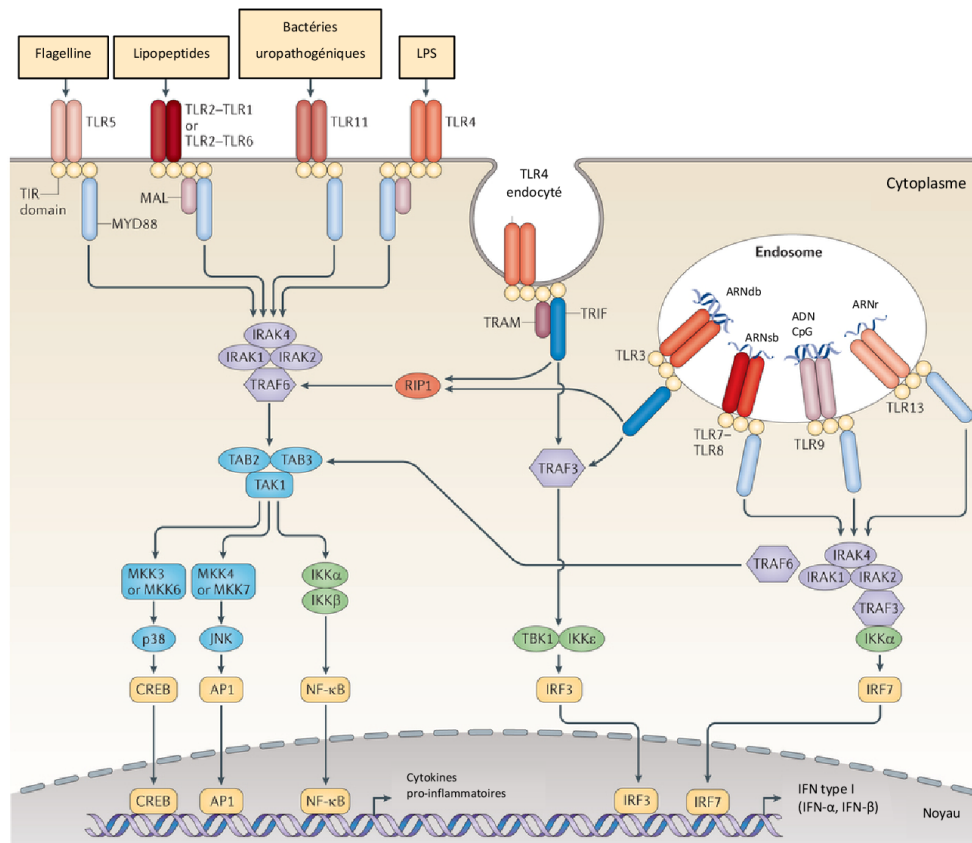
Pour finir, le récepteur **AIM2** (Absent In Melanoma 2) peut également détecter l'ADNdb et former un inflammasome, induisant la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 (*Fernandes-Alnemri et al., 2009*). AIM2 est activé au niveau du tissu pulmonaire des patients atteints de BPCO, ainsi que dans des modèles d'exposition à la fumée de cigarette (*Tran et al., 2021*). Dans des conditions où il y a une forte augmentation d'ADN au sein de la cellule, AIM2 vient en support au senseur cGAS qui est stimulé dans un premier temps, pour induire l'inflammation (*Emming et al., 2019*).

### c) Les Toll Like Receptors (TLR)

Les **TLRs** (Toll Like Receptor) sont les récepteurs transmembranaires les plus étudiés des PRRs. Ils sont impliqués dans la reconnaissance de signaux de dangers qui leur sont très spécifiques. Ils peuvent être :

- Insérés dans la membrane cytoplasmique : **TLRs 1, 2, 4, 5, 6** sont tournés vers le milieu intra ou extra cellulaire. Les composants des parois bactériennes seront reconnus par ces TLRs. Par exemple le TLR4, est capable de reconnaître le motif bactérien du LPS (lipopolysaccharide), le TLR10, le peptidoglycane ou le LTA (acide lipotéichoïque) (**Fig. 8**).

- Insérés dans la membrane des endosomes : **TLRs 3, 7, 8, 9** sont activés en réponse à l'entrée d'un pathogène intra-cellulaire via leur capacité à reconnaître des acides nucléiques bactériens ou viraux comme les ARNs simples et doubles brins (**Fig. 8**).



**Figure 8 :** Schéma de la réponse immunitaire dépendante des TLRs. Les TLRs peuvent être insérés dans la membrane extracellulaire ou dans celle des endosomes (*O'Neil et al., 2013*).

Ils sont retrouvés dans de nombreux types cellulaires (immunitaire et non-immunitaire). La fixation du ligand spécifique du TLR induira son activation et la signalisation intracellulaire associée où souvent les facteurs **MyD88** (Myeloid Differentiation primary response protein 88) ou **TRIF** (TIR-domain containing adapter inducing IFN) sont impliqués (**Fig. 8**). Il existe chez l'Homme 10 TLRs et 13 chez la souris.

De façon intéressante, l'implication de la voie TLR4 et TLR9 en réponse à la fumée de cigarette a été montrée (*Doz et al., 2008 & Nadigel et al., 2011*). Un effet de la fumée de cigarette sur l'activation des TLRs des macrophages alvéolaires dans un contexte de BPCO a aussi été mis en évidence (*Metcalfe et al., 2014*).

#### d) Les RIG Like Receptors (RLR)

Les **RLRs** (RIG Like Receptors) sont des hélicases, on retrouve **MDA-5** (Melanoma Differentiation Associated protein 5), **LGP2** et **RIG-1** (Retinoic acid Inducible Gene-1). RIG-1, la plus décrite, est impliquée dans la reconnaissance d'acides nucléiques intracellulaires viraux via son domaine hélicase. Ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance des virus de la grippe A et B, le virus de l'hépatite C (HCV) et d'autres. RIG-1 contient aussi un domaine CARD permettant le recrutement de caspases pro-inflammatoires conduisant à l'élimination de pathogènes ou d'induire une mort cellulaire

par apoptose ou pyroptose (décrites plus bas, chapitre des morts cellulaires) (*Yoneyama et al., 2004 & Iurescia et al., 2020*). Il a été montré un effet protecteur de la surexpression de RIG-1 chez les souris exposées à de la fumée de cigarette et infectées par le virus de la grippe A (*Wang et al., 2017*).

### e) Les NOD Like Receptors (NLR)

Les **NLRs** (NOD Like Receptor) sont des protéines cytosoliques appartenant à la famille des PRRs. Ils sont impliqués dans la reconnaissance de DAMPs et de PAMPs. Leurs structures très conservées, sont retrouvées de façon commune :

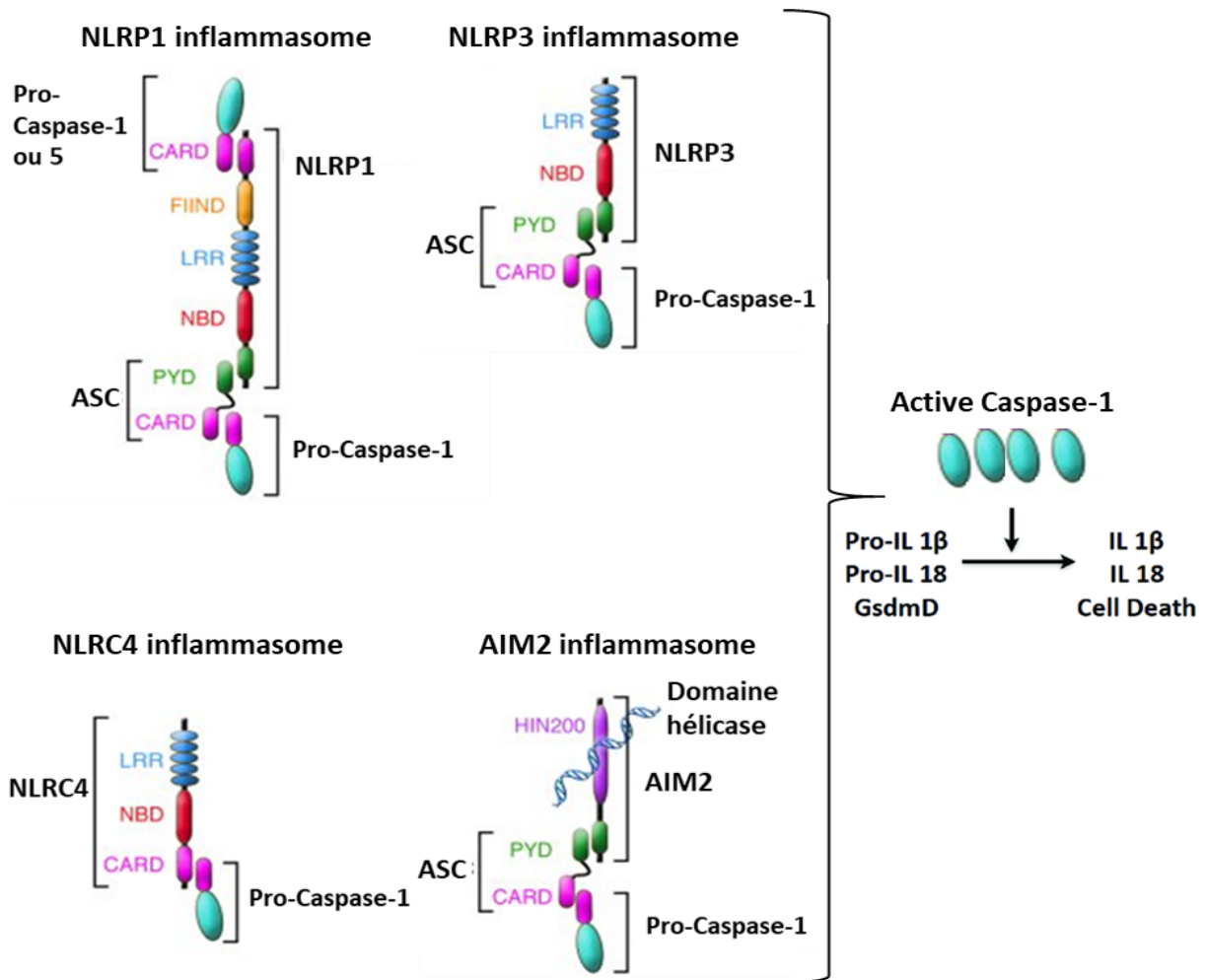
- Un domaine riche en **leucine** (**Leucine Rich-Repeat : LRR**) du côté C-terminal
- Un domaine central **NACHT**
- Un domaine N-terminal **PYD (Pyrine)** ou **CARD (Caspase Activation and Recruitment Domains)**.

L'association de certains domaines spécifiques des NLRs avec des domaines identiques présents chez des protéines adaptatrices ou effectrices va permettre la formation d'un complexe protéique, appelé inflammasome. On distingue les NLRPs qui possèdent un domaine PYD et les NLRCs qui possèdent un domaine CARD.

- **Les NLRPs** pour former l'inflammasome s'associent à la protéine adaptatrice **ASC** (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD). Cette dernière comporte donc un domaine CARD ainsi qu'un domaine PYD. La formation de l'inflammasome se fera donc via le domaine PYD du **NLRP** et celui de **ASC** et avec la caspase (protéine effectrice) concernée via le domaine CARD de **ASC** sur celui de la **Caspase-1 ou Caspase-11** dans certains cas.
- **Les NLRCs** peuvent s'associer avec la **Caspase-1** (protéine effectrice de l'inflammasome) directement via leur domaine CARD respectif sans recrutement de ASC.



Les caspases recrutées se retrouvant très proches au sein du complexe inflammasome, vont être clivées entre elles et seront donc sous leur forme active. L'activation de la Caspase-1 permettra d'une part, le clivage de précurseurs d'interleukines telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (qui sont présentes dans le cytoplasme) et pourront, une fois activées par ce clivage, être sécrétées dans un contexte pro-inflammatoire (**Fig. 9**) (*Christgen et al., 2020 & Martinon et al., 2006*). D'autre part, l'activation par clivage de Gasdermine D qui formera alors des pores membranaires, conduira à la pyroptose dans certaines conditions (*Broz et al., 2020*).



**Figure 9 :** Schéma représentant les inflammasomes NLRPs (NLRP1 et NLRP3), NLRCs (NLRC4) et AIM2 aboutissant à la sécrétion d'interleukines ou l'activation de la protéine Gasdermine D (*Adapté de Vanaja et al., 2015 & Stutz et al., 2009*).

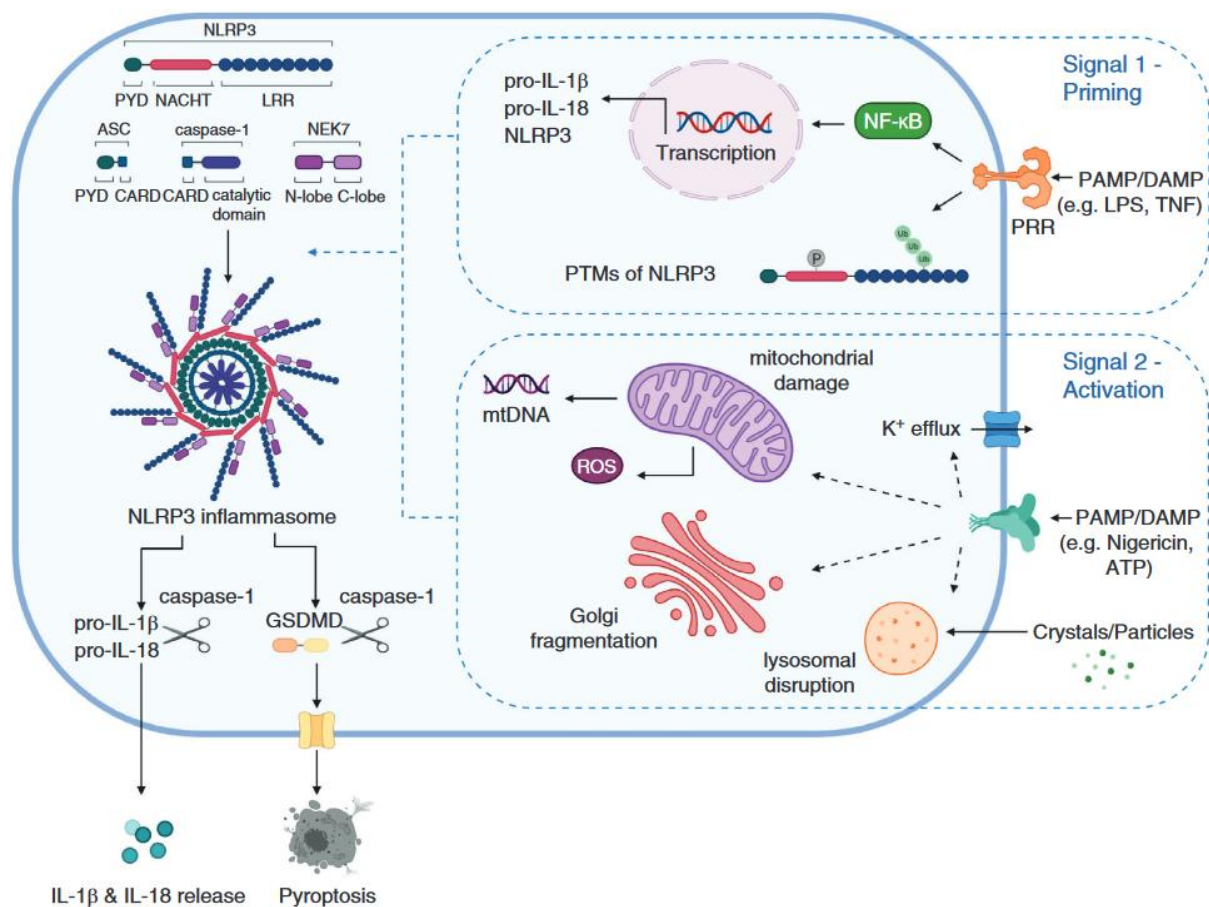
L'assemblage de l'inflammasome requiert l'activation de la Caspase-1 (voie canonique) ou de la Caspase-11 (voie non-canonique) de l'inflammasome (*Jamilloux et al., 2013 & Broderick et al., 2015*). Bon nombre de pathologies auto-inflammatoires montrent une activation des inflammasomes (*Broderick et al., 2015*). Les inflammasomes peuvent être activés après infection par des pathogènes, en réponse vaccinale ou encore dans un contexte de cancer (jouant, soit un rôle pro- soit anti-tumorigénique) (*Deets and Vance 2021*).

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis intéressée à l'implication des récepteurs NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) et NLRP6 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 6) dans des modèles d'inflammations pulmonaires induites par l'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone. C'est pourquoi, je vais décrire tout particulièrement ces deux NLRs.

Les protéines NLRP3 et NLRP6 sont très proches en terme de structure. Toutes deux sont composées : en N-terminal, d'un domaine PYD, puis NATCH et enfin LRR en C-terminal, comme décrit précédemment. Par contre ils diffèrent par leur taille (*Data base Uniprot #Q8R4B8 (NLRP3) et #Q91WS2(NLRP6)*) :

- **NLRP3** comporte 1033 acides aminés (118kDa) et contient **9 domaines LRR**.
- **NLRP6** comporte 869 acides aminés (97kDa) et contient **3 domaines LRR**.

**NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3)** : est l'inflammasome le plus étudié, notamment en clinique (*Christgen et al., 2020 & Martinon et al., 2006*). Son activation repose sur un premier signal qui induira sa transcription puis traduction ainsi que celle de la pro-IL-1 $\beta$ /pro-IL-18. S'ensuit un second signal induisant la formation du complexe inflammasome dépendant de la Caspase-1, permettant la maturation et sécrétion IL-1 $\beta$  et/ou IL-18 (*Broderick et al., 2015*) (**Fig. 10**).



**Figure 10 :** Schéma de l'activation de NLRP3 impliquant un signal 1 dit de « priming », suivi du signal 2 dit « d'activation » qui est la formation du complexe lui-même (*McKee et al., 2020*).

L'implication du récepteur NLRP3 dans un contexte de BPCO ou simplement dans des modèles d'exposition à la fumée de cigarette *in vivo* ou *in vitro* restait à définir. Certains travaux ont montré une sur-expression de NLRP3 au niveau du tissu pulmonaire chez les patient BPCO (*Faner et al., 2016*). *In vivo* ou ex-vivo, des études montrent une activation de l'inflammasome NLRP3 (*Mahalanobish et al., 2020 & Mehta et al., 2020*), tandis que d'autres montrent une inhibition (*Morris et al., 2015 & Buscetta et al., 2015*).

Considérant les controverses décrites dans la littérature, une partie de mes travaux de thèse sont consacrée à l'étude de l'implication de NLRP3 en réponse à la fumée de cigarette *in vivo*.

Il existe différents inhibiteurs bloquant la voie de signalisation en aval de l'inflammasome NLRP3. On retrouve le MCC950, CY-09, OLT1177... (*Zahid et al., 2019*). Une partie de ces inhibiteurs ont déjà été testés dans certaines pathologies chez la souris, certains sont en essais cliniques et montrent une efficacité considérable sans pour autant avoir d'effets délétères. Le MCC950 semble être l'inhibiteur le plus sélectif. Il bloque la formation de l'inflammasome en empêchant l'hydrolyse de l'ATP au niveau du domaine NATCH (*Coll et al., 2019*). Ce dernier a déjà été testé *in vivo* chez la souris et diminue par exemple l'inflammation dans la pathologie de l'EAE (Expérimentale Autoimmune Encephalomyelitis) (*Coll et al., 2015*). De plus, il a montré son efficacité dans des pathologies inflammatoires cérébrales grâce à sa capacité à passer la barrière hématoencéphalique (*Gordon et al., 2019*). Pour finir, l'efficacité du MCC950 en réponse à l'inflammation pulmonaire induite par le LPS a été décrite chez la souris (*Wang et al., 2020*), ainsi que dans la « Lung ischemia-reperfusion », efficacité caractérisée par une diminution de l'inflammation et du recrutement neutrophilique dans le tissu (*Xu et al., 2018*). Nous avons donc choisi d'utiliser cet inhibiteur *in vivo* dans notre modèle d'exposition à la fumée de cigarette afin de déterminer le rôle de NLRP3.

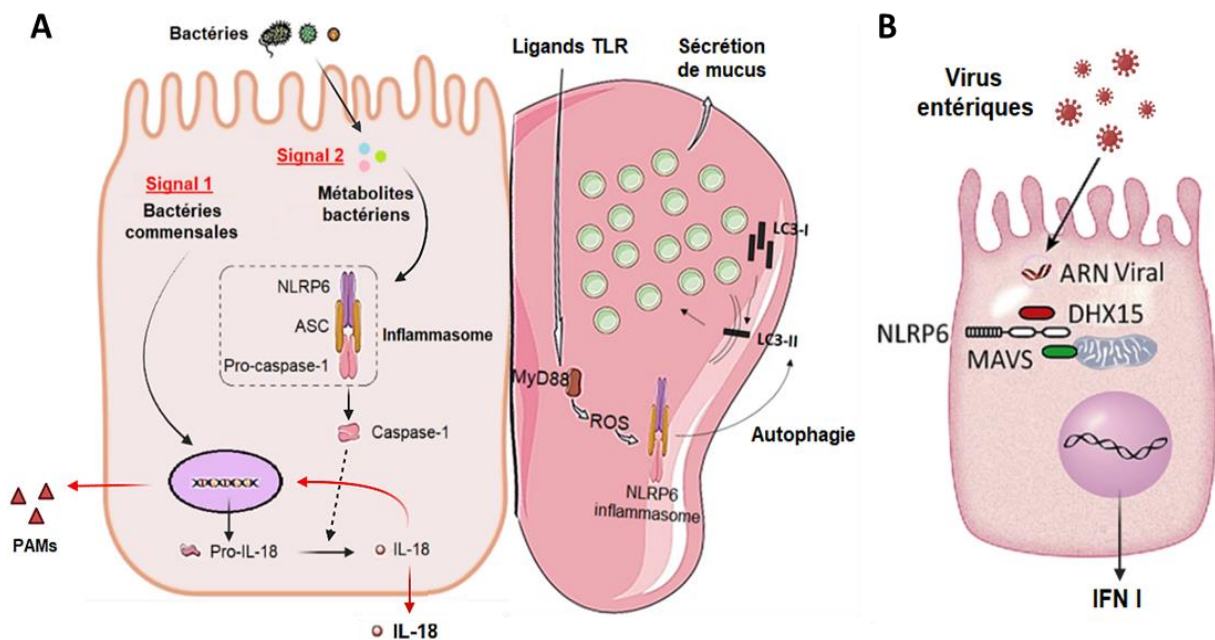
**NLRP6 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 6)** : Tout comme NLRP3, NLRP6 peut aussi former une structure en inflammasome via son association avec ASC et la Caspase-1 et/ou la Caspase-11. Mais il peut aussi être activé de manière indépendante d'un inflammasome et des caspases.

Tout d'abord, il a été décrit dans la littérature une forte expression de NLRP6 dans l'intestin (*Chen et al., 2011*). Son activation repose sur un premier signal de stimulation provenant des bactéries commensales de la flore intestinale via le LPS cytosolique ou le LTA (Lipoteichoic acid) qui peut être également présent dans le cytosol après infection par *Listeria monocytogenes* (*Hara et al., 2018*) (**Figure 10A**). Puis s'ensuit un second signal activateur tel que les métabolites bactériens comme la taurine qui permet l'assemblage de l'inflammasome NLRP6, aboutissant à la maturation et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et/ou d'IL-18. L'IL-18 mature favorise la sécrétion de peptides antimicrobiens impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Dans ce modèle d'infection à la *Listeria monocytogenes*, l'inflammasome NLRP6 formé avec la protéine adaptatrice ASC est capable d'activer la Caspase-11, qui active à son tour la Caspase-1 et la maturation de l'IL-1 $\beta$  et IL-18 dans les macrophages (*Hara et*

*al., 2018 & Ghimire et al., 2020*) (**Fig. 12**). L'inflammasome NLRP6-Caspase-11 est aussi impliqué dans la mort des neurones entériques (*Matheis et al., 2019*). Ces deux études suggèrent que le senseur NLRP6 est particulièrement impliqué dans la formation d'un inflammasome non canonique avec la Caspase-11 et activant celle-ci dans un processus d'induction de mort cellulaire pro-inflammatoire.

Toujours au niveau de l'intestin, dans les cellules caliciformes, l'activation de l'inflammasome NLRP6 est impliqué dans la sécrétion de mucus indispensable au maintien l'homéostasie intestinale. Il s'agit d'un mécanisme dépendant de l'autophagie impliquant la protéine **LC3-I/LC3-II** et la formation d'un autophagosome encapsulant les granules de mucine (**Fig. 11A**) (*Li & Zhu, 2020*).

Le récepteur NLRP6 exprimé dans l'intestin a aussi été décrit comme acteur antiviral important, mais de façon indépendante de la formation de l'inflammasome. Dans des cas d'infection, l'ARN viral une fois internalisé dans la cellule, va se lier à l'hélicase **Dhx15**, qui va activer NLRP6. C'est ensuite en interagissant avec la protéine **MAVS** (Mitochondrial antiviral signaling adaptor) qu'une réponse de type IFN de type 1 sera induite (**Fig. 11B**) (*Levy et al., 2017*).

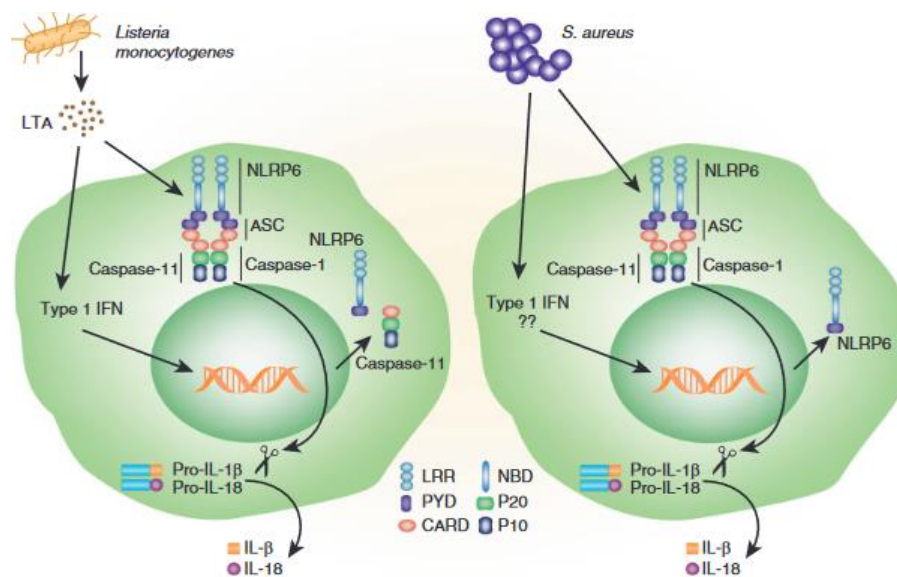


**Figure 11 :** Rôle de l'inflammasome NLRP6 dans le maintien de l'homéostasie intestinale via la régulation de sécrétion de mucus (A) (*Adapté de Li & Zhu, 2020*) et dans la réponse antivirale au niveau de l'intestin de manière indépendante de l'inflammasome (B) (*Levy et al., 2017*).

Au niveau des poumons, quelques études récentes montrent que NLRP6 est impliqué dans l'inflammation pulmonaire induite lors d'infections à *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* (bactéries gram positif). Les souris déficientes pour *Nlrp6* (*Nlrp6<sup>-/-</sup>*) présentent une meilleure survie, une diminution de la charge bactérienne dans les poumons, et du nombre de neutrophiles et de macrophages dans le lavage bronchoalvéolaire par rapport aux souris sauvages (WT),

ainsi qu'une diminution de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$  (Ghimire et al., 2018).

Toujours lors d'infections bactériennes par *S. aureus*, le LBA des souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> présente une diminution de la LDH (Lactate DesHydrogenase), de l'IL-1 $\alpha$  (Interleukin 1 alpha) et de HMGB1 (High Mobility Group Box 1). Ces molécules (alarmines) sont généralement sécrétées de façon dépendante de l'activation de la **GSDMD** (Gasdermine D), protéine clé de la mort cellulaire par pyroptose. De plus, les auteurs ont montré que dans des macrophages de souris dérivés de la moelle osseuse, l'infection par *S.aureus* induit l'activation des Caspase-1 et Caspase 11 et de la Gasdermine D de façon dépendante de NLRP6, identifiant un nouveau rôle de NLRP6 dans l'induction de la mort par pyroptose (Fig. 12). NLRP6 induit également la mort des macrophages par nécroptose, ces deux types de morts cellulaires (décrits plus bas) étant défavorables à la survie des souris infectées par *S. aureus* (Ghimire et al, 2018 & Ghimire et al., 2020).



**Figure 12 :** Formation de l'inflammasome NLRP6 dépendant de la Caspase 1 ou Caspase 11 après infection chez *Listeria monocytogenes* ou *S.aureus* (Ghimire et al., 2020).

A contrario, dans le cas d'infection par *Klebsiella pneumoniae* (bactérie gram négatif), les souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> présentent une charge bactérienne plus importante que les souris WT, ainsi qu'un recrutement de neutrophiles moins important au niveau du LBA (Cai et al., 2021).

En conclusion, NLRP6 est impliqué activement dans la réponse immunitaire de type infectieuse au niveau pulmonaire. Cependant, le rôle de NLRP6 dans la mise en place de pathologies pulmonaires dites « stériles » c'est-à-dire non infectieuses n'étant pas connu, nous avons développé cette thématique qui fait l'objet d'une grande partie de mes travaux de thèse.

### 3) Les paramètres solubles de l'inflammation : les cytokines

#### a) Les chimiokines

Les chimiokines sont des protéines impliquées dans le recrutement des cellules de l'immunité au niveau des tissus, via un phénomène de chimiotactisme. De ce recrutement s'ensuit la diapédèse, (passage des leucocytes à travers les capillaires sanguins) dans un contexte inflammatoire. Les motifs caractéristiques des chimiokines, notamment celles impliquées dans les modèles d'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone, sont C-C ou C-X-C (ou C est un résidu Cystéine et X un acide aminé X). Il est important de noter que cette famille ne se limite pas à ces motifs-là.

Dans le modèle aigu d'exposition à la fumée de cigarette ainsi que dans le modèle chronique d'exposition à l'ozone, nous retrouvons la chimiokine **CXCL1** (GRO- $\alpha$  chez l'Homme et KC : Keratinocyte Chemoattractant chez la souris) produite par les cellules épithéliales et les macrophages et est impliquée dans le recrutement des neutrophiles (ces derniers possédant le récepteur de CXCL1, nommé CXCR2) (*Vieira et al., 2009*).

La chimiokine **CXCL5** (ENA-78 chez l'Homme et LIX : LPS-induced CXC Chemokine chez la souris) est également présente dans nos modèles et essentiellement produite par les cellules épithéliales (*Kalchiem-Dekel et al., 2020*). Elle participe au recrutement et au maintien de la présence des neutrophiles dans le poumon dans un contexte inflammatoire (*Vieira et al., 2009 & Disteldorf et al., 2015*). Il a été montré une forte augmentation de CXCL5 chez les patients dans le lavage bronchoalvéolaire ainsi que dans le plasma (*Chen et al., 2019*).

La chimiokine **CXCL15** (Lungkine) qui est présente dans ces deux modèles d'étude est, produite par les cellules épithéliales pulmonaires et a une fonction analogue à CXCL1 et CXCL5. Son induction a été mise en évidence après exposition à la fumée de cigarette chez la souris (*Solleti et al., 2015*).

Nous avons également étudié deux autres chimiokines retrouvées uniquement dans notre modèle d'exposition à l'ozone qui sont **CCL11** (Eotaxine 1) et **CCL24** (Eotaxine 2). Elles sont toutes deux impliquées dans le recrutement des éosinophiles et leur maintien au niveau du tissu pulmonaire (*Menzies-Gow et al., 2002*).

## **b) Les Interleukines**

Les interleukines ont un rôle pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Les interleukines impliquées dans la réponse à la fumée de cigarette appartiennent en majorité à la famille de l'IL-1. L'IL-17 et l'IL-33 jouent aussi un rôle important (*Lee et al., 2018*).

Dans la famille de l'IL-1 on retrouve, l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18. Les IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  ont un rôle pro-inflammatoire via l'activation du récepteur à l'IL-1, induisant la transcription des composantes de la voie NF- $\kappa$ B.

L'alarmine IL-1 $\alpha$  n'a pas besoin d'être maturée pour être active, elle est présente dans le cytoplasme et pourra être libérée dans des conditions inflammatoires ou lors d'un dommage cellulaire (*Aoshiba and Nagai., 2003*). A contrario de la pro-IL-1 $\beta$  qui nécessite un clivage par la Caspase-1 ou 11 pour être active et sécrétée. L'utilisation d'anticorps anti-IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  réduit l'inflammation à la fumée de cigarette chez la souris (*Bucher et al., 2017*). Une large étude statistique a montré l'importance de l'implication des IL-1 dans la BPCO, une inhibition de ces voies de signalisation réduirait l'inflammation (*Yang et al., 2021*).

Dans un modèle d'exposition aigu à l'ozone, le recrutement des neutrophiles au niveau du lavage bronchoalvéolaire dépend de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  (*Park et al., 2004*). A l'inverse, toujours dans ce même modèle aigu, une étude plus récente montre l'implication de l'IL-1 $\alpha$  uniquement (*Michaudel et al., 2018*). En revanche, dans un modèle chronique d'exposition le phénotype reste à être caractériser. L'IL-18 est également produite sous une pro-forme qui nécessite un clivage pour être activée. Cette interleukine est augmentée dans les expectoras de patients BPCO (*Rovina et al., 2009 & Yang et al., 2021*).

## **c) La famille des TNF (Tumor Necrosis Factors)**

La superfamille des **TNFs** (Tumor Necrosis Factors) comprend un grand nombre de protéines qui peuvent être sécrétées par les cellules immunitaires ou par les cellules épithéliales. On trouve les TNF $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , décrits pour être impliqués dans bon nombre de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, certains cancers, le psoriasis, les pathologies inflammatoires de l'intestin ou encore dans l'inflammation pulmonaire. La production de TNF $\alpha$  par les cellules peut se faire via l'activation des voies cGAS/STING ou encore après activation des inflammasomes (*Riteau et al., 2022*).

Cette famille comprend aussi le **FasL** (Fas Ligand) impliqué dans l'apoptose ainsi que **TRAIL** (Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) décrit pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses. La cytokine **BAFF** (B-cell Activating Factor) appartient aussi à cette famille et est impliquée dans la formation de nœuds lymphoïdes tertiaires dans la BPCO corrélés à la gravité de la pathologie (*Nascimento et al., 2019*).

Les TNFs agissent via leur fixation à différents récepteurs spécifiques, augmentant l'inflammation

ou induisant la prolifération/différenciation cellulaire ou l'apoptose. Chez les mammifères, ils sont exprimés dans une grande variété de tissus notamment dans les leucocytes.

L'exposition à l'ozone induit la production de TNF $\alpha$  (*Fakhrzadeh et al., 2004*). Actuellement, des anticorps spécifiques du TNF (anti-TNF) sont largement utilisés comme thérapie dans les pathologies inflammatoires et montrent une bonne efficacité. De manière intéressante, les patients atteints d'une BPCO qui reçoivent un traitement anti-TNF pour palier à des pathologies associées de type arthrite rhumatoïde, ont moins besoin d'être hospitalisés (*Barnes et al., 2007 & Matera et al., 2009*).

#### 4) Les facteurs de remodelage tissulaire

##### a) Les protéases et métalloprotéases (MMP-X)

Les protéases sont des enzymes capables de cliver des protéines à un site spécifique. A l'état physiologique leur fonction principale est de réguler la **MEC** (Matrice Extra Cellulaire) et permettre la migration de certains types cellulaires en son sein (*Mackarel et al., 1999*).

Leur régulation peut se faire en isolant les protéases de leurs substrats ou en les contenant dans des granules intracellulaires (cas dans les granules des neutrophiles). Les protéases peuvent être produites sous forme inactive et c'est leur clivage qui permet leur activation (cas des Caspases), elles peuvent aussi être régulées grâce à des anti-protéases c'est le cas des **MMPs** (MétalloProtéases) régulées par les **TIMPs** (Tissue Inhibitor of MetalloProteases) (*Arpino et al., 2015*).

Les protéases à sérines comme la neutrophile élastase (NE) contenues dans les granules des neutrophiles sont importantes pour leur migration au sein de la MEC via la dégradation de son contenu. En plus de contenir ces dernières, les granules des neutrophiles contiennent des peptides antimicrobiens qui participent à la clairance de l'environnement. Sur un court terme cette libération du contenu granulaire est bénéfique au tissu, en revanche une libération trop importante ou trop répétée aura un effet délétère sur l'intégrité du de ce dernier. Dans la BPCO ou la mucoviscidose, l'inflammation entretenue additionnée à des phases d'exacerbations de type infectieuses va aggraver la pathologie en partie à cause des NE qui vont digérer la MEC de façon trop importante et aussi induire un épaissement du mucus (*Voynow et al., 2021*).

Les MMPs possèdent un ion zinc au site catalytique et sont toutes très impliquées dans l'aggravation de la BPCO (*Linder et al., 2015*). Sécrétées elles aussi par les neutrophiles pour migrer dans la MEC, elles ont pour substrat la gélatine, l'élastine et le collagène et vont par conséquent être impliquées dans la dégradation du tissu (*Jablonska-Trypuc et al., 2016*).

Enfin, une autre catégorie de protéases induites dans la BPCO, sont les protéases à cystéine (comprenant les Caspases). Elles vont réguler l'inflammation en induisant la sécrétion de cytokine pro-inflammatoires et en régulant les morts cellulaires induites après exposition aux polluants ou à la fumée de cigarette.



## **b) Les inhibiteurs de protéases (TIMP-X)**

Incontournable pour le maintien de l'homéostasie, les inhibiteurs de protéases jouent un rôle important dans la régulation de la dégradation tissulaire. Parmi eux, on trouve l'anti-protéase **A1AT** (l' $\alpha$ -1-anti-trypsine) circulante, produite par le foie qui est impliquée dans l'inhibition de la NE. Il a été montré que l'absence de cette protéase à cause d'une anomalie génétique est à l'heure actuelle, la seule cause génétique identifiée, impliquée dans l'apparition de BPCO et l'emphysème (*Brode et al., 2012*).

Par ailleurs, on trouvera les protéases inhibitrices des MMP, les **TIMPs** qui sont au nombre de quatre chez les mammifères et sont sécrétées par le tissu résident et/ou les cellules infiltrées. Les TIMPs inhibent les MMPs au niveau de leur site catalytique ce qui permet de réguler la migration cellulaire et l'inflammation (*Arpino et al., 2015*). Une augmentation excessive en TIMPs est un marqueur privilégié de la fibrose.

La dérégulation de la balance protéases/inhibiteurs, est impliqué dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires ou neurodégénératives par exemple (*Rivera S et al., 2004*). De plus, une augmentation importante des NE, des MMPs, des TIMPs (en particulier MMP-9/12 et TIMP-1) chez les patients BPCO, est associée à la sévérité de la pathologie (*Li et al., 2016*). C'est pour cela que dans nos modèles (décrits plus bas), nous insistons sur le dosage de ces deux paramètres importants.

## **5) Le microbiote intestinal et l'axe poumon intestin :**

Le microbiote intestinal est très décrit, très étudié et on sait aujourd'hui qu'il joue un rôle primordial dans la digestion et l'absorption des nutriments. En effet, les bactéries présentes au niveau de l'intestin sont impliquées dans des processus de fermentation pour la digestion, ou encore dans la synthèse de nutriments essentiels comme certaines vitamines ou neuromédiateurs (*Mohajeri et al., 2018*). De plus, le microbiote intestinal est un facteur clé dans la réponse immunitaire à l'échelle de l'organisme tout entier et dans la réponse allergique via la sécrétion de médiateurs de l'immunité (*Schwierzeck et al., 2021*).

La composition de ce microbiote peut être perturbé par l'alimentation, le stress, les produits chimiques, une prise médicamenteuse, des expositions à des polluants ou encore le tabac. De plus, le microbiote peut varier selon la génétique de l'hôte, ce qui peut perturber l'interaction « hôte/micro-organisme » rendant moins optimal l'ensemble des processus décrits précédemment.

L'importance du microbiote intestinal est bien avéré dans le cas des infections respiratoires et se fait via la sécrétion dans le sang de métabolites qui stimulent l'immunité pulmonaire au quotidien et lors d'inflammations (*Samuelson et al., 2015*). De plus, le microbiote intestinal joue un rôle sur l'hématopoïèse qui n'est pas sans conséquence pour l'immunité (*Marsland et al., 2014 et Dang et al., 2019*).

Par ailleurs, la colonisation par des bactéries intestinales au niveau du poumon lors de la

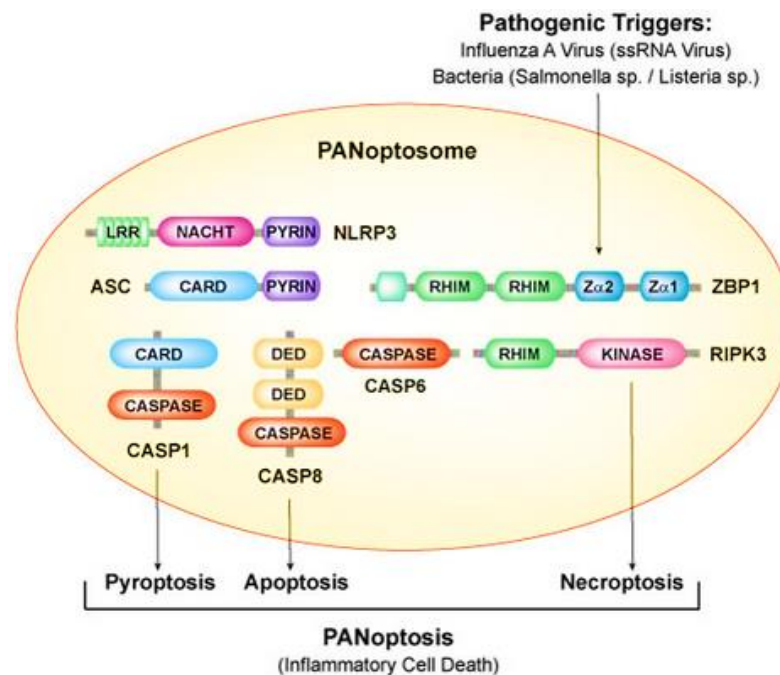
naissance, aura un impact direct sur l'immunité pulmonaire chez des individus sains ou développant des maladies chroniques ou encore ayant des pathologies génétiques comme la mucoviscidose (*Pattaroni et al.,2018 & Rofael et al.,2019*).

## E- Implication des différentes morts cellulaires

Le processus physiologique de mort cellulaire est essentiel au maintien de l'homéostasie globale des êtres vivants. Il est impliqué dans le renouvellement de cellules endommagées, vieilles ou dysfonctionnelles. Ce processus en conditions physiologiques normales, n'induit aucune réponse immunitaire et une partie du contenu cellulaire, comme par exemple les acides aminés sera recyclée. La mort par apoptose est la mort cellulaire la plus impliquée dans ce processus.

En revanche, dans des conditions physiopathologiques induites par une infection ou encore des dommages tissulaires, l'activation de différentes voies de mort cellulaire sera occasionnée, dans un but final d'élimination de l'infection et/ou de réparation du tissu. La majeure partie du temps, dans de telles conditions, l'apoptose engendrée sera couplée à des morts cellulaires pro-inflammatoires telles que la nécrose, la pyroptose (dépendante de l'activation d'un complexe inflammasome), la nécroptose ou encore la NETose (spécifique des neutrophiles) (*Karki et al., 2021 & Yipp et al., 2012*).

Dans certains cas particuliers, l'ensemble de ces processus de morts cellulaires sera activé en même temps, ce qui a donné lieu récemment à l'émergence d'un nouveau concept, celui de mort par PANoptose (P pour pyroptose, A pour apoptose, N pour nécroptose). La PANoptose est comme son nom l'indique un type de mort cellulaire programmée pro-inflammatoire pour lequel les voies de signalisations spécifiques à la fois de la pyroptose, de l'apoptose et de la nécroptose sont activées (*Wang & Kanneganti, 2021*) (Fig. 13).



**Figure 13** : Schéma de la mort cellulaire par PANoptose. (*Christgen et al., 2020*).

## 1) La nécrose

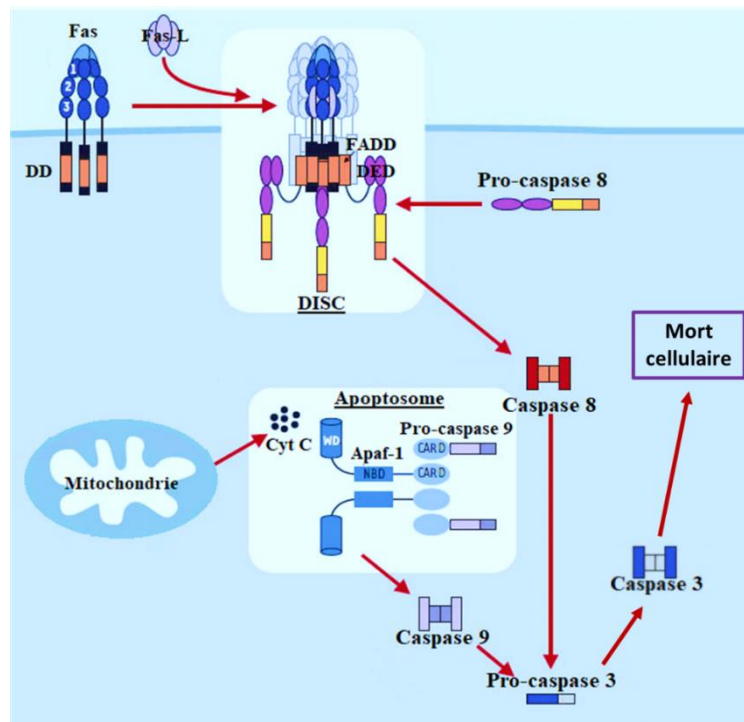
Certainement la mort cellulaire la plus décrite, la nécrose est un type de mort cellulaire non-réglée et non-programmée. Elle survient lorsque les cellules sont incapables de réguler leur homéostasie, c'est-à-dire dans des conditions anormales (un défaut d'oxygénation, une température anormale, des polluants, des irradiations).

La conséquence sera un gonflement de la cellule avec formation de vacuoles cytoplasmiques et rupture de la membrane plasmique et de celle des organites. Le contenu cellulaire sera libéré, induisant une inflammation importante. Le mécanisme le plus impliqué dans l'induction de la nécrose est une dérégulation des canaux ioniques  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dépendant. En conclusion, la nécrose correspond à une mort cellulaire accidentelle et irréparable (*Wei et al., 2015*).

## 2) L'apoptose

L'apoptose, à la différence de la nécrose, est une mort cellulaire programmée et très régulée. Elle se caractérise par un rétrécissement de la cellule sur elle-même. Son but est d'éliminer les cellules vieilles, inutiles et endommagées afin de les renouveler sans créer d'inflammation.

La majeure partie du temps, les macrophages vont phagocyter les corps apoptotiques formés afin de les dégrader. L'apoptose peut être induite par deux voies moléculaires différentes : la voie intrinsèque mitochondriale et la voie extrinsèque (**Fig. 14**).



**Figure 14 :** Schéma représentant les voies intrinsèques (dépendante du cytochrome C et la Caspase 9) et extrinsèques (dépendante des Fas-L/R et de la Caspase 8) de l'apoptose (*Adapté de Inserm, 2002*).

La voie intrinsèque mitochondriale repose sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale qui libère ainsi son contenu. Le **cytochrome C** libéré en présence d'ATP, va se fixer à la protéine **Apaf1** (Apoptotic peptidase activating factor 1) qui verra sa conformation changer. La protéine Apaf1 contient un domaine CARD qui va ensuite se fixer au domaine CARD de la **pro-Caspase-9**, pour former l'apoptosome. La pro-Caspase-9 est alors clivée pour former la **Caspase-9** effectrice qui va ensuite à son tour activer la **pro-Caspase-3** en **Caspase-3** effectrice (**Fig. 14**).

Par ailleurs, la protéine **p53** (protéine gardienne du génome) est impliquée dans la voie intrinsèque de l'apoptose induisant la mort cellulaire lorsque l'ADN est endommagé (*Elmore., 2007*).

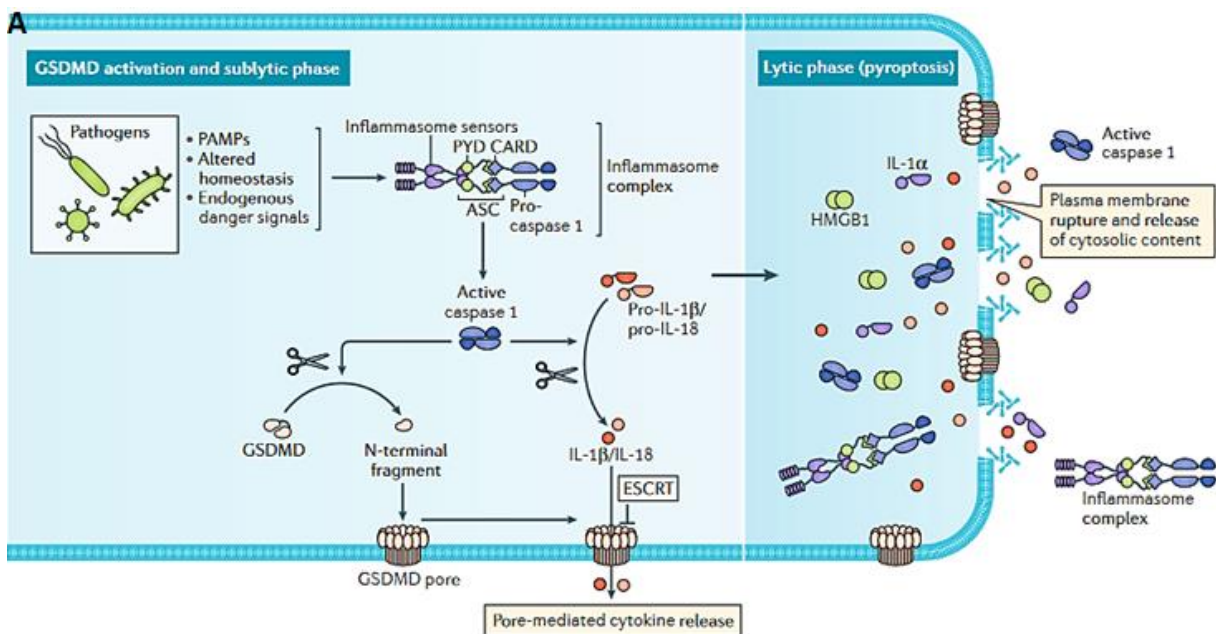
La voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée par un signal extracellulaire comme la fixation du **Fas-L** (Fas-Ligand) exprimé à la surface de cellules immunitaires sur le **Fas-R** (Fas-Receptor). Appartenant à la famille des **TNF-R** (Tumor Necrosis Factors Receptor), il contient un domaine extracellulaire nommé DD (Death domain) qui permettra le recrutement de la protéine **FADD** (Fas-Associated protein with Death Domain) qui contient aussi un domaine DD.

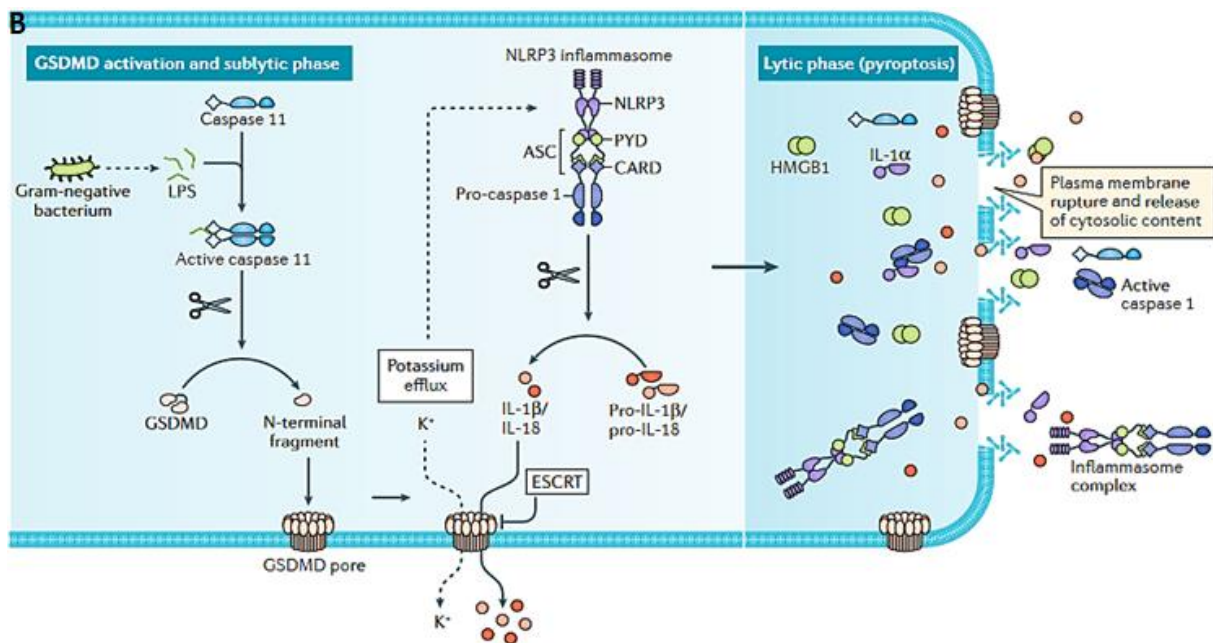
La protéine **FADD** via son domaine DED (Death Effector Domain) va permettre le recrutement des **pro-Caspase-8** afin de former le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). C'est l'auto-clivage de la pro-Caspase-8 en **Caspase-8** qui va permettre ensuite l'activation de la pro-Caspase-3 en Caspase-3, protéine clé effectrice de l'apoptose (**Fig. 14**).

Il a été montré *in vivo*, que l'exposition de primates non humains à la fumée de cigarette induit une apoptose au niveau des parois alvéolaires (*Polverino et al., 2015*). Par ailleurs, il a aussi été démontré que l'expression de la Caspase 3 clivée était induite dans les poumons des souris WT exposées deux fois par semaine à 2,5ppm d'ozone pendant 3h sur 6 semaines (*Triantaphyllopoulos et al., 2011*). C'est pourquoi au cours de ces travaux je me suis intéressée au rôle potentiel de l'apoptose dans l'inflammation pulmonaire dans notre modèle d'exposition à l'ozone.

### 3) La pyroptose

La pyroptose est une mort cellulaire lytique pro-inflammatoire mise en place après activation de PRRs intracellulaires. La GSDMD est la protéine clé de la pyroptose, qui possède un site de clivage qui permettra de libérer un fragment N-ter. Une fois libéré, ce dernier pourra s'insérer dans la membrane plasmique, formant ainsi des pores qui induiront soit, une perméabilité complète de la cellule créant un déséquilibre osmotique aboutissant à la mort cellulaire, soit, une perméabilité réversible et partielle permettant la sécrétion d'alarmines de la famille des IL-1 (l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , IL-18) ou encore de l'HMGB1 (*Broz et al., 2020*).





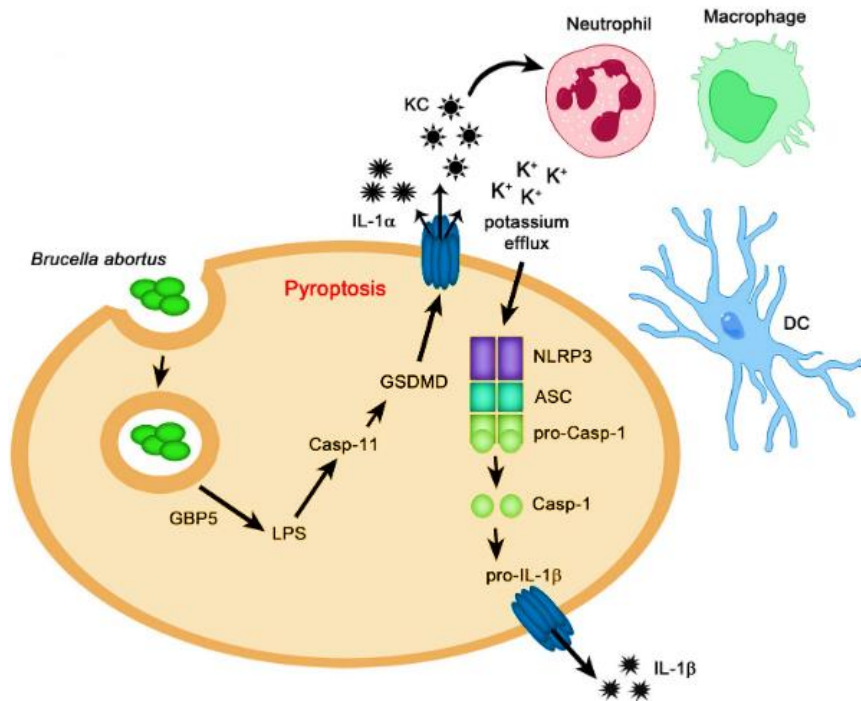
**Figure 15 :** Rôle de la GSDMD dans l'activation de la voie canonique de l'inflammasome dépendante de la Caspase 1 (A) et non canonique dépendante de la Caspase 11 (B) (Broz *et al.*, 2020).

L'activation de la voie canonique de l'inflammasome médiée par le recrutement de la Caspase-1 peut aboutir à l'activation de la GSDMD. Par ailleurs, il a été montré que la fixation du LPS (composant de la paroi des bactéries gram négatives), entraîne l'activation de la Caspase-11 aboutissant aussi au clivage de la GSDMD et finalement à la pyroptose (Broz *et al.*, 2020). La mort par pyroptose a été décrite dans les monocytes (Bergsbaken *et al.*, 2009) ainsi que dans les neutrophiles lorsqu'ils meurent par NETose pour expulser leur contenu cellulaire, de façon dépendante de la Caspase-1 ou-11 (Kambara *et al.*, 2018 & Chen *et al.*, 2020) (Fig. 15).

De récents travaux ont montrés que l'activation de la Caspase-3 peut inhiber la pyroptose en clivant la GSDMD à un site différent de celui utilisé par la Caspase-1 ou la Caspase-11, mettant en évidence l'existence d'un mécanisme de régulation entre les deux types de morts cellulaires (Taabazing *et al.*, 2017).

A contrario de ce phénomène, la Caspase-3 clivée pourrait indirectement conduire à la formation de pores par la GSDMD via l'activation des pannexines. Ces dernières forment des pores membranaires permettant un efflux potassique capable d'activer l'inflammasome NLRP3 conduisant au clivage de la Caspase 1, puis celui de la GSDMD qui va former des pores responsables du phénomène de pyroptose (Chen *et al.*, 2020).

Dans une étude utilisant un modèle d'infection à *B. abortus*, l'inflammasome canonique NLRP3/Caspase 1 peut être activé via le clivage de la Caspase 11, ceci activant la GSDMD, induisant la libération d'alarmines et un efflux potassique responsables de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Cerqueira *et al.*, 2018) (Fig. 16).



**Figure 16 :** Représentation schématique montrant un lien entre l'activation de la Caspase 11 et l'activation de l'inflammasome NLRP3/Caspase 1 dans un modèle d'infection à *B. abortus* (Cerqueira *et al.*, 2018).

Pour terminer, de récents travaux ont montré un rôle de la GSDMD dans la sécrétion du mucus au niveau de l'intestin, rôle quasi analogue à celui de NLRP6 dans la régulation de la sécrétion de mucus (Gao *et al.*, 2021). Hypothétiquement, nous pourrions imaginer une corrélation entre NLRP6 et l'activation de la GSDMD au niveau de l'intestin.

Ces études montrent la complexité des mécanismes régissant la régulation des morts cellulaires dans un contexte physiopathologique donné. L'implication de la mort cellulaire par pyroptose dans des modèles d'exposition à la fumée de cigarette et à l'ozone n'a pour le moment jamais été étudiée.

Il existe des inhibiteurs de la GSDMD, comme le disulfiram par exemple, qui a été approuvé par la FDA en 2019 comme potentielle molécule utilisable dans des pathologies inflammatoires chez l'Homme. En agissant sur la formation des pores à la membrane, il diminue la libération de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que la mort cellulaire par pyroptose (Hu *et al.*, 2019). L'inhibition de la formation de pores membranaires par la Gasdermine D est très étudiée actuellement, notamment via des tests d'utilisation de « nanobodies » pour bloquer la formation des pores.



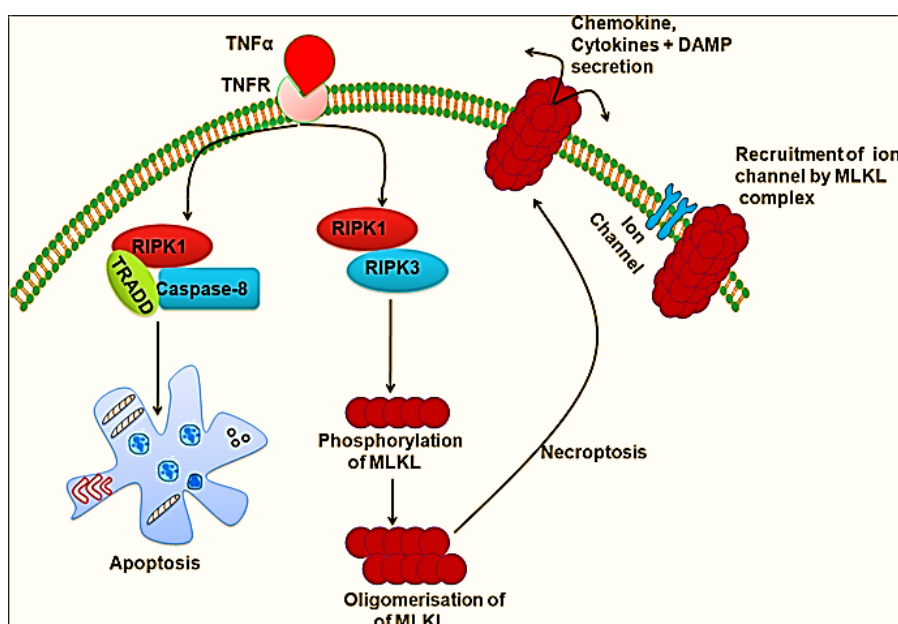
#### 4) La nécroptose

La nécroptose est une mort cellulaire programmée pro-inflammatoire, décrite comme étant une « nécrose régulée ». En effet, elle diffère de la nécrose par les mécanismes d'induction impliqués, ainsi que par les protéines caractéristiques qui la régissent.

Comme l'apoptose, la nécroptose peut être induite par des stimuli extracellulaires impliquant le Fas-L et son récepteur Fas-R, d'autres récepteurs de la famille des TNF-R, TLR-3/4 ainsi que des acides nucléiques intracellulaires (*Li et al., 2020 & Cabon L et al., 2013*).

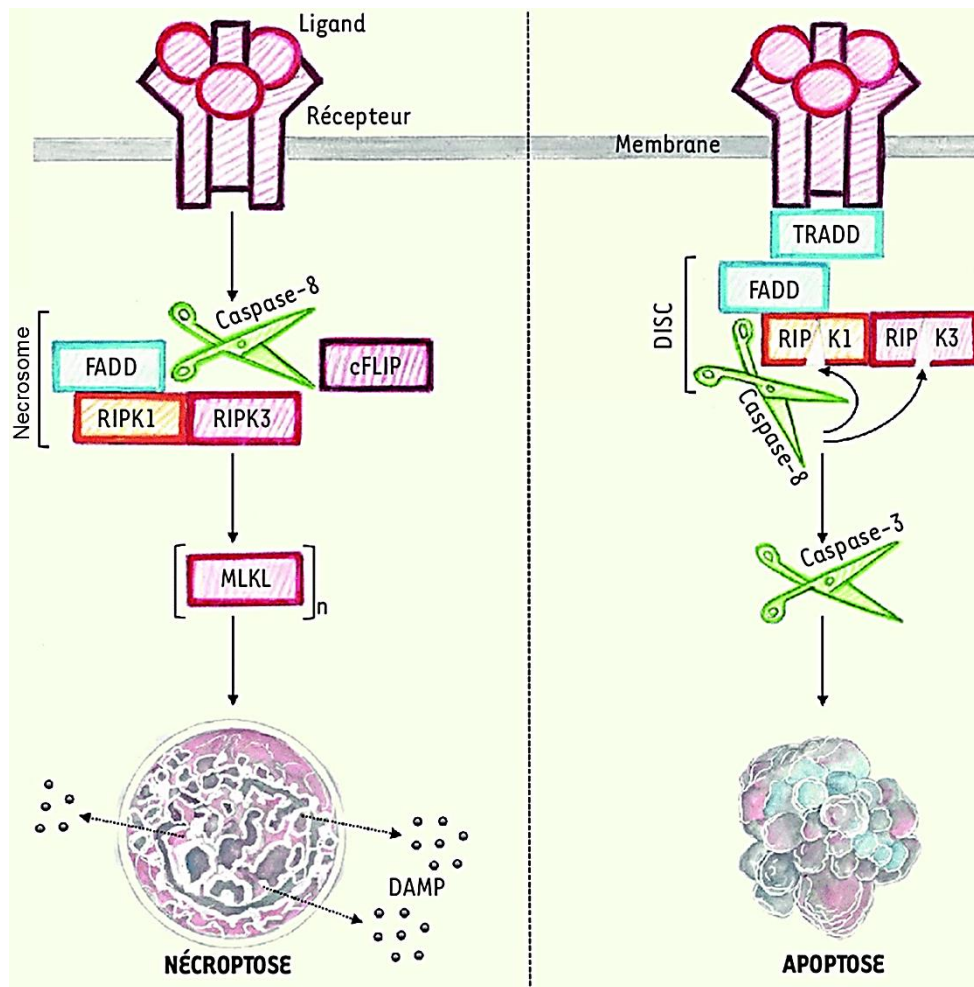
L'induction de la nécroptose se fait via la dé-ubiquitination de la protéine **RIPK1** (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) qui va ensuite recruter la protéine **RIPK3** (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3) pour former un hétérodimère.

S'ensuit le recrutement de RIPK3 libres et de la protéine **MLKL** (Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase), clé de la nécroptose. L'ensemble forme un complexe appelé nécrosome. La phosphorylation de plusieurs homodimères de **Phospho-MLKL** permet leur insertion dans la membrane plasmique afin de former des pores et permettant la libération du contenu cellulaire (**Fig. 17**).



**Figure 17 :** Schéma représentant la mort cellulaire par nécroptose (*Dhuriya and Sharma, 2018*).

Il est important de noter qu'il existe une balance entre apoptose et nécroptose qui a été démontrée dans un contexte de pathologies du foie. En effet, la voie de signalisation choisie préférentiellement, reposera sur activation ou non de la **Caspase-8**. Cette dernière, une fois activée, peut cliver RIPK1 et RIPK3 pour prévenir la formation du nécrosome et permettre l'induction de l'apoptose. En l'absence d'activation de la Caspase 8, la nécroptose sera favorisée (**Fig. 18**) (*Ornig et Lien., 2021 & Gautheron., 2017*).



**Figure 18 :** Schéma représentant la régulation entre apoptose et nécroptose. Induction de la nécroptose lorsque la Caspase-8 est inhibée (A). Induction de l'apoptose via l'activation de la Caspase-8 qui clive la Caspase-3 et inhibe en même temps RIPK1 et RIPK3, ne rendant pas possible la nécroptose (B). (Gautheron., 2017).

La nécroptose est impliquée dans l'initiation de l'inflammation provoquée par la fumée de cigarette (Pouwels *et al.*, 2015). De plus, de récents travaux ont montré l'induction des marqueurs de la nécroptose chez des patients BPCO, suggérant son implication dans l'aggravation de la pathologie (Lu Z *et al.*, 2021).

Comme dit précédemment (dans la partie présentant NLRP6), il a été montré que la nécroptose dans le modèle d'infection à *S.aureus*, est dépendante de NLRP6 (Caspase-1 et/ou 11) (Ghimire *et al.*, 2018). Au cours de mes travaux de thèse, il est apparu intéressant de regarder si la nécroptose était impliquée dans l'inflammation provoquée par l'ozone chez la souris et notamment de façon dépendante de l'inflammasome NLRP6 (Caspase-1 et/ou 11).

## F- Objectifs d'études et modèles d'expositions à la cigarette ou à l'ozone utilisés au laboratoire

Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'inflammation pulmonaire développés suite à l'exposition à des polluants, nous avons utilisé trois modèles de pathologies chez la souris durant mes travaux de thèse.

Concernant l'étude de l'inflammation pulmonaire développée en réponse à la fumée de cigarette, le premier modèle mis en place au laboratoire, repose sur une exposition sub-chronique de 6 semaines à raison de 12 cigarettes par jour. On l'appelle sub-chronique car il existe aussi des modèles dits chroniques de 12 semaines d'exposition à la fumée de cigarette qui conduisent au développement d'une BPCO expérimentale. A l'aide de ce modèle, nous avons étudié l'implication du récepteur NLRP3 uniquement.

Un second modèle a été mis en place, cette fois-ci avec une exposition aiguë à la fumée de cigarette sur 4 jours à raison de 12 cigarettes par jours également. Le phénotype d'inflammation dans ce modèle aigu mime l'inflammation que l'on peut observer chez un fumeur occasionnel ne présentant pas de pathologie. Une partie de mes travaux repose sur l'étude de l'implication du récepteur NLRP3 et de la Gasdermine D dans l'inflammation pulmonaire induite par une exposition aiguë à la fumée.

Le troisième modèle utilisé repose quant à lui sur l'étude des effets au niveau des poumons d'une exposition répétée de souris à l'ozone. L'exposition à l'ozone est aujourd'hui un sujet préoccupant, en effet, la pollution à l'ozone ne fait que croître dans notre environnement, les pathologies pulmonaires déjà existantes peuvent être fortement exacerbées. De plus, nous ne sommes pas à l'abri de l'apparition de pathologies pulmonaires directement induites par l'ozone, si les expositions sont récurrentes et de plus en plus fortes dans le futur. L'utilisation de ce modèle chronique d'exposition s'avère donc particulièrement intéressant car au bout de 6 semaines d'expositions à l'ozone 2 fois par semaines pendant 1h30 à raison de 1.5ppm, il y a mise en place d'un début d'emphysème et d'un début de fibrose pulmonaire, une légère production de mucus ainsi qu'un fort recrutement cellulaire de type neutrophiles, éosinophiles et lymphocytaires. S'ajoute à ce recrutement, beaucoup de mort cellulaire, faisant de ce modèle chronique un modèle mimant dans une certaine mesure la BPCO induite par la fumée de cigarette (*Triantaphyllopoulos et al., 2011*). Nous avons donc au cours de mes travaux de thèse choisi d'utiliser ce modèle expérimental afin d'étudier les mécanismes de la BPCO et mis en évidence l'implication du récepteur NLRP6 dans l'inflammation pulmonaire induite par l'ozone.

# RESULTATS

## A- Etude de l'implication du récepteur NLRP3 et de la GSDMD en réponse à la fumée de cigarette.

Dans cette partie nous avons étudié l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation pulmonaire induite par une exposition sub-chronique ou aigue à la fumée de cigarette. Ce modèle aigu nous permet d'étudier les effets de la cigarette lorsque la consommation est ponctuelle (*Nascimento et al., 2019 & Nascimento et al., 2020*). Nous nous sommes intéressés aux paramètres inflammatoires, c'est-à-dire au recrutement de cellules immunitaires, à la sécrétion de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires et aux paramètres de remodelage tissulaires dans les poumons et dans l'espace bronchoalvéolaire. Enfin, nous avons montré que l'activation de la Gasdermine D (GSDMD) dépend de NLRP3.

Les résultats ont montré chez les souris déficientes pour NLRP3 (*Nlrp3<sup>-/-</sup>*), des souris sauvages (WT) traitées avec le MCC950, un inhibiteur de la formation de l'inflammasome NLRP3, ou déficientes pour les Caspases 1 et 11 (*Caspase-1/11<sup>-/-</sup>*), une réduction importante de l'inflammation pulmonaire avec une diminution de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans l'espace bronchoalvéolaire. La sécrétion de d'IL-1 $\beta$  est décrite dans de multiples pathologies comme étant dépendante de l'activation de la GSDMD. Nous avons mis en évidence pour la première fois dans un modèle aigu d'exposition à la fumée de cigarette, l'implication de NLRP3 et de la GSDMD au niveau des cellules épithéliales bronchiques et dans les macrophages recrutés dans l'espace bronchoalvéolaire. De plus, les résultats obtenus avec les souris déficientes pour la GSDMD (*Gsdmd<sup>-/-</sup>*) confirment que cette protéine joue un rôle clé dans l'inflammation pulmonaire induite par une exposition aigue à la fumée de cigarette puisqu'elles présentent une inflammation diminuée après exposition.

# *Cigarette smoke-induced Gasdermin D activation in bronchoalveolar macrophages and bronchial epithelial cells dependently on NLRP3*

**Sarah Huot-Marchand**<sup>1</sup>, Mégane Nascimento<sup>1</sup>, Elodie Culerier<sup>1</sup>, Mélissa Bourenane<sup>1</sup>, Florence Savigny<sup>1</sup>, Corinne Panek<sup>1</sup>, Cindy Serdjebi<sup>2</sup>, Marc Le Bert<sup>1</sup>, Valérie F. J. Quesniaux<sup>1</sup>, Bernhard Ryffel<sup>1</sup>, Petr Broz<sup>3</sup>, Nicolas Riteau<sup>1</sup>, Aurélie Gombault<sup>1</sup>, Isabelle Couillin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Orleans and CNRS, INEM-UMR7355, Orleans, France

<sup>2</sup>Biocellvia, Marseille, France

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Lausanne, 1066 Epalinges, Switzerland

**Keywords: Cigarette smoke, NLRP3 inflammasome, Gasdermin D, Lung, Mice**

**Running Title: NLRP3 and Gasdermin D in acute pulmonary inflammation**

Address of correspondence to Isabelle Couillin and Nicolas Riteau, Molecular and Experimental Immunology and Neurogenetics, UMR 7355, 3B, rue de la Férollerie, 45071 Orleans, France.

Phone: 0033 238 25 5502; 0033 238 25 54 43

E-mail: isabelle.couillin@cnr-orleans.fr; nicolas.riteau@cnr-orleans.fr

Grant support by the « Agence nationale de Recherche » (ANR AAPG2019 CES15 Smoke6) and the “Fondation pour la Recherche Médicale” (EQU202003010405) and the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Orleans.

## ABSTRACT

Chronic pulmonary inflammation and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are major health issues largely due to air pollution and cigarette smoke (CS) exposure. The role of the innate receptor NLRP3 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing protein 3) orchestrating inflammation through formation of an inflammasome complex in CS-induced inflammation or COPD remains controversial. Using acute and subchronic CS exposure models, we found that *Nlrp3*-deficient mice or wild-type mice treated with the NLRP3 inhibitor MCC950 presented an important reduction of inflammatory cells recruited into the bronchoalveolar space and of pulmonary inflammation with decreased chemokines and cytokines production, in particular IL-1 $\beta$  demonstrating the key role of NLRP3. Furthermore, mice deficient for *Caspase-1/Caspase-11* presented also decreased inflammation parameters, suggesting a role for the NLRP3 inflammasome. Importantly we showed that acute CS-exposure promotes NLRP3-dependent cleavage of Gasdermin D in macrophages present in the bronchoalveolar space and in bronchial airway epithelial cells. Finally, *Gsdmd*-deficiency reduced acute CS-induced lung and bronchoalveolar space inflammation and IL-1 $\beta$  secretion. Thus, we demonstrated in our model that NLRP3 and Gasdermin D are key players in CS-induced pulmonary inflammation and IL-1 $\beta$  release potentially through Gasdermin D forming-pore and/or pyroptotic cell death.

## INTRODUCTION

Among lung inflammatory diseases, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) represents one of the most important public health issue. This illness is now the third leading cause of death in the world as predicted by the World Health Organization (WHO). COPD is characterized by chronic inflammation and mucus hypersecretion responsible for bronchial obstruction and that may lead to alveolar wall destruction and impaired lung functions (*Barnes et al., 2014 & Barnes et al., 2015*). Cigarette smoking (CS) is the major cause of COPD including emphysema with more than 95% of cases in industrialized countries (*Barnes et al., 2015*). Inflammation can persist when smoking has been stopped and still be present even decades later. Frequent exacerbations of lung inflammation occur during respiratory infections which are characterized by impaired immune response to invading pathogens (*Wedzicha et al., 2014*). Current treatments have limited efficiency (*Barnes et al., 2013*) and thus research efforts to better understand the cellular and molecular mechanisms involved in airway inflammation leading to the pathophysiology of COPD have become a priority. COPD patients display a significant increase of airway recruited alveolar macrophages and neutrophils, which correlates with the disease severity (*Barnes et al., 2014 & Barnes et al., 2015 & Sethi et al., 2002*).

Inflammasomes are cytoplasmic multiprotein complexes that orchestrate diverse functions during homeostasis and inflammation (*Broderick et al., 2015*). Among the various inflammasomes, NLRP3 inflammasome demonstrated the most significant clinical relevance to date (*Zoete et al., 2014*). The canonical NLRP3 inflammasome consists of the sensory protein NLRP3, the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), and the effector protein Caspase-1 (*Christgen et al., 2020 & Martinon et al., 2006*). NLRP3 activation requires a first signal resulting in transcriptional and post-transcriptional priming of NLRP3 and to pro-IL-1  $\beta$ , and pro-IL-18 expression; and a second signal to promote NLRP3 inflammasome complex formation and subsequent Caspase-1 activation, and pro-IL-1  $\beta$  and/or pro-IL-18 maturation (*Broderick et al., 2015*).

The role of the NLRP3 inflammasome in CS-induced pulmonary inflammation and CS-resulting COPD is unclear. NLRP3 overexpression was reported in lungs of COPD patients and correlated with airway obstruction (*Faner et al., 2016*). *In vivo* studies reported increased NLRP3 and pro-IL-1 $\beta$  protein expression upon CS exposure in adult mice (*Mahalanobish et al., 2020*) or in offspring after maternal



CS exposure (*Wang et al., 2020*). Mice exposure to cigarette smoke condensate (CSC) also activates NLRP3 inflammasome (*Mehta et al., 2020*). In contrast, CS was shown to repress NLRP3 inflammasome-dependent innate immune response to asbestos in mice (*Morris et al., 2015*). In addition, cigarette smoke extract (CSE) or CSC induce activation of NLRP3 inflammasome in bronchial and alveolar epithelial cells and/or monocytic cells in *in vitro* experiments (*Rumora et al., 2021 & Nachimias et al., 2019 & Mehta et al., 2020*). Finally, CSE was shown to inhibit the NLRP3 inflammasome and to lead to Caspase-1 activation via TLR4-TRIF-Caspase-8 axis in human macrophages (*Brucetta et al., 2020*).

Inflammasome-dependent activation of Caspase-1 also leads to Gasdermin D (GSDMD) protein cleavage thereby releasing its N-terminal domain, which forms pores in plasma and organellar membranes. GSDMD-N pore-forming protein was first described as the executor of pyroptosis, a programmed cell death dependent on inflammasome activation and as a part of the host innate immune defense allowing to kill bacteria-infected cells and restrict pathogen infection (*Demarco et al., 2020*). Pyroptosis cell death leads to the release of pro-inflammatory cytokines and endogenous danger signals that amplify inflammation (*Broz et al., 2015 & Aglitti et al., 2017 & Broz et al., 2020*). On the other hand, GSDMD-mediated pyroptosis can be induced directly by Caspase-8 or by the noncanonical inflammasome, via Caspase-11-dependent cleavage (*Shi et al., 2015*). Besides macrophages, pyroptosis was also detected in neutrophils upon activation of non-canonical inflammasome leading to neutrophil extracellular trap (NET) formation dependent on GSDMD and Caspase-11 (*Chen et al., 2018*), and in tissue cells in particular airway epithelial cells, exacerbating airway inflammation (*Zhuang et al., 2020*).

Importantly, GSDMD-forming pores at the plasma membrane were recently identified as the most important mechanism to explain IL-1 $\beta$  secretion, taking into account that this cytokine lacks a signal sequence preventing classical secretion through the endoplasmic reticulum/Golgi compartment (*Heilig et al., 2018*). GSDMD pores were shown to be selective channels for cytokine release and ion fluxes, permitting passage of small molecules up to 25-50 kDa in particular of mature IL-1 $\beta$  and IL-18, independently of cell lysis, whereas larger proteins, such as the heterotetrameric Caspase-1 p10/p20 (60 kDa), are released after lysis of pyroptotic macrophages (*Ruhl et al., 2022*). Interestingly, calcium influx through GSDMD pores promotes membrane repair and epithelial cell survival, highlighting that

GSDMD activation may result in different fate (*Ruhl et al., 2022 & ruhl et al., 2018*).

The NLRP3/Caspase-1 GSDMD pathway was shown to be involved in the induction of human airway epithelial cell pyroptosis by CSE or nicotine, and associated with COPD progression (*Zhang et al., 2021 & Mo et al., 2022*). However, whether GSDMD activation also contributes to CS-mediated pulmonary inflammation and/or COPD was poorly studied with mostly *in vitro* data and remains to be elucidated.

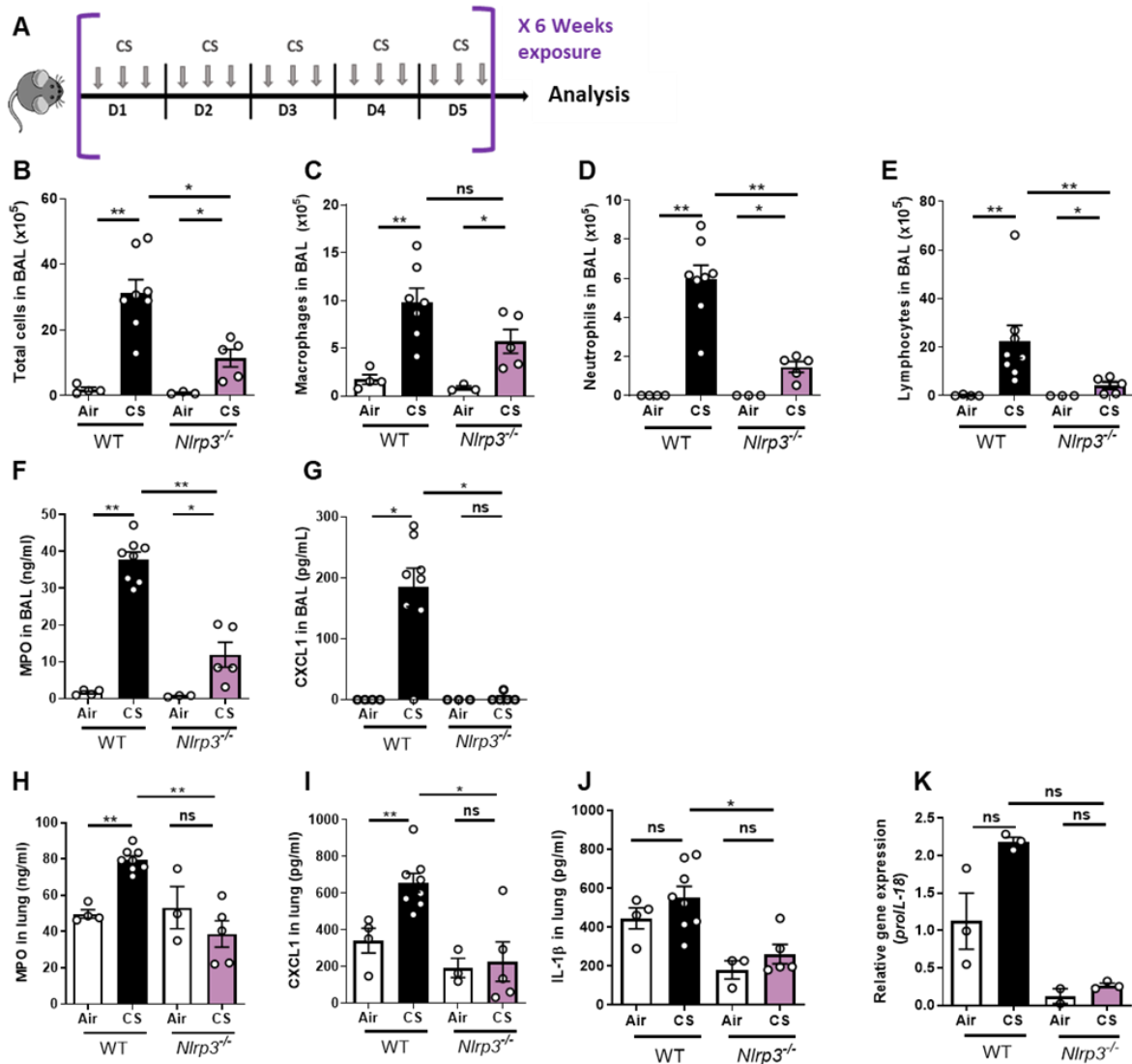
We here addressed the involvement of the NLRP3 inflammasome and Gasdermin D in pulmonary cell influx and cytokine secretion upon acute or subchronic CS exposure.

Using an acute murine model of CS exposure which could mimic exacerbation phases of COPD or pulmonary diseases, already used to describe recent papers (*Nascimento et al., 2019 & Nascimento et al., 2020*), we showed that *Nlrp3*- or *Caspase-1/11*-deficiency or pharmacological treatment with the NLRP3 inhibitor MCC950 strongly reduced pulmonary inflammation and remodeling. Importantly, NLRP3 depletion reduced IL-1 $\beta$  levels in the bronchoalveolar space. Due to the pivotal role of IL-1 $\beta$  release in multiple inflammatory diseases, we hypothesized that GSDMD-forming pores contribute to CS-induced pulmonary inflammation. We showed for the first time that mouse acute CS exposure induces GSDMD activation in lung tissue and macrophages recruited into the bronchoalveolar space, through a NLRP3 dependent manner. In addition, using *Gsdmd*-deficient mice, we demonstrated that GSDMD is a key player in acute CS-induced lung inflammation.

## RESULTS

### *Nlrp3* deficiency dampens pulmonary inflammation and remodeling in response to cigarette smoke exposure

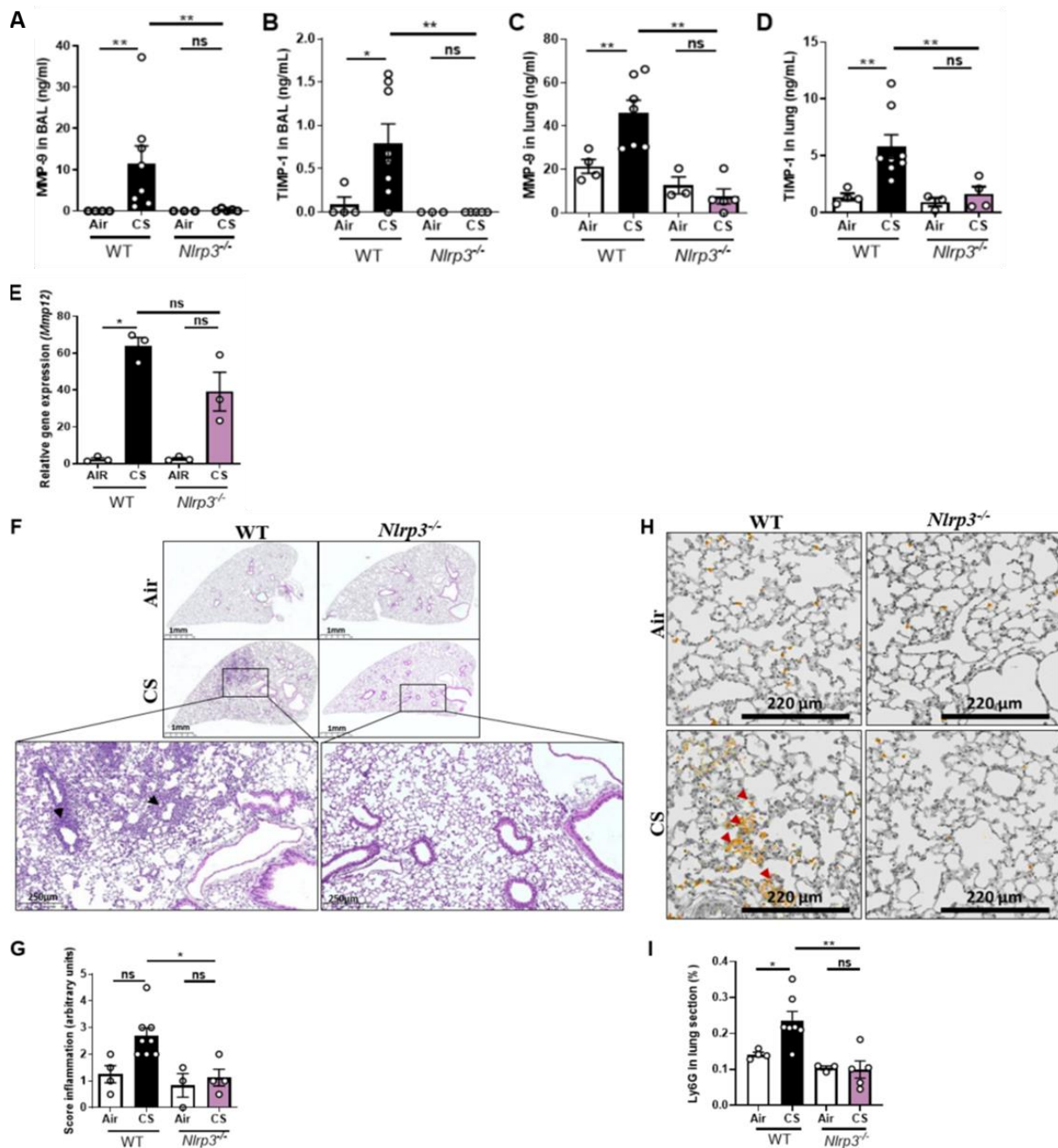
Since the role of the NLRP3 inflammasome in cigarette smoke (CS)-induced pulmonary inflammation is not well-established *in vivo*, we analyzed the impact of *Nlrp3* deficiency using first a subchronic models of mouse CS-exposure during 6 weeks which leads to pulmonary inflammation, in comparison to chronic model of 12 weeks often used to induce experimental COPD in mice. Wild-type (WT) and *Nlrp3*-deficient (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) mice were exposed to CS three times a day, five days a week for six weeks (**Fig. 1A**). As compared to unexposed (Air) mice, subchronically CS-exposed WT mice presented increased numbers of bronchoalveolar lavage (BAL) cells (**Fig. 1B**), in particular macrophages (**Fig. 1C**), neutrophils (**Fig. 1D**) and lymphocytes (**Fig. 1E**). Importantly, neutrophils and lymphocytes recruitment into the BAL was significantly attenuated in CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice. Neutrophils play a major role in the pathogenesis developed in response to CS exposure (*Balamayooran et al., 2012* & *Morisette et al., 2014*). As a marker of recruited neutrophils, BAL levels of myeloperoxidase (MPO) (**Fig. 1F**), an enzyme presents in neutrophil granules, and of the neutrophilic chemokine CXCL1 (**Fig. 1G**) were elevated in CS-exposed WT mice and significantly decreased in CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice. In lung homogenates MPO (**Fig. 1H**) and CXCL1 (**Fig. 1I**) were also significantly reduced in CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice compared to CS-exposed WT mice. In addition, we observed significantly reduction of IL-1 $\beta$  protein (**Fig. 1J**) and *proll-18* mRNA (**Fig. 1K**) levels in the lungs of CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice compared to CS-exposed WT mice.



**Figure 1. *Nlrp3* deficiency impairs inflammation to subchronic cigarette smoke (CS) exposure in mice.** WT and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were exposed to CS or air during 6 weeks (A). CS exposure led to significant decrease counts of total cells (B), macrophages (C), neutrophils (D) and lymphocytes (E) into BAL of *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice compared to exposed WT mice. Levels of myeloperoxidase (MPO) (F), CXCL1 (G) in BAL, and MPO (H), CXCL1 (I) and IL-1 $\beta$  (J) in lung were reduced in *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice exposed to CS compared to CS WT mice. The *proIL-18* mRNA expression (K) was reduced in CS *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice as compared to exposed WT mice. Data are representative of one experiment and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 6-9 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, ns non-significant, using a Mann Whitney test).

We next analyzed the balance between expression of remodeling proteases involved in the progression to COPD and their inhibitors. We focused on matrix metalloproteinase (MMP-9), a gelatinase produced by alveolar macrophages and neutrophils that degrades extracellular matrix proteins

and promotes neutrophil chemotaxis, MMP-12 an elastase mainly produced by alveolar macrophages that contributes to alveolar damages (*Chukowry et al., 2021*) and their inhibitor tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1). MMP-9 and TIMP-1 protein levels (**Fig. 2A and B**) in BAL and in lungs (**Fig. 2C and D**) were significantly decreased in subchronically CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice as compared to WT mice. *Mmp-12* mRNA levels in lungs (**Fig. 2E**) were reduced in CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice as compared to WT mice. Further, lung microsections and histology analysis showed increased cell recruitment and inflammation in lung tissue of CS-exposed WT mice compared to Air-exposed mice, which were attenuated in CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 2F and G**). These findings were confirmed by an increase in Ly6G labelling in lungs of CS-exposed WT mice (**Fig. 2H and I**). In lungs of *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice, however, CS exposure did not affect the neutrophil count compared to Air-exposed deficient mice.



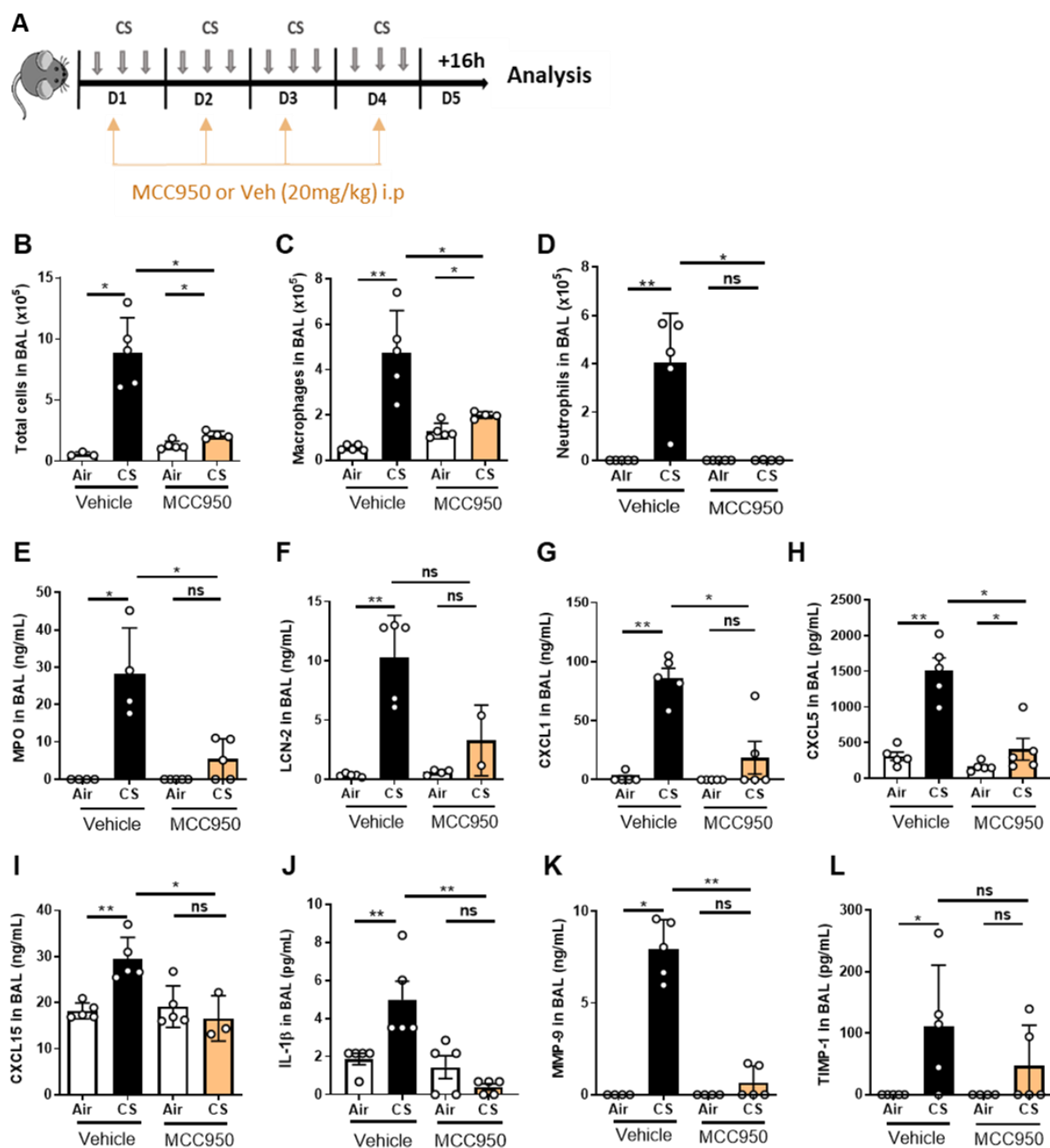
**Figure 2. *Nlrp3* deficiency decreases remodeling factor expression and lung tissue inflammation upon subchronic cigarette smoke (CS) exposure.** WT and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were exposed to CS or air during 6 weeks and protein levels of remodeling factor such as MMP-9 (A), TIMP-1 (B) in BAL, and MMP-9 (C), TIMP-1 (D) in lung tissue were measured by ELISA whereas lung MMP-12 mRNA expression was measured by quantitative RT-PCR (E). All these parameters were decreased in response to CS exposure in *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice as compared to exposed WT mice. Histological analysis of pulmonary inflammation and cell recruitment were evaluated from histology sections (F) and inflammation score were determined (G). Ly6G immunostaining was performed on WT and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> lung sections (H). Percentage of Ly6G positive area per tissue section (I). Data are representative of five experiments for A-G and one experiment for H and I, and are expressed as mean values ± SEM (n= 4-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, ns non-significant, using a Mann Whitney test).

We next performed acute CS exposures during 4 days (**Fig. S1A**) that confirmed reduced inflammation in *Nlrp3<sup>-/-</sup>* in comparison to WT mice. Total cells (**Fig. S1B**), macrophages (**Fig. S1C**) and neutrophils (**Fig. S1D**) numbers in BAL were significantly attenuated in *Nlrp3<sup>-/-</sup>* mice acutely exposed to CS as compared to CS-exposed WT mice. BAL levels of MPO (**Fig. S1E**), CXCL1 (**Fig. S1F**), IL-1 $\beta$  (**Fig. S1G**), as well as MMP-9 (**Fig. S1H**) and TIMP-1 (**Fig. S1I**) were significantly reduced in CS-exposed *Nlrp3<sup>-/-</sup>* mice compared to CS-exposed WT mice. We also observed significant reduction of CXCL1 (**Fig.S1J**), IL-1 $\beta$  (**Fig. S1K**) in lungs of CS-exposed *Nlrp3<sup>-/-</sup>* mice. Finally, MMP-9 (**Fig. S1L**) and TIMP-1 (**Fig. S1M**) levels in lungs of CS-exposed *Nlrp3<sup>-/-</sup>* mice were non significantly reduced as compared to WT mice. Infiltrating cells were not detected on histology slides after only 4 days of CS (data not shown). Our results demonstrate that the NLRP3 sensor is important for pulmonary inflammation and remodeling in response to CS exposure. Since our data show the role of NLRP3 in pulmonary inflammation induced by both acute and subchronic CS-exposure in mice, we next used the acute exposure model as previously (*Nascimento et al., 2019 & Nascimento et al., 2020*) in order to investigate the mechanism of NLRP3-mediated lung inflammation.

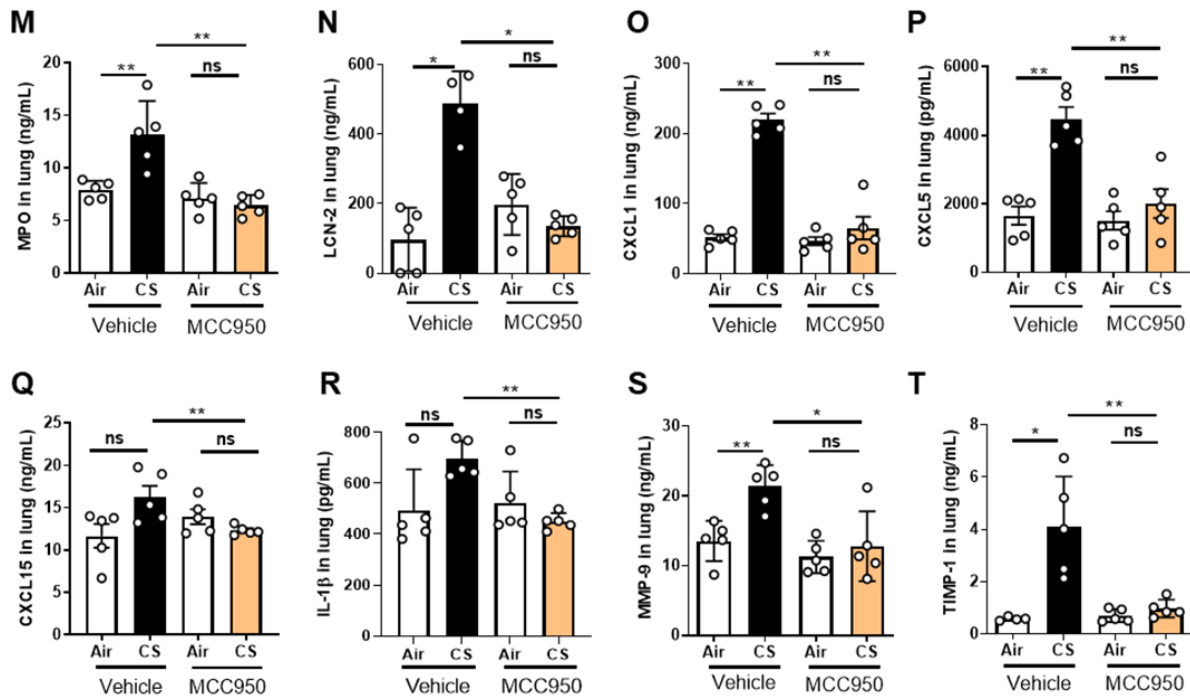
### Pharmacological MCC950 treatment inhibits lung inflammation induced by cigarette smoke

To confirm NLRP3 implication as a sensor in CS-induced pulmonary inflammation, we treated mice intraperitoneally with MCC950, a potent specific inhibitor of NLRP3 inflammasome activation (*Coll et al., 2015 & Coll et al., 2019*). MCC950 is active in different NLRP3-dependent inflammatory mouse models, impairing *in vivo* IL-1 $\beta$  production and attenuating the severity in inflammatory disease models (*Coll et al., 2015*) WT mice exposed to CS during 4 days were treated daily with MCC950 or vehicle (20mg/kg) (**Fig. 3A**). BAL total cells (**Fig. 3B**), macrophages (**Fig. 3C**) and neutrophils (**Fig. 3D**) were significantly reduced in MCC950-treated CS-exposed mice as compared to control group. Moreover, BAL levels of MPO levels (**Fig. 3E**), of the neutrophil gelatinase-associated lipocalin (LCN)-2 (**Fig. 3F**), a protein expressed by neutrophils and involved in innate immunity, of the neutrophilic chemokine CXCL1 (**Fig. 3G**) and also of CXCL5 (**Fig. 3H**) and CXCL15 (**Fig. 3I**), two neutrophilic chemokines mainly produced by epithelial cells, were significantly reduced in BAL of MCC950-treated

CS-exposed mice compared to CS-exposed WT mice. Importantly, BAL levels of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  (**Fig. 3J**) was significantly decreased in MCC950-treated CS-exposed mice. Levels of MMP-9 (**Fig. 3K**) and TIMP-1 (**Fig. 3L**) were significantly and non-significant reduced respectively in BAL of MCC950-treated CS-exposed mice. Furthermore, in lung tissues, levels of MPO, LCN-2, CXCL1, CXCL5, CXCL15, IL-1 $\beta$ , MMP-9 and TIMP-1 (**Fig. 3M to T**) were significantly decreased in MCC950-treated CS-exposed compared to CS-exposed WT mice.







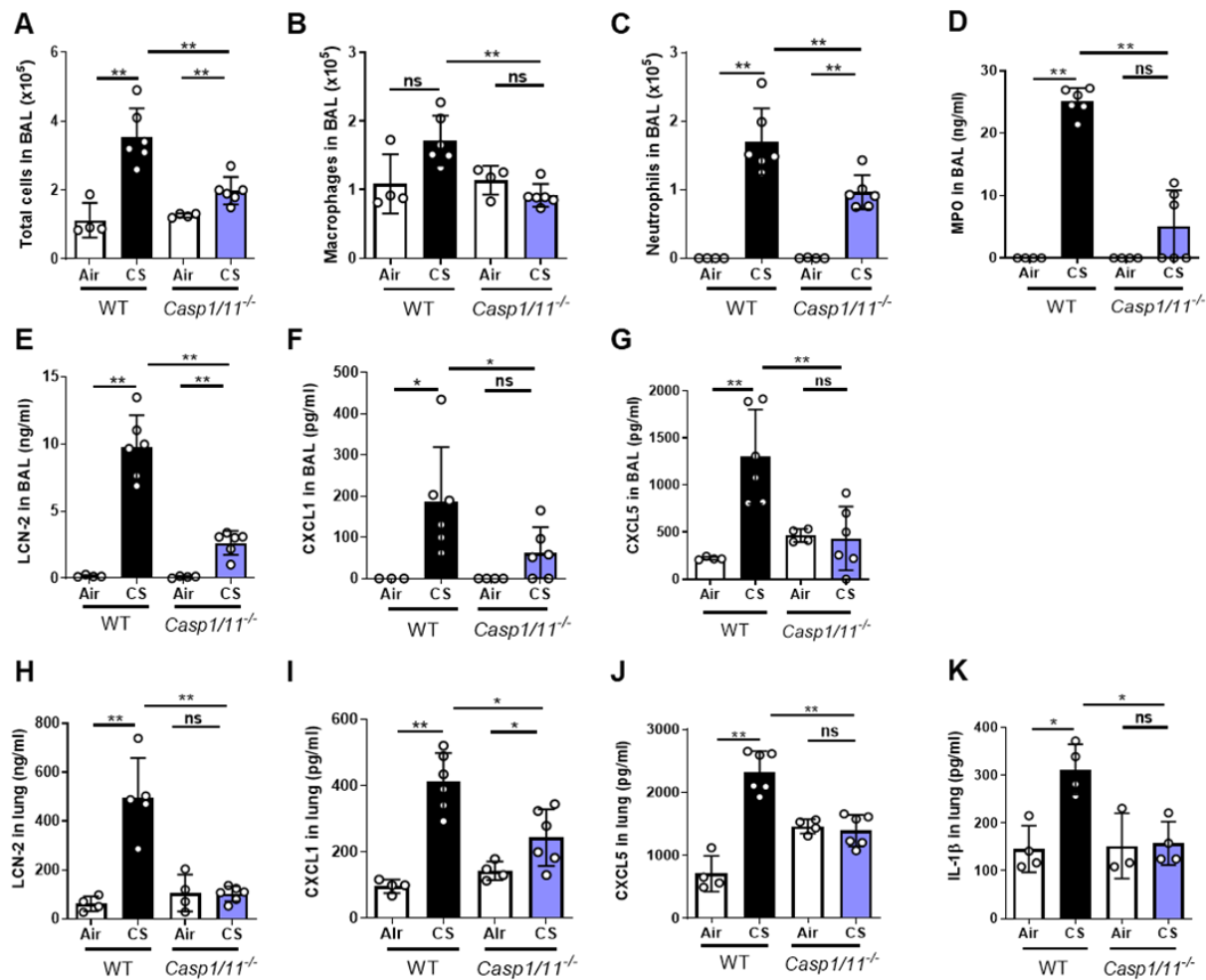
**Figure 3. The NLRP3 inhibitor MCC950 impairs pulmonary inflammation upon acute cigarette smoke (CS) exposure.** WT mice, treated or not with MCC950 (20mg/kg i.p. daily) were exposed to CS or air during 4 days (A). CS exposure led to significant decrease of total cells (B), macrophages (C), neutrophils (D) into BAL of MCC950 treated mice compared to untreated exposed WT mice. Myeloperoxidase (MPO) (E), lipocaline 2 (LCN-2) (F), CXCL1 (G), CXCL5 (H) and CXCL15 (I) and IL-1β (J), MMP-9 (K) and TIMP-1 (L) levels were measured in BAL by ELISA. All these parameters were decreased in response to CS exposure in MCC950-treated mice as compared to untreated exposed WT mice. Lung levels of MPO (M), lipocaline 2 (LCN-2) (N), CXCL1 (O), CXCL5 (P), CXCL15 (Q), IL-1β (R), MMP-9 (S) and TIMP-1 (T) were significantly decreased in MCC950 treated CS-exposed mice as compared to exposed WT mice. Data are representative of two experiments and are expressed as mean values ± SEM (n= 4-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, ns non-significant, using a Mann Whitney test).

Thus, results with NLRP3 pharmacological inhibition confirmed those obtained with NLRP3 gene deletion, showing that this receptor is involved in acute inflammation and remodeling induced by CS in mice.

### Caspase-1 and/or Caspase 11 play a key role in acute CS-induced pulmonary inflammation

In order to investigate the role of the canonical and/or non-canonical inflammasome in pulmonary inflammation to CS, we used mice double deficient for Caspase-1 and Caspase-11 (*Caspase-1/11*<sup>-/-</sup>). Acute CS-exposure led to reduced inflammation in *Caspase-1/11*<sup>-/-</sup> mice in comparison to WT

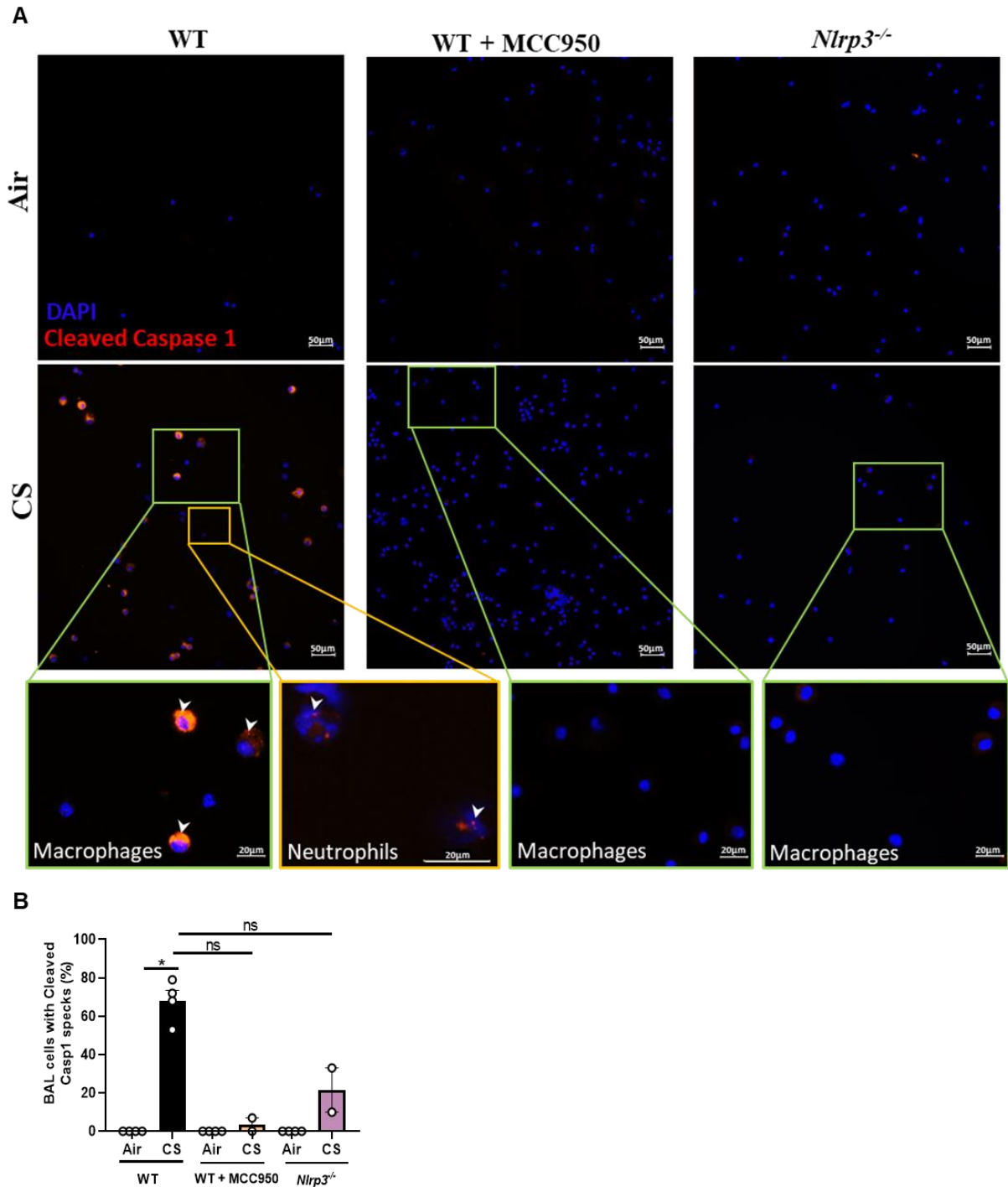
mice with a strong decrease in BAL total cells, macrophages and neutrophils (Fig. 4A, B and C). BAL levels of MPO (Fig. 4D) and LCN-2 (Fig. 4E), CXCL1 (Fig. 4F) and CXCL5 (Fig. 4G) were significantly decreased in acutely CS-exposed *Caspase-1/11*<sup>-/-</sup> mice in comparison to WT. In lungs levels of LCN-2, CXCL1 and CXCL5 (Fig. 4H to J) were also significantly reduced in *Caspase-1/11*<sup>-/-</sup> CS-exposed mice compared to WT CS-exposed mice. Importantly, IL-1 $\beta$  levels (Fig. 4K) were significantly reduced in the lungs of *Caspase-1/11*<sup>-/-</sup> mice.



**Figure 4.** *Caspase1/11*-deficient mice (*caspase1/11*<sup>-/-</sup>) have reduced pulmonary inflammation after acute cigarette smoke (CS) exposure. WT and *caspase1/11*<sup>-/-</sup> mice were exposed to CS or air during 4 days. Total cells (A), macrophages (B) and neutrophils (C) counts and MPO levels (D) in BAL are shown. Lipocaline 2 (LCN-2) (E), CXCL1 (F), CXCL5 (G) levels were reduced in BAL of *caspase1/11*<sup>-/-</sup> CS-exposed mice. LCN-2 (H), CXCL1 (I), CXCL5 (J) and IL-1 $\beta$  (K). were also significantly reduced in lungs of *caspase1/11*<sup>-/-</sup> CS-exposed mice compared to CS-exposed WT mice. Data are representative of four experiments and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 4-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, ns non-significant, using a Mann Whitney test).

These results indicate that either a canonical NLRP3/Caspase-1 inflammasome and/or the non-canonical inflammasome pathway (i.e. Caspase-11 and NLRP3/Caspase-1 inflammasome) are involved in acute CS-induced lung inflammation.

In order to determine if acute CS exposure induces activation of the canonical inflammasome in alveolar macrophages and/or neutrophils recruited into the BAL, we probed for Caspase-1 cleavage. Immunostaining with an antibody specific for the cleaved form (Asp 296) of murine Caspase-1 showed that BAL recruited macrophages of acute CS-exposed mice, identified by their large uni-lobulated DAPI-stained nucleus, featured high levels of active processed Caspase-1 in comparison to BAL cells from air-exposed mice (**Fig. 5A and B**). In addition, BAL recruited neutrophils, identified by their tri-lobulated nucleus and small size compared to macrophages presented a weak expression of cleaved Caspase-1. In contrast, cleaved Caspase-1 was almost not detectable in BAL alveolar macrophages from MCC950-treated acute CS-exposed WT mice or from CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice (**Fig.5A and B**).

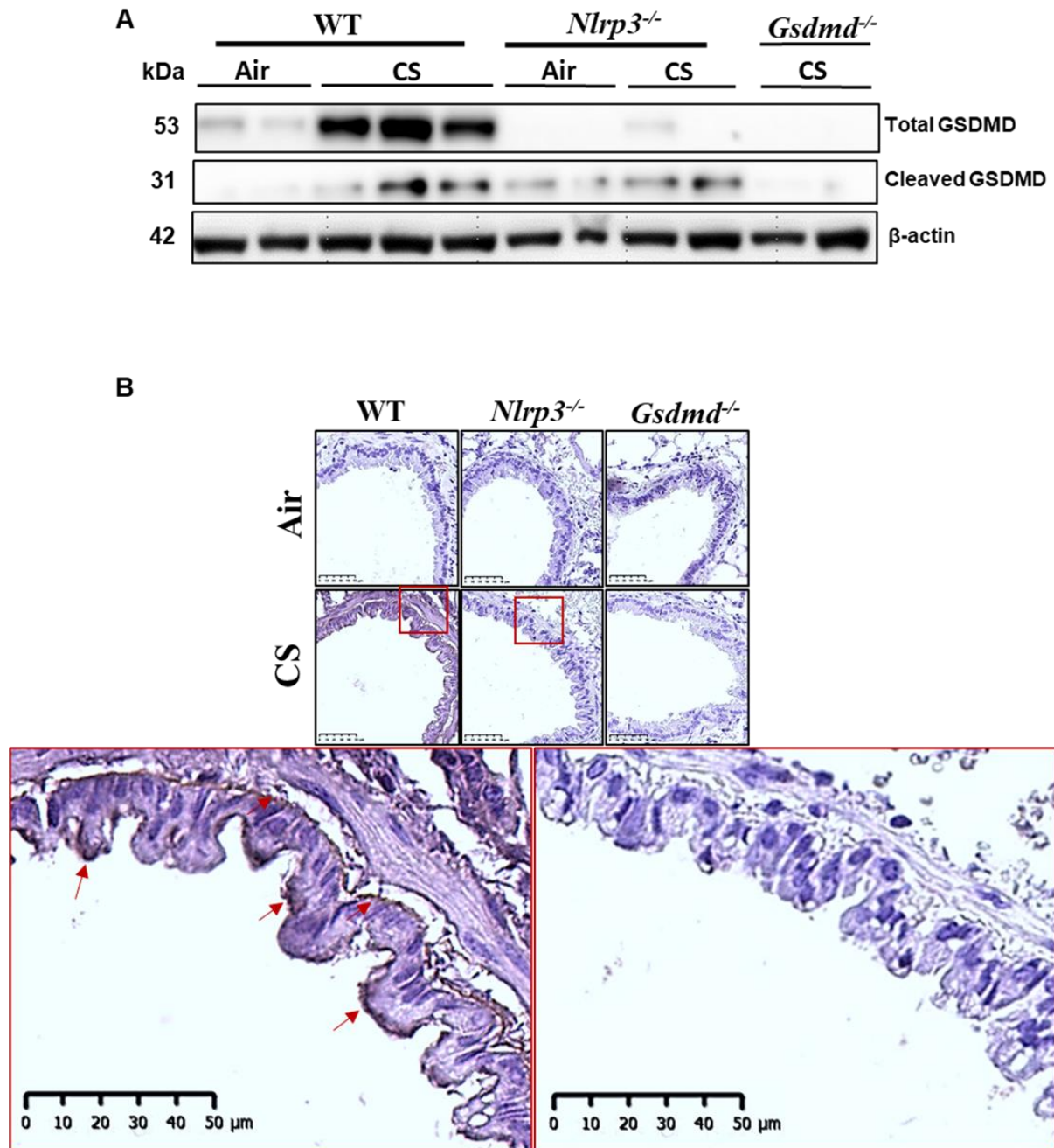


**Figure 5. Cigarette Smoke (CS) exposure promotes caspase-1 cleavage in BAL macrophages and neutrophils in an NLRP3-dependent manner.** Cleaved caspase-1 immunostaining on BAL cells collected after Air or CS exposure of WT, MCC950 WT treated mice and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice. Cleaved caspase-1 is shown in red and nucleus in blue (DAPI) (A). BAL cells fluorescence intensity quantification (B). Data are representative of three experiments. Bar graph is expressed as mean ± SEM (n = 2–4 mice per group, \*p < 0.05, ns non-significant, using a Mann Whitney test).

These results indicate that acute CS-exposure promotes NLRP3-dependent Caspase-1 activation in macrophages and recruited neutrophils of the bronchoalveolar space.

### **CS exposure promotes NLRP3-dependent activation of Gasdermin D in lung tissue**

To better understand the mechanisms of inflammation in response to acute CS-exposure, we investigated whether NLRP3 activation leads to Gasdermin D (GSDMD) cleavage and possibly to IL-1 $\beta$  secretion or pyroptosis, an immunogenic cell death (ICD) associated with NLRP3 activation. GSDMD is a 53.2 kDa protein that is cleaved by Caspase-1 and/or Caspase-11 upon NLRP3 activation, resulting in the generation of the GSDMD-N p31 fragment. The active GSDMD-N forms pores in the plasma membrane, allowing small cytokine release such as mature IL-1 $\beta$  and/or ion fluxes that may lead to cell swelling and to pyroptosis. We first analysed the level of the p53 full-length GSDMD and/or the GSDMD-N p31 active form in the lungs of acute CS-exposed mice by western blot. We observed that acute CS exposure increased lung tissue expression of the pro-GSDMD p53 in WT mice that was strongly reduced in acutely CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice (**Fig.6A and Fig.S2**). Importantly, using an antibody specifically recognizing the cleaved form of GSDMD at its N-terminal domain, we show that acute CS-exposure induced lung expression of the cleaved GSDMD p31 protein in WT mice but less importantly in lungs of *Nlrp3*<sup>-/-</sup> acute CS-exposed mice (**Fig. 6A and Fig. S2**). Furthermore, lung section immunostaining analysis indicates that acute CS induced expression of the cleaved GSDMD p31 in bronchial airway epithelial cells that was reduced in lung of *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice and absent in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice as compared to WT mice (**Fig. 6B**). However, we did not observe cleaved GSDMD expression in lung alveolar regions or in infiltrating cells that were not detectable on histology slides after only 4 days of CS exposure.

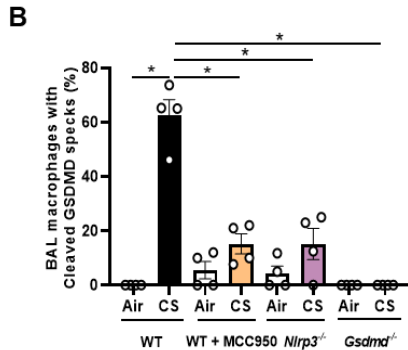
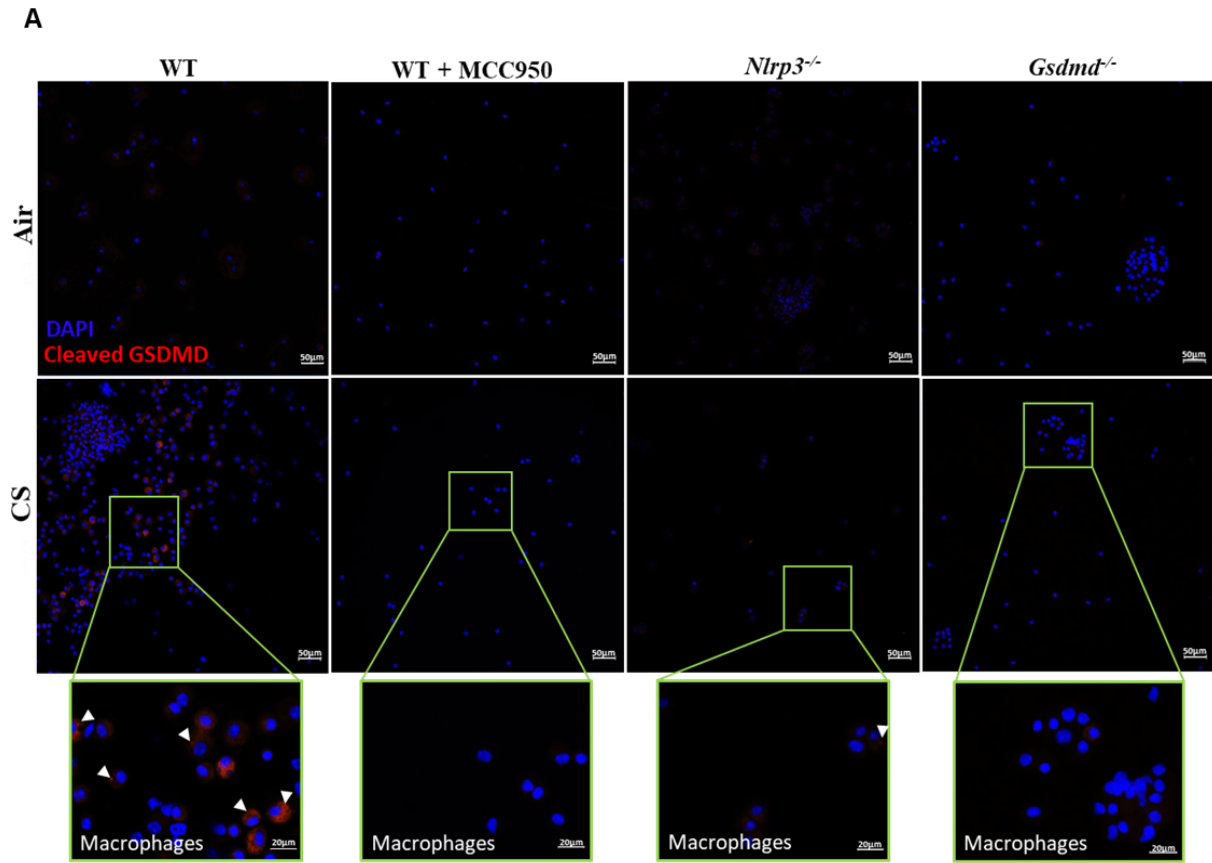


**Figure 6. Cigarette Smoke (CS) exposure induces GSDMD cleavage in bronchial epithelial cells in an NLRP3-dependent manner.** Immunoblot for total and cleaved GSDMD proteins in lung homogenates of air or CS-exposed mice of WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> or *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice (A). Cleaved GSDMD immunostaining was performed on lung sections of air or CS-exposed WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice (B). Data are representative of three experiments. Bar graph are expressed  $\pm$  SEM (n =2–4 mice per group).

These results demonstrate that acute CS exposure induces NLRP3 activation which is involved in GSDMD protein cleavage in bronchial airway epithelial cells.

### Mouse CS exposure induces NLRP3-dependent activation of GSDMD in bronchoalveolar space macrophages

We next determined whether GSDMD activation occurs in BAL cells upon CS exposure by immunostaining using the specific antibody that recognizes the cleaved N-terminal domain of GSDMD. We observed that airway macrophages, identified by their large unit-lobulated DAPI-stained nucleus, show cleaved GSDMD in response to acute CS-exposure of WT mice but not in recruited neutrophils (**Fig. 7A and B**). Importantly, cleaved GSDMD levels in macrophages were reduced in CS-exposed WT mice treated with MCC950 and importantly reduced in CS-exposed *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 7A and B**).



**Figure 7. Cigarette Smoke (CS) exposure promotes GSDMD expression and cleavage in BAL alveolar macrophages dependently of NLRP3.** Cleaved GSDMD immunostaining on BAL cells collected after air or CS exposure in WT, MCC950-treated WT mice, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice. Cleaved GSDMD is shown in red and nucleus in blue (DAPI) (A). Airway macrophages fluorescence intensity quantification (B). Data are representative of three experiments. Bar graph is expressed as mean  $\pm$  SEM (n =2–4 mice per group, \*p < 0.05 using a Mann Whitney test).

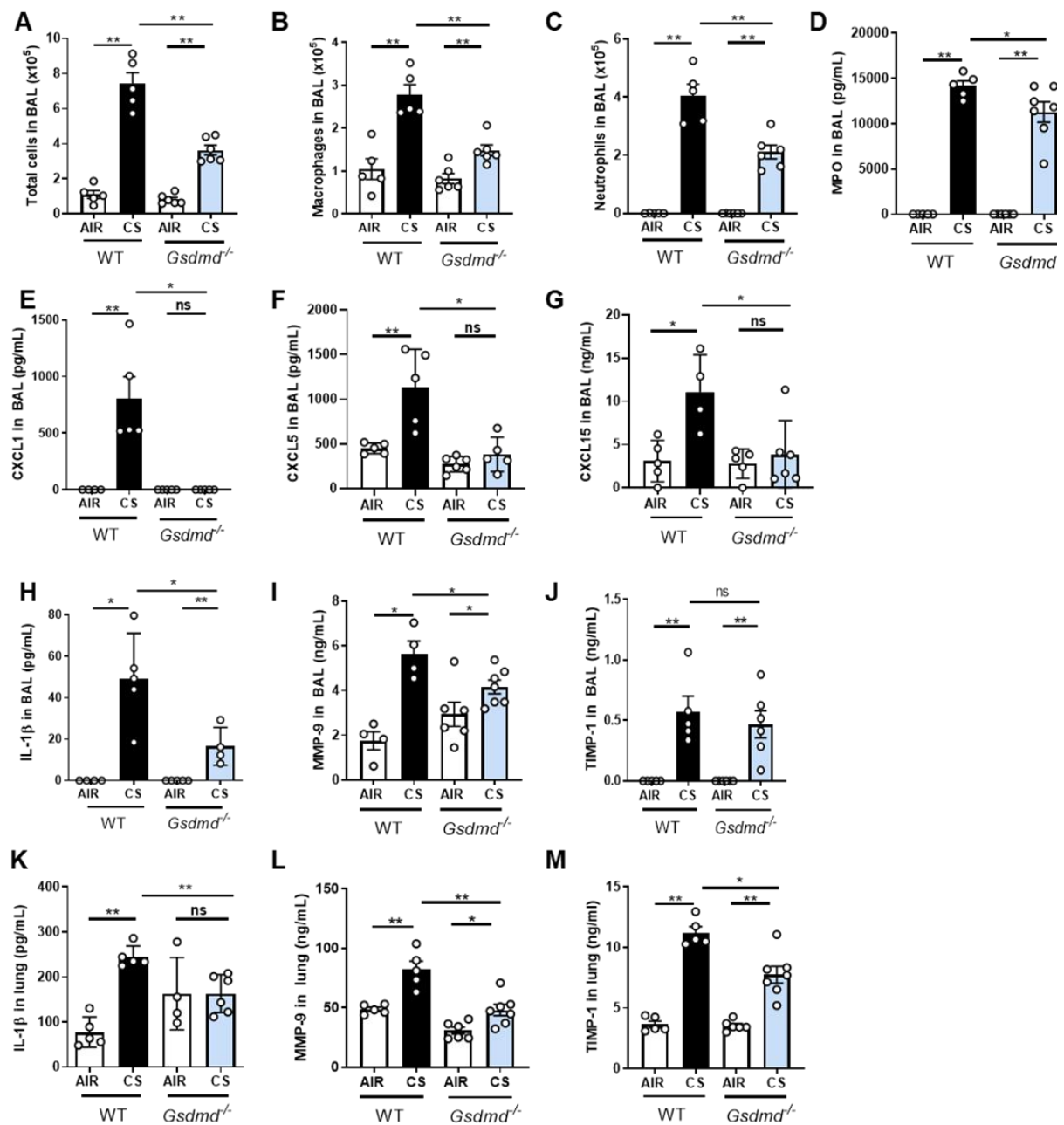
These results demonstrate that CS-exposure induces NLRP3 dependent GSDMD cleavage in bronchoalveolar space macrophages potentially through NLRP3 inflammasome activation.



### **GSDMD deficient mice have reduced pulmonary inflammation to CS exposure**

Finally, in order to confirm that GSDMD participates in pulmonary inflammation to acute CS exposure, we exposed WT and *Gsdmd*-deficient (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) mice to Air or CS for 4 days. We observed that total cells, macrophages and neutrophils (**Fig. 8A to C**) together with MPO, CXCL1, CXCL5 and CXCL15 (**Fig. 8D-G**) levels were significantly decreased in BAL of acutely CS-exposed *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice as compared to WT mice. Importantly, IL-1 $\beta$  levels in BAL (**Fig. 8H**) was significantly reduced in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice indicating a role of GSDMD in IL-1 $\beta$  release. In addition, BAL levels of MMP-9 (**Fig. 8I**) and TIMP-1 (**Fig. 8J**) were significantly and non-significantly reduced respectively in acutely CS-exposed *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice as compared to WT CS-exposed mice. Finally, IL-1 $\beta$  (**Fig. 8K**) levels in lungs of acutely CS-exposed *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice was also significantly reduced, as well as MMP-9 and TIMP-1 (**Fig. 8L and M**) compared to WT mice.

Altogether, these results confirm that GSDMD protein is a key player of pulmonary inflammatory responses to acute CS exposure.



**Figure 8. Gasdermin d-deficient mice (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) have reduced pulmonary inflammation and remodeling after acute smoke cigarette (CS) exposure.** WT and *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice were exposed to CS or air during 4 days. Total cells (A), macrophages (B) and neutrophils (C) counts and MPO level in BAL (D) are shown. CXCL1 (E), CXCL5 (F), CXCL15 (G) and IL-1β (H) levels were measured in BAL. MMP-9 (I) and TIMP-1 (J) remodeling factor levels were measured in BAL. In lungs, levels of IL-1β (K), MMP-9 (L) and TIMP-1 (M) were also measured. All parameters decreased in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice exposed to CS as compared to CS WT mice. Data are representative of four experiments and are expressed as mean values ± SEM (n= 4-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, ns non-significant, using a Mann Whitney test).

## DISCUSSION

We investigated whether NLRP3 is involved in pulmonary inflammation induced by acute or subchronical experimental CS-exposure. We previously demonstrated that murine CS-induced airway inflammation depends on the IL-1R1/MyD88 signaling pathway and showed that *ex vivo* stimulation of bone marrow-derived macrophages with LPS and ATP, promotes Caspase-1-dependent IL-1 $\beta$  maturation and secretion, suggesting involvement of an inflammasome complex (*Doz et al., 2008*). However, subsequent *in vivo* studies were controversial regarding the role of NLRP3 in inflammation to CS (*Mahalanobish et al., 2020 & Wang et al., 2020 & Mehta et al., 2020 & Morris et al., 2015*).

We demonstrate here that NLRP3 is a key player in pulmonary inflammation and remodeling upon acute or subchronical mouse CS exposure. Macrophages and neutrophils are innate immune cells infiltrating lung and recruited in bronchoalveolar space upon CS exposure and also associated with COPD pathogenesis (*Barnes et al., 2014 & Barnes et al., 2004*). Pro-inflammatory cytokines, chemokines and proteases, secreted by pulmonary recruited cells and lung resident cells amplify organ inflammation and damages. Here we highlighted a decrease of bronchoalveolar space and lung tissue cell influx, cytokines/chemokines expression and/or release upon acute and subchronic CS exposure after knockdown of the NLRP3 sensor. Influx of macrophages, and neutrophils and importantly IL-1 $\beta$  secretion in the bronchoalveolar space of acutely of subchronically CS-exposed mice were dependent on NLRP3. Furthermore, we report attenuated inflammation and remodeling responses to acute CS exposure after pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome by MCC950 treatment. MCC950 was shown to directly targets the NLRP3 ATP hydrolysis motif to specifically inhibit canonical and non-canonical NLRP3 formation at nanomolar concentrations (*Coll et al., 2019*). MCC950 is active *in vivo* in multiple NLRP3-dependent mouse models, impairing IL-1 $\beta$  production and attenuating the severity of inflammatory disease models (*Coll et al., 2015*). Although we cannot exclude that MCC950 may non-specifically inhibit other targets, our data with genetic depletion and pharmacological inhibition strongly suggest that NLRP3 is a key sensor of pulmonary injury and in particular induced by acute CS exposure but possibly after other noxious airway exposure, open new fields to investigate. Importantly, MCC950 treatment might be beneficial in preventing pulmonary inflammation and this hypothesis could be tested in chronically CS-exposed mice models. However,

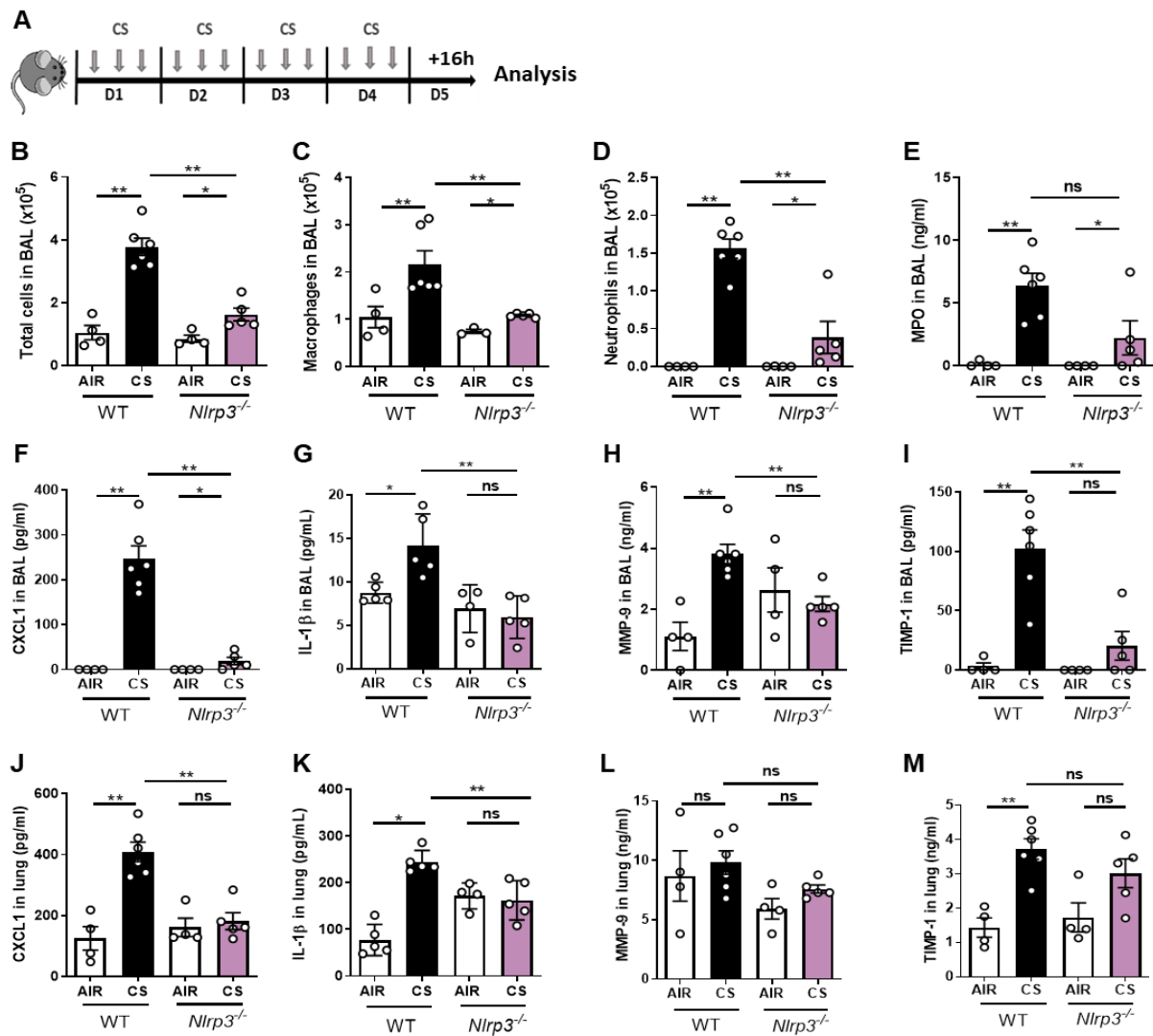
although MCC950 inhibited the NLRP3 inflammasome in a lot of nonclinical models of inflammatory diseases with very high specificity and at nanomolar concentrations, this inhibitor presents pharmacokinetic and toxicokinetic properties that may limit its therapeutic development in the clinic. Several improved next-generation inhibitors are now in clinical trials (*Corcoran et al., 2021*). We further showed that *Caspase1/11* deficiency leads to reduced pulmonary inflammation suggesting that NLRP3-canonical and/or non-canonical inflammasome pathways are involved in acute CS exposure-induced lung inflammation. Moreover, mouse CS exposure induced cleaved Caspase-1 in macrophages and neutrophils present in the bronchoalveolar space, which was dampened after knockdown or pharmacological inhibition of the NLRP3 sensor. These results demonstrated that the canonical NLRP3 inflammasome is a key player of acute CS exposure-induced inflammation mediated by macrophages and neutrophils in the bronchoalveolar space.

In addition, we investigated the role of the Gasdermin D (GSDMD) in pulmonary inflammation upon mouse acute CS exposure. GSDMD-forming pores is known to drive a rapid pro-inflammatory form of cell death known as pyroptosis and release pro-inflammatory cytokines and endogenous danger signals (*Broz et al., 2015 & Aglietti et al., 2017 & Broz et al., 2020*). Importantly, GSDMD-forming pores were also identified as the most important way for the secretion of mature IL-1 $\beta$  (*Heilig et al., 2018*). GSDMD activation may result in different fate such as membrane repair and cell survival depending on cell types (*Ruhl et al., 2022 & Ruhl et al., 2018*). Interestingly, we demonstrated that NLRP3 mediates GSDMD activation in bronchial epithelial cells and in macrophages of the bronchoalveolar space upon acute CS exposure of mice, possibly through NLRP3 inflammasome activation. Finally, we demonstrated for the first time in *Gsdmd* deficient mice that this pore-forming protein is central to airway inflammation upon mouse acute CS exposure, probably through GSDMD expression and activation in bronchoalveolar space recruited macrophages and in bronchial airway epithelial cells.

Importantly, implication of GSDMD activation in acute CS-induced lung inflammation opens new potential studies in chronic CS-induced lung inflammation, using GSDMD inhibitors such as disulfiram that blocks pore formation (*Hu et al., 2020*). Pore forming ability of GSDMD represents a drug target to block IL-1 $\beta$  release during inflammasome-driven sterile inflammatory diseases.

Collectively, our data report a key role of the NLRP3 sensor and of the pore-forming GSDMD protein, in pulmonary inflammation to acute CS exposure in mice.

## Supplementary data



**Figure S1.** *Nlrp3*-deficient mice (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) have reduced pulmonary inflammation after acute cigarette smoke (CS) exposure. WT and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice were exposed to CS or air during 4 days (A). Total cells (B), macrophages (C), neutrophils (D) counts and MPO (E), CXCL1 (F), IL-1 $\beta$  (G) and remodeling factors MMP-9 (H) and TIMP-1 (I) levels in BAL were decreased in *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice exposed to CS compared to CS WT mice. CXCL1 (J), IL-1 $\beta$  (K) and MMP-9 (L) and TIMP-1 (M) levels in lungs are shown. Data are representative of four experiments and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 4-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, ns non-significant, using a Mann Whitney test).

## B- Etude de l'implication du récepteur NLRP6 et de la GSDMD en réponse à l'ozone.

Dans cette partie nous avons étudié l'implication de l'inflammasome NLRP6 dans l'inflammation pulmonaire induite par une exposition chronique à l'ozone. Nous avons tout d'abord montré l'expression de NLRP6 au niveau basal dans le tissu pulmonaire et son induction après exposition chronique à l'ozone au niveau des pneumocytes, des cellules épithéliales bronchiques ainsi que dans une petite proportion de macrophages présents dans le tissu pulmonaire et dans l'espace bronchoalvéolaire.

Les résultats ont montré que les souris déficientes pour NLRP6 (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) ont une diminution de l'inflammation pulmonaire qui se caractérise par une réduction du recrutement cellulaire, de la sécrétion de cytokine/chimiokines pro-inflammatoires et des paramètres de remodelage tissulaires. De plus, l'absence de NLRP6 diminue l'apparition des foyers de fibrose, d'emphysème et de la sécrétion de mucus et dans les poumons. L'activation des Caspases 1 et 11 ainsi que de la Gasdermine D (GSDMD) est aussi diminuée chez les souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> exposées à l'ozone.

Le clivage de la GSDMD induit par une exposition chronique à l'ozone est dépendant de l'activation de NLRP6 et de la Caspase 11 dans les pneumocytes de type 1 (AT1). En revanche, dans les macrophages infiltrés au niveau du tissu pulmonaire, le clivage de la GSDMD ne dépend pas de NLRP6 ni de la Caspase 11. Concernant les macrophages présents dans le liquide bronchoalvéolaire, une petite proportion montre un clivage de la GSDMD qui est dépendant de NLRP6 et de la Caspase 11.

Afin de confirmer l'implication de la GSDMD dans la réponse induite par une exposition chronique à l'ozone, des souris déficientes pour la GSDMD (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) ont été utilisées et présentent une diminution globale de l'inflammation pulmonaire.

Afin de confirmer que l'expression de NLRP6 au niveau des AT1 joue un rôle primordial dans l'inflammation pulmonaire induite par une exposition chronique à l'ozone, des souris NLRP6 AT1 déficientes (*Nlrp6*<sup>fl/fl</sup> X *AcidCre*<sup>+/+</sup>) ont été utilisées et présentent aussi une diminution globale de l'inflammation pulmonaire.

# Chronic ozone induces lung inflammation through NLRP6/Caspase-1/Caspase-11/Gasdermin D activation in type 1 pneumocytes

**Sarah Huot-Marchand**<sup>1</sup>, Aurélie Gombault<sup>1</sup>, Elodie Culerier<sup>1</sup>, Chloé Véront, Florence Savigny<sup>1</sup>, Sandra Carignon<sup>1</sup>, Cindy Serdjebi<sup>2</sup>, Marc Le Bert<sup>1</sup>, Valérie F. J. Quesniaux<sup>1</sup>, Bernhard Ryffel<sup>1</sup>, Petr Broz<sup>3</sup>, Nicolas Riteau<sup>1</sup>, Isabelle Couillin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Orleans and CNRS, INEM-UMR7355, Orleans, France

<sup>2</sup>Biocellvia, Marseille, France

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Lausanne, 1066 Epalinges, Switzerland

**Keywords:** Ozone, NLRP6, Caspase11, Apoptosis, Gasdermin D, COPD, Emphysema, Lung fibrosis,

**Mice**

**Running Title:** NLRP6 and cell death in response to ozone

Address of correspondence to Isabelle Couillin, Molecular and Experimental Immunology and Neurogenetics, UMR 7355, 3B, rue de la Férollerie, 45071 Orleans, France.

Phone : 0033 238 25 54 43 Fax : 0033 238 25 79 79.

E-mail: [isabelle.couillin@cnrs-orleans.fr](mailto:isabelle.couillin@cnrs-orleans.fr)

Grant support by the « Agence nationale de Recherche » (ANR AAPG2019 CES15 Smoke6) and the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Orléans.



## ABSTRACT

The ozone ground-level is an important gaseous constituent of air pollution that contributes to lung disease progression and mortality. Ozone exposure in mice causes pulmonary inflammation evolving into lung emphysema and/or fibrosis but mechanisms are not well understood. Using a 6 weeks chronic ozone exposure mice model, we investigated the role of the innate receptor nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing protein 6 (NLRP6) in ozone exposure-associated pulmonary inflammation and diseases. We found that *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) dampens lung inflammation in comparison to wild-type mice with reduced neutrophils, eosinophils influx and production of associated chemokines/cytokines including Th2 cytokines. In addition, *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice presented attenuated remodeling factor levels, collagen deposition and fibrosis induced after chronic ozone exposure. Interestingly, we show that chronic ozone exposure increases NLRP6 expression in lungs epithelial cells and partly in lung and airway macrophages. Mechanistically, chronic ozone exposure promotes NLRP6-mediated Caspase-3 and Caspase-8 activation in lung tissues. Moreover, we report Gasdermin D activation through a NLRP6/Caspase-1/Caspase 11-dependent manner in type 1 pneumocytes and partly in recruited macrophages suggesting NLRP6 inflammasome-mediated pyroptotic cell death as a driver of lung inflammation. In line with these data, Gasdermin D deficiency leads to reduced pulmonary inflammation after chronic ozone exposure. Finally, mice deficient for NLRP6 in type 1 pneumocytes display reduced inflammation with impaired Caspase-3/8/1/11 and Gasdermin D activation in lungs, which confirms NLRP6-driven inflammation in these cells. Together, we identified NLRP6 as a new innate sensor involved in ozone-triggered lung pathology.

## INTRODUCTION

The ozone ground-level is recognized as an important gaseous constituent of air pollution that results from photochemical interaction in the presence of sunlight between nitrogen oxides and volatile organic compounds emitted as pollutants from chemical industries, power plants, cars and other sources. Ground-level ozone contributes to lung disease progression and mortality (*Turner et al., 2016*) with worsening symptoms and increased hospitalizations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients after peak ozone levels encountered on days of high urban air pollution (*Gao et al., 2020 & Morici et al., 2020*). Ozone concentration usually reaches unhealthy levels on hot sunny days in urban areas as well as non-urban areas when carried by the wind. Ozone is a highly reactive molecule causing oxidative damage leading to cell death. Oxidative stress is likely a major trigger of tissue injury associated with the inflammatory response and emphysema (*Wiegman et al., 2014*). While acute ozone exposure induces airway hyperreactivity and neutrophilic inflammation, chronic exposure induces oxidative pathways resulting in cell death and a chronic bronchial inflammation with emphysema. This chronic ozone exposure model mimics to a certain extent cigarette smoke-induced COPD (*Sokolowska et al., 2019 & Triantaphyllopoulos et al., 2011*), such as airflow limitation and other COPD features (*Li et al., 2013 & Li et al., 2016*).

Ozone promotes an oxidative stress, harming airway and alveolar epithelial cells promoting the release of organelles content, mitochondrial ROS or other endogenous danger signals such as uric acid, extracellular ATP, genomic or mitochondrial DNA. Most of these events are canonical activators of inflammasomes, leading to pulmonary inflammation and potentially to COPD and/or lung fibrosis (*Wiegman et al., 2020*). The nucleotide-oligomerization domain-like receptors (NLRs) are a family of cytoplasmic PRRs that mediate inflammatory cytokines production and immunological cell death (ICD). NLRs are involved in inflammation and pathogenicity induced by lung injury upon ozone exposure. It has been demonstrated that NLRP3 is implicated in response to acute ozone exposure (*Li et al., 2018 & Sokolowska et al., 2019*), as well as upon chronic ozone exposure via caspase-1 activation and IL-1 alarmines release (*Wiegman et al., 2020*). However, the role of NLRP6, in ozone-induced lung pathologies remains unknown.

NLRP6 has been described to be highly expressed in gut epithelial cell (*Chen et al., 2011*).

NLRP6 is able to form canonical inflammasome in association with Caspase-1 and its activation regulates gut homeostasis and mucus production through autophagy regulation (*Li & Zhu, 2020*). But, it can also form non-canonical inflammasome in association with Caspase-11 (*Hara et al., 2018 & Matheis et al., 2019*). Furthermore, NLRP6 regulates enteric viral response through binding with DNA sensors like helicases (MAVS). While NLRP6 has been well described in gut and also in lung infectious response, it remains poorly described in a context of noninfectious diseases. In lungs, NLRP6 mediates gram positive bacteria-driven inflammation (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae*) through neutrophil influx regulation (*Ghimire et al., 2018 & Xu et al., 2021*). Moreover, upon *S. aureus* infection it has been shown that NLRP6 mediates Caspase-1/Gasdermin D (GSDMD) and necroptosis activations in bone marrow-derived macrophages (*Ghimire et al., 2018*).

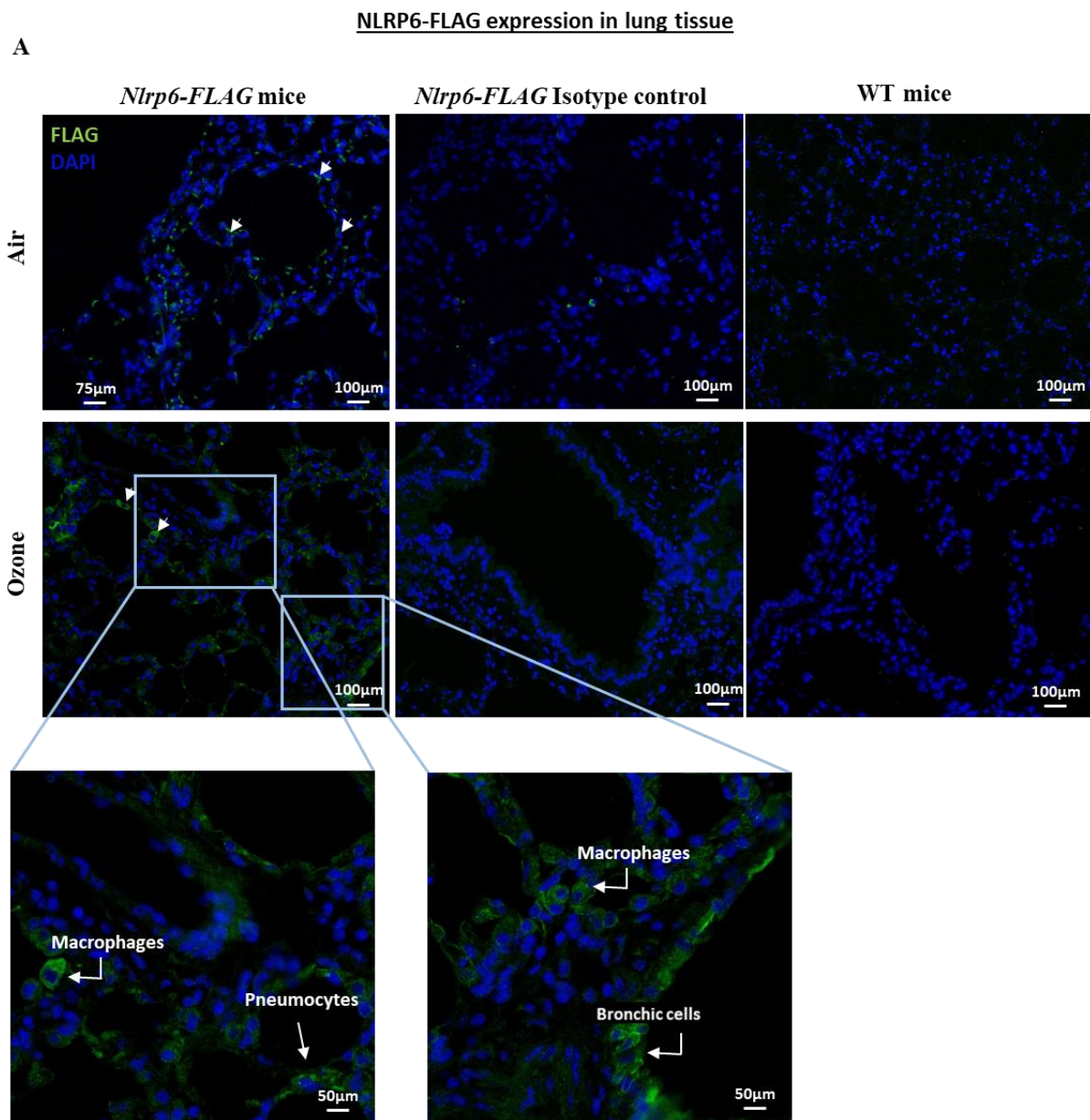
GSDMD activation through inflammasome/Caspase-1-dependent pathway promotes its N-terminal domain release, which forms pores in cell membranes. GSDMD-N pore-forming protein was described as the executor of pyroptotic cell death, inducing endogenous danger signals production and pro-inflammatory cytokines release (*Broz et al., 2015*). GSDMD-mediated pyroptosis can be induced directly by Caspase-8 or by the noncanonical inflammasome, via Caspase-11-dependent cleavage (*Shi et al., 2015*). Pyroptosis has been described in macrophages, neutrophils and in airway epithelial cells, exacerbating airway inflammation (*Zhuang et al., 2020*).

In the present study, we explored potential NLRP6 functions in chronic inflammation and severe lung pathologies using a chronic model of ozone exposure recognized as a COPD model. Using *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice, we provide the first evidence that NLRP6 is a key player in chronic pulmonary inflammation associated with the induction of apoptosis. Importantly, we demonstrate for the first time that NLRP6 regulates Gasdermin D in type 1 pneumocytes and a fraction of airway macrophages, through NLRP6/Caspase-11 activation. Using mice deficient for *Nlrp6* in type 1 pneumocytes (*Nlrp6*<sup>fl/fl X AcidCre/+</sup>), we confirmed that NLRP6 plays an important role in these cells to mediate the inflammation and promote lung injury. Finally, we confirmed GSDMD implication in response to chronic ozone exposure by using *Gsdmd*-deficient mice (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>).

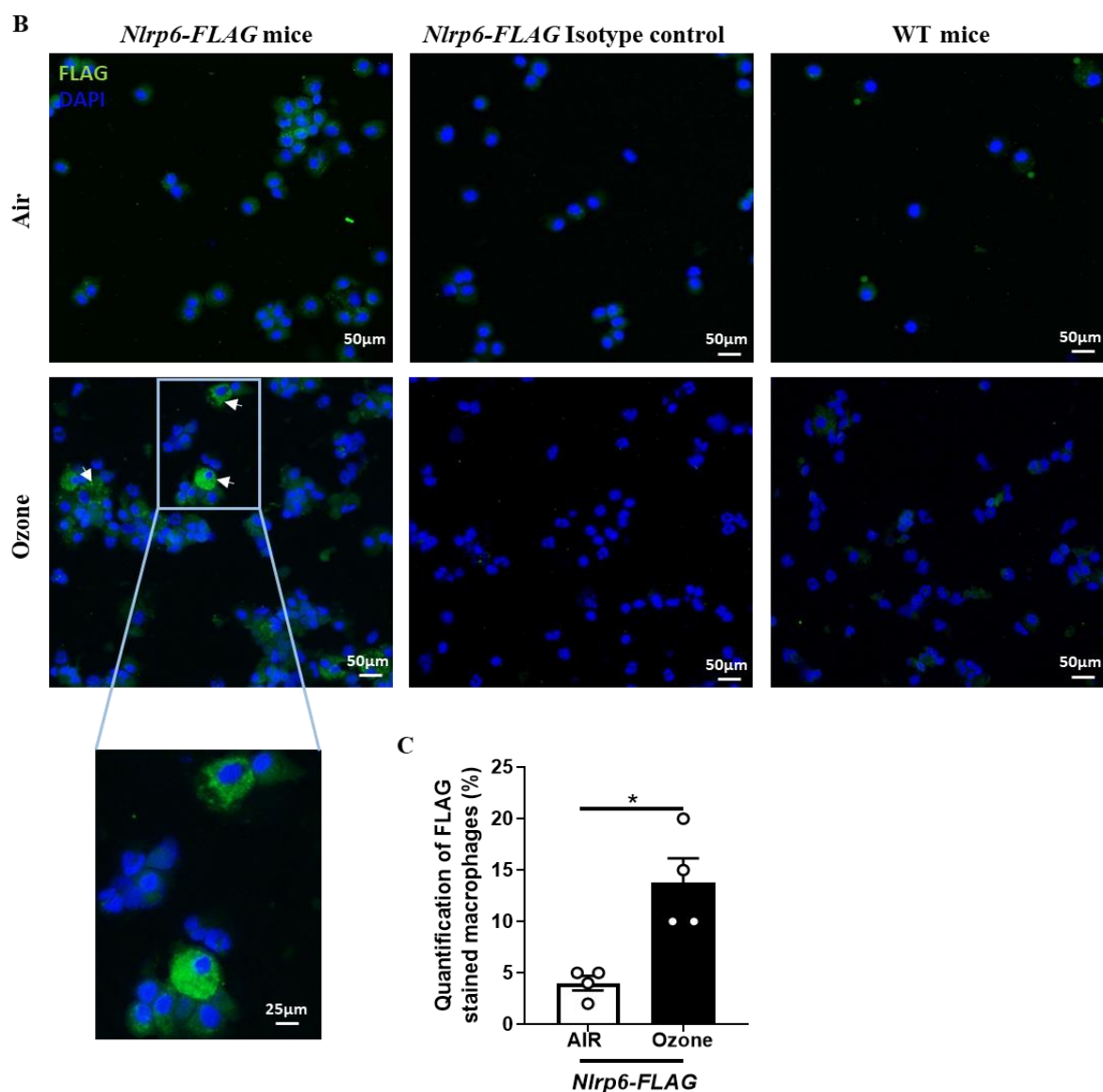
## RESULTS

### Ozone increases NLRP6 expression in lung epithelial cells and recruited macrophages

To address the unknown role of NLRP6 upon chronic ozone exposure, we first investigated whether ozone induces its expression. We exposed NLRP6-FLAG mice to air or ozone during 6 weeks and performed anti-FLAG immunostaining as readout of NLRP6 expression. In lung tissue, NLRP6 is detectable at low levels in air-exposed mice and strongly induced after ozone exposure in pneumocytes, bronchoalveolar cells and macrophages (**Fig. 1A**). Staining specificity was verified using both isotype control in NLRP6-FLAG mice and anti-FLAG staining in wild-type (WT) mice (**Fig. 1A**). Results were confirmed by immunohistochemistry (**Fig. Supp1**).



## NLRP6-FLAG expression in BAL recruited cells



**Figure 1. NLRP6 is increased by chronic ozone exposure in lungs and in a part of BAL recruited macrophages.** *Nlrp6-FLAG* mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks. NLRP6 expression was shown using an antibody that targeting FLAG region attached to the *Nlrp6* ending region. FLAG staining is in green and nucleus in blue (DAPI), we showed an increase of NLRP6-FLAG expression in lungs sections (A) and in BAL recruited macrophages (characterized by their uni-lobulated nuclei) (B) quantification for BAL stained macrophages is shown (C). Zoom on stained lung region and BAL macrophages is shown. Data are representative of one experiment using 4-5 mice in each group (Air and Ozone).

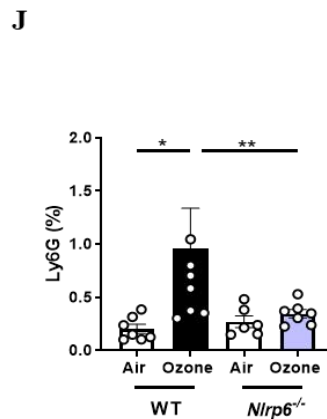
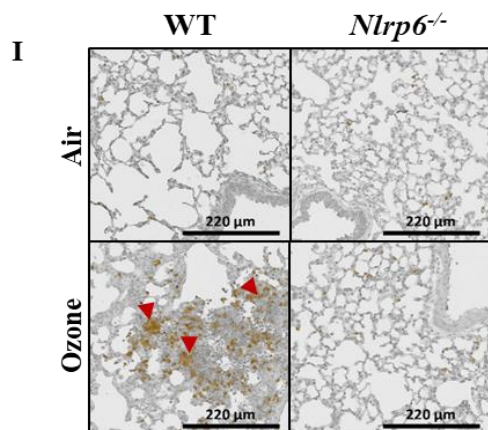
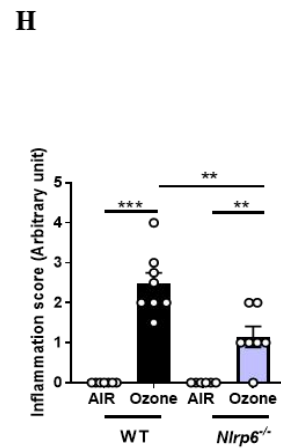
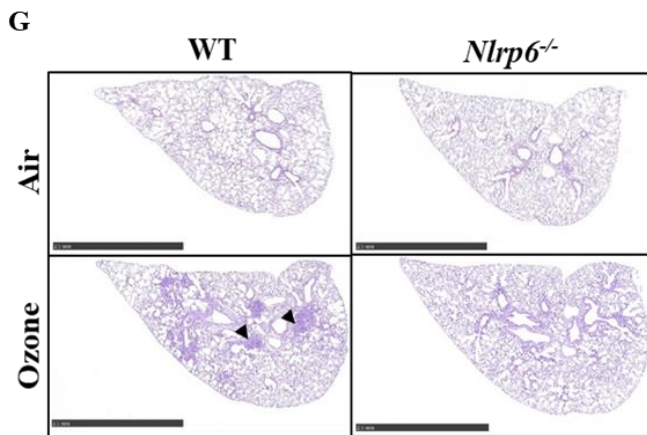
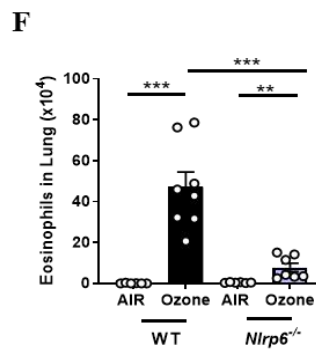
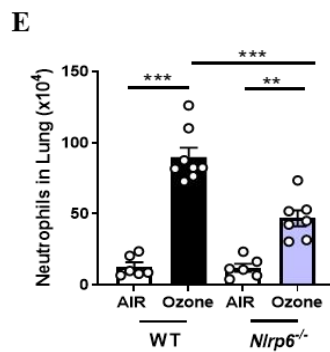
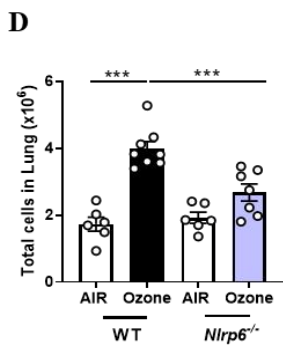
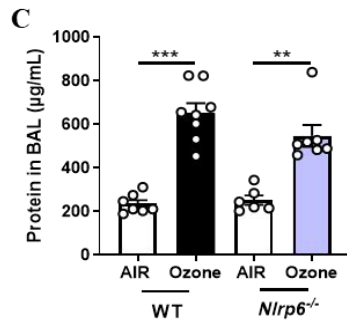
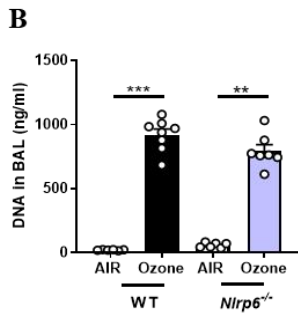
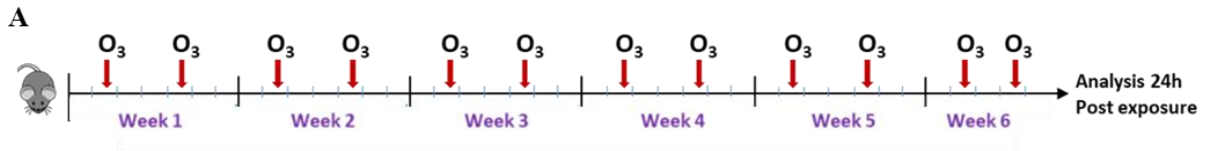
In airway cells collected by bronchoalveolar lavage (BAL), NLRP6 is expressed in a fraction of macrophages but not in neutrophils or eosinophils (Fig. 1B). Isotype control in the BAL of NLRP6-FLAG mice or anti-FLAG staining in WT mice did not show specific staining (Fig. 1B).

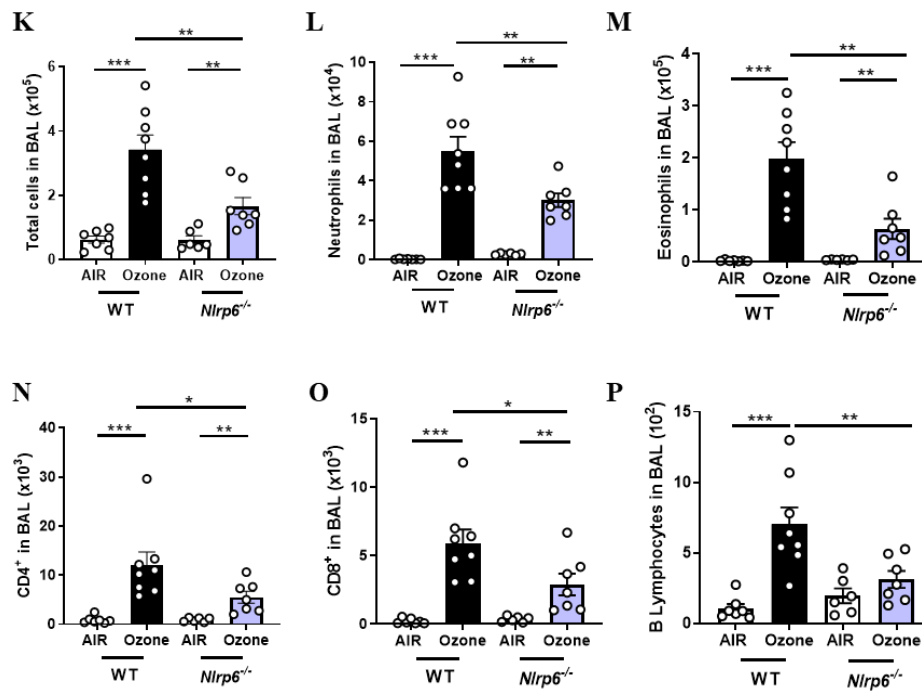
## ***Nlrp6* deficiency dampens pulmonary and air space cellular inflammation in response to chronic ozone exposure in mice**

We next used a model of chronic ozone exposure in WT and *Nlrp6*-deficient (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) by exposing them for one hour, 1.5ppm twice a week for six weeks (**Fig. 2A**). At this time point, ozone induces lung damage as reflected by increased cell free double strand DNA content and protein release in the BAL (**Fig. 2B and C**). No differences were observed comparing WT mice and *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice, suggests ozone-induced toxicity.

As compared to unexposed (Air) mice, chronically ozone-exposed WT mice showed increased numbers of immune cells recruited in lung tissue (**Fig. 2D**), in particular neutrophils (**Fig. 2E**) and eosinophils (**Fig. 2F**). Both neutrophil and eosinophil numbers were reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice as compared to ozone-exposed WT mice (**Fig. 2E-F**). Histological analysis of lung tissue showed distinct parenchymal inflammation following ozone exposure in WT mice (**Fig. 2G and H**), and neutrophil-enriched clusters as shown by immunohistochemistry anti-Ly6G positive cells (**Fig. 2I and J**). In contrast, ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice displayed lower tissue inflammation and lung neutrophil recruitment (**Fig. 2G-I**).

Ozone-induced cell recruitment in the BAL was further confirmed by flow cytometry using the gating strategy presented in **Fig. Supp2 A, B and C**. Total cells (**Fig. 2K**) as well as neutrophils (**Fig. 2L**) and eosinophils (**Fig. 2M**) numbers recruited in the BAL are significantly reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice as compared to ozone WT mice. Further, the recruitment of adaptive immune cells in lesser extent, in particular CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and B lymphocytes in WT mice that was significantly reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 2N, O and P**).





**Figure 2.** *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) reduces cell recruitment in lungs and BAL after chronic ozone exposure in mice. WT and *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks (A). DNA (B) and proteins (C) measurements in BAL showing ozone damages induced by chronic ozone exposure. Total cells in lung (D), lung infiltrated neutrophils (E) and eosinophils (F) are significantly reduced in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> deficient mice compared to WT mice. Histological analysis of pulmonary inflammation and cell recruitment were evaluated from histology sections (G) and inflammation score determined (H). Ly6G immunostaining was performed on WT and *Nlrp6*<sup>-/-</sup> lung sections (I). Percentage of Ly6G positive area per tissue section (J). Total cells in BAL (K), recruited neutrophils (L), eosinophils (M), CD4<sup>+</sup> (N) and CD8<sup>+</sup> (O) and B lymphocytes (P) are significantly reduced in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> deficient mice compared to WT mice. Data are representative of two experiments and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 6-9 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).

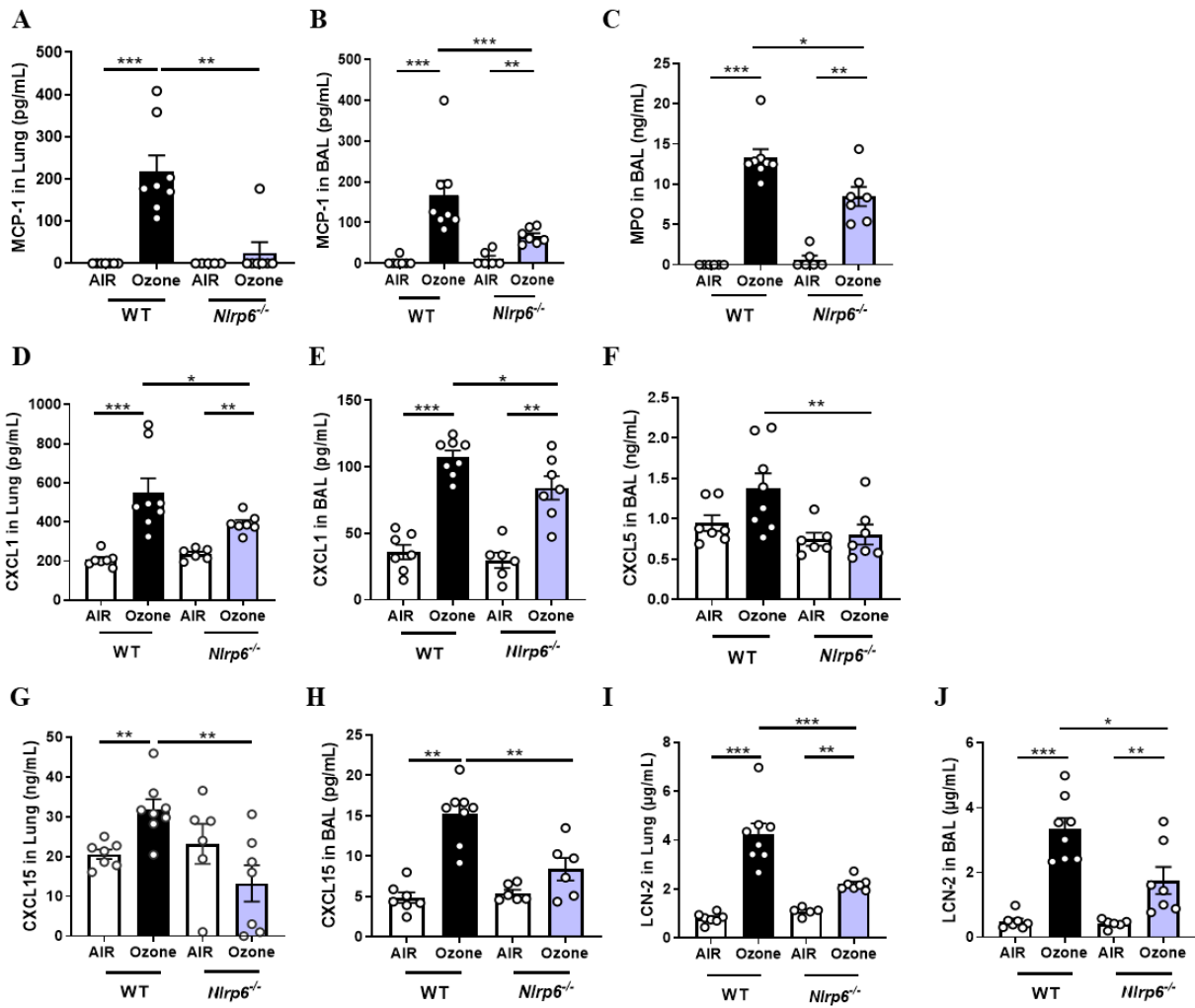


## Neutrophilic and eosinophilic chemokines and markers are reduced in *Nlrp6* deficient mice in response to chronic ozone exposure

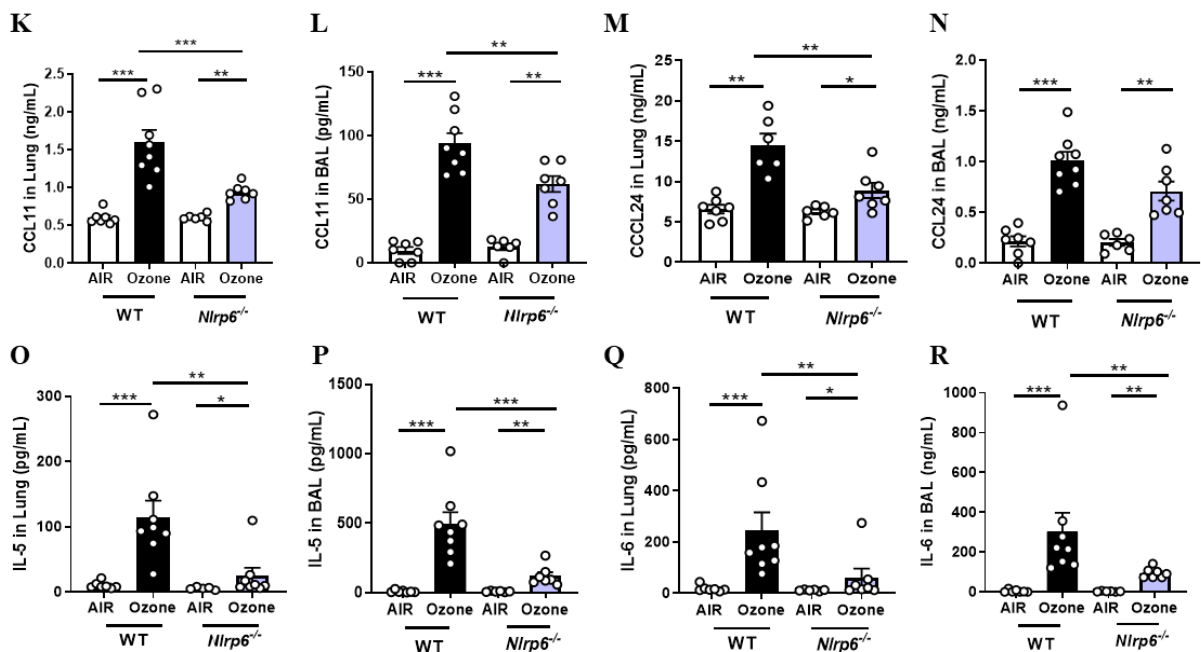
Neutrophils and eosinophils recruited in lung and BAL may play an important role in the pathogenesis developed in response to chronic ozone exposure, we analyzed related inflammatory marker expressions. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL2), a key chemokine that regulate migration and infiltration of monocytes/macrophages, is significantly induced in lungs and BAL of ozone-exposed WT mice but not in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 3A and B**). Then, analyzing markers related to neutrophil recruitment, levels of myeloperoxidase (MPO) (**Fig. 3C**), an enzyme present in neutrophil granules was significantly elevated in BAL of ozone-exposed WT mice but significantly reduced in BAL of ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice. Neutrophilic chemokines CXCL1 (**Fig. 3D and E**) and CXCL15 (**Fig. 3G and H**) induction observed in lungs and BAL of ozone-exposed WT mice were significantly reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice. In addition, the level of CXCL5 in BAL of ozone WT mice was significantly reduced in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 3F**). The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (LCN)-2, a protein expressed by neutrophils and are involved in innate immunity, was significantly decreased in the lungs and BAL of ozone *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice compared to ozone WT mice (**Fig. 3I and J**).

The protein expression of CCL11 (eotaxine-1) and CCL24 (eotaxine-2) involved in eosinophil recruitment. Both CCL11 and CCL24 were induced upon ozone exposure in lungs and BAL of WT mice and significantly reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 3K-N**). IL-5 expression, a pivotal cytokine in the chemoattraction, proliferation, differentiation, survival, and activation of eosinophils, was strongly induced in lungs and BAL of WT mice exposed to ozone but not in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 3O and P**). In addition, pro-Th2 cytokine IL-6 was induced in WT mice exposed to ozone but significantly decreased in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 3Q and R**). Together, these data indicate that NLRP6 is important to drive lung inflammation induced by chronic ozone exposure.

**Monocyte chemoattractant protein and neutrophil-associated chemokines and cytokines**



## Eotaxins and eosinophil-associated cytokines

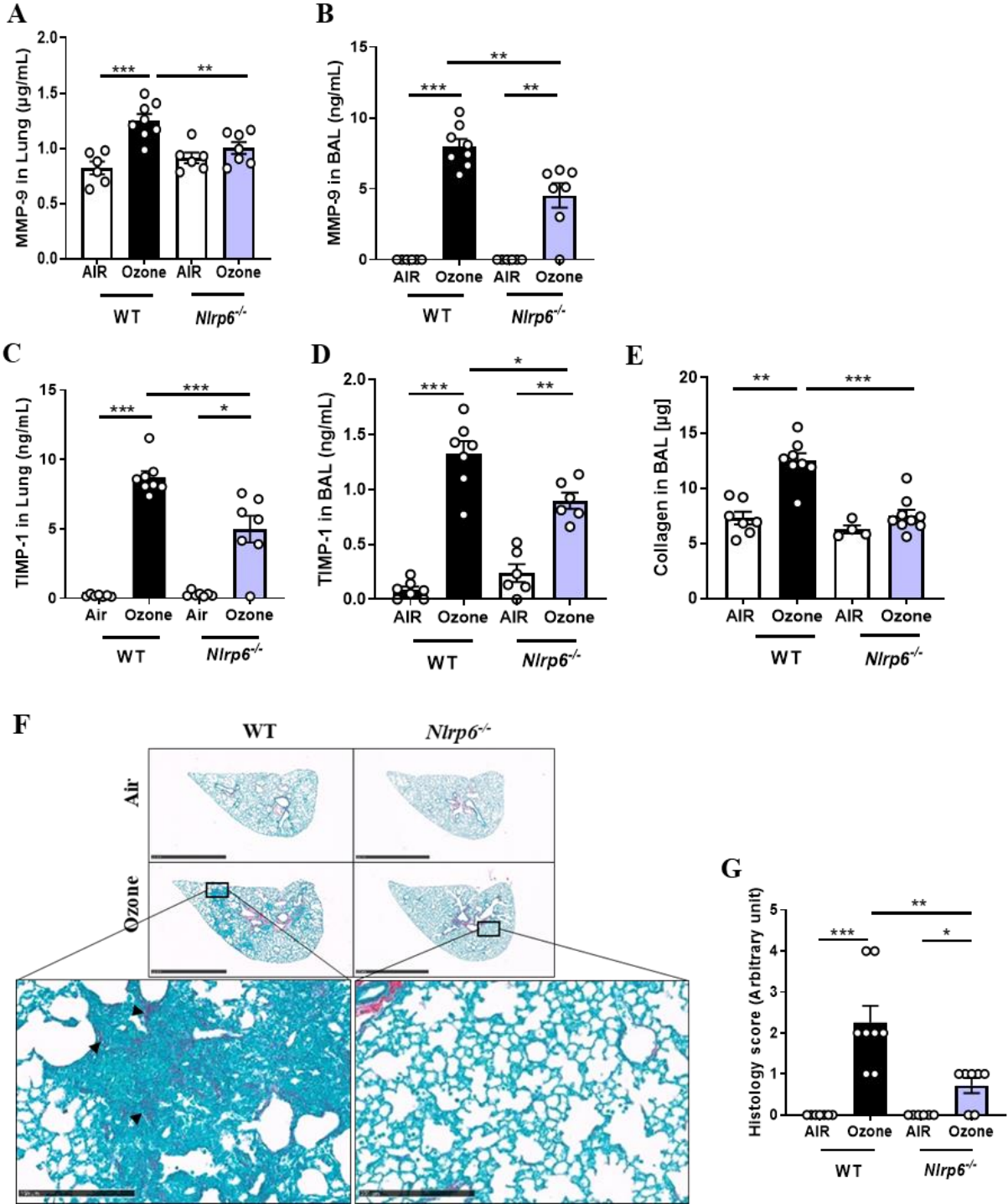


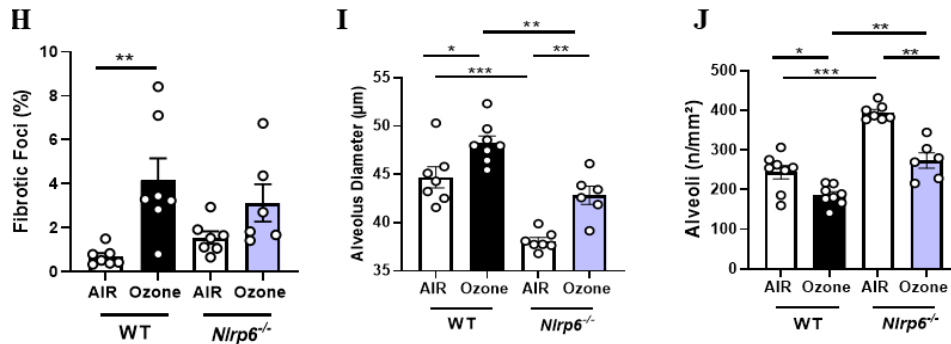
**Figure 3.** *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) decrease cytokines and chemokines parameters involved in neutrophils and eosinophils recruitment after chronic ozone exposure in mice. WT and *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in lungs and BAL (A, B), myeloperoxidase (MPO) in BAL (C). CXCL1, CXCL15 (D,E and G, H) in lungs and BAL were reduced as well as CXCL5 in BAL (F) and LCN-2 (I, J) in lungs and BAL in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice compared to WT Ozone exposed mice. CCL11 (K, L) and CCL24 (M, N), IL-5 (O, P) and IL-6 (Q, R) in lungs and BAL were also reduced in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice compared to WT exposed mice. Data are representative of three experiments and are expressed as mean values ± SEM (n= 6-9 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).

## *Nlrp6* deficiency attenuates tissue remodeling and fibrosis induced by chronic ozone exposure

We next analyzed the balance between expression of tissue remodeling proteases and their inhibitors commonly involved in lung pathologies. We focused on matrix metalloproteinase (MMP-9), a gelatinase produced by alveolar macrophages and neutrophils that degrades extracellular matrix proteins and promotes neutrophil chemotaxis and its inhibitor tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1). MMP-9 protein levels were significantly increased in the lungs and BAL of ozone-exposed WT mice but not in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> ozone-exposed mice BAL (Fig. 4A and B). In addition, TIMP-1 protein levels were enhanced after chronic ozone exposure in lungs and BAL of WT mice and

significantly less increased in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4C and D). Importantly, BAL collagen content was greatly increased in ozone-exposed WT mice but reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4E). Sirius Red/Fast Green staining in lung tissues highlighting collagen deposition in ozone-exposed WT mice was reduced in ozone *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4F and G).

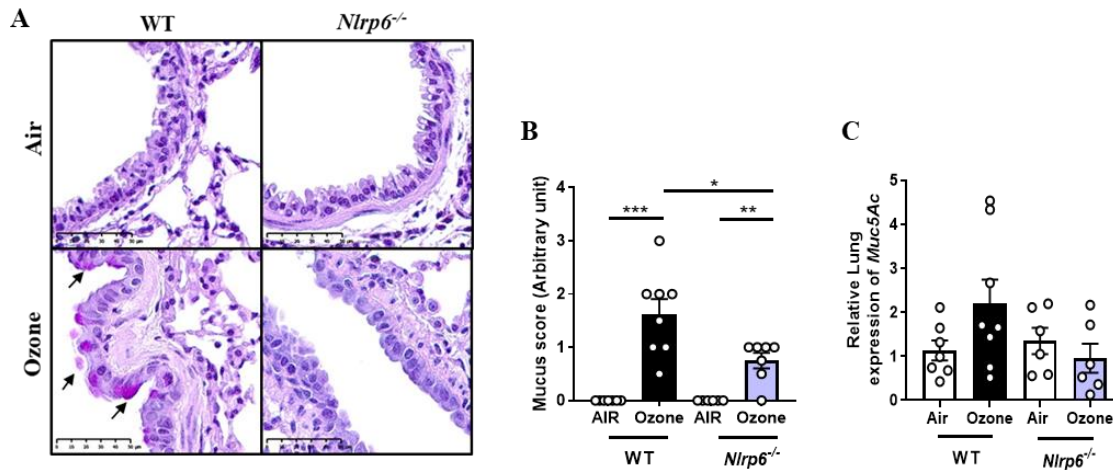




**Figure 4.** *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) decreases remodeling factor production in BAL and lung, collagen deposition in lung and release in BAL and lung fibrosis in of mice exposed to chronic ozone. WT and *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks and remodeling factor such as MMP-9 (A, B) in lung and BAL and TIMP-1 (C, D) in lung and BAL were measured by ELISA. Collagen (E) BAL release was measured. All these parameters were decreased in response to ozone exposure in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice as compared to exposed WT mice. Red Sirius/Fast Green highlighting collagen fibers and red arrows show collagen deposition (F) collagen score was determined (G). Percentage of fibrotic foci (H), alveolar diameter (I) and airspace number were measured on histological slice. Data are representative of two experiments and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 6-8 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).

In addition, lung morphometric analyses showed a significant induction of alveolar diameters and density (Fig. 4I and J) indicating emphysema in ozone-exposed WT mice, which are significantly reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup>. The percentage of fibrotic foci is present after ozone exposure and reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> (Fig. 4H). Thus, chronic ozone exposure induces characteristic of both emphysema and lung fibrosis foci that were attenuated in absence of NLRP6, suggesting a protective effect of *Nlrp6* deficiency on fibrosis an emphysema development.

Interestingly, chronic ozone exposure induces mucus secretion in airways of WT mice and our results show that this is decreased in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A and B). These results were supported by evaluating *Muc5ac* mRNA expression, a mucus marker (Fig. 5. C). Altogether, our results demonstrate that the NLRP6 sensor is important for pulmonary inflammation, injury, remodeling and emphysema in response to chronic ozone exposure.

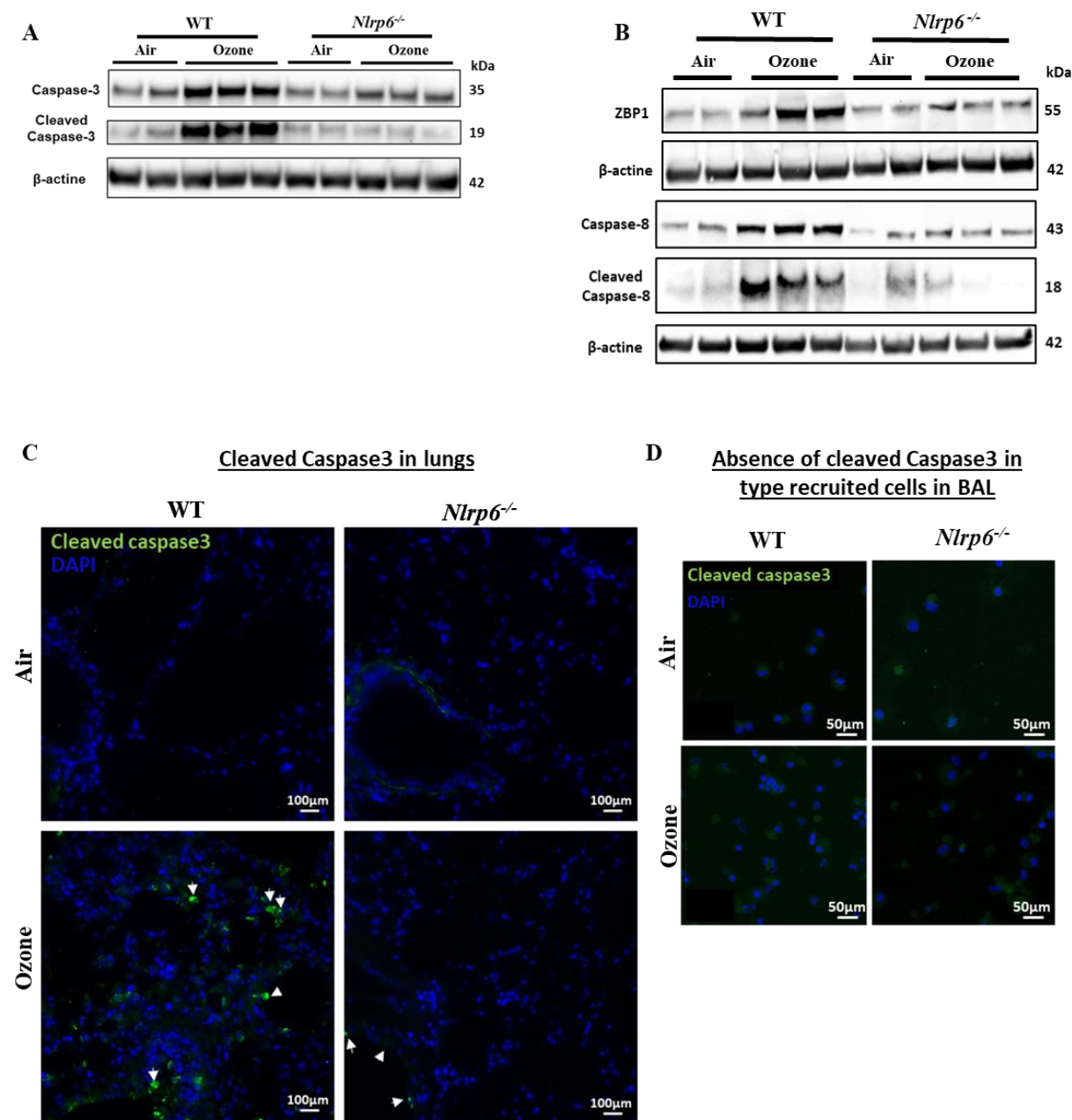


**Figure 5. *Nlrp6* deficiency (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) decreases mucus production by airway epithelial cells induced in mice by chronic ozone exposure** WT and *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks and mucus deposition was highlighted by PAS staining (A) on histological slices. Mucus score was determined (B). *Muc5ac* mRNA level was measured by qPCR (C). Data are representative of two experiments and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 6-8 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).

### Chronic ozone exposure induces NLRP6-dependent Caspase-3 and Caspase-8 activation in pulmonary cells

Since structural cell apoptosis was proposed as a mechanism that promote emphysema (*Doonan et al., 2007*) and Caspase-3 expression, a marker of apoptosis was observed in lung tissue after chronic ozone exposure (*Abdelrahman et al., 2022 & Li et al., 2013 & Triantaphyllopoulo et al., 2011*), we investigated whether apoptotic cell death in response to chronic ozone exposure could be dependent on NLRP6. We first analyzed by western blot expression of full length and cleaved active Caspase 3 forms in the lungs of chronic ozone-exposed mice. We also examined Caspase-8 expression, involved in extrinsic apoptosis induction. We found that Caspase-3 and Caspase-8 and their cleaved forms were induced in lungs of WT ozone-exposed mice (**Fig. 6A and B**). Total Caspase-3 and Caspase-8 expressions were greatly reduced in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> ozone-exposed mice (**Fig. 6A and B**) and their cleaved forms were strongly impaired in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 6A and B**). Interestingly, the DNA sensor Z-DNA-binding protein 1 (ZBP1) involved in necroptosis was induced by ozone in WT mice and less in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 6B**). Moreover, immunofluorescence imaging with a cleaved Caspase-3 specific antibody confirmed that apoptosis is induced in lung of ozone-exposed WT mice and importantly reduced in

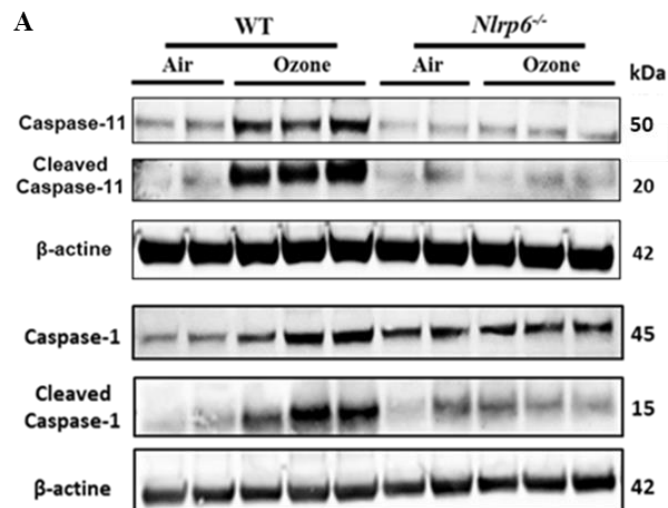
ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 6C**). In contrast, we did not observe cleaved Caspase 3 in BAL cells of ozone-exposed WT mice (**Fig. 6D**). These results indicate that chronic ozone exposure induces Caspase-3 and Caspase-8 activation in lungs and this is greatly reduced in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice and suggest possible NLRP-6-apoptotic cell death induced by chronic ozone exposure.



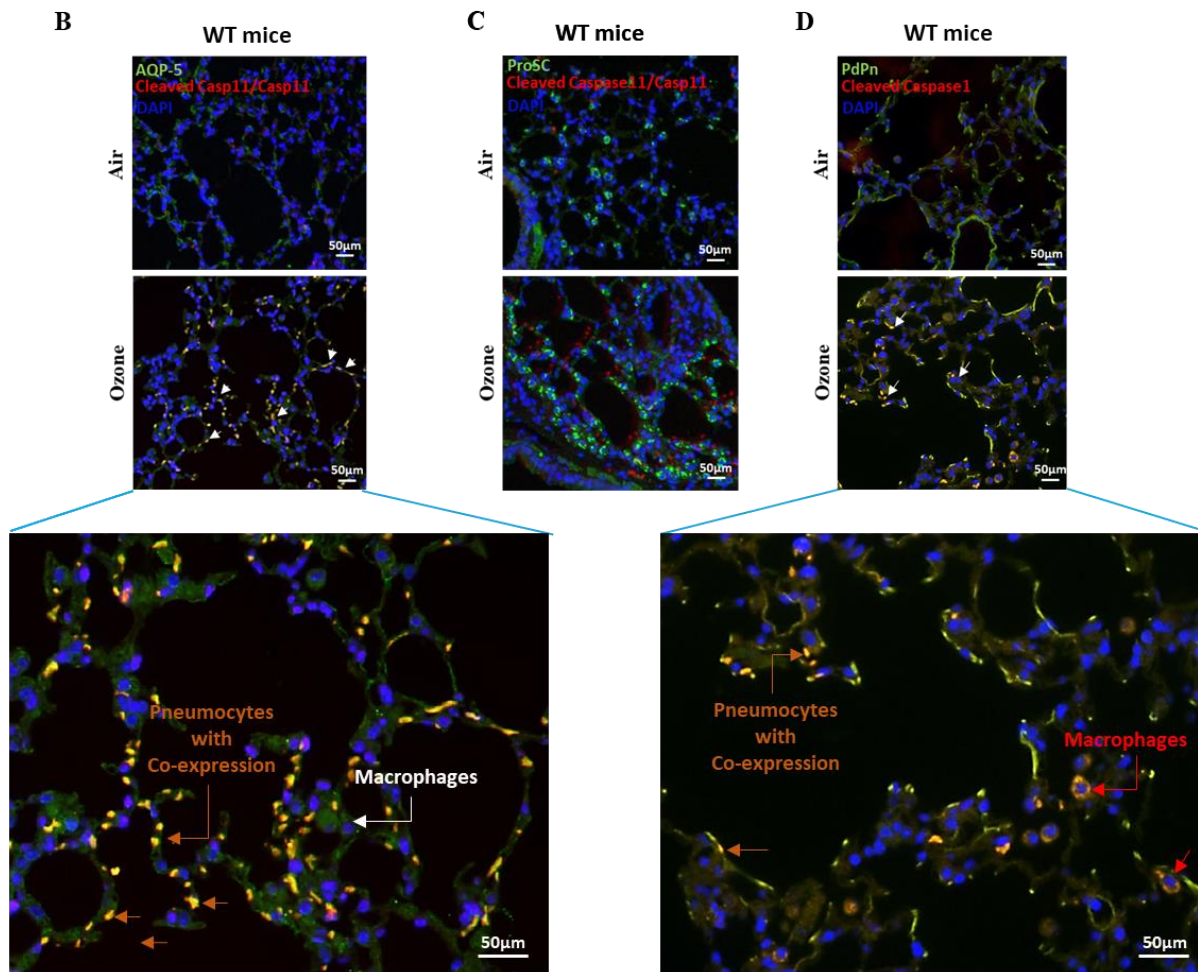
**Figure 6. Apoptosis is reduced in lung epithelial cells and infiltrated cells upon chronic ozone exposure in *Nlrp6* deficient (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) mice.** Immunoblot for total and cleaved caspase3 (A), total and cleaved caspase 8 (B) and ZBP1 proteins in lung homogenates with their associated β-actine as reference for air or ozone exposed WT or *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice were shown. Immunostaining of cleaved caspase 3 in green and nucleus in blue (DAPI), was performed on lung sections (B) and recruited cells in BAL (C) of air or ozone exposed WT, *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice. Data are representative of two experiments using 4-5 mice in each group (Air and Ozone).

## Chronic ozone exposure promotes NLRP6-dependent Caspase-1, Caspase-11 and GSDMD activation in alveolar type 1 pneumocytes

We investigated the involvement of Caspase-1 or Caspase-11 and showed an induction of both Caspase-1 and Caspase-11 total form upon chronic ozone exposure in WT mice in an NLRP6-dependent mechanism (**Fig. 7A**). We next performed immunofluorescence imaging to investigate Caspase expressing cells and showed co-expression of Caspase-11/cleaved Caspase-11 with aquaporin 5 (AQP-5) (**Fig. 7B**) but not with pro-surfactant C (ProSC) (**Fig. 7C**), indicating that Caspase-11 is expressed in alveolar type 1 pneumocytes (**Fig. 7B**) but not in type 2 pneumocytes (**Fig. 7C**). Our data also show Caspase-1 expression in a part of type 1 pneumocytes as well as in some lung infiltrated macrophages (red arrow) (**Fig. 7D**). However, expression of Caspase-11 and its cleaved form are absent in macrophages (white arrow) (**Fig. 7B**).



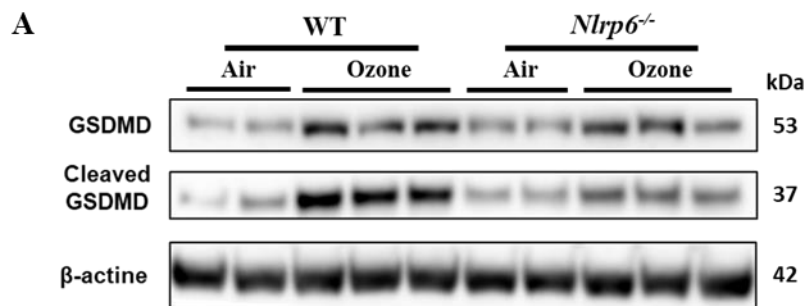


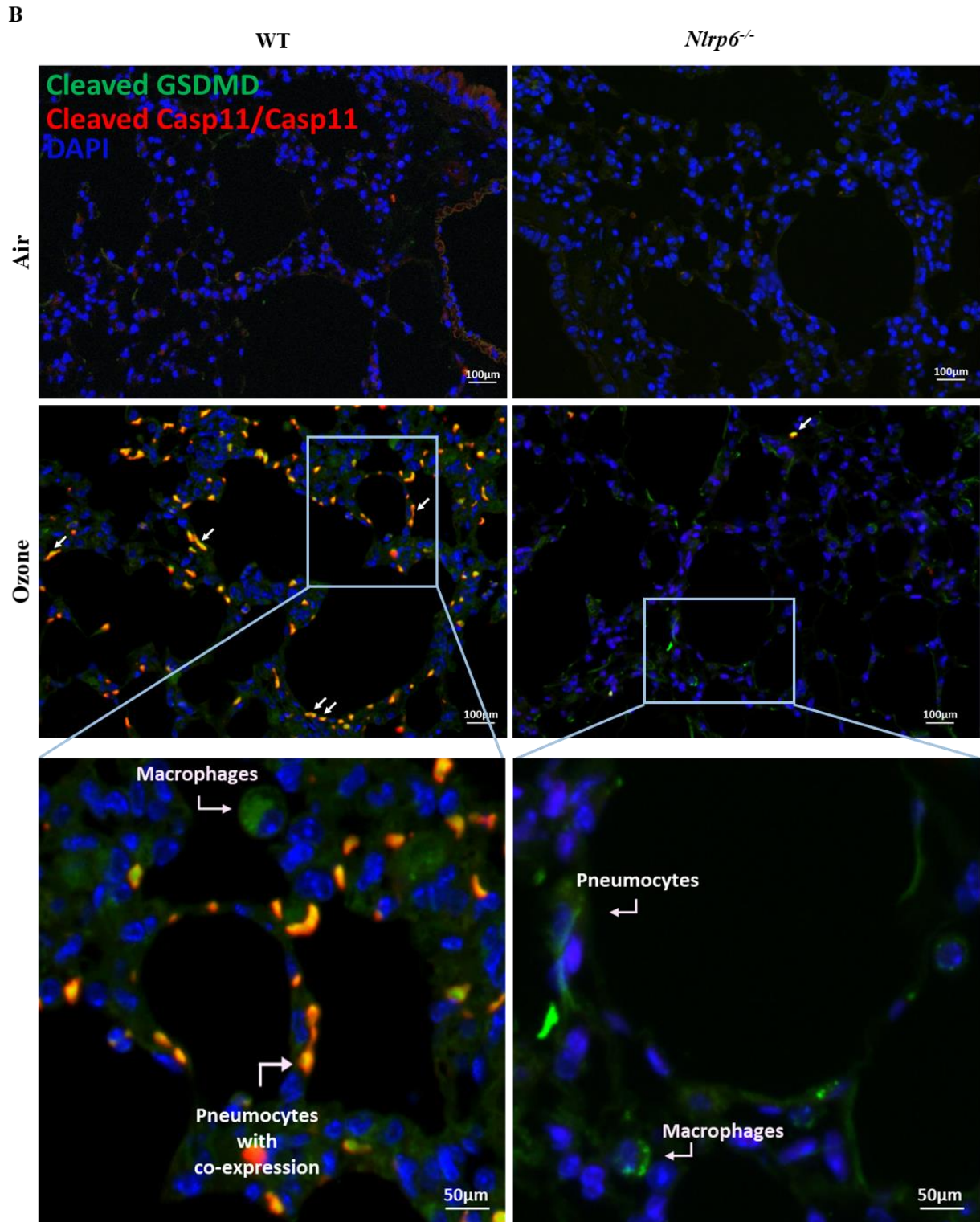


**Figure 7.** GSDMD, caspase 1 and caspase 11 expression and cleavage are reduced in *Nlrp6* deficient (*Nlrp6*<sup>-/-</sup>) mice. Immunoblot caspase1 and caspase11 total and cleaved forms (A) proteins in lung homogenates with their associated  $\beta$ -actin as reference of air or ozone exposed WT or *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice were shown. In WT mice exposed to air or ozone, co-expression in yellow of caspase11/cleaved caspase11 in red, aquaporin 5 (AQP-5) in green and nucleus in blue (DAPI), is shown (B). Absence of co-expression of caspase11/cleaved caspase11 in red, pro-surfactant C (ProSC) in green and nucleus in blue (DAPI), is shown (C). Co-expression in yellow of cleaved caspase1 in red, podoplanine (PdPn) in green and nucleus in blue (DAPI), is shown (D). Data are representative of two experiments using 4-5 mice in each group (Air and Ozone). Data are representative of two experiments using 4-5 mice in each group (Air and Ozone).

We next investigated whether NLRP6 activation leads to Gasdermin D (GSDMD) cleavage. GSDMD is a 53.2 kDa protein that is cleaved by Caspase-1 and/or Caspase-11 upon inflammasomes activation, resulting in the generation of the GSDMD-N p31 fragment. Cleaved GSDMD-N forms pores in the plasma membrane, allowing the release of small cytokine such as members of the IL-1 family and/or ion fluxes that may lead to cell swelling and pyroptosis. We first analyzed the level of the p53 full-length GSDMD and/or the GSDMD-N p31 active form in the lungs of chronic ozone exposed mice by western blot. Chronic ozone exposure increases lung tissue expression of the pro-GSDMD p53 in WT and *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 8A**). We could detect a strong cleaved GSDMD signal in ozone-exposed WT mice and this was strongly reduced in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 8A**).

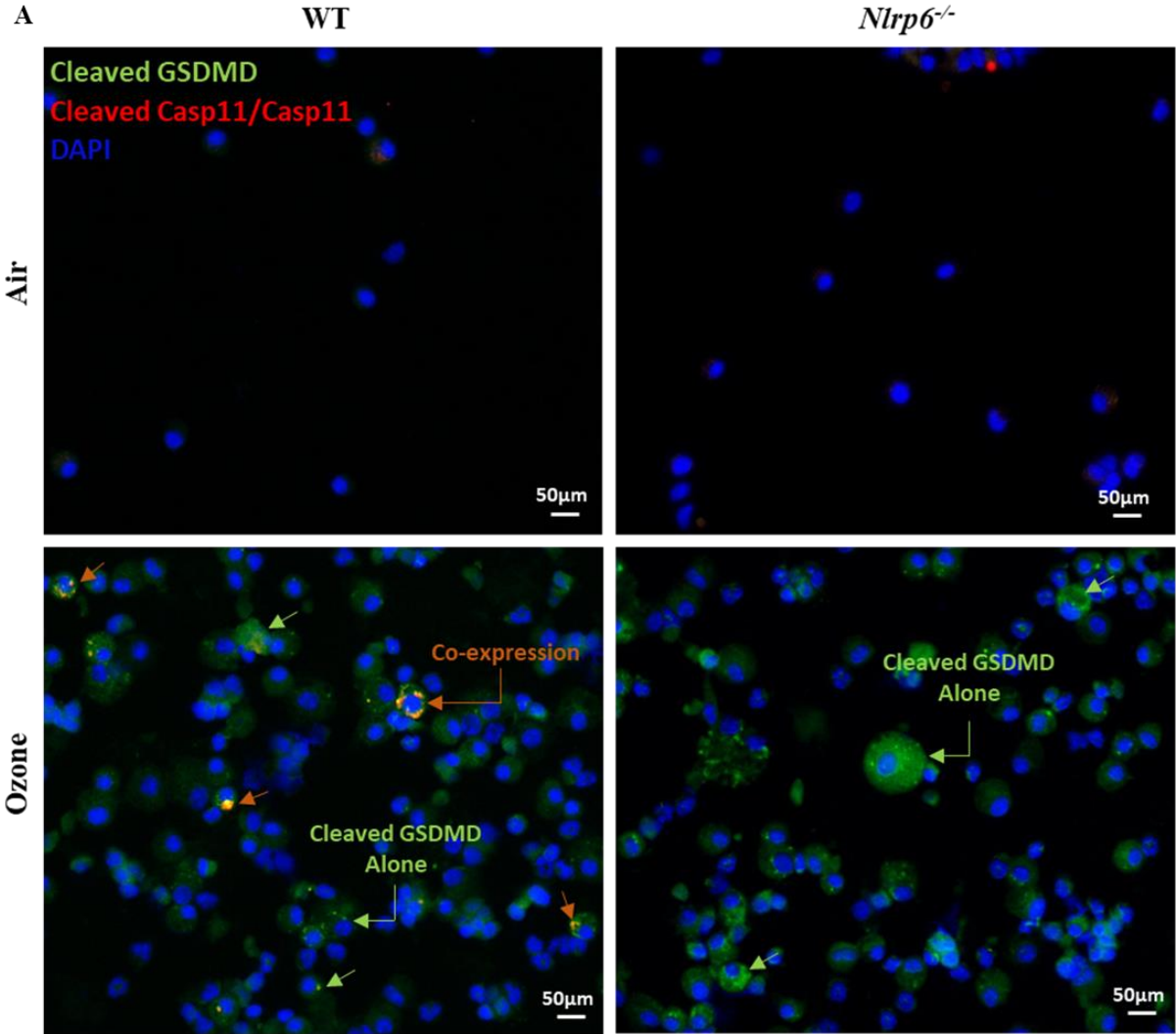
To address whether GSDMD cleavage upon chronic ozone exposure is mediated by NLRP6/Caspase11 activation pathway, we realized Caspase-11 and cleaved GSDMD co-immunostaining in lungs (**Fig. 8B**). We previously showed Caspase-11 is expressed in type 1 pneumocytes (**Fig. 7B**) and here we can clearly observe Caspase-11 expression in GSDMD-positive cells. In contrast, GSDMD activation in lung infiltrating cells does not appear to be NLRP6/Caspase11-dependent since we observed cleaved GSDMD in *Nlrp6*<sup>-/-</sup> lung infiltrating macrophages (**Fig. 8B**).

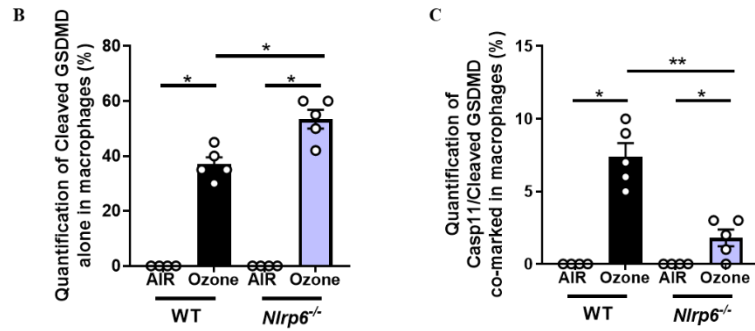




**Figure 8. GSDMD cleavage is through NLRP6/Casp 11 dependent manner in Type 1 pneumocytes cells but not in lung macrophages.** Immunoblot for total and cleaved GSDMD proteins in lung homogenates with their associated  $\beta$ -actin as reference of air or ozone exposed WT or *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice were shown (A). Co-expression in yellow of cleaved GSDMD in green, caspase11/cleaved caspase11 in red and nucleus in blue (DAPI) was performed on lung sections of air or ozone exposed WT or *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice (B). Data are representative of two experiments using 4-5 mice in each group (Air and Ozone).

In addition, a fraction of airway macrophages, identified by their large unit-lobulated DAPI-stained nucleus, showed cleaved GSDMD co-expressed with Caspase-11 in response to chronic ozone exposure of WT mice (Fig. 9A, B and C). In ozone-exposed *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice, cleaved GSDMD was still present in a large fraction of BAL macrophages while no Caspase 11 staining was observed. Therefore, the data suggest GSDMD activation in airway macrophages is independent of NLRP6/Caspase-11 activation.

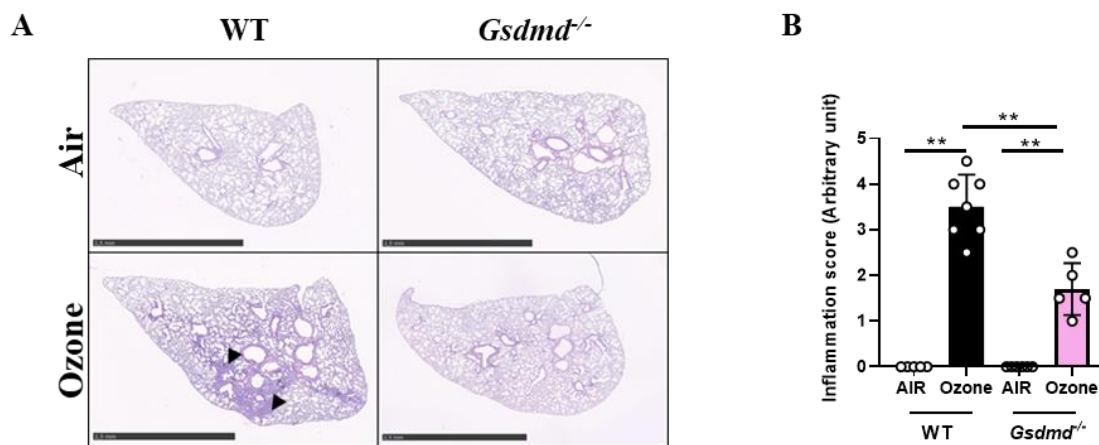


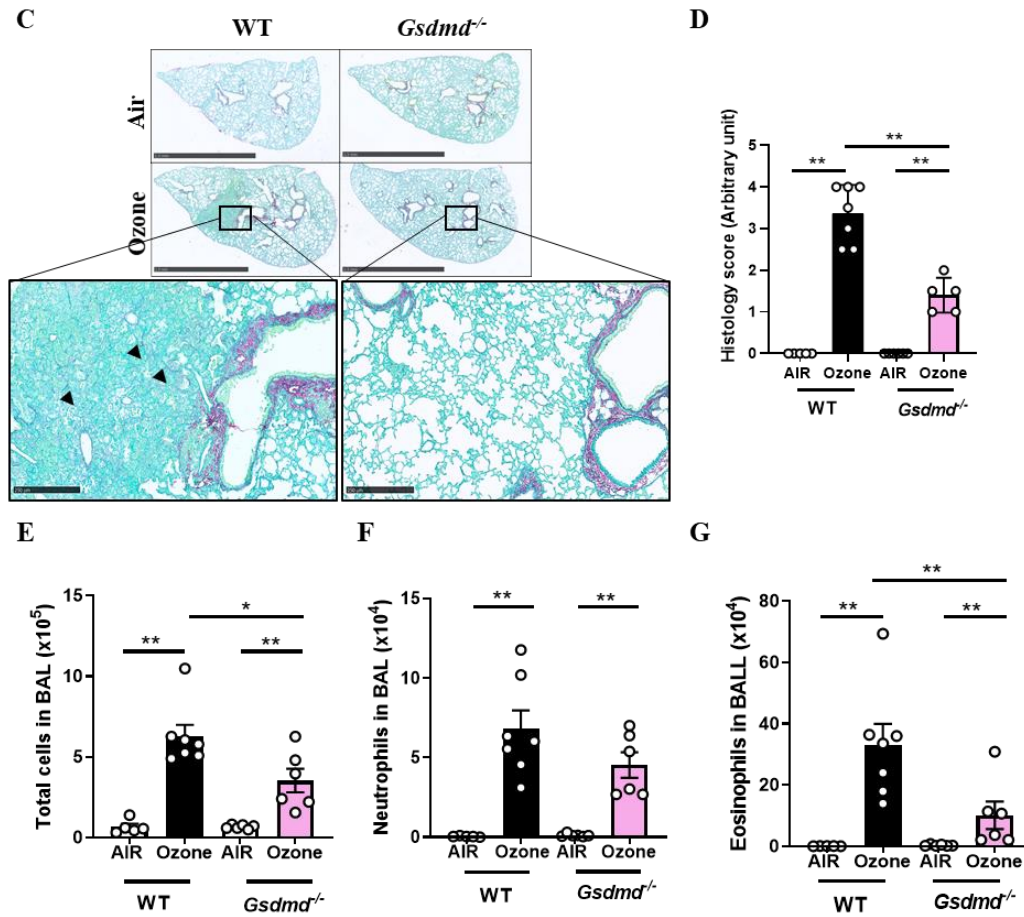


**Figure 9. GSDMD is cleaved through an NLRP6/Casp 11 dependent manner in a part of BAL recruited macrophages.** Co-expression in yellow of cleaved GSDMD in green, caspase11/cleaved caspase11 in red and nucleus in blue (DAPI) was performed on recruited cells in BAL. Quantification of cleaved GSDMD alone (**B**) and co-expressed Casp11 and cleaved GSDMD (**C**). Data are representative of one experiment using 4-5 mice in each group (Air and Ozone).

***Gsdmd* deficiency leads to reduced pulmonary inflammation after chronic ozone exposure.**

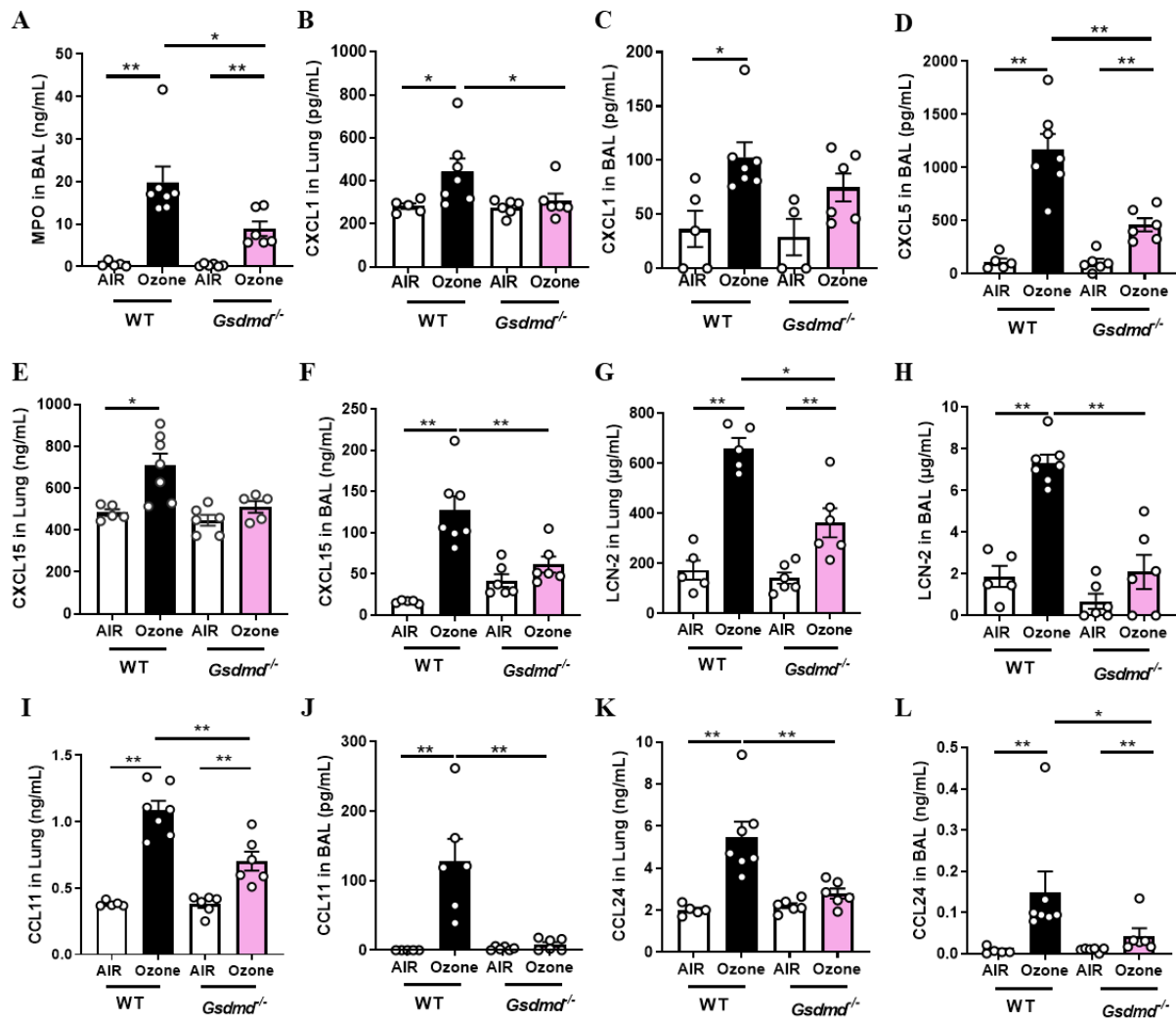
To confirm the involvement of GSDMD in chronic ozone-induced inflammation, WT and *Gsdmd*-deficient (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) mice were exposed to ozone twice a week for six weeks. Lung tissue histology analysis showed increased inflammation in lung tissue of ozone exposed WT mice as compared to air-exposed mice, which was attenuated in ozone-exposed *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 10A and B**). Collagen deposition in the lungs of ozone-exposed WT mice was importantly reduced ozone *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 10C and D**). Total cell (**Fig. 10E**), neutrophils (**Fig. 10F**) and eosinophils (**Fig. 10G**) BAL numbers are reduced in ozone-exposed *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice as compared to WT mice.





**Figure 10. Gasdermin D deficiency (*Gsdmd*<sup>-/-</sup>) reduces cell recruitment in lungs and BAL after chronic ozone exposure in mice.** WT and *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks and histological analysis of pulmonary inflammation and cell recruitment were evaluated from histology sections (A) and inflammation score determined (B). Red Sirius/Fast Green highlighting collagen fibers and red arrows show collagen deposition (C) collagen score was determined (D). Total cells in BAL (E), recruited neutrophils (F), eosinophils (G) are significantly reduced in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> deficient mice compared to WT mice. Data are representative of one experiments and are expressed as mean values ± SEM (n= 6-9 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).

In addition, CXCL1, CXCL15, LCN-2, CCL11 and CCL24 levels in lungs and BAL as well as MPO and CXCL5 in BAL were significantly elevated in ozone-exposed WT mice and reduced in ozone-exposed *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 11A to L). These results indicate that GSDMD plays an important role in lung inflammation in response to chronic ozone exposure.

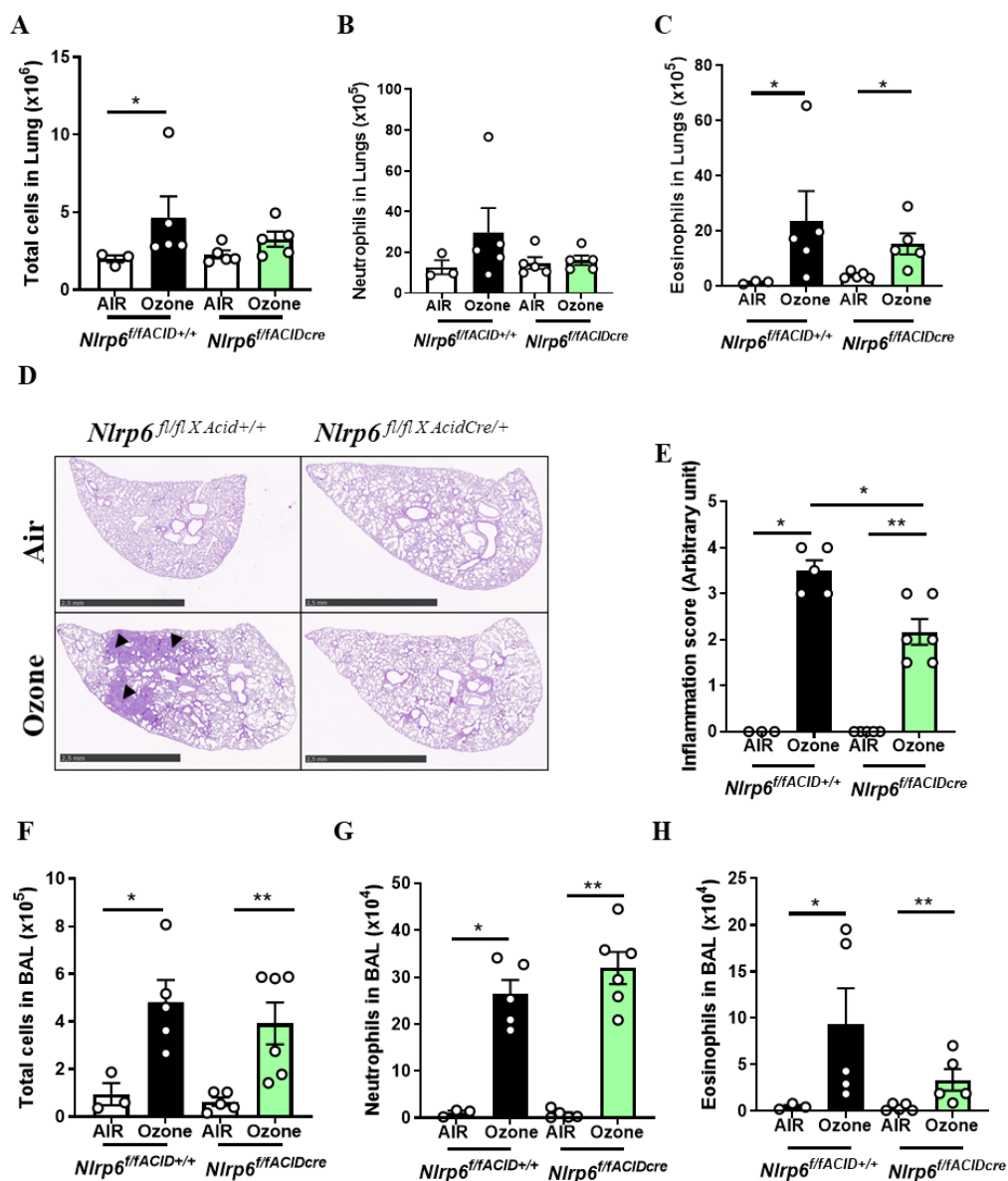


**Figure 11. Gasdermin D deficiency *Gsdmd*<sup>-/-</sup> decrease cytokines and chemokines parameters involved in neutrophils and eosinophils recruitment after chronic ozone exposure in mice.** WT and *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks. Myeloperoxidase (MPO) in BAL (A). CXCL1, CXCL15 (B, C and E, F) in lungs and BAL were reduced as well as CXCL5 in BAL (D) and LCN-2 (G, H) in lungs and BAL in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice compared to WT Ozone exposed mice. CCL11 (I, J) and CCL24 (K, L) in lungs and BAL were also reduced in *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice compared to WT exposed mice. Data are representative of one experiments and are expressed as mean values ± SEM (n= 5-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).

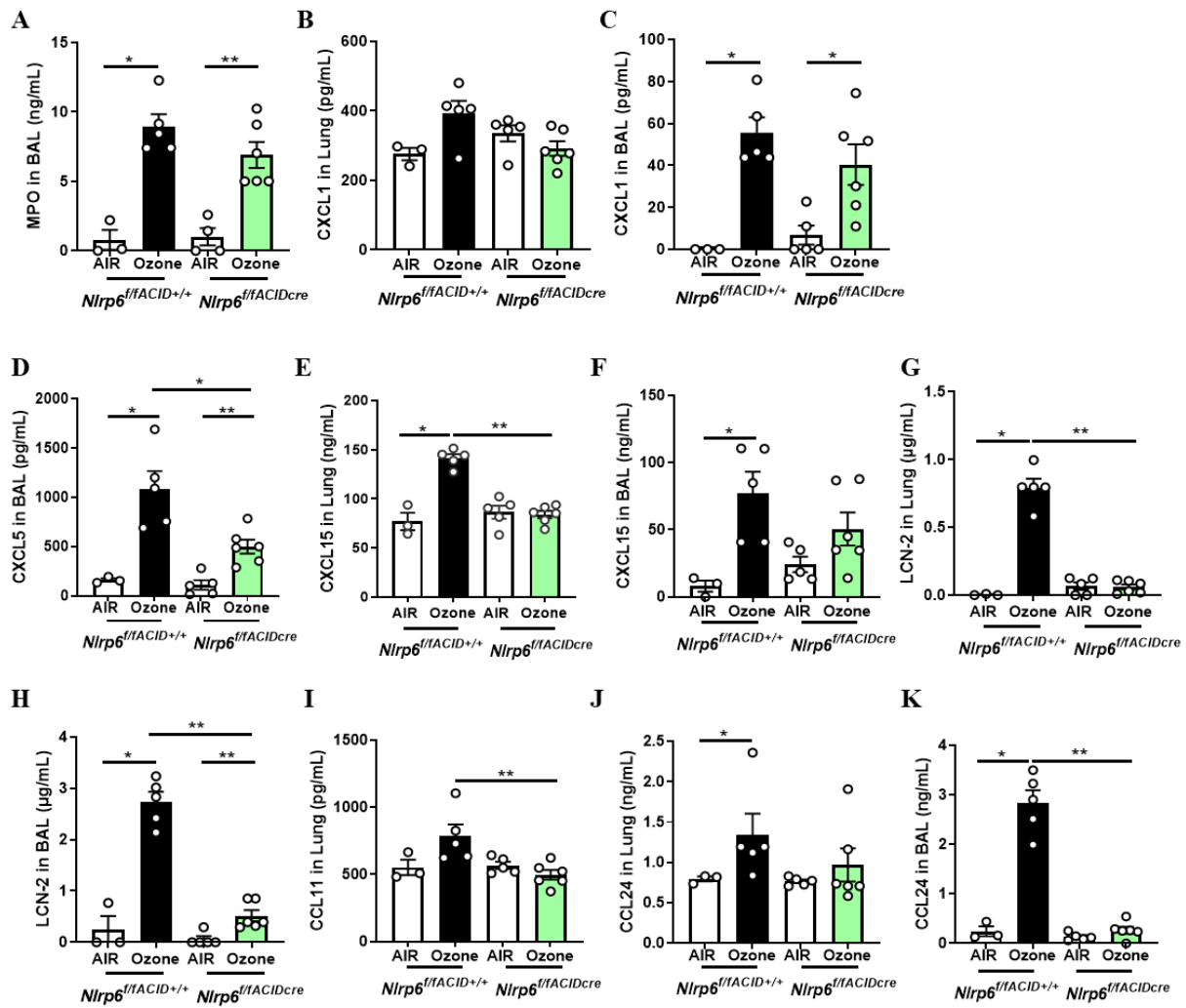
### Specific *Nlrp6* deficiency in type 1 pneumocytes dampers pulmonary inflammation to ozone

To confirm that *Nlrp6* expression we observed in type 1 pneumocytes and bronchial epithelial cells is implicated in response to chronic ozone exposure, we generated mice deficient for *Nlrp6* specifically in aquaporin-expressing lung cells (*Nlrp6*<sup>fl/fl X AcidCre/+</sup>) as well as their control littermate (*Nlrp6*<sup>fl/fl X Acid+/+</sup>) mice and exposed them to ozone twice a week for six weeks. Total cell (**Fig. 12A**), neutrophils (**Fig. 12B**) and eosinophils (**Fig. 12C**) recruited in lungs were reduced in *Nlrp6*<sup>fl/fl X AcidCre/+</sup> as compared to *Nlrp6*<sup>fl/fl X Acid+/+</sup> control mice. Histological analysis showed increased inflammation in lung tissue of ozone-exposed *Nlrp6*<sup>fl/fl X Acid+/+</sup> control mice as compared to air-exposed mice, which was attenuated in ozone-exposed *Nlrp6*<sup>fl/fl X AcidCre/+</sup> mice (**Fig. 12D and E**). Total cell (**Fig. 12F**) and eosinophils (**Fig. 12H**) in BAL were importantly decrease, while neutrophils were not (**Fig. 12G**) in *Nlrp6*<sup>fl/fl X AcidCre/+</sup> as compared to *Nlrp6*<sup>fl/fl X Acid+/+</sup>. In addition, we observed a global decrease of inflammatory parameters including MPO, CXCL1, CXCL15, LCN-2 in lungs and BAL as well as CXCL5 in BAL ozone-exposed *Nlrp6*<sup>fl/fl X AcidCre/+</sup> mice as compared to *Nlrp6*<sup>fl/fl X Acid+/+</sup> mice (**Fig. 13A to H**). We also observed an important ozone-mediated induction of CCL11 in lungs and CCL24 in lungs and BAL of *Nlrp6*<sup>fl/fl X AcidCre/+</sup> mice as compared to *Nlrp6*<sup>fl/fl X Acid+/+</sup> mice (**Fig. 13I to K**).



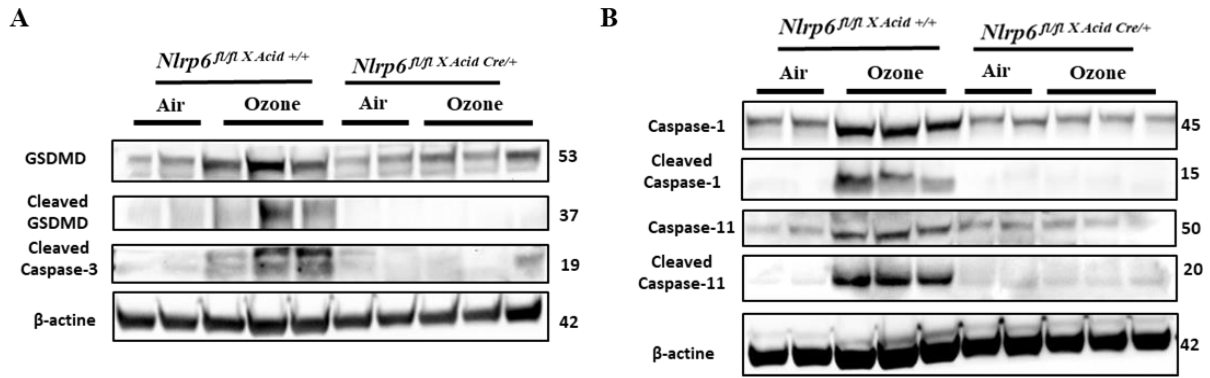


**Figure 12.** *Nlrp6* deficiency in type 1 pneumocytes (*Nlrp6<sup>fl/fl</sup>X.Acid<sup>Cre/+</sup>*) reduces cell recruitment in lungs and BAL after chronic ozone exposure in mice. *Nlrp6<sup>fl/fl</sup>X.Acid<sup>+/+</sup>* and *Nlrp6<sup>fl/fl</sup>X.Acid<sup>Cre/+</sup>* mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks. Total cells in lungs (A), recruited neutrophils (B), eosinophils (C) are reduced in *Nlrp6<sup>fl/fl</sup>X.Acid<sup>Cre/+</sup>* deficient mice compared to their relative controls, *Nlrp6<sup>fl/fl</sup>X.Acid<sup>+/+</sup>* mice. Histological analysis of pulmonary inflammation and cell recruitment were evaluated from histology sections (D) and inflammation score determined (E). Total cells in BAL (F), recruited neutrophils (G), eosinophils (H) are shown. Data are representative of one experiments and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 5-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).



**Figure 13.** *Nlrp6* deficiency in type 1 pneumocytes (*Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>+/+</sup>*) decrease cytokines and chemokines parameters involved in neutrophils and eosinophils recruitment after chronic ozone exposure in mice. *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>+/+</sup>* and *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>-/+</sup>* mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks. Myeloperoxidase (MPO) in BAL (A). CXCL1, CXCL15 (B, C and E, F) in lungs and BAL were reduced as well as CXCL5 in BAL (D) and LCN-2 (G, H) in lungs and BAL in *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>-/+</sup>* mice compared to WT Ozone exposed mice. CCL11 (I) in BAL and CCL24 (J, K) in lungs and BAL were also reduced in *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>-/+</sup>* mice compared to *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X AcidCre<sup>+/+</sup>* exposed mice. Data are representative of one experiments and are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n= 5-6 mice per group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, using a Mann Whitney test).

In conclusion, we report a decrease of cellular inflammation with attenuated cytokines and chemokines production in mice deficient for *Nlrp6* in type 1 pneumocytes in comparison to their relative controls.



**Figure 14. *Nlrp6* deficiency in type 1 pneumocytes (*Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acid<sup>Cre/+</sup>*) leads to a decrease of GSDMD, caspase 3, caspase 1 and caspase 11 expression and cleavage in lungs.** Immunoblot for cleaved caspase 3, total and cleaved GSDMD (A), caspase1 and caspase11 total and cleaved forms (B) proteins in lung homogenates with their associated β-actine as reference of air or ozone exposed *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acid<sup>+/+</sup>* or *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acid<sup>Cre/+</sup>* mice were shown. Data are representative of one experiments using 5-6 mice in each group (Air and Ozone). Data are representative of two experiments using 4-5 mice in each group (Air and Ozone).

We investigate if this tissue specific deficiency leads to a decrease of Caspases 3, and Caspases 1/11) and GSDMD expression and cleavage in lungs and further investigated whether Caspase 3, Caspases 1/11 and GSDMD expression and cleavage in lungs. By western blot analysis, we observe that ozone exposure increased protein expression of total Caspase-1, Caspase-11 and GSDMD in *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acid<sup>+/+</sup>* control mice that was reduced in ozone exposed *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acid<sup>Cre</sup>* (Fig. 14A and B). Very importantly, we showed a drastic decrease of Caspase-3, Caspase-1, Caspase-11 and GSDMD cleaved forms in lungs from ozone exposed *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acid<sup>Cre/+</sup>* in comparison to *Nlrp6<sup>fl/fl</sup> X Acid<sup>+/+</sup>*.

Together, these results demonstrate that *Nlrp6* expression in type 1 pneumocytes mediates Caspase-3, Caspase-1, Caspase-11 and GSDMD activation in lung tissue and pulmonary inflammation to chronic ozone exposure

## DISCUSSION

Here, we investigated the unknown role of NLRP6 inflammasome in sterile pulmonary inflammation induced by chronic ozone exposure in mice and we demonstrated that NLRP6 plays an important role in ozone induced lung inflammation, remodeling, fibrosis and emphysema

First, we reported NLRP6 protein expression in lungs upon sterile inflammation that is very poorly described. We showed an increase of NLRP6 protein expression upon chronic ozone exposure in mice essentially in pneumocytes, a part of bronchial epithelial cells, airways and lungs infiltrated macrophages. We previously observed NLRP6 expression in bronchial epithelial cells upon acute smoke cigarette exposure (*Manuscript submitted*). Recent studies report NLRP6 protein expression in lungs in a model of inflammation-related lung tumorigenesis induced by local instillation of benzo(a)pyrene with LPS (*Gao et al., 2019*) and also in mice after bacterial infection in key innate immune cells such as neutrophils macrophages and also epithelial cells (*Ghimire et al., 2018 & Cai S et al., 2021*).

Here, we highlighted an important decrease of inflammatory parameters as neutrophils and eosinophils influx known to play an important role in multiple lung pathogenesis such as COPD (*Barnes et al., 2014 & Li et al., 2013 & Li et al., 2016*), cytokines/chemokines and eotaxins release as well as remodeling factors in lungs and bronchoalveolar space, reduced emphysema and mucus secretion in *Nlrp6* deficient mice. Further these mice also displayed a decrease of collagen release in bronchoalveolar space, fibrotic foci, features of fibrosis. Mice exposed to chronic ozone display an increase of fibrotic markers including TGF- $\beta$ , collagen and smooth muscle actin (*Katre et al., 2011*). NLRP6 negatively regulates pulmonary host defense in Gram-positive bacterial infection through modulating neutrophil recruitment and function (*Ghimire et al., 2018 & Cai et al., 2018*). NLRP6 was shown to regulate both neutrophilic and eosinophilic inflammation, collagen deposition and fibrotic processes in liver in schistosomiasis-associated pathology (*Sanches et al., 2020*).

We further demonstrated chronic ozone exposure promotes NLRP6-dependent Caspase-11 and GSDMD activation in alveolar type 1 pneumocytes (AT1). Regarding Caspase 1, its cleaved form was slightly detected in AT1 cells but strongly expressed in lung infiltrating macrophages.

Importantly, we showed for the first time NLRP6/Caspase 11 or possibly NLRP6/Caspase-1/Caspase-11 inflammasome expressed in type 1 pneumocytes leads to GSDMD activation in sterile lung injury-

induced inflammation. According to our results, Caspase 1, Caspase 11 and GSDMD were activated dependently on NLRP6 after lung bacterial infection in mice (*Ghimire et al., 2018 & Hara et al., 2018*).

However, in our model, decreased Caspase-11 activation in NLRP6 deficient mice might reduce NLRP3/Caspase 1 activation (*Cerqueira et al., 2018*). GSDMD activation that leads to GSDMD-forming pores may drive inflammatory pro-cytokines release such as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or pyroptosis cell death (*Broz et al., 2015 & Heilig et al., 2018 & Broz et al., 2020*). We confirmed that GSDMD pore-forming protein is involved in chronic ozone response since *Gsdmd*<sup>-/-</sup> display a strong decrease of multiple inflammatory parameters. In addition, we confirmed that NLRP6 expressed in AT1 cells, mediate ozone-induced inflammation upon chronic ozone exposure using a mouse strain carrying selective NLRP6 deficiency in AT1 cells (*Flodby et al., 2010*). NLRP6 deficiency in AT1 cells was enough to reduce lung inflammation and impair Caspase-1, Caspase-3, Caspase-11 and GSDMD activation in lung tissue of chronically ozone exposed mice. Our data suggest for the first time the formation of an NLRP6-Caspase-1-11 inflammasome in AT1 cells.

In addition, we showed for the first time pulmonary NLRP6-dependent Caspase-3 and caspase-8 activation in lung epithelial cells and infiltrating cells for caspase-3, indicating NLRP6-dependent apoptotic cell death. Concomitant protein expression of NLRP6, NLRP3 and Caspase-3 was evoked in a murine model of liver injury (*Yang et al., 2016*). Caspase-8 activation in response to ROS-mediated damages in low humidity- and high osmolality-induced dry eye disease was shown to regulate NLRP3/NLRP6 inflammasomes imbalanced activity (*Chi et al., 2017*). However, recent studies showed that Gasdermin E cleavage by Caspase-3 converts apoptosis to pyroptosis (*Rogers et al., 2016 & Wang et al., 2017*) and Caspase-8 was also involved in inflammation through induction of Gasdermin D, Gasdermin E activation and pyroptosis induction (*Kang et al., 2022*).

Interestingly, we showed NLRP6-dependent lung expression of Z-DNA combined protein-1 (ZBP1) necroptosis marker, suggesting a role of NLRP6 in lung necroptotic cell death in response to chronic ozone exposure. Increased ZBP1 expression was associated with necroptosis-associated inflammation with activation of receptor interacting protein kinase receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3 (RIPK1/RIPK3) and the pseudokinase, mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL). Following activation, RIPK3 phosphorylates MLKL that promotes MLKL oligomerization,

translocation to the plasma membrane and subsequent membrane permeabilisation (*Dhuriya and Sharma, 2018*). However, necroptosis was reported to occur when apoptotic signals are blocked and in particular when Caspase-8 activity is inhibited leading to RIPK1, RIPK3 and MLKL-forming necrosomes and MLKL pore formation at the plasma membrane. Recent studies revealed an unexpected amount of crosstalk between pyroptosis, apoptosis and necroptosis that leads to a newly concept of immunogenic cell death termed PANoptosis for Pyroptosis with both Apoptosis and Necroptosis (*Pandian et Kanneganti., 2022*).

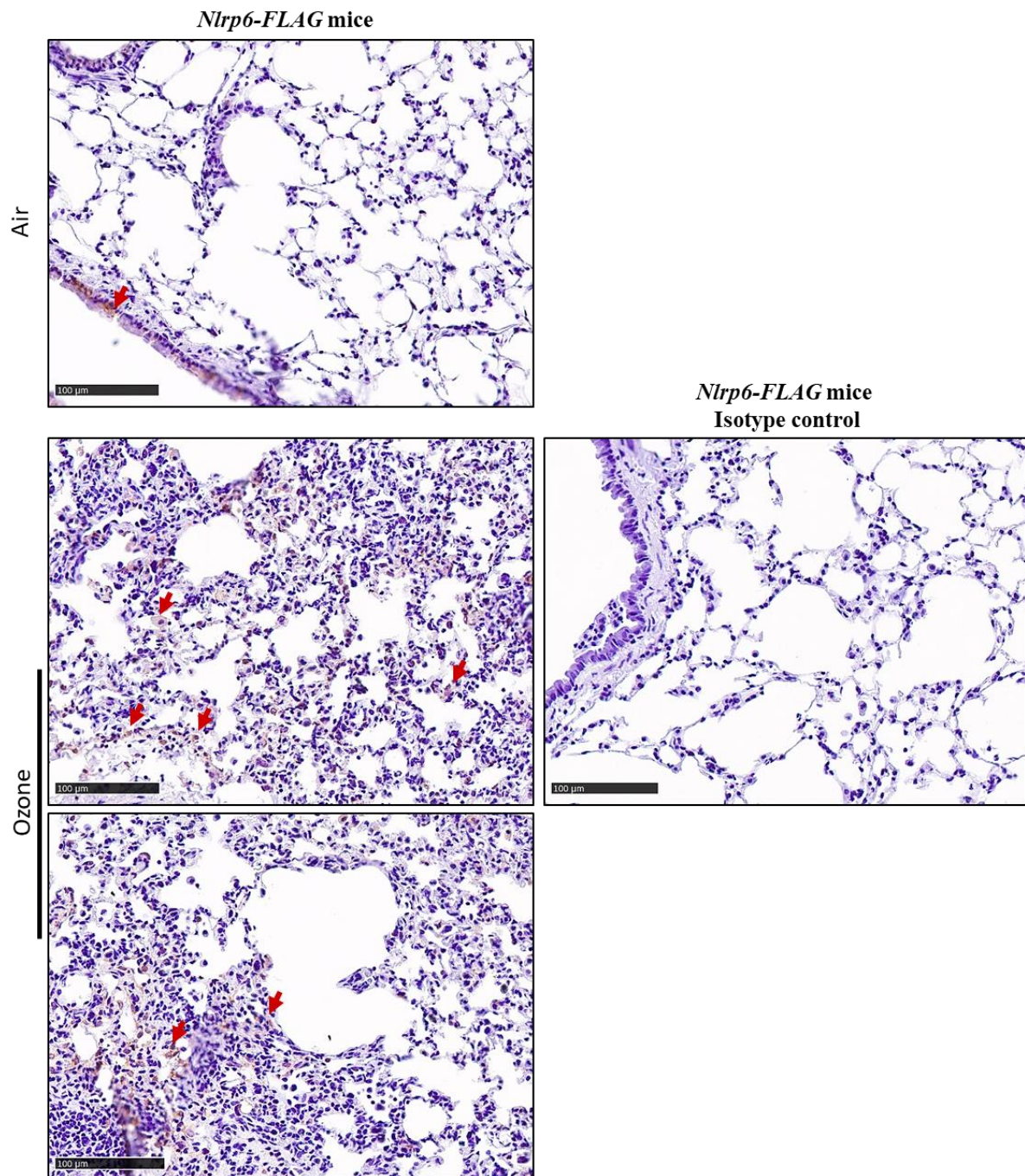
Interestingly, ZBP1 nucleic acid sensor was described as a master regulator in innate immunity that play vital roles in the regulation of RIPK1/RIPK3–FADD–Caspase-8 cell death complex assembly and its versatility in executing PANoptosis (*Malireddi et al., 2019*). ZBP1 activation leads to its interaction with RIPK3 and Caspase-8 recruitment to form cell death signaling scaffolds. This ZBP1-RIPK3-CASP8 complex engages NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis, CASP8-mediated apoptosis, and RIPK3-MLKL driven necroptosis (*Malireddi et al., 2019*).

Only one study reported that NLRP6 triggers necroptosis of both hematopoietic and resident lung cells upon *S. Aureus* infection in mice, leading to hyper-inflammation (*Ghimire et al., 2018*). Further investigations are needed to characterized MLKL pores forming at the cellular membrane to confirm necroptosis in our model.

Altogether, we demonstrate for the first time that NLRP6 drives sterile lung inflammation upon chronic ozone exposure, probably through the formation of an NLRP6-Caspase-1-11 inflammasome in AT1 cells. In addition, NLRP6-dependent ZBP1 expression and activation of Caspase-3, Caspase-8 in lung are reminiscent of a potential formation of a PANoptosome complex in type 1 pneumocytes. However, further studies have to be performed in order to understand NLRP6-dependent mechanisms of immunogenic cell deaths involved in pulmonary inflammation and disease upon chronic ozone exposure.

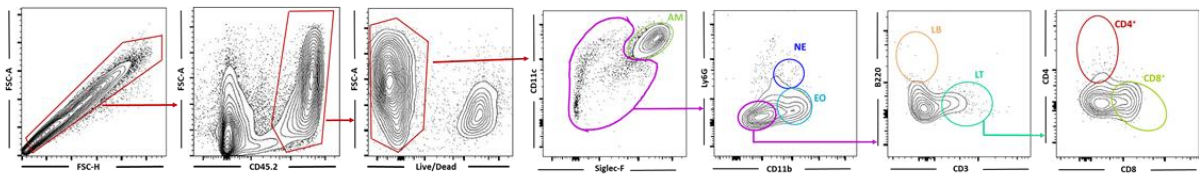
## Supplementary data

### NLRP6-FLAG expression in lung tissue

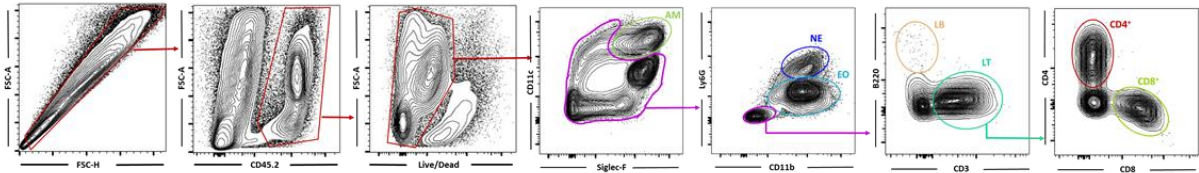


**Figure Supp 1. NLRP6 is increased by chronic ozone exposure in lungs and lung recruited macrophages.** *Nlrp6-FLAG* mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks. NLRP6 expression was shown using an antibody that targeting FLAG region attached to the Nlrp6 ending region. FLAG immunostaining is in brown in lung sections and showed with red arrows. Data are representative of one experiment using 3-4 mice in each group (Air and Ozone).

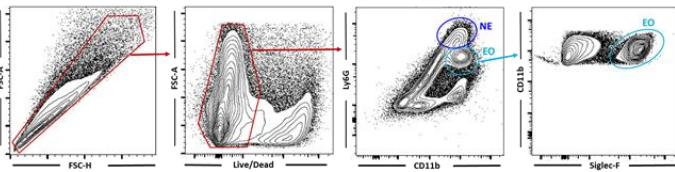
**A Entire gating in BAL of Air WT mice**



**B Entire gating in BAL of ozone WT mice**



**C Entire gating in Lungs of ozone WT mice**



**Figure Supp 2. FACS used gating for lung and BAL cell count.** WT, *Nlrp6*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Nlrp6*<sup>flloxAcidCre</sup> mice were exposed to Ozone or air during 6 weeks. Gating for air mice (A) ozone mice (B) and lungs of ozone mice (C) are shown. Data are representative of 4 experiments using 5-8 mice in each group (Air and Ozone).



# DISCUSSION

La consommation de tabac et l'exposition à des polluants de l'air issus de l'activité humaine comme l'ozone, peuvent conduire à des dommages pulmonaires : tout dépend de la dose, du temps d'exposition et de l'état immunitaire de chacun. Une consommation de tabac occasionnelle peut induire une inflammation pulmonaire. Il est d'ailleurs important de prendre en compte les expositions passives au tabac qui peuvent elles aussi être responsables de dommages. Le tabagisme, sur le long terme peut donner lieu à l'apparition de bronchopneumopathies chroniques obstructives (**BPCO**) puisque 80% des patients atteints de cette pathologie sont fumeurs ou anciens fumeurs et 90% des cancers du poumon sont attribuables au tabac. La consommation de ce dernier tout comme la BPCO, sont aujourd'hui des problèmes de santé majeurs auxquels s'ajoute l'augmentation de la pollution par l'ozone qui expose les personnes atteintes de pathologies pulmonaires à une aggravation de leurs symptômes. Si l'ozone atmosphérique continue à croître comme c'est le cas depuis ces 20 dernières années, il n'est pas aberrant d'imaginer que l'ensemble de la population soit concerné par les effets de l'ozone dans un futur proche.

Malheureusement, la prise en charge tardive de la BPCO permet seulement de soulager le quotidien des patients en essayant de ne pas aggraver leurs symptômes et leurs maux mais il n'existe pas de réel traitement. L'arrêt de la consommation de tabac est sans conteste le meilleur moyen de ne pas développer une BPCO.

En prenant compte de l'ensemble de ces paramètres, il semble aujourd'hui incontournable d'étudier les mécanismes qui régissent l'inflammation pulmonaire dans des phases précoces de telles pathologies et d'identifier des acteurs clés impliqués dans les mécanismes inflammatoires.

Ces travaux de thèse m'ont permis d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'inflammation pulmonaire provoquée par une exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone. Par l'utilisation de ces modèles murins, nous avons mis en évidence l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 et l'activation de la Gasdermine D dans la mise en place de l'inflammation pulmonaire.

### A propos des modèles d'étude

D'une part, nous avons utilisé deux modèles d'exposition à la fumée de cigarette, un modèle sub-chronique pour étudier l'implication du récepteur NLRP3 dans la réponse inflammatoire pulmonaire et un modèle aigu nous permettant d'étudier les effets à court terme d'une exposition à la fumée de cigarette et l'implication de NLRP3 et de la Gasdermine D. D'autre part, nous avons utilisé le modèle d'étude chronique d'exposition à l'ozone qui mime dans une certaine mesure la pathologie de la BPCO, l'ensemble du phénotype retrouvé chez ces souris exposées étant représentatif des symptômes observés chez les patients (*Triantaphyllopoulos et al., 2011*). Ce modèle nous a permis d'étudier l'implication du récepteur NLRP6 et de la Gasdermine D dans l'inflammation pulmonaire stérile.

Les modèles expérimentaux d'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone peuvent être critiquables et difficilement comparable à ce qui est décrit dans la littérature dans la mesure où ils peuvent présenter quelques variables en terme de dose administrée à chaque souris, durée d'exposition

ou encore l'intensité d'exposition, d'une étude à l'autre. Concernant le modèle chronique d'exposition à l'ozone, nous avons comparé nos études avec les résultats déjà obtenus au laboratoire ayant fait l'objet de publications pour valider nos expériences.

Dans ces trois modèles, nous pourrions étudier les effets d'une exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone couplé à une infection bactérienne, ce qui mimerait les phases d'exacerbations de la BPCO par exemple.

Dans le modèle d'exposition chronique à l'ozone de 6 semaines, nous pourrions étudier l'implication du récepteur NLRP3 compte tenu des résultats que nous avons eu dans le modèle d'exposition à la fumée de cigarette. D'autre part, l'ensemble de la littérature montre des résultats controversés sur l'effet pro- ou anti-inflammatoire du récepteur NLRP3 dans la réponse inflammatoire pulmonaire. D'ailleurs, une récente étude a montré une régulation entre l'effet pro-inflammatoire de NLRP3 contrebalancé par l'effet anti-inflammatoire de NLRP6 dans un modèle de pathologie oculaire, impliquant l'activation de la Caspase 8 (*Chi et al., 2017*).

De plus, il serait intéressant d'utiliser le modèle d'exposition à l'ozone pour mener une étude cinétique de la mise en place de l'inflammation pulmonaire et l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 dans cette dernière. Pour ce faire, le modèle d'exposition aigu (1 exposition avec un sacrifice 16h plus tard déjà utilisé au laboratoire) (*Michaudel et al., 2018*) serait utilisé puis poursuivi avec 2 expositions par semaines à raison de 1h30 et 1.5ppm et un sacrifice des souris à la semaine 2, 3, 4, 5 et 6, afin d'analyser l'évolution progressive de l'inflammation pulmonaire. Ce qui nous permettrait d'avoir une idée de la progression de l'inflammation et par exemple de la chronologie de l'apparition des différentes morts cellulaires.

### Les cellules épithéliales au cœur de l'inflammation pulmonaire stérile

Les cellules épithéliales pulmonaires sont en contact direct avec l'extérieur et donc avec les polluants de la fumée de cigarette et atmosphériques comme l'ozone. Elles jouent donc un rôle primordial dans la mise en place de la réponse inflammatoire pulmonaire en détectant les signaux de dangers et induisant grâce à la sécrétion de cytokines/chimiokines, le recrutement des neutrophiles et éosinophiles dans le tissu pulmonaire et l'espace bronchoalvéolaire.

Nous avons pu mettre en évidence dans le modèle aigu d'exposition à la fumée de cigarette que le clivage de la Gasdermine D se fait de manière dépendante du récepteur NLRP3 dans les cellules épithéliales bronchiques ce qui suggère l'induction de la pyroptose dans ce type cellulaire ou une libération d'alarmine dépendante de la formation de pores à la membrane par la Gasdermine D qui participe au recrutement cellulaire par exemple. Une diminution conséquente de l'alarmine IL-1 $\beta$  dans les poumons et l'espace bronchoalvéolaire chez les souris déficientes pour NLRP3 est constaté après exposition aiguë à la fumée de cigarette. Nous faisons l'hypothèse que l'IL1- $\beta$  est sécrétée par les

cellules épithéliales pulmonaires suite à l'activation de la Gasdermine D de façon dépendante du récepteur NLRP3. Une autre possibilité est que l'IL-1 $\beta$  soit sécrétée par les neutrophiles recrutés via l'activation du récepteur NLRP3 présent dans les cellules épithéliales pulmonaires comme montré dans une étude sur l'asthme sévère (*Marshall et al., 2021*). Etant donné la diminution des neutrophiles recrutés dans l'espace bronchoalvéolaire, les deux hypothèses semblent possibles. Nous pourrions essayer de mieux caractériser les conséquences de l'activation de la Gasdermine D au niveau des cellules épithéliales bronchiques dans ce modèle d'inflammation pulmonaire d'exposition aiguë à la fumée de cigarette.

Dans le second modèle d'exposition chronique à l'ozone, nous avons mis en évidence l'expression du récepteur NLRP6 dans les cellules épithéliales bronchiques et les pneumocytes. Nous avons ensuite montré que le clivage de la Gasdermine D au niveau des pneumocytes de type 1 est majoritairement dépendant du récepteur NLRP6 et de la Caspase 11 bien que la Caspase 1 soit aussi activée dans une petite proportion de ces cellules.

Dans la littérature, l'activation de l'inflammasome NLRP6/Caspase 11/Caspase 1 a été décrite dans plusieurs modèles infectieux (*Ghimire et al., 2020*). Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'un tel inflammasome soit formé dans les pneumocytes de type 1 après exposition chronique à l'ozone.

Par ailleurs, l'activation de la Caspase 1 peut aussi se faire indirectement via l'activation de la Caspase 11 qui clive la Gasdermine D, conduisant ainsi à la libération d'alarmines qui elles-mêmes vont activer l'inflammasome NLRP3/Caspase 1 (*Cerqueira et al., 2018*). Il s'agirait donc de savoir si le récepteur NLRP6 est en amont de l'activation de la Caspase 11. Pour ce faire, nous pourrions analyser l'expression des protéines qui composent l'inflammasome NLRP3/Caspase 1 chez des souris sauvages et déficientes pour NLRP6 après exposition chronique à l'ozone et voir si l'on observe une diminution de l'inflammasome NLRP3/Caspase 1 chez les souris déficientes pour le récepteur NLRP6. De plus, en utilisant des souris déficientes pour le récepteur NLRP3, nous pourrions savoir si le clivage de la Caspase 1 est diminué dans la population de pneumocytes de type 1 qui l'exprime et conclure sur le rôle du récepteur NLRP3.

Enfin, nous pourrions dans notre modèle d'exposition chronique à l'ozone regarder premièrement si la Caspase 1 est exprimée dans les pneumocytes de type 2 et deuxièmement nous intéresser à ce type cellulaire puisqu'il permet le renouvellement des pneumocytes de type 1 et la production de surfactant important pour le maintien d'alvéoles pulmonaires intègres.

## Une sécrétion de mucus dépendante de NLRP6 au niveau des cellules épithéliales pulmonaires ?

Dans bon nombre de pathologies pulmonaires et notamment dans la BPCO, la surproduction d'un mucus fait partie des symptômes les plus gênants au quotidien pour les patients. Or, nous avons constaté que l'ozone induit une sécrétion de mucus chez les souris sauvages et que ce paramètre est diminué chez les souris déficientes pour NLRP6. Tout d'abord, nous pouvons nous demander si cette diminution n'est pas due à la diminution globale de l'inflammation chez ces souris. Cependant, nous savons que NLRP6 au niveau de l'intestin et particulièrement au niveau de cellules caliciformes joue un rôle dans la sécrétion du mucus via la régulation de l'autophagie (*Li & Zhu, 2020*). Afin d'étudier l'importance de NLRP6 dans la sécrétion de mucus au niveau pulmonaire, il serait intéressant d'utiliser un modèle dans lequel la sécrétion de mucus est plus conséquente comme le modèle d'allergie induite par une administration de « House Dust Mite » (HDM), utilisé au laboratoire pour étudier les mécanismes de l'asthme allergique. Le rôle des protéines impliquées dans l'autophagie c'est-à-dire LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) (*Tanida et al., 2008*) et les facteurs ATG5/7 (Autophagy related proteins 5/7) (*Zheng et al., 2019*) seraient alors étudiés. Afin de confirmer le rôle de l'autophagie dans la sécrétion de mucus au niveau de l'épithélium pulmonaire, nous pourrions aussi utiliser des souris déficientes pour ATG5.

## Les macrophages aussi impliqués dans l'inflammation pulmonaire stérile

Nous avons montré dans le modèle d'exposition à la fumée de cigarette que le clivage de la Gasdermine D au niveau des macrophages de l'espace bronchoalvéolaire dépend de l'activation du récepteur NLRP3 et certainement sous sa forme d'inflammasome avec la Caspase 1 puisque cette dernière est clivée dans ces mêmes macrophages de façon dépendante du récepteur NLRP3 (*Fig. de conclusion*).

Nous avons montré dans le modèle d'exposition chronique à l'ozone que la Gasdermine D est activée de façon dépendante de NLRP6 et de la Caspase 1 uniquement dans une petite proportion de macrophages de l'espace bronchoalvéolaire (*Fig. de conclusion*).

Une étude récente montre que la polarisation des macrophages en M2 anti-inflammatoires dans le cancer du poumon à petite cellule dépend de l'activation du récepteur NLRP6 (*Rao et al. 2022*). Etant donné qu'une petite proportion de macrophages retrouvés au niveau de l'espace bronchoalvéolaire et du tissu pulmonaire expriment le récepteur NLRP6, il serait intéressant de les caractériser dans notre modèle d'exposition chronique à l'ozone.

Une activation de la Gasdermine D indépendante de du récepteur NLRP6 et de la Caspase 11 est également observée au niveau des macrophages présents dans le tissu pulmonaire (**Fig. de conclusion**).

Compte tenu des résultats obtenus dans le modèle d'exposition à la fumée de cigarette, le clivage de la Gasdermine D dans les macrophages du tissu pulmonaire et de l'espace bronchoalvéolaire pourrait être dû à l'activation du récepteur NLRP3 et de la Caspase 1, celle-ci étant clivée après exposition à l'ozone de manière indépendante du récepteur NLRP6.

Une suite du projet pourrait être d'analyser si le récepteur NLRP3 est exprimé par l'ensemble des macrophages et est impliqué dans le clivage de la Caspase 1. Nous pourrions ici utiliser d'une part, des souris déficientes pour *Nlrp6* dans les macrophages (*Nlrp6<sup>fl/fl X MLYsCre/+</sup>*) afin de voir si cette délétion impacte ou non la réponse inflammatoire pulmonaire lors d'exposition à chronique à l'ozone et d'autre part, en utilisant des souris déficientes pour *Nlrp3* afin de vérifier que l'activation de la Gasdermine D au niveau des macrophages dépend bien du récepteur NLRP3.

### Les neutrophiles et éosinophiles dans tout ça ?

Dans les modèles d'études d'inflammation pulmonaire stérile que nous avons utilisé, les neutrophiles et éosinophiles sont recrutés dans le tissu pulmonaire et dans l'espace bronchoalvéolaire. Dans un cadre infectieux le recrutement de neutrophiles permet la clairance des pathogènes opportunistes. Lors d'une exposition répétée à un polluant, si les neutrophiles persistent au niveau des poumons, ils ont plutôt un effet délétère, aggravant l'inflammation.

L'absence du récepteur NLRP3 dans le modèle d'exposition à la fumée de cigarette conduit à une diminution du recrutement des neutrophiles dans les poumons et l'espace bronchoalvéolaire et celle du récepteur NLRP6 dans le cas d'une exposition chronique à l'ozone conduit à une diminution des neutrophiles et éosinophiles.

Après exposition aigüe à la fumée de cigarette, nous observons l'activation de la Caspase 1 dans les neutrophiles recrutés au niveau de l'espace bronchoalvéolaire sans activation de la Gasdermine D, pourtant connue pour être impliqué dans la NETose, la mort cellulaire « kamikaze » pro-inflammatoire des neutrophiles au cours de laquelle ils libèrent leur contenu cellulaire de façon dépendante de la Caspase 11 (*Spel et Martinon., 2018*).

Compte tenu de l'activation de la Caspase 1 de manière dépendante du récepteur NLRP3, nous pourrions nous intéresser à l'expression de la Gasdermine E qui peut être clivée par la Caspase 1 (*Zhou & Abbott., 2021*).

Dans le modèle d'exposition chronique à l'ozone, nous observons un recrutement d'éosinophiles au niveau de l'espace bronchoalvéolaire chez les souris sauvages, et qui est fortement

diminué chez les souris déficientes pour le récepteur NLRP6. De manière intéressante, nous observons chez les souris sauvages exposées à l'ozone, l'induction d'interleukine-6 (IL-6) impliquée dans la réponse Th2, dite allergique. Dans la suite de l'étude, nous pourrions nous intéresser plus en détail à la réponse Th2 qui semble être impliquée dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par une exposition chronique à l'ozone et dépendante de l'expression du récepteur NLRP6 dans les pneumocytes de type 1. En effet, les souris déficientes pour le récepteur NLRP6 dans ce type cellulaire spécifiquement montrent aussi une diminution drastique du recrutement d'éosinophiles dans les poumons et l'espace bronchoalvéolaire.

Au cours de ces deux études, nous nous sommes intéressés aux cellules épithéliales et macrophages présents dans les poumons et dans l'espace bronchoalvéolaire et à leur implication dans la réponse inflammatoire pulmonaire. Cependant, il serait vraiment intéressant d'étudier l'implication des neutrophiles (notamment la NETose) et éosinophiles dans cette réponse inflammatoire pulmonaire.

### **L'apoptose et la nécroptose dépendantes de l'activation du récepteur NLRP6 ? Pouvons-nous parler de PANoptose ?**

De manière intéressante, dans le modèle d'exposition chronique à l'ozone, nous avons mis en évidence l'activation des Caspase 3 et Caspase 8 de façon dépendante de NLRP6 puisque les souris déficientes présentent une diminution drastique de leur activation respective dans les poumons. Il serait intéressant de savoir dans quel type cellulaire le clivage de la Caspase 3 et de la Caspase 8 ont lieu et si l'activation de ces dernières est une conséquence de la diminution globale de l'inflammation chez les souris déficientes pour le récepteur NLRP6 ou la conséquence d'une interaction directe avec ce dernier par un mécanisme qui n'est pas encore décrit.

La Caspase 3 est la protéine clé de l'apoptose. Cependant, de récentes études montrent que la Gasdermine E peut être clivée par la Caspase 3 induisant une pyroptose et non une apoptose de la cellule (*Rogers et al., 2016 & Wang et al., 2017*). Il semble donc intéressant de caractériser davantage le rôle de la Caspase 3 dans un contexte d'inflammation pulmonaire stérile induite par une exposition chronique à l'ozone.

La Caspase 8, quant à elle est impliquée dans la voie extrinsèque de l'apoptose, mais pas seulement ... ! Cette dernière peut aussi être impliquée dans l'activation des Gasdermine D et Gasdermine E aboutissant à la pyroptose (*Zhou & Abbott., 2021 & Kang et al., 2022*).

De plus, la Caspase 8 peut aussi inhiber la nécroptose en faveur de l'apoptose dans certaines pathologies (*Ornig et Lien., 2021 & Gautheron., 2017*) et à l'inverse, l'activation de la Caspase 8 via

la formation du complexe RIPK1/RIPK3–FADD–Caspase-8 (ou RIPK : receptor interacting protein kinase receptor-interacting serine/threonine-protein kinase) conduit à la PANoptose, un concept récent qui propose que la mort cellulaire se fait via l'activation de protéines impliquées dans l'apoptose, la pyroptose et la nécroptose (*Malireddi et al., 2019 & Pandian et Kanneganti., 2022*).

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, la mort par nécroptose reste encore à caractériser dans le modèle d'exposition à l'ozone, en analysant l'expression de RIPK3 dans le tissu pulmonaire ainsi que le niveau de phosphorylation de la protéine MLKL. Seule une étude montre l'implication du récepteur NLRP6 dans la nécroptose induite au niveau des poumons après infection par la bactérie *S.Aureus* (*Ghimire et al 2018*).

Nous avons choisi dans un premier temps de regarder l'expression de la protéine ZBP1 (pour Z-DNA combined protein-1) qui est un senseur d'acide nucléique décrit comme étant un marqueur de la nécroptose et pouvant aussi conduire à la formation du complexe de la PANoptose (*Malireddi et al., 2019*).

ZBP1 va interagir avec la protéine RIPK3 et la Caspase 8 pour former un complexe qui va induire la pyroptose via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'apoptose grâce à l'activation de la Caspase 8 ainsi que la nécroptose grâce à l'interaction entre RIPK3 et la pseudokinase MLKL (pour mixed lineage kinase domain-like protein). Cette dernière pouvant s'insérer dans la membrane cellulaire et y former des pores (*Dhuriya and Sharma, 2018 & Malireddi et al., 2019*). La protéine ZBP1 est donc impliquée dans la nécroptose et est à l'origine de la formation du complexe PANoptosome.

De façon intéressante, les résultats préliminaires obtenus montrent une augmentation de l'expression de la protéine ZBP1 au niveau du tissu pulmonaire des souris sauvages exposées à l'ozone qui n'est pas observé chez les souris déficientes pour le récepteur NLRP6. De plus, comme que le récepteur NLRP3 est impliqué dans la PANoptose pour induire l'activation de la Gasdermine D (*Christgen et al., 2020*), et que le récepteur NLRP6 clive aussi cette dernière dans notre modèle d'exposition à l'ozone, nous pourrions tenter de voir si le récepteur NLRP6 ne pourrait pas aussi être impliqué dans ce mécanisme. Puis, nous pourrions étudier la formation potentielle du complexe ZBP1-RIPK1/RIPK3–FADD–Caspase-8 afin de savoir si la PANoptose est induite par une exposition chronique à l'ozone et ce, de manière dépendante de l'activation du récepteur NLRP6.



CONCLUSIONS et  
PERSPECTIVES

Les objectifs de ce projet de thèse étaient d'étudier la mise en place de l'inflammation pulmonaire provoquée par la fumée de cigarette ou l'ozone chez la souris. Pour ce faire, nous avons d'une part étudié les effets de la cigarette en utilisant un modèle sub-chronique et un modèle aigu d'exposition à la fumée de cigarette et d'autre part, ceux de l'ozone en utilisant un modèle chronique.

Le modèle d'exposition à la fumée de cigarette nous permet de comprendre les mécanismes mis en place lors d'expositions occasionnelles à cette dernière. Le modèle d'exposition chronique à l'ozone nous montre les dégâts engendrés par la pollution à l'ozone et mime en partie les caractéristiques que l'on retrouve chez des patients atteints de BPCO, c'est-à-dire une inflammation chronique des voies respiratoires, des foyers de fibrose naissants et au niveau des alvéoles pulmonaires un début d'emphysème. La BPCO, souvent diagnostiquée tardivement, n'a pas de traitement à proprement parler, seuls les symptômes étant atténués. C'est pourquoi ce sujet m'a tenu à cœur du début à la fin.

Nous avons pu mettre en évidence l'implication du récepteur NLRP3 et de la Gasdermine D (GSDMD) dans la mise en place de l'inflammation pulmonaire induite par une exposition à la fumée de cigarette. Dans cette partie de l'étude, nous avons tout d'abord étudié l'implication du récepteur NLRP3 dans la réponse inflammatoire après exposition sub-chronique, en utilisant des souris déficientes pour le récepteur NLRP3 (*Nlrp3<sup>-/-</sup>*), lesquelles présentaient des paramètres d'inflammations diminués. Dans le modèle aigu d'exposition à la fumée de cigarette, ces mêmes souris *Nlrp3<sup>-/-</sup>* ainsi que des souris sauvages (WT) traitées avec un inhibiteur de NLRP3 le MCC950, montre un même phénotype d'inflammation diminuée. La GSDMD pouvant être clivée par l'inflammasome NLRP3 (**Broz et al., 2020**), nous nous sommes intéressés à son activation dans ce modèle aigu d'exposition.

Nous avons mis en évidence que l'activation de la GSDMD se fait de manière dépendante de NLRP3 dans les cellules épithéliales bronchiques et dans les macrophages recrutés au niveau de l'espace bronchoalvéolaire. Il a été montré que la GSDMD peut être soit impliquée dans la sécrétion de cytokines et/ou libération d'alarmines, soit dans la pyroptose. Ici, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  est diminuée chez les souris *Nlrp3<sup>-/-</sup>*, les souris WT traitées avec le MCC950 et chez les souris déficientes pour la GSDMD (*Gsdmd<sup>-/-</sup>*) après exposition à la fumée de cigarette dans les poumons et dans le lavage bronchoalvéolaire par rapport aux souris WT exposées. Nous faisons l'hypothèse que l'IL-1 $\beta$  soit sécrétée grâce à l'activation du récepteur NLRP3 et de la GSDMD.

Dans une seconde partie du projet, nous nous sommes intéressés à l'implication du récepteur NLRP6 et de la GSDMD dans l'inflammation pulmonaire induite par une exposition chronique à l'ozone. Tout d'abord, grâce à des souris NLRP6-FLAG nous avons mis en évidence l'expression de NLRP6 dans le tissu pulmonaire et plus particulièrement dans les pneumocytes (il reste cependant à savoir si ce sont les pneumocytes de type 1 et/ou 2 qui l'expriment), les bronchioles et une partie des macrophages infiltrés dans le poumon et ceux recrutés dans l'espace bronchoalvéolaire. Les souris déficientes pour NLRP6 (*Nlrp6<sup>-/-</sup>*) montrent une diminution de l'ensemble des paramètres

inflammatoires au niveau des poumons, des foyers de fibrose et de l'emphysème ainsi que de l'apoptose.

De façon surprenante, des résultats préliminaires concernant le marqueur de nécroptose RIPK3 montrent une légère augmentation chez les souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> exposées à l'ozone par rapport aux souris WT exposées (résultats non montrés). Cette légère augmentation pourrait s'expliquer par la diminution de la Caspase 8 clivée quasi absente chez les souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> car on sait que l'activation de la Caspase 8 induit l'apoptose et inhibe la nécroptose (*Gautheron., 2017*).

Nous savons que le récepteur NLRP6 peut former un inflammasome avec la Caspase 1 ou la Caspase 11, aboutissant à la libération d'alarmines ou au clivage de la GSDMD (*Ghimire et al. 2020*). De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'activation de l'ensemble de ces protéines ainsi que des types cellulaires les exprimant. L'expression et le clivage de la Caspase 11 sont induits dans les pneumocytes de type 1 (AT1) de manière dépendante de NLRP6 et l'activation de la GSDMD dans ces mêmes cellules dépend de NLRP6 et de la Caspase 11.

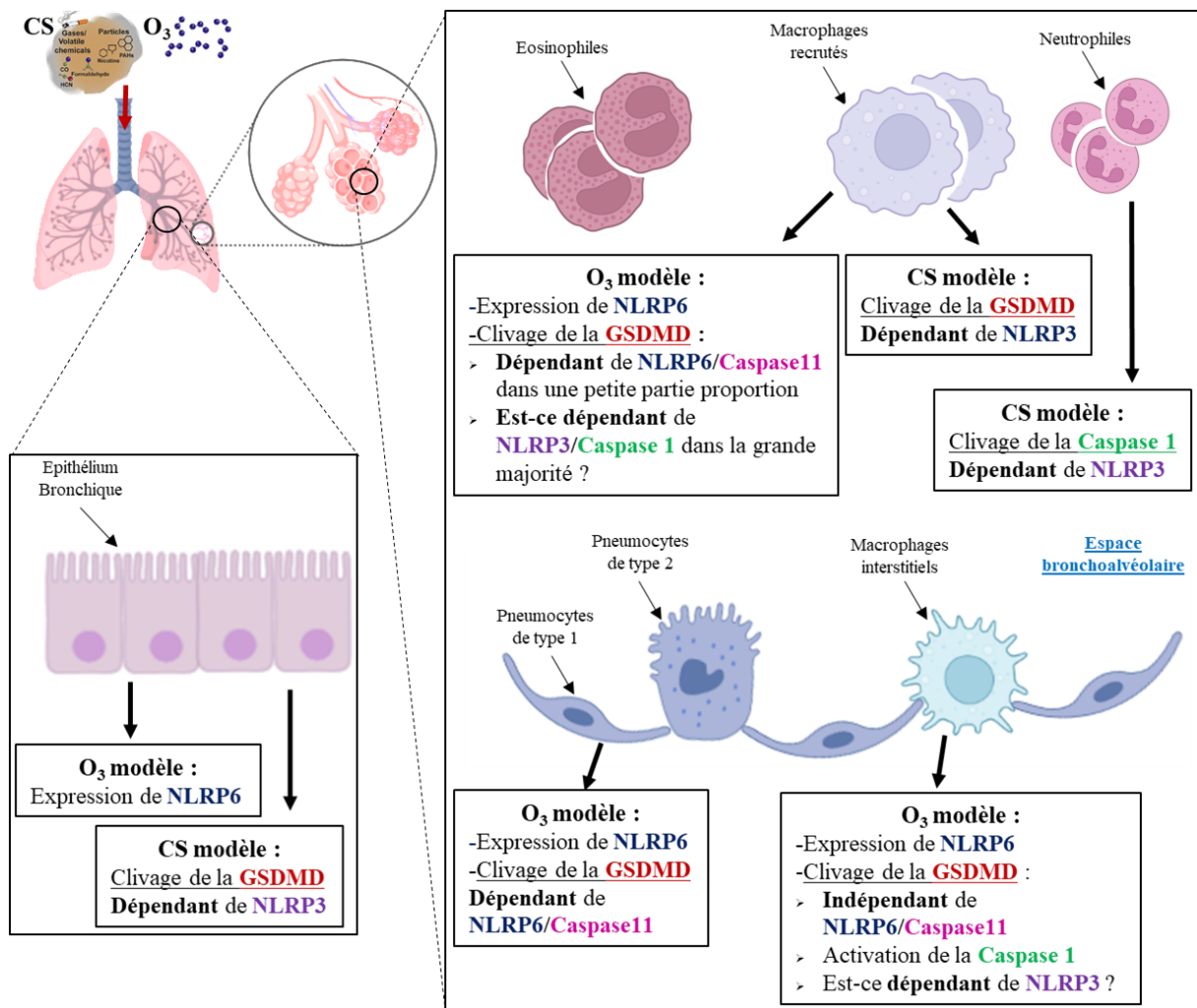
La forme clivée de la Caspase 1 est elle aussi induite après exposition à l'ozone dans une faible proportion d'AT1. Il reste cependant à déterminer si son clivage est dépendant de l'activation d'un autre inflammasome. En revanche, la Caspase 1 clivée est induite par l'ozone dans les macrophages infiltrés au niveau du tissu pulmonaire et de l'espace bronchoalvéolaire tout comme la GSDMD mais de manière indépendante de NLRP6, ou seulement une petite proportion de ces macrophages montrent une expression de la GSDMD dépendante de NLRP6/Caspase 11.

L'implication de la GSDMD dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite après exposition à l'ozone est confirmée car les souris *Gsdmd*<sup>-/-</sup> qui présentent une réduction globale des paramètres inflammatoires.

Enfin, en utilisant des souris déficientes pour NLRP6 au niveau des AT1 uniquement (*Nlrp6*<sup>fl/fl X *AcideCre*<sup>+/+</sup>), nous avons confirmé que le récepteur NLRP6 exprimé dans ce type cellulaire joue un rôle essentiel dans l'inflammation pulmonaire provoquée par une exposition chronique à l'ozone puisque ces souris présentent une diminution importante des paramètres inflammatoires par rapport à leurs contrôles relatifs (*Nlrp6*<sup>fl/fl X *Acide*<sup>+/+</sup>).</sup></sup>

L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de caractériser l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 dans l'inflammation pulmonaire. De façon intéressante, ils sont impliqués dans le clivage de la GSDMD, cependant dans les mêmes types cellulaires et via l'activation de caspases différentes.

J'ai souhaité reprendre l'ensemble des données qui concernent les deux modèles d'inflammation pulmonaire (cigarette et ozone) dans un schéma afin d'illustrer nos résultats (*Fig. de conclusion*).



**Figure de conclusion :** Schéma représentant les types cellulaires exprimant NLRP3 ou NLRP6 permettant le clivage de la GSDMD. Ce schéma prend en compte les modèles d'exposition à la fumée de cigarette et à l'ozone. **CS:** Cigarette Smoke. **GSDMD:** Gasdermine D. **O<sub>3</sub>:** Ozone.

MATERIEL et

METHODES

### Modèle animal

Pour l'étude de la fumée de cigarette ainsi que de l'exposition à l'ozone, des souris mâles ou femelles sauvages C57BL/6J (WT) provenant du laboratoire Janvier (Janvier Laboratory, France) ont été utilisées. Les souris *Caspase1/11<sup>-/-</sup>* ont été fournies en collaboration avec Seshadri Tara au BASF BioResearch (**Le Roux et al., 2021**). Les souris *Nlrp3<sup>-/-</sup>* par le Dr. Virginie Petrilli (**Martinon et al., 2006**), les souris *Gsdmd<sup>-/-</sup>* par le Dr Petr Broz (**Ruhl et al., 2022**). Les souris *Nlrp6<sup>-/-</sup>* par le Dr. Mathias Chamaillard à l'institut Pasteur de Lille (**Normand et al., 2011**). Les souris *Nlrp6 flox/flox* ont été fournies par le Dr. Philip Rosenstiel de l'Institut clinique de Biologie Moleculaire de Kiel en Allemagne. Pour finir, les souris *Nlrp6*-déficientes tissu spécifique ont été obtenues en croisant les souris *Nlrp6 flox/flox* avec cell Aqp5Cre « knock-in » (Acid ou Aqp5tm1.1(cre,DsRed)Pfl), permettant la délétion du gène *Nlrp6* au niveau des pneumocytes de type 1 (AT1) du poumon (**Flodby et al., 2010**). L'ensemble des souris sont sur fond génétique de souris C57BL/6J et sont conservées à l'institut de Trangenose (TAAM) au CNRS d'Orléans, France. Pour les différentes expériences, les souris adultes (8-15 semaines) ont été gardées dans des cages sur portoirs isolées et ventilées. Les expériences menées sont soumises au respect des lois gouvernementales éthiques (**APAFIS 2020 #26177**).

### Modèle d'exposition aiguë et chronique à la fumée de cigarette

Les expositions à la fumée de cigarette (CS) sont réalisées en utilisant l'automate « EMKA InExpose smoking robot ». Les souris sont exposées 20min, 3 fois par jour à raison de 12 cigarettes par jour, pendant 4 jours pour l'exposition aiguë et 4 jours consécutifs durant 6 semaines pour le modèle chronique. Des cigarettes de recherche 3R4F ont été utilisées (Université Kentucky). Chaque bouffée de cigarette a une durée de 4s, pour une aspiration de 200ml par bouffée. L'exposition alterne entre CS et air frais, avec un calibrage maintenu constant à  $3.10^7$  L.min<sup>-1</sup>. La concentration en particule de fumée est estimé à 350 mg/m<sup>3</sup> (**Le Roux et al., 2021**).

### Modèle d'exposition chronique à l'ozone

Les souris sont exposées sous Sorbonne dans une boîte en plexiglas étanche à 1,5 ppm d'ozone produit par un ozoniseur (*Ozoniseur Sander 500*) pendant 1h30, deux fois par semaine pendant six semaines. Les animaux témoins ont été exposés à l'air pendant la totalité de l'étude. Un suivi clinique quotidien est réalisé durant toute la durée de l'expérimentation, y compris les week-ends.

### Traitement au MCC950

Les souris sont traitées en intra péritonéale avec 20mg/kg de MCC950 fourni par Luke O'Neill (Coll, 2015 #3697) (le composé a été dissout dans du (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin (H31133, Alfa Aesar) véhicule) ou traitées avec le véhicule seul tous les jours entre la première et la seconde exposition à la CS et exposées de manière aiguë à la fumée de cigarette.

### Compte cellulaire des cellules du lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Le LBA est réalisée comme déjà décrit (*Lu et al., 2021*). Les comptes cellulaires concernant le modèle d'exposition à la fumée de cigarette sont réalisés en comptant 250 cellules sur cytopspin (Shandon CytoSpin 3, ThermoFisher Scientific<sup>TM</sup>, Illkirch, France) d'après les instructions du fabricant May-Grünwald-Giemsa staining (Diff Quick, Medion Diagnostics, Dürdingen, Switzerland). Le compte de cellules dans le LBA concernant l'exposition à l'ozone est fait par analyse FACS.

### Prélèvement des poumons

Après la réalisation du LBA, les poumons sont perfusés avec de l'Isoton® (Beckman Coulter France, Villepinte) afin de s'affranchir du contenu vasculaire. Pour l'analyse protéique, la partie trilobée est homogénéisée en utilisant rotor-stator (Ultra-turrax®) dans 1ml de tampon d'extraction protéique T-Per (ThermoFisher Scientific<sup>TM</sup>) mélangé avec des inhibiteurs de protéase phosphatase (ThermoFisher Scientific<sup>TM</sup>). Les échantillons sont centrifugés 10 min à 10000 rpm et le surnageant conservé à -80°C avant le dosage des médiateurs inflammatoire et l'analyse par western blot.

### Histologie pulmonaire et immunohistochimie (IHC) de Ly6G

Le lobe gauche du poumon est fixé en paraformaldehyde 4% (PFA) et enrobé en paraffine dans les conditions standards. Des micro-sections de 3µm sont coupées pour chaque organe afin de réaliser les coloration nécessaire Hématoxyline/Eosine (HE) ou d'Acide Periodic Schiff (PAS) ou encore RedSirius/FastGreen. Une partie des coupes histologiques a servi au marquage de Ly6G en utilisant un anti corps anti-Ly6G (ab238132, Abcam). Les coupes sont scannées au x20 (0.452 µm/pixel) en utilisant le NanoZoomer-SQ. Les images sont analysées à l'aide du logiciel NDP.view 2 software (Les deux provenant de chez Hamamatsu Corporation, Japan). L'ensemble des scores réalisés est quantifié de 0 à 5 suivant la sévérité. Pour la coloration HE, un ratio est réalisé entre la surface infiltrée par des cellules de l'immunité sur la surface totale de la section de poumon. Pour la coloration RedSirius/FastGreen, une quantification est réalisée. L'ensemble des quantifications sont faites par deux observateurs différents.

### Quantification de IHC Ly6G

La quantification de Ly6G est réalisée sur analyse digitale de chaque section de poumon en utilisant le logiciel MorphoQuant<sup>TM</sup> (Biocellvia, France), initialement développé pour mesurer les lésions pulmonaires induites par la fibrose pulmonaire ou l'emphysème (*Michaudel et al., 2017*). Un ratio est réalisé par le logiciel entre la surface marquée par Ly6G sur l'aire totale de la section de poumon, exprimée en pourcentage (%).

### Immunohistochimie de la Gasdermine D Clivée et FLAG

Le lobe gauche du poumon est fixé en PFA 4% et enrobé en paraffine dans les conditions standards. Des micro-sections 3µm sont coupées pour chaque organe. Chaque section coupe est déparaffinée et déshydratée puis chauffée 30min à 80°C dans du tampon citrate 10 mM pH=6 afin de démasquer les antigènes. Les sections de poumon sont perméabilisées dans du PBS 0.5% triton X-100 ensuite saturées avec 5% SVF et 1% BSA 1h à température ambiante puis incubées sur la nuit avec l'anticorps primaire mouse **anti-Gasdermin D clivée** (1:100, #10137, Cell Signaling) pour l'étude concernant son expression et rabbit **anti-FLAG** (1:100, 4301135 Sigma) d'autre part. Après lavage, les sections de poumon sont soit incubées dans 5% de SVT, 1% BSA, 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (1:200 **anti-rabbit IgG**, Sigma Aldrich®) concernant la **Gasdermine D clivée** soit avec un anticorps secondaire couplé à la biotine (1:200 anti-rabbit Biotylated IgG, R&D®) pour la détection du FLAG. Ensuite, les sections marquées avec l'anti-FLAG sont incubées avec le substrat de la biotine ABC kit (VectaStain®) en suivant les instructions du fournisseur. L'ensemble des sections de poumon sont incubées avec le DAB (Vector Laboratories®), en suivant les instructions du fournisseur. Après un lavage à l'eau distillée, une contre-coloration à l'hématoxyline de Gill est faite. Pour finir, les sections de poumon sont déshydratées, fixées et montées sur lame avec de l'Eukitt. Les lames sont ensuite examinées avec le scanner NDPview.

### Mesure des médiateurs de l'inflammation

Pour déterminer la concentration en cytokines dans le BAL et l'homogénat de poumon, des kits de dosage ELISA murin sont utilisés : MPO, CXCL1, CXCL5, CXCL15, LCN-2, CCL11, CCL24, MMP-9, TIMP-1, (Mouse DuoSet, R&D system, Minneapolis, USA) en suivant les instructions du fournisseur. Pour l'IL-1β, l'IL-5 et l'IL-6, MCP-1 dans le BAL les mesures sont faites en utilisant un kit multiplex en suivant les instructions du fournisseur (ProcartaPlex, Invitrogen™) & (Millipore Milliplex®). L'acquisition des résultats est réalisée avec l'équipement Luminex (MagPix, BioRad) et analysé avec le logiciel Bioplex (BioRad).

### Dosage du collagène soluble Sircol™

Le dosage colorimétrique du collagène soluble dans le LBA est réalisé grâce au kit SIRCOL COLLAGEN ASSAY (*Biocolor*). L'absorbance lue à 540nm (*ELx800 Bioteck*).

### RT-PCR quantitative sur tissu pulmonaire

L'ARN est extrait des poumons en utilisant un protocole d'extraction avec du Trizol. Les ARN sont transcrits en ADNc en utilisant un kit de Reverse transcription (Go script, Promega). Les RT-PCR sont réalisées à l'aide du Fast SYBR Green master mix et de la machine ARIA MX (Stratagene MX3005P, Agilent technologies). Les amorces utilisées proviennent de chez Qiagen pour *mmp12*, *pro-IL-18*, *Muc5ac* (Qiagen, Hilden, Germany). L'expression des différents gènes étudiés est calculée en



expression relative par rapport au gène de ménage *18S* ARNm. Pour chaque expérience des quadruplicats biologiques et des triplicats techniques sont réalisés.

### Western Blot (WB)

La concentration en protéine est déterminée en utilisant le kit de dosage protéique DCTM protein Assay (BIO-RAD, France). 80 µg de protéines sont dénaturées (95°C, 5min) en utilisant l'agent réducteur SDS, puis du tampon de charge glycérolé est ajouté. Les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide à gradient 4-12% commerciaux et ont migrés à 140V, 45min en utilisant les cuves Mini gel (ThermoFisher Scientific™). L'ensemble des protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham™) de 0,2µm en utilisant la machine Trans-Blot SD Transfer System (Bio-Rad) à 100V for 45 min. Le transfert des protéines est vérifié par une coloration au rouge ponceau de la membrane. Les membranes sont saturées avec du 5% lait commercial (#9999S, Ozyme) dilué dans du TBS 1X - 0,1% Tween®20 (20 mM Tris Trizma® Base, 150 mM chlorure de sodium et 0.05% Tween® 20 pH 7.6) 2h à température ambiante sous agitation. Ensuite, les membranes sont incubées avec les différents anticorps primaires d'intérêt. **Anti-Gasdermine D totale** (1:500, ab209845, Abcam), **anti-Gasdermine D Clivée** (1:500, #10137, Cell Signaling), **anti-Caspase 3 totale** (1:1000, #9662S, Cell Signaling), **anti-Caspase 3 clivée** (1:500, #9661S, Cell Signaling), **anti-ZPB1** (1 :100, #SC-271483, Santa Cruz, Texas), **anti-Caspase 8 totale et clivée** (1:500, #8592, Cell Signaling), **anti-Caspase 1 totale et clivée** (1 :500, M-20, Santa Cruz) et **anti-Caspase 11 totale et clivée** (1 :500, 17D9, BioTechne) dans du 5% lait TBS 1X - 0,1% Tween®20, toute la nuit à 4°C.

L'anticorps **anti-Actine** (1:10 000, #A3854, Sigma-Aldrich) est incubé 1h à température ambiante. Les membranes sont lavées 3 fois dans du TBS 1X - 0,1% Tween®20 et incubées avec l'anticorps secondaire approprié conjugué avec la HRP (**anti-rabbit, anti-mouse ou anti-rat IgG**, Sigma-Aldrich) 1h à température ambiante. Les bandes protéiques sont visualisées grâce à ECL prime (#2516195, Amersham™) ou le Femto (#34095, ThermoScientific™) par chimioluminescence avec l'imageur iBright de chez ThermoFisher™ et quantifiées avec le logiciel ImageJ.

### Immunofluorescence (IF) sur coupe de poumon et cytopins

Le lobe gauche du poumon est en PFA 4% et enrobé en paraffine dans les conditions standards. Des micro-sections 3µm sont coupées pour chaque organe. Chaque section coupe est déparaffinée et déshydratée puis chauffée 30min à 80°C dans du tampon citrate 10 mM pH=6 afin de démasquer les antigènes. Les sections de poumon sont perméabilisées dans du PBS 0.5% triton X-100 ensuite saturées avec 5% SVF et 1% BSA 1h à température ambiante puis incubées sur la nuit avec les différents anticorps primaires d'intérêt. **Anti-Gasdermine D clivée** (1:100, #10137, Cell Signaling), **anti-FLAG** (1:100, #4301135, Sigma), **anti-Caspase 3 clivée** (1:100, #9661S, Cell Signaling), **anti-Caspase 1 clivée** (1:500, M-20, Santa Cruz), **anti-Caspase 11 clivée** (1 :500, #17D9, BioTechne), **anti-Aquaporine-5** (1:100, Ab78486, Abcam), **anti-ProSurfactant C** (1:100, #AB3786, Sigma) et **anti-**

**PodoPlanine** (1:100, #9661S, Cell Signaling). Ensuite, les lames sont lavées et les sections de poumons sont incubées avec l'anticorps secondaire correspondant. **Alexa Fluor 488** (1:200, # ab150077, Abcam) ou **Alexa Fluor 594** (1:200, # A-11037, Invitrogen) ou **AlexaFluor 647** (1:200, #21472, Invitrogen) dans de la solution de saturation 5% SVF et 1% BSA. Les sections de poumons sont ensuite incubées 5min avec du DAPI (1:1000), lavées avec du PBS 1X et montées sur lame avec du Fluoromount-G, (Invitrogen).

Les cytopspins sont fixés dans du PFA 4% (Sigma-Aldrich). Les lames sont lavées 3 fois dans du TBS et puis perméabilisées 15min avec du TBS-0.3% Triton X-100. Après 3 lavages, les lames sont saturées avec du 5% SVF et 1% BSA pendant 45min puis incubées avec l'anticorps primaire sur la nuit, **anti-Caspase1 Clivée** (1:100, #89332, Cell Signaling), **anti-Gasdermine D Clivée** (1:100, #10137, Cell Signaling), **anti-FLAG** (1:100, 4301135 Sigma), **anti-Caspase 11 clivée** (1 :500, #17D9, BioTechne). Après lavages, les cytopspins sont incubés avec l'anticorps secondaire correspondant, **Alexa Fluor 488** (1:200, # ab150077, Abcam) ou **Alexa Fluor 594** (1:200, # A-11037, Invitrogen) ou **AlexaFluor 647** (1:200, #21472, Invitrogen) dans du 5% SVF, 1% BSA. Ensuite, une contre coloration de 5min avec du DAPI (1:1000) est réalisée. Après lavage au PBS, les lames sont montées avec du Fluoromount-G, (Invitrogen). L'immunofluorescence est examinée par différents expérimentateurs à l'aveugle en utilisant le microscope Leica au 20X (Leica, Solms, Germany). Les images sont traitées à l'aide des logiciels ImageJ ou Zen blue Zeiss.

### **Cytométrie en Flux (FACS)**

Le comptage des cellules totales ainsi que les populations cellulaires dans le BAL et le poumon des souris WT et déficientes, sont évaluées par cytométrie en flux. Pour les cellules du poumon, après perfusion ils sont hachés au ciseaux et digérés avec de la collagénase libérase (#05401127001 ROCHE) et de la DNase (DN25- Sigma). Un ACK lysing (A10492-01 Gibco) est réalisé pour s'affranchir des hématies. Pour le compte de cellules totales, un anticorps anti-CD16/32 non conjugué (BD Pharmingen™, 553142, 1:100) est utilisé pour bloquer les récepteurs Fc non spécifiques pendant 20 min à 4 °C. Les cellules totales contenues dans les poumons ou le lavage bronchoalvéolaire sont ensuite marquées : nous avons discriminé les cellules CD45<sup>+</sup> vivantes. (**Cf table des anticorps**).

L'ensemble des cellules a ensuite été caractérisé dans les poumons et dans le lavage bronchoalvéolaire, de sorte à marquer les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles dans les deux et les lymphocytes TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> et les lymphocytes B dans lavage bronchoalvéolaire.

Les données ont été acquises avec un cytomètre en flux (BD FACSCanto II) pour le compte de cellules totales et (BD FACSFortessa) pour la discrimination des cellules et analysées avec le logiciel FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, OR). Les faibles SSC et FSC ont été exclus pour éliminer les débris cellulaires de l'analyse et définir strictement les populations d'intérêt. Ensuite, les cellules vivantes individuelles ont été sélectionnées (**Cf table des anticorps**).

Antibody	Fluo.	Ref.	Manufacturer	BAL dilution	Lung dilution		Lung/BAL
					Myeloid Mix	Lymphoid Mix	
CD103	PE	#12-1031-83	eBioscience		1/100		
CD11b	EF450	#48-0112-82	eBioscience	1/300	1/200	1/200	
CD11e	BV605	#117334	Sirigen	1/200	1/100		
CD24	BV650	#563545	BD Biosciences		1/200		
CD3	AF700	#56-0032-82	eBioscience	1/100		1/100	
CD4	SB645	#64-0042-82	Invitrogen	1/200		1/200	
CD45	BD785	#103149	Sirigen	1/200		1/200	1/200
CD45.2	AF700	#56-0454-82	eBioscience		1/150		
CD69	BV650	#740460	BD Biosciences			1/200	
CD8a	PerCy 5.5	#45-0081-82	Invitrogen	1/200			
CD8b	EF450	#48-0083-82	eBioscience			1/200	
F4/80	PE-Cy7	#563899	BD Biosciences	1/300	1/100	1/200	
IA/IE	SB702	#67-5321-82	Invitrogen		1/300		
Live/de ad	EF780	#65-0865-14	eBioscience	1/800	1/800	1/800	1/500
Ly6C	PerCy 5.5	#45-5932-82	eBioscience		1/200		
Ly6G	FITC	#127606	BioLegend	1/200	1/200		
NK1-1	PE Cy7	#12-5941-83	eBioscience			1/200	
Siglec-F	PE-CF594	#562757	BD Biosciences	1/300	1/300	1/200	
TCR $\gamma\delta$	APC	#17-5711-82	eBioscience			1/200	

**Table 2 :** Table récapitulative des anticorps utilisés pour l'analyse FACS, leurs références et leurs dilutions.

## ANNEXES

Constituent	Carcinogen (CA)	Respiratory Toxicant (RT)	Cardiovascular Toxicant (CT)	Reproductive or Developmental Toxicant (RDT)	Addictive (AD)
Acetaldehyde	x	x			x
Acetamide	x				
Acetone		x			
Acrolein		x	x		
Acrylamide	x				
Acrylonitrile	x	x			
Aflatoxin B1	x				
4-Aminobiphenyl	x				
1-Aminonaphthalene	x				
2-Aminonaphthalene	x				
Ammonia		x			
Anabasine					x
o-Anisidine	x				
Arsenic	x		x	x	
A- $\alpha$ -C (2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole)	x				
Benz[a]anthracene	x		x		
Benz[j]aceanthrylene	x				
Benzene	x		x	x	
Benzo[b]fluoranthene	x		x		
Benzo[k]fluoranthene	x		x		
Benzo[b]furan	x				
Benzo[a]pyrene	x				
Benzo[c]phenanthrene	x				
Beryllium	x				
1,3-Butadiene	x	x		x	
Cadmium	x	x		x	
Caffeic acid	x				
Carbon monoxide				x	
Catechol	x				
Chlorinated dioxins/furans	x			x	
Chromium	x	x		x	
Chrysene	x		x		
Cobalt	x		x		

Coumarin	Banned in				
Cresols (o-, m-, and p-cresol)	x	x			
Crotonaldehyde	x				
Cyclopenta[c,d]pyrene	x				
Dibenz[a,h]anthracene	x				
Dibenzo[a,e]pyrene	x				
Dibenzo[a,h]pyrene	x				
Dibenzo[a,i]pyrene	x				
Dibenzo[a,l]pyrene	x				
2,6-Dimethylaniline	x				
Ethyl carbamate (urethane)	x			x	
Ethylbenzene	x				
Ethylene oxide	x	x		x	
Formaldehyde	x	x			
Furan	x				
Glu-P-1 (2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole)	x				
Glu-P-2 (2-Aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole)	x				
Hydrazine	x	x			
Hydrogen cyanide		x	x		
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	x				
IQ (2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline)	x				

**Annexe 1** : Liste des composés chimiques identifiés par la FDA comme constituants dangereux et potentiellement nocifs dans les produits de tabac et la fumée de cigarette.

## BIBLIOGRAPHIE

### A

- Abdelrahman S,H. Abdelrahman, A. Samy, W. Dessouky, AA. Ahmed, SM, Hypoxia pretreatment enhances the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (BMSCs) on ozone-induced lung injury in rats. *Cell and Tissue Research* (2022) 389:201–217. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03627-8>.
- Addy N,A. An ongoing saga of nicotine complexity and dopamine heterogeneity: Nicotine activation and inhibition mediating reward and anxiety. *Cell Press* (2021) Pages 2505-2507. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.07.016>.
- Aglietti R.A, and E.C. Dueber, Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends Immunol* 38 (2017) 261-271. [doi: 10.1016/j.it.2017.01.003](https://doi.org/10.1016/j.it.2017.01.003).
- Arpino V. Brocka M. Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* (2015) 44-46:247-54. [doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.005](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.005).
- Aspal M. and Zemans R.L, Mechanisms of ATII-to-ATI Cell Differentiation during Lung Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* (2020) 21-3188. [doi: 10.3390/ijms21093188](https://doi.org/10.3390/ijms21093188).
- Air quality in Europe (2019) European Environment Agency. (2019). <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2019>
- Agence Européenne de l'environnement. (2022). <https://www.eea.europa.eu/highlights/premature-deaths-due-to-air>
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES) 2022 <https://www.anses.fr/fr/content/qualit%C3%A9-de-l%E2%80%99air-ext%C3%A9rieur>
- Aoshiha, K., and Nagai, A.. Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. *Tobacco induced diseases*1, (2003) 219-226. [doi: 10.1186/1617-9625-1-3-219](https://doi.org/10.1186/1617-9625-1-3-219).

### B

- Balamayooran G, S. Batra, S. Cai, J. Mei, G.S. Worthen, A.L. Penn, and S. Jeyaseelan, Role of CXCL5 in leukocyte recruitment to the lungs during secondhand smoke exposure. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47 (2012) 104-11. [doi: 10.1165/rcmb.2011-0260OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0260OC).
- Basil M,C. and Morrissey E, E. Lung regeneration: a tale of mice and men. (2019) 1084-9521. [doi: 10.1016/j.semcd.2019.11.006](https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.11.006).
- Barnes, P.J. Unexpected Failure of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. (2007) 357:1513–1518. [doi: 10.1164/rccm.200702-253ED](https://doi.org/10.1164/rccm.200702-253ED).
- Barnes P.J, New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov* 12 (2013) 543-59. [doi: 10.1038/nrd4025](https://doi.org/10.1038/nrd4025).
- Barnes P.J, Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 35 (2014) 71-86. [doi: 10.1183/09031936.03.00040703](https://doi.org/10.1183/09031936.03.00040703)
- Barnes P.J, Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 56 (2004) 515-48. [doi: 10.1124/pr.56.4.2](https://doi.org/10.1124/pr.56.4.2).

- Barnes P.J, P.G. Burney, E.K. Silverman, B.R. Celli, J. Vestbo, J.A. Wedzicha, and E.F. Wouters, Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers* 1 (2015) 15076. [DOI: 10.1038/nrdp.2015.76](https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.76).
- Barnes, P.J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* (2016) 138, 16-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>.
- Bennet T, J, Randhawa A, Hua J, Karen C. Cheung K,C. Airway-On-A-Chip: Designs and Applications for Lung Repair and Disease. *Cells* (2021) 10, 1602. [doi: 10.3390/cells10071602](https://doi.org/10.3390/cells10071602).
- Bergsbaken T, Susan L. Fink and Brad T. Cookson. Pyroptosis: host cell death and Inflammation. *Nature Reviews Microbiology* (2009) 99–109. [doi: 10.1038/nrmicro2070](https://doi.org/10.1038/nrmicro2070).
- Borgerding M, Klus H. Analysis of complex mixtures – Cigarette smoke. *Experimental And toxicologic pathology* (2005) 43–73. [doi: 10.1016/j.etp.2005.05.010](https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.05.010).
- Brode S, Ling S, Chapman K, Alpha-1 antitrypsin deficiency: a commonly overlooked cause of lung disease. *CMAJ*(2012) 184(12). [doi: 10.1503/cmaj.111749](https://doi.org/10.1503/cmaj.111749)
- Broderick L, D. De Nardo, B.S. Franklin, H.M. Hoffman, and E. Latz, The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annual review of pathology* 10 (2015) 395-424. [doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040431](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040431).
- Benowitz, N.L. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2009) 49, 57-71. [doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742](https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742).
- Brown, R.L., Sequeira, R.P., and Clarke, T.B. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nature communications* 8, (2017) 1512-1512. [doi: 10.1038/s41467-017-01803-x](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01803-x).
- Broz P, Immunology: Caspase target drives pyroptosis. *Nature* 526 (2015) 642-3. [doi: 10.1038/nature15632](https://doi.org/10.1038/nature15632).
- Broz P, P. Pelegrin, and F. Shao, The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* 20 (2020) 143-157. [doi: 10.1038/s41577-019-0228-2](https://doi.org/10.1038/s41577-019-0228-2).
- Buscetta M, S. Di Vincenzo, M. Miele, E. Badami, E. Pace, and C. Cipollina, Cigarette smoke inhibits the NLRP3 inflammasome and leads to caspase-1 activation via the TLR4-TRIF-caspase-8 axis in human macrophages. *FASEB J* 34 (2020) 1819-1832. [doi: 10.1096/fj.201901239R](https://doi.org/10.1096/fj.201901239R).
- Brusselle, G.G., Joos, G.F., and Bracke, K.R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 378, (2011) 1015-1026. [doi: 10.1016/S0140-6736\(11\)60988-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4).
- Bucher, H., Mang, S., Keck, M., Przibilla, M., Lamb, D.J., Schiele, F., Wittenbrink, M., Fuchs, K., Jung, B., Erb, K.J., and Peter, D. Neutralization of both IL-1alpha/IL-1beta plays a major role in suppressing combined cigarette smoke/virus-induced pulmonary inflammation in mice. *Pulm Pharmacol Ther* (2017) 44, 96-105. [doi: 10.1016/j.pupt.2017.03.008](https://doi.org/10.1016/j.pupt.2017.03.008).
- Bustamante-Marin, X.M., and Ostrowski, L.E. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, (2017) a028241. [doi: 10.1101/cshperspect.a028241](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241).

## C

- Cabon L, Martinez-Torres A.C, Susin S. A La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Médecine/Science* (2013) 29 : 1117-24. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912015>

- Cai S, Paudel S, in L, Ghimire L, Taylor C.M, Wakamatsu N, Bhattarai D, Jeyaseelan S. NLRP6 modulates neutrophil homeostasis in bacterial pneumonia-derived sepsis. *Mucosal Immunology* (2021) 574–584. [doi: 10.1038/s41385-020-00357-4](https://doi.org/10.1038/s41385-020-00357-4).
- Cerqueira D, M, Gomes M, T, R, Silva A, L, N, Rungue M, Assis N, R,G, Guimarães E, S, Morais S, B, Broz P, Zamboni D, S, Oliveira S, C. Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection. *PLOS Pathogens* (2018) 14(12): e1007519. [doi:10.1002/JLB.4MR0119-013R](https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0119-013R).
- Chen G.Y, Liu M, Wang F, Bertin J, Nunez G. A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J Immunol* 2011; 186:7187-7194. [doi: 10.4049/jimmunol.1100412](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100412).
- Chen K.W, M. Monteleone, D. Boucher, G. Sollberger, D. Ramnath, N.D. Condon, J.B. von Pein, P. Broz, M.J. Sweet, and K. Schroder, Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol* 3 (2018). [doi: 10.1126/sciimmunol.aar6676](https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6676).
- Chen J, Daia L, Wanga T, Hec J, Wang Y, Wena F. The elevated CXCL5 levels in circulation are associated with lung function decline in COPD patients and cigarette smoking-induced mouse model of COPD. 2019, VOL. 51, NOS. 5–6, 314–329. [doi: 10.1080/07853890.2019.1639809](https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1639809).
- Chen K. C, Demarco B, Broz P. Beyond inflammasomes: emerging function of gasdermins during apoptosis and NETosis. *The EMBO Journal* (2019) e103397. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103397>.
- Chen Y, Shi Y, Wu J, Qi N. MAVS: A Two-Sided CARD Mediating Antiviral Innate Immune Signaling and Regulating Immune Homeostasis. *Front. Microbiol.* (2021) 12:744348. [doi: 10.3389/fmicb.2021.744348](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744348).
- Chi W, et al., Mitochondrial DNA oxidation induces imbalanced activity of NLRP3/NLRP6 inflammasomes by activation of caspase-8 and BRCC36 in dry eye. *Journal of Autoimmunity*. (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2017.02.006>.
- Christgen S, D.E. Place, and T.D. Kanneganti, Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. *Cell Res* 30 (2020) 315-327. [doi: 10.1038/s41422-020-0295-8](https://doi.org/10.1038/s41422-020-0295-8).
- Christgen S, Zheng M, Kesavardhana S, Karki R, Malireddi R.K.S, Banoth B, Place D.E, Briard B, Sharma BR, Tuladhar S, Samir P, Burton A, Kanneganti T-D. Identification of the PANoptosome: A Molecular Platform Triggering Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2020) 10:237. [doi: 10.3389/fcimb.2020.00237](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00237).
- Chukowry P.S, D.A. Spittle, and A.M. Turner, Small Airways Disease, Biomarkers and COPD: Where are We? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 16 (2021) 351-365. [doi: 10.2147/COPD.S280157](https://doi.org/10.2147/COPD.S280157).
- Coll R.C, A.A. Robertson, J.J. Chae, S.C. Higgins, R. Munoz-Planillo, M.C. Inserra, I. Vetter, L.S. Dungan, B.G. Monks, A. Stutz, D.E. Croker, M.S. Butler, M. Haneklaus, C.E. Sutton, G. Nunez, E. Latz, D.L. Kastner, K.H. Mills, S.L. Masters, K. Schroder, M.A. Cooper, and L.A. O'Neill, A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 21 (2015) 248-55. [doi: 10.1007/s10787-017-0401-9](https://doi.org/10.1007/s10787-017-0401-9).
- Coll R.C, J.R. Hill, C.J. Day, A. Zamoshnikova, D. Boucher, N.L. Massey, J.L. Chitty, J.A. Fraser, M.P. Jennings, A.A.B. Robertson, and K. Schroder, MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol* 15 (2019) 556-559. [doi: 10.1038/s41589-019-0277-7](https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7).
- Corcoran S.E, R. Halai, and M.A. Cooper, Pharmacological Inhibition of the Nod-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome with MCC950. *Pharmacol Rev* 73 (2021) 968-1000. [doi: https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000171](https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000171).
- Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. Réparation et régénération de l'épithélium



Respiratoire. Médecine science (2005) 21 : 1063-9.  
<https://doi.org/10.1051/medsci/200521121063>

## D

- Dang A.T, Marsland B.J. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. *Mucosal Immunology* (2009) 2:843–850. [doi: 10.1038/s41385-019-0160-6](https://doi.org/10.1038/s41385-019-0160-6).
- Davis J.D, Wypych T.P. Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. (2021) 14:978–990. [doi: 10.1038/s41385-020-00370-7](https://doi.org/10.1038/s41385-020-00370-7).
- Deets K.A, Vance R.E. Inflammasomes and adaptive immune responses. *Nature Immunology* (2021) 412–422. [doi: 10.1038/s41590-021-00869-6](https://doi.org/10.1038/s41590-021-00869-6).
- Demarco B, K.W. Chen, and P. Broz, Cross talk between intracellular pathogens and cell death. *Immunol Rev* 297 (2020) 174-193. [doi: 10.1111/imr.12892](https://doi.org/10.1111/imr.12892).
- Dhuriya T.K, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of neuroinflammation* (2018) 15:199. [doi: 10.1186/s12974-018-1235-0](https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0).
- Disteldorf E.M, Krebs C.F, H.J, Turner J.E, Nouailles G, Tittel A, Meyer-Schwesinger C, Stege G, Brix S, Velden J, Wiech T, Helmchen U, Oliver M, Steinmetz O.M, Peters A, Bennstein S.B, Kaffke A, Llanto C, Lira S.A, Mittrücker H.W, Rolf A.K, Stahl R.A.K, Kurts C, Kaufmann S. H.E, Panzer U. CXCL5 Drives Neutrophil Recruitment in TH17-Mediated GN. *Basic Research*. (2015) 26: 55–66. [doi: 10.1681/ASN.2013101061](https://doi.org/10.1681/ASN.2013101061).
- Doonan F, Cotter T. G. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 44 (2008) 200–204. [doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.006).
- Doz E, N. Noulain, E. Boichot, I. Guenon, L. Fick, M. Le Bert, V. Lagente, B. Ryffel, B. Schnyder, V.F. Quesniaux, and I. Couillin, Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol* 180 (2008) 1169-78. [doi: 10.4049/jimmunol.180.2.1169](https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.1169).

## E

- Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, (2007) 495-516. [doi: 10.1080/01926230701320337](https://doi.org/10.1080/01926230701320337).
- Emming E, Schroder K. Tiered DNA sensors for escalating responses. *Science* 365 (6460), 1375-1376. [doi: 10.1126/science.aay2701](https://doi.org/10.1126/science.aay2701).
- Erb-Downward, J.R., Thompson, D.L., Han, M.K., Freeman, C.M., McCloskey, L., Schmidt, L.A., Young, V.B., Toews, G.B., Curtis, J.L., Sundaram, B., *et al.*. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS one* 6, (2011)e16384. [doi: 10.1371/journal.pone.0016384](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016384).
- European Environment Agency. (2019). <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2019>.

## F

- Faiz, A., Heijink, I.H., Vermeulen, C.J., Guryev, V., van den Berge, M., Nawijn, M.C., and Pouwels, S.D. Cigarette smoke exposure decreases CFLAR expression in the bronchial epithelium, augmenting susceptibility for lung epithelial cell death and DAMP release. *Sci Rep* 8, (2018) 12426. [doi: 10.1038/s41598-018-30602-7](https://doi.org/10.1038/s41598-018-30602-7).

- Fakhrzadeh L, Laskin J.D, Laskin D.L. Ozone-induced production of nitric oxide and TNF- $\alpha$  and tissue injury are dependent on NF- $\kappa$ B p50. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2004) 287: L279–L285. doi: [10.1152/ajplung.00348.2003](https://doi.org/10.1152/ajplung.00348.2003).
- Falcon-Rodriguez, C.I., Osornio-Vargas, A.R., Sada-Ovalle, I., and Segura-Medina, P. (2016). Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol* 7, 3. doi: [10.3389/fimmu.2016.00003](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003).
- Faner R, P. Sobradillo, A. Noguera, C. Gomez, T. Cruz, A. Lopez-Giraldo, E. Ballester, N. Soler, J.I. Arostegui, P. Pelegrin, R. Rodriguez-Roisin, J. Yague, B.G. Cosio, M. Juan, and A. Agusti, The inflammasome pathway in stable COPD and acute exacerbations. *ERJ Open Res* 2 (2016). doi: [10.1183/23120541.00002-2016](https://doi.org/10.1183/23120541.00002-2016).
- Fays C, Carlier F.M, Gohy S, Pilette C. Secretory Immunoglobulin A Immunity in Chronic Obstructive Respiratory Diseases. *Cells* 2022, 11, 1324. doi: [10.3390/cells11081324](https://doi.org/10.3390/cells11081324).
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513. doi: [10.1038/nature07710](https://doi.org/10.1038/nature07710)
- Flodby P, Borok Z, Banfalvi A, Zhou B, Gao D, Mino P, Ann D.K, Morrissey E.E, Crandall E.D. Directed expression of Cre in alveolar epithelial type 1 cells. (2010) 43(2):173-8. doi: [10.1165/rcmb.2009-0226OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0226OC).
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen H.K, Ciofu O. Høiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *nature reviews microbiology* (2012) 841–851. doi: [10.1038/nrmicro2907](https://doi.org/10.1038/nrmicro2907).
- Food and Drug Administration (FDA): <https://www.fda.gov/tobacco-products/products-guidance-regulations/rules-regulations-and-guidance>
- Franceinfo. (2015). Pollution à l’ozone : Quels sont les risques pour la santé ? Franceinfo. [https://www.francetvinfo.fr/sante/maladie/pollution-a-lozone-quels-sont-les-risques-pour-la-sante\\_1193615.html](https://www.francetvinfo.fr/sante/maladie/pollution-a-lozone-quels-sont-les-risques-pour-la-sante_1193615.html)
- Fujimura, K.E., Sitarik, A.R., Havstad, S., Lin, D.L., Levan, S., Fadrosch, D., Panzer, A.R., LaMere, B., Rackaityte, E., Lukacs, N.W., et al.. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med* 22, (2016) 1187-1191. doi: [10.1038/nm.4176](https://doi.org/10.1038/nm.4176).

## G

- Ghimire, L., Paudel, S., Jin, L., Baral, P., Cai, S., and Jeyaseelan, S. NLRP6 negatively regulates pulmonary host defense in Gram-positive bacterial infection through modulating neutrophil recruitment and function. *PLOS Pathogens* (2018) 14, e1007308. doi: [10.1371/journal.ppat.1007308](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007308).
- Ghimire, L., Paudel, S., Jin, L., Baral, P., Cai, S., and Jeyaseelan, S. The NLRP6 inflammasome in health and disease. *Mucosal Immunology* (2020) 13:388–398. doi: [10.1038/s41385-020-0256-z](https://doi.org/10.1038/s41385-020-0256-z).
- Gilhodes J.C, Y. Jule, S. Kreuz, B. Stierstorfer, D. Stiller, and L. Wollin, Quantification of Pulmonary Fibrosis in a Bleomycin Mouse Model Using Automated Histological Image Analysis. *PLoS One* 12 (2017) e0170561. doi: [10.1371/journal.pone.0170561](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170561).

- Gao M, Zhang P, Huang L, Shao H, Duan S, Li C, Zhang Q, Wang W, Wu Y, Wang J, Liu H, Feng F. Is NLRP3 or NLRP6 inflammasome activation associated with inflammation-related lung tumorigenesis induced by benzo(a)pyrene and lipopolysaccharide?. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 185 (2019) 109687. doi: [10.1016/j.ecoenv.2019.109687](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109687).
- Gao H, Cao M, Yao Y, Hu W, Sun H, Zhang Y, Zeng C, Tang J, Luan S, Chen P. Dysregulated Microbiota-Driven Gasdermin D Activation Promotes Colitis Development by Mediating IL-18 Release. *Front. Immunol.* (2021) 12:750841. doi: [10.3389/fimmu.2021.750841](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750841).
- Gautheron J. Stéatohépatite non alcoolique et nécroptose Les différentes facettes de RIPK3. *Medecine sciences.* (2017) 33 : 832–834. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310007>.
- Gordon R, Albornoz E.A, Christie D.C, Langley M.R, Kumar V, Manotovani S, Robertson A. A. B, Butler M. S, Rowe D. B, O'Neill L. A, Kanthasamy A.G, Schroder K, Cooper M.A, Woodruff T.M. *Sci Transl Med.* 2018 October 31; 10(465). doi: [10.1126/scitranslmed.aah4066](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4066).
- Gravelle S, Joly L, Detcheverry F, Ybert C, Cottin-Bizonne C, Bocquet L. Optimizing water permeability through the hourglass shape of aquaporins. *PNAS* (2013) 110 (41) 16367-16372. doi: [10.1073/pnas.1306447110](https://doi.org/10.1073/pnas.1306447110)

## H

- Han S.H, Mallampalli R.K. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc.* (2015) May;12(5):765-74. doi: [10.1513/AnnalsATS.201411-507FR](https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201411-507FR).
- Hara, H., Seregin, S.S., Yang, D., Fukase, K., Chamaillard, M., Alnemri, E.S., Inohara, N., Chen, G.Y., and Nunez, G. The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection. *Cell* 175, (2018) 1651-1664 e1614. doi: [10.1016/j.cell.2018.09.047](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.047).
- Heilig R, M.S. Dick, L. Sborgi, E. Meunier, S. Hiller, and P. Broz, The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1beta secretion in mice. *Eur J Immunol* 48 (2018) 584-592. doi: [10.1002/eji.201747404](https://doi.org/10.1002/eji.201747404).
- Hecht S.S. Lung Carcinogenesis by Tobacco Smoke. *Int J Cancer.* 2012 December 15; 131(12): 2724–2732. doi: [10.1002/ijc.27816](https://doi.org/10.1002/ijc.27816).
- Hu J.J, X. Liu, S. Xia, Z. Zhang, Y. Zhang, J. Zhao, J. Ruan, X. Luo, X. Lou, Y. Bai, J. Wang, L.R. Hollingsworth, V.G. Magupalli, L. Zhao, H.R. Luo, J. Kim, J. Lieberman, and H. Wu, FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation. *Nat Immunol* 21 (2020) 736-745. doi: [10.1038/s41590-020-0669-6](https://doi.org/10.1038/s41590-020-0669-6)

## I

- Inserm. (2020). Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) · Inserm, La science pour la santé. Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/bronchopneumopathie-chronique-obstructive-bpco/>.
- Inserm. (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée: Vers une conception plus dynamique. [https://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/5024/MS\\_2002\\_8-9\\_841.html?sequence=35&isAllowed=y](https://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/5024/MS_2002_8-9_841.html?sequence=35&isAllowed=y)
- Institut royal d'Aéronomie Spatiale de Belgique (IASB) (2022) <https://www.aeronomie.be/fr/researchdomains/surveillance-lozone-stratospherique>

Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, (2009) 788-792. [doi: 10.1038/nature08476](https://doi.org/10.1038/nature08476).

Iurescia S, Fioretti D, Rinaldi M. The Innate Immune Signalling Pathways: Turning RIG-I Sensor Activation against Cancer. (2020) 12, 3158. [doi:10.3390/cancers12113158](https://doi.org/10.3390/cancers12113158)

## J

Jablonska-Trypuc, A., Matejczyk, M., and Rosochacki, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 31, 177-183 (2016). [doi: 10.3109/14756366.2016.1161620](https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620).

Jamilloux Y, Thomas Henry T. Les inflammasomes Plates-formes de l'immunité innée. *médecine/sciences*. (2013) ; 29 : 975-84. [doi: 10.1051/medsci/20132911013](https://doi.org/10.1051/medsci/20132911013)

## K

Kalchiem-Dekel O, Yao X, Barochia A.V, Kaler M, Figueroa D.M, Karkowsky W.B, Gordon E.M, Meixia Gao I, Fergusson M.M, Qu X, Liu P, Li Y, Seifuddin F, Pirooznia M, and Levine S.J. Apolipoprotein E Signals via TLR4 to Induce CXCL5 Secretion by Asthmatic Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. (2020) Vol 63, Iss 2, pp 185–197. [doi: 10.1165/rcmb.2019-0209OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0209OC)

Kambara, H., Liu, F., Zhang, X., Liu, P., Bajrami, B., Teng, Y., Zhao, L., Zhou, S., Yu, H., Zhou, W., et al. Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. *Cell reports* 22, (2018) 2924-2936. [doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.067](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.067).

Kang L, Dai J, Wang Y, Shi P, Zou Y, Pei J, et al. Blocking Caspase-1/Gsdmd and Caspase-3/-8/Gsdme pyroptotic pathways rescues silicosis in mice. *PLoS Genet*. (2022) 18(12): e1010515. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010515>.

Karmarkar D, Rock K. L. Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic neutrophilic inflammatory response. (2013) *Immunology*, 140, 483–492. [doi:10.1111/imm.12159](https://doi.org/10.1111/imm.12159)

Karki R, Sundaram B, Sharma B.R, Lee S, Subbarao Malireddi R.K., Nguyen L.N, Christgen S, Zheng M, Wang Y, Samir P, Neale G, Vogel P, Kanneganti T-D. ADAR1 restricts ZBP1-mediated immune response and PANoptosis to promote tumorigenesis. *Cell Rep*. (2021) 19; 37(3): 109858. [doi:10.1016/j.celrep.2021.109858](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109858).

Katre A, Ballinger C, Akhter H, Fanucch M, Kim D-K, Postlethwait E, Liu R-M. Increased transforming growth factor beta 1 expression mediates ozone-induced airway fibrosis in mice. *Inhalation Toxicology*. (2011) 23(8): 486–494. [doi: 0.3109/08958378.2011.584919](https://doi.org/0.3109/08958378.2011.584919).

Kuschner, W.G., D'Alessandro, A., Wong, H., and Blanc, P.D. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 9, (1996) 1989-1994. [doi: 10.1183/09031936.96.09101989](https://doi.org/10.1183/09031936.96.09101989).

Kuida K, J.A. Lippke, G. Ku, M.W. Harding, D.J. Livingston, M.S. Su, and R.A. Flavell, Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267 (1995) 2000-3. [doi: 10.1126/science.7535475](https://doi.org/10.1126/science.7535475).

Kuriakose T, Kanneganti T.D. ZBP1: Innate sensor regulating cell death and inflammation. *Trends Immunol*. 2018 February ; 39(2): 123–134. [doi:10.1016/j.it.2017.11.002](https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.002).

## L

- Lee, K.H., Lee, C.H., Woo, J., Jeong, J., Jang, A.H., and Yoo, C.G. Cigarette Smoke Extract Enhances IL-17A-Induced IL-8 Production via Up-Regulation of IL-17R in Human Bronchial Epithelial Cells. *Molecules and cells* 41, (2018) 282-289. doi: [10.14348/molcells.2018.2123](https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2123).
- Leopold, P.L., O'Mahony, M.J., Lian, X.J., Tilley, A.E., Harvey, B.-G., and Crystal, R.G. Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS one* 4, (2009) e8157-e8157. doi: [10.1371/journal.pone.0008157](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008157).
- Le Roux M, A. Ollivier, G. Kervoaze, T. Beke, L. Gillet, M. Pichavant, and P. Gosset, IL-20 Cytokines Are Involved in Epithelial Lesions Associated with Virus-Induced COPD Exacerbation in Mice. *Biomedicines* 9 (2021). doi: [10.3390/biomedicines9121838](https://doi.org/10.3390/biomedicines9121838).
- Levy, M., Thaiss, C.A., Zeevi, D., Dohnalova, L., Zilberman-Schapira, G., Mahdi, J.A., David, E., Savidor, A., Korem, T., Herzig, Y., et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* 163, (2015) 1428-1443. doi: [10.1016/j.cell.2015.10.048](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.048).
- Lewis T.C, Robins T.G, Mentz G.B, Zhang X,1, Mukherjee B, Lin X, Gerald J. Keeler G. Dvonch J.T, et al., Air pollution and respiratory symptoms among children with asthma: Vulnerability by corticosteroid use and residence area. *Science of the Total Environment* 448 (2013) 48–55. doi.org/[10.1016/j.scitotenv.2012.11.070](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.070).
- Li R, Zhu S. NLRP6 inflammasome. *Molecular Aspects of Medicine*. (2020) ;76:100859. doi: [10.1016/j.mam.2020.100859](https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100859).
- Li F, Wiegman C, Seiffert JM, Zhu J, Clarke C, et al. Effects of N-Acetylcysteine in Ozone-Induced Chronic Obstructive Pulmonary. *Disease Model*. (2013) PLoS ONE 8(11): e80782. doi:[10.1371/journal.pone.0080782](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080782).
- Li, Y., Lu, Y., Zhao, Z., Wang, J., Li, J., Wang, W., Li, S., and Song, L. Relationships of MMP-9 and TIMP-1 proteins with chronic obstructive pulmonary disease risk: A systematic review and meta-analysis. *J Res Med Sci* 21, (2016) 12-12.
- Li F, Xu M, Wang M, Wang L, Wang H, Zhang H, Chen Y, Gong J, Zhang J (J), Adcock I.M, Chung K.F, Zhou X. *Respiratory Research* (2018) 19:230 <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0931-8>.
- Linder R, Rönmark E, Pourazar J, Behndig A, Blomberg A, Lindberg A. Serum metalloproteinase-9 is related to COPD severity and symptoms - cross-sectional data from a population based cohort-study. *Respiratory Research* (2015) 16:28 doi : [10.1186/s12931-015-0188-4](https://doi.org/10.1186/s12931-015-0188-4)
- Livre d'embryologie Humaine de Larsen, 5<sup>ème</sup> édition, Copyright © 2015, 2009 Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc. ISBN : 978-1-4557-0684-6. Chapitre 11, Page 251 à 260.
- L'ozone Airparif. (2021). Consulté 14 décembre 2021, à l'adresse <https://www.airparif.asso.fr/lozone>
- Li L, Tong A, Zhang Q, Wei Y, and Wei X. The molecular mechanisms of MLKL-dependent and MLKL-independent necrosis. *Journal of Molecular Cell Biology*. (2021) 13(1), 3–14. doi:[10.1093/jmcb/mjaa055](https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa055).
- Liu P, Sun M, Sader. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. 2006 Feb;22 Suppl B(Suppl B):25B-30B. doi: [10.1016/s0828-282x\(06\)70983-7](https://doi.org/10.1016/s0828-282x(06)70983-7).
- Lu, H.P.Z. Van Eeckhoutte, G. Liu, P.M. Nair, B. Jones, C.M. Gillis, B.C. Nalkurthi, F. Verhamme, T. Buyle-Huybrecht, P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe, G.G. Brusselle, J.C. Horvat, J.M. Murphy, P.A. Wark, K.R. Bracke, M. Fricker, and P.M. Hansbro, Necroptosis Signaling Promotes Inflammation, Airway Remodeling, and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 204 (2021) 667-681. doi: [10.1164/rccm.202009-3442OC](https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3442OC).
- Lu Z, Van Eeckhoutte H.P, Liu G, Nair G.M, Jones B, Gillis C.M, Nalkurthi B.C, Verhamme F, Buyle-Huybrecht T, Vandenabeele P. Necroptosis Signaling Promotes Inflammation, Airway

Remodeling, and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 204, Iss 6. (2021) pp 667–681. [doi : 10.1164/rccm.202009-3442OC](https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3442OC).

## M

- Mackarel A.J, Cottell D.C, Russell K.J, FitzGerald M.X, and O'Connor C.M. Migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells is not blocked by matrix metalloproteinase or serine protease inhibitors. *Am. J. Respir. (199) Cell Mol. Biol. Vol. 20*, pp. 1209–1219. [doi: 10.1165/ajrcmb.20.6.3539](https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.6.3539).
- Mahalanobish, S., Dutta, S., Saha, S., Sil, P.C., Melatonin induced suppression of ER stress and mitochondrial dysfunction inhibited NLRP3 inflammasome activation in COPD mice, *Food and Chemical Toxicology*, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111588>.
- Malireddi R.K.S, Kesavardhana S, Kanneganti T-D. ZBP1 and TAK1: Master Regulators of NLRP3 Inflammasome/Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PAN-optosis). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2019) 9:406. [doi: 10.3389/fcimb.2019.00406](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00406)
- Marshall CL, Hasani K and Mookherjee N Immunobiology of Steroid-Unresponsive Severe Asthma. *Front. Allergy.* (2021) 2:718267. [doi: 10.3389/falgy.2021.718267](https://doi.org/10.3389/falgy.2021.718267).
- Marsland B.J, Gollwitzer E.S. Host–microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* (2014) 14, 827–835. <https://doi.org/10.1038/nri3769>.
- Martinon F, V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp, Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440 (2006) 237-41. [doi: 10.1038/nature04516](https://doi.org/10.1038/nature04516).
- Matera M.G, Luigino Calzetta L, Cazzola M. TNF-a inhibitors in asthma and COPD: We must not throw the baby out with the bath water. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 23 (2010) 121–128. [doi:10.1016/j.pupt.2009.10.007](https://doi.org/10.1016/j.pupt.2009.10.007).
- Matheis F, Muller P.A, Graves C.L, Gabanyi I, Kerner Z.J, Costa-Borges D, Ahrends T, Rosenstiel P, Mucida D. Adrenergic Signaling in Muscularis Macrophages Limits Infection-Induced Neuronal Loss. *Cell* 180 (2020) 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.002>.
- McKee C.M, Coll R.C. NLRP3 inflammasome priming: A riddlewrapped in amystery inside an enigma. *J Leukoc Biol.* (2020) 108:937–952. [doi: 10.1002/JLB.3MR0720-513R](https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0720-513R).
- Mehta S., Dhawan V. Exposure of cigarette smoke condensate activates NLRP3 inflammasome in THP-1 cells in a stage-specific manner: An underlying role of innate immunity in atherosclerosis. *Cell Signal* 72 (2020) 109645. [doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109645](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109645).
- Mehta S, N. Srivastava, A. Bhatia, and V. Dhawan, Exposure of cigarette smoke condensate activates NLRP3 inflammasome in vitro and in vivo: A connotation of innate immunity and atherosclerosis. *Int Immunopharmacol* 84 (2020) 106561. [doi: 10.1016/j.intimp.2020.106561](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106561).
- Menzies-Gow A, Ying S, Sabroe I, Stubbs V.L, Soler D, Williams T.J, Kay A.B et al., Eotaxin (CCL11) and Eotaxin-2 (CCL24) Induce Recruitment of Eosinophils, Basophils, Neutrophils, and Macrophages As Well As Features of Early- and Late-Phase Allergic Reactions Following Cutaneous Injection in Human Atopic and Nonatopic Volunteers. *Journal of Immunology.* (2002), 169: 2712–2718. [doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2712](https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2712).
- Metcalf H. J, Lea S, Hughes D, Khalaf R, Abbott-Banner K., Singh D. Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages. *Clinical and Experimental Immunology.* (2014) 176: 461–472. [doi: 10.1111/cei.12289](https://doi.org/10.1111/cei.12289).

- Michaudel C, Couturier-Maillard A, Chenuet P, Maillet I, Mura C, Couillin I, Gombault A, Quesniaux V.F, Huaux F, Ryffel B. Inflammasome, IL-1 and inflammation in ozone-induced lung injury. *Am J Clin Exp Immunol* (2016) 5(1):33-40.
- Michaudel C, Mackowiak C, Maillet I, Fauconnier L, Akdis C.A, Sokolowska M, Dreher A, Tan H.T.T, Quesniaux V.F, Ryffel B, Togbe D. Ozone exposure induces respiratory barrier biphasic injury and inflammation controlled by IL-33. (2018) 142(3):942-958. [doi: 10.1016/j.jaci.2017.11.044](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.044).
- Michaudel C, Fauconnier L, Jule Y, Ryffel B. Functional and morphological differences of the lung upon acute and chronic ozone exposure in mice. *Sci Rep* 8 (2018) 10611.
- Mo R, J. Zhang, Y. Chen, and Y. Ding, Nicotine promotes chronic obstructive pulmonary disease via inducing pyroptosis activation in bronchial epithelial cells. *Mol Med Rep* 25 (2022). [doi: 10.3892/mmr.2022.12608](https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12608).
- Mohajeri, M.H., Brummer, R.J.M., Rastall, R.A., Weersma, R.K., Harmsen, H.J.M., Faas, M., and Eggersdorfer, M. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European journal of nutrition* 57, (2018) 1-14. [doi: 10.1007/s00394-018-1703-4](https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4).
- Morris G.F, S. Danchuk, Y. Wang, B. Xu, R.J. Rando, A.R. Brody, B. Shan, and D.E. Sullivan, Cigarette smoke represses the innate immune response to asbestos. *Physiol Rep* 3 (2015). [doi: 10.14814/phy2.12652](https://doi.org/10.14814/phy2.12652).
- Morissette M.C, B.N. Jobse, D. Thayaparan, J.K. Nikota, P. Shen, N.R. Labiris, R. Kolbeck, P. Nair, A.A. Humbles, and M.R. Stampfli, Persistence of pulmonary tertiary lymphoid tissues and anti-nuclear antibodies following cessation of cigarette smoke exposure. *Respir Res* 15 (2014) 49. [doi: 10.1186/1465-9921-15-49](https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-49).
- Morsch A.L.B.C, Wisniewskia E, Luciano T.F, Comina V.H et al., Cigarette smoke exposure induces ROS-mediated autophagy by regulating sestrin, AMPK, and mTOR level in mice. *Redox report*. (2019) VOL. 24, NO. 1, 27–33 <https://doi.org/10.1080/13510002.2019.1601448>
- Morse D, Rosas I.O. Tobacco Smoke–Induced Lung Fibrosis and Emphysema. *Annu. Rev. Physiol.* 2014. 76:24.1–24.21. [doi: 10.1146/annurev-physiol-021113-170411](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170411)
- Mulay S, Desai J, Kumar S.V, Eberhard J.N, Thomasova D, Romoli S, Grigorescu M, Kulkarni O.P, Popper B, Vielhauer V et al., Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL mediated necroptosis. *Nature communications* 7:10274 [doi: 10.1038/ncomms10274](https://doi.org/10.1038/ncomms10274).

## N

- Nadigel, J., Préfontaine, D., Baglole, C.J., Maltais, F., Bourbeau, J., Eidelman, D.H., and Hamid, Q.. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8+T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 12, (2011) 149. [doi: 10.1186/1465-9921-12-149](https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-149).
- Nachmias N, S. Langier, R.Y. Brzezinski, M. Siterman, M. Stark, S. Etkin, A. Avriel, Y. Schwarz, S. Shenhar-Tsarfaty, and A. Bar-Shai, NLRP3 inflammasome activity is upregulated in an in-vitro model of COPD exacerbation. *PLoS One* 14 (2019) e0214622. [doi: 10.1371/journal.pone.0214622](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214622).
- Nascimento M, A. Gombault, N. Lacerda-Queiroz, C. Panek, F. Savigny, M. Sbeity, M. Bourinet, M. Le Bert, N. Riteau, B. Ryffel, V.F.J. Quesniaux, and I. Couillin, Self-DNA release and STING-dependent sensing drives inflammation to cigarette smoke in mice. *Sci Rep* 9 (2019) 14848. [doi: 10.1038/s41598-019-51427-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-51427-y).
- Nascimento M, S. Huot-Marchand, A. Gombault, C. Panek, M. Bourinet, M. Fanny, F. Savigny, P. Schneider, M. Le Bert, B. Ryffel, N. Riteau, V.F.J. Quesniaux, and I. Couillin, B-Cell

Activating Factor Secreted by Neutrophils Is a Critical Player in Lung Inflammation to Cigarette Smoke Exposure. *Front Immunol* 11 (2020) 1622. [doi: 10.3389/fimmu.2020.01622](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01622).  
Nuka E, Ohnishi K, Terao J, Kawai Y. ATP/P2X7 receptor signaling as a potential anti-inflammatory target of natural polyphenols. *PLoS ONE* 13(9): (2018) e0204229.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204229>.

## O

Ojha, U.C., Singh, D.P., Choudhari, O.K., Gothi, D., and Singh, S. Correlation of Severity of Functional Gastrointestinal Disease Symptoms with that of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Multicenter Study. *Int J Appl Basic Med Res* 8, (2018) 83-88. [doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR\\_258\\_17](https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_258_17).  
O'Neill L. A. J, Golenbock D, Bowie A.G. The history of Toll-like receptors redefining innate immunity. *2013 Jun*;13(6):453-60. [doi: 10.1038/nri3446](https://doi.org/10.1038/nri3446).  
Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 2022 <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>  
Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 2018  
[https://www.lemonde.fr/planete/article/2018/05/02/la-pollution-de-l-air-tue-7-millions-de-personnes-par-an-dans-le-monde-alerte-l-oms\\_5293076\\_3244.html](https://www.lemonde.fr/planete/article/2018/05/02/la-pollution-de-l-air-tue-7-millions-de-personnes-par-an-dans-le-monde-alerte-l-oms_5293076_3244.html)  
Organisation mondiale de la Santé. (2022). *Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)*. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))  
Orning P, Lien E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *Leukoc Biol.* (2021) 109(1): 121–141. [doi:10.1002/JLB.3MR0420-305R](https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0420-305R).  
Ouest-France. (2022). La pollution fait toujours 9 millions de morts prématurés par an dans le monde, selon une étude. *Ouest-France.fr*. <https://www.ouest-france.fr/environnement/pollution/la-pollution-fait-toujours-9-millions-de-morts-prematures-par-an-dans-le-monde-selon-une-etude-f4bf9af4-d6ab-11ec-9b2d-786031940fdf>

## P

Pandian N, Kanneganti T.D. PANoptosis: A Unique Innate Immune Inflammatory Cell Death Modality. *J Immunol* (2022) 209 (9): 1625–1633.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200508>.  
Park J.W, Taube C, Swasey C, Kodama T, Joetham A, Balhorn A, Takeda K. Interleukin-1 Receptor Antagonist Attenuates Airway Hyperresponsiveness Following Exposure to Ozone. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2004) Vol. 30, pp. 830–836. [doi: 10.1165/rcmb.2003-0373OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0373OC).  
Pattaroni et al., Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. *Cell. Host & Microbe* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.019>.  
Pauwels N.D, Bracke K.R, Maes T, Pottelberge G.R.V, Garlanda C, Mantovani A, Joos G.F, Brusselle G.G. Cigarette smoke induces PTX3 expression in pulmonary veins of mice in an IL-1 dependent manner. *Respiratory Research* (2010) 11:134  
<http://respiratory-research.com/content/11/1/134>  
Polverino, F., Doyle-Eisele, M., McDonald, J., Wilder, J.A., Royer, C., Laucho-Contreras, M., Kelly, E.M., Divo, M., Pinto-Plata, V., Mauderly, J., et al. A novel nonhuman primate model of cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Pathol* 185, (2015) 741-755. [doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.006).  
Pouwels, S.D., Zijlstra, G.J., van der Toorn, M., Hesse, L., Gras, R., Ten Hacken, N.H., Krysko, D.V., Vandenabeele, P., de Vries, M., van Oosterhout, A.J., et al. Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 310, (2016) L377-386. [doi: 10.1152/ajplung.00174.2015](https://doi.org/10.1152/ajplung.00174.2015).



Putcha, N., Drummond, M.B., Wise, R.A., and Hansel, N.N. Comorbidities and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prevalence, Influence on Outcomes, and Management. *Semin Respir Crit Care Med* 36, (2015) 575-591. [doi: 10.1055/s-0035-1556063](https://doi.org/10.1055/s-0035-1556063).

## R

- Rao X, Zhou X, Wang G, Jie X, Xing B, Xu Y, Chen Y, Li J, Zhu K, Wu Z, Wu G, Wu C, Zhou R. NLRP6 is required for cancer-derived exosome-modified macrophage M2 polarization and promotes metastasis in small cell lung cancer. *Cell death and dis.* (2022) 21;13(10):891. [doi: 10.1038/s41419-022-05336-0](https://doi.org/10.1038/s41419-022-05336-0).
- Reid A.T, Sutanto E.N, Chander-Veerati P, Looi K, Li N.F, Iosifidis T, Loo S-T, Garratt L.W, Kicic A AusREC. Ground zero the airway epithelium. *Rhinovirus Infections.* (2019) [doi: 10.1016/B978-0-12-816417-4.00003-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816417-4.00003-2)
- Ridley C, Thornton D. J. Mucins: the frontline defence of the lung. (2018) 46 1099–1106 <https://doi.org/10.1042/BST20170402>
- Riteau N, Huot-Marchand S, Coullin I. Inflammasomes in cigarette smoke- or ozone-induced lung diseases. Book chapter in *Inflammasome Biology Fundamentals, Role in Disease States, and Therapeutic Opportunities*, 1st Edition - Editor: Pablo Pelegrin, Paperback ISBN: 9780323918022. November 23, 2022
- Rivera S, Jourquin J, Ogier C, Bernard A, Charton G, Tremblay E, Khrestchatsky M. Le système MMP/TIMP dans le système nerveux. *Medecine/sciences* (2004) 20 : 55-60. <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/200420155>
- Rofael SAD, McHugh TD, Troughton R, et al. Airway microbiome in adult survivors of extremely preterm birth: the EPICure study. *Eur Respir J.* (2019) 53: 1801225 <https://doi.org/10.1183/13993003.01225-2018>.
- Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri E.S. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications.* (2016) 8:14128. [Doi : 10.1038/ncomms14128](https://doi.org/10.1038/ncomms14128).
- Rovina, N., Dima, E., Gerassimou, C., Kollintza, A., Gratziou, C., and Roussos, C. Interleukin-18 in induced sputum: association with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 103, (2009) 1056-1062.
- Ruhl S, Broz P. Regulation of Lytic and Non-Lytic Functions of Gasdermin Pores. *JMB.* (2022) Volume 434, Issue 4. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167246>
- Ruhl S, K. Shkarina, B. Demarco, R. Heilig, J.C. Santos, and P. Broz, ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* 362 (2018) 956-960. [doi: 10.1126/science.aar7607](https://doi.org/10.1126/science.aar7607).
- Ruhl S, and P. Broz, Regulation of Lytic and Non-Lytic Functions of Gasdermin Pores. *J Mol Biol* 434 (2022) 167246. *Diseases: Current Understanding and Future Perspectives.* [doi: 10.1016/j.jmb.2021.167246](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167246).
- Rumora L, I. Hlapcic, A. Hulina-Tomaskovic, A. Somborac-Bacura, M. Bosnar, and M.G. Rajkovic, Pathogen-associated molecular patterns and extracellular Hsp70 interplay in NLRP3 inflammasome activation in monocytic and bronchial epithelial cellular models of COPD exacerbations. *APMIS* 129 (2021) 80-90. [doi: 10.1111/apm.13089](https://doi.org/10.1111/apm.13089).
- Randall Harrell C, Sadikot R, Pascual J, Fellabaum C, Jankovic M.G, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Lung. *Stem Cells International* Volume 2019, Article ID 4236973, 14 pages <https://doi.org/10.1155/2019/4236973>.

## S

Saad A, B. Khemakhem R. MhamedS, C. Fahem N, Migaou A, Joobeur S, Rouatbi N,

- Study of the role of blood eosinophil count in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease hospitalized in a Tunisian Center. *Pan African Medical Journal*. (2019) 34:138 [doi : 10.11604/pamj.2019.34.138.17392](https://doi.org/10.11604/pamj.2019.34.138.17392)
- Samuelson D.R, Welsh D.A, Shellito J.E. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front. Microbiol*. (2015).6:1085. [doi: 10.3389/fmicb.2015.01085](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01085).
- Sanches R.C.O, Souza C, Marinho F.V, Mambelli F.S, Morais S.B, Guimarães E.S Oliveira S.C. NLRP6 Plays an Important Role in Early Hepatic Immunopathology Caused by *Schistosoma mansoni*. *Infection*. *Front. Immunol*. (2020) 11:795. [doi: 10.3389/fimmu.2020.00795](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00795).
- Santoro A, Tomino C, Prinzi G, Palma Lamonaca P, Vittorio Cardaci V, Massimo Fini M, Russoa P. Tobacco Smoking: Risk to Develop Addiction, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Lung Cancer. (2019) 2212-3970/19 \$58.00+.00. [doi: 10.2174/1574892814666190102122848](https://doi.org/10.2174/1574892814666190102122848).
- Schwierzeck V, Hülpiusch C, Reiger M. Microbiome of Barrier Organs in Allergy: Who Runs the World? *Germs! Handb Exp Pharmacol*. (2022) 268:53-65. [doi: 10.1007/164\\_2021\\_478](https://doi.org/10.1007/164_2021_478).
- Sethi S, N. Evans, B.J. Grant, and T.F. Murphy, New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 347 (2002) 465-71. [doi: 10.1056/nejmoa012561](https://doi.org/10.1056/nejmoa012561).
- Seys, L.J., Verhamme, F.M., Schinwald, A., Hammad, H., Cunoosamy, D.M., Bantsimba-Malanda, C., Sabirsh, A., McCall, E., Flavell, L., Herbst, R., et al. (2015). Role of B Cell-Activating Factor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 192, 706-718. [doi: 10.1164/rccm.201501-0103OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201501-0103OC).
- Shi J, Y. Zhao, K. Wang, X. Shi, Y. Wang, H. Huang, Y. Zhuang, T. Cai, F. Wang, and F. Shao, Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526 (2015) 660-5. [doi: 10.1038/nature15514](https://doi.org/10.1038/nature15514).
- Solleti, S.K., Simon, D.M., Srisuma, S., Arikan, M.C., Bhattacharya, S., Rangasamy, T., Bijli, K.M., Rahman, A., Crossno, J.T., Jr., Shapiro, S.D., and Mariani, T.J. Airway epithelial cell PPARgamma modulates cigarette smoke-induced chemokine expression and emphysema susceptibility in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 309, (2015) L293-304. [doi: 10.1152/ajplung.00287.2014](https://doi.org/10.1152/ajplung.00287.2014).
- Spel L, Martinon F. Gasdermin D opens the way for NETs. *Cell biology*. (2018) 14(12):690-692. [doi: 10.1038/s41584-018-0124-3](https://doi.org/10.1038/s41584-018-0124-3).
- Stämpfli, M.R., and Anderson, G.P. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nature Reviews Immunology* 9, (2009) 377. [doi: 10.1038/nri2530](https://doi.org/10.1038/nri2530).
- Stutz A, Golenbock D.T, Latz E. Inflammasomes: too big to miss. *Clin. Invest*. 119:3502–3511 (2009). [doi:10.1172/JCI40599](https://doi.org/10.1172/JCI40599).
- Sun S, Schiller J.H, Gazdar A.F. Lung cancer in never smokers a different disease. *Nat Rev Cancer*. (2007) 7(10):778-90. [doi: 10.1038/nrc2190](https://doi.org/10.1038/nrc2190).
- Swan G.E, Lessov-Schlaggar C.N. The Effects of Tobacco Smoke and Nicotine on Cognition and the Brain. *Neuropsychol Rev* (2007) 17:259–273. [doi 10.1007/s11065-007-9035-9](https://doi.org/10.1007/s11065-007-9035-9).

## T

- Taabazuing C, Okondo M.C, Bachovchin D.A, Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages, *Cell Chemical Biology*. (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.009>
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology*, vol. 445: Autophagosome and Phagosome. (2008) 445:77-88. [doi: 10.1007/978-1-59745-157-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4).
- Thurston G, Burnett R.T, Turner M.C, Shi Y, Krewski D, Lall R, Ito K, Jerrett M, et al., Ischemic Heart Disease Mortality and Long-Term Exposure to Source-Related Components of U.S. Fine Particle Air Pollution. *Environmental Health Perspectives* • volume 124, number 6. (2016) <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1509777>.
- Tran H.B, Hamon R, Jersmann H, Ween M.P, Asare P, Haberberger R, Pant H, Hodge S.J. AIM2 nuclear exit and inflammasome activation in chronic obstructive pulmonary disease and response to cigarette smoke. *Journal of Inflammation*. (2021) 18:19

<https://doi.org/10.1186/s12950-021-00286-4>

Triantaphyllopoulos K, Hussain F, Pinart M, Zhang M, Li F, Adcock I, Kirkham P, Zhu J, Chung K.F. A model of chronic inflammation and pulmonary emphysema after multiple ozone exposures in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2011) 300: L691–L700, 2011. [doi:10.1152/ajplung.00252.2010](https://doi.org/10.1152/ajplung.00252.2010).

## V

Vanaja, S.K., Rathinam, V.A., and Fitzgerald, K.A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol* (2015) 25, 308-315. [doi: 10.1016/j.tcb.2014.12.009](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.009).

Vance, R.E. Cytosolic DNA Sensing: The Field Narrows. *Immunity* (2016) 45, 227-228. [doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.006](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.006).

Veldhuizen E. J.A, Haagsman H.P. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1467 (2000) 255-270. [doi: 10.1016/s0005-2736\(00\)00256-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00256-x).

Vieira S.M, Lemos H.P, Grespan R, Napimoga M.H, Dal-Secco D, Freitas A, Cunha T.M, Verri Jr W.A, Souza-Junior D.A. *British Journal of Pharmacology* (2009) 158, 779–789. [doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00367](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00367).

Voynow J.A, Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *biomoleculesReview.* (2021) 11, 1065. <https://doi.org/10.3390/biom11081065>.

## W

Wang B, Y.L. Chan, S. Zhou, S. Saad, H. Chen, and B.G. Oliver, Offspring sex affects the susceptibility to maternal smoking-induced lung inflammation and the effect of maternal antioxidant supplementation in mice. *J Inflamm (Lond)* 17. (2020) 24. [doi:10.1038/nature22393](https://doi.org/10.1038/nature22393)

Wang C, Kanneganti T-D. From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways. *Computational and Structural Biotechnology.* (2021) 4641–4657. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.038>

Wang X, Wu W, Zhang W, Booth J.L, Duggan E.S, Tian L, More S et., RIG-I overexpression decreases mortality of cigarette smoke exposed mice during influenza A virus infection. *Respiratory Research.* (2017) 18:166 [doi:10.1186/s12931-017-0649-z](https://doi.org/10.1186/s12931-017-0649-z).

Wang L, Wu L, Zhang S, Li Yao L. (2020) S0968-0896(20)30784-7

Wedzicha, R., Singh, and A.J. Mackay, Acute COPD exacerbations. *Clin Chest Med* 35 (2014) 157-63. [doi: 10.1016/j.ccm.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ccm.2013.11.001).

Wei X, Shao B, He Z, Ye T, Luo M, Sang Y, Liang X, Wang W, Luo S, Yang S, Zhang S, Gong C et al., Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Research.* (2015) 25:237-253. [doi:10.1038/cr.2015.9](https://doi.org/10.1038/cr.2015.9)

## X

Xu K-Y, Wu C-Y, Tong S, Xiong Peng Wang S-H. The selective Nlrp3 inflammasome inhibitor Mcc950 attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2018). Volume 503 Issue 4 P 3031-3037. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.089>

## Y

Yang Q, Wang J, Liu R, Wang Z, Li Y, Zhang Y, Hao X, Huang Y, Xie W, Wei H. Amelioration of concanavalin A-induced autoimmune hepatitis by magnesium isoglycyrrhizinate through

- inhibition of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup> subset proliferation. *Drug Design, Development and Therapy*. (2016) 10 443–453. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S92440>
- Yang Z, Schooling C.M, Kwok M.K. Genetic Evidence on the Association of Interleukin (IL)-1-Mediated Chronic Inflammation with Airflow Obstruction: A Mendelian Randomization Study. (2021) 18:4, 432-442. [doi: 10.1080/15412555.2021.1955848](https://doi.org/10.1080/15412555.2021.1955848).
- tB.G, Petri B, Salina D, Jenne C.N, Scott B.N.V, Zbytniuk L.D, Pittman K, Asaduzzaman M, WuK, Meijndert H.C, Malawista S.E et al., Dynamic NETosis is Carried Out by Live Neutrophils in Human and Mouse Bacterial Abscesses and During Severe Gram-Positive Infection. *Nat Med*. (2012) 18(9): 1386–1393. [doi:10.1038/nm.2847](https://doi.org/10.1038/nm.2847).
- Yoneyama M, Fujita T. Structural Mechanism of RNA Recognition by the RIG-I-like Receptors. *Immunity* 29. (2008). [doi 10.1016/j.immuni.2008.07.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.009).
- Yun Y, Srinivas G, Kuenzel S, Linnenbrink M, Alnahas S, Bruce K.D,Steinhoff U, BainesJ.F, Schaible U.E. Environmentally Determined Differences in the Murine Lung Microbiota and Their Relation to Alveolar Architecture. *PLoS ONE* 9(12). (2014) e113466. [doi:10.1371/journal.pone.0113466](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113466).

## Z

- Zahid A, Li B, Kombe A.J.K, Jin T, Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol*. (2019) 10:2538. [doi: 10.3389/fimmu.2019.02538](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538).
- Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464, (2010) 104-107. [doi: 10.1038/nature08780](https://doi.org/10.1038/nature08780).
- Zhang M.Y, Y.X. Jiang, Y.C. Yang, J.Y. Liu, C. Huo, X.L. Ji, and Y.Q. Qu, Cigarette smoke extract induces pyroptosis in human bronchial epithelial cells through the ROS/NLRP3/caspase-1 pathway. *Life Sci* 269 (2021) 119090. [doi: 10.1016/j.lfs.2021.119090](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119090).
- Zheng W, Xie W, Yin D, Luo R, Liu M, Guo F. ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK signaling. *Cell Communication and Signaling*. (2019) 17:42 <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0353-3>.
- Zhou B, Abbott D.W. Gasdermin E permits interleukin-1 beta release in distinct sublytic and pyroptotic phases. *Cell Reports*. (2021) 35, 108998. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108998>
- Zhuang J, H. Cui, L. Zhuang, Z. Zhai, F. Yang, G. Luo, J. He, H. Zhao, W. Zhao, Y. He, and E. Sun, Bronchial epithelial pyroptosis promotes airway inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *Biomed Pharmacother* 125 (2020) 109925. [doi: 10.1016/j.biopha.2020.109925](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109925).
- Zysman M, Deslee G, Caillaud D, Chanez P, Escamilla R, Court-Fortune I, Nesme-Meyer P, Perez T, Paillasseur J-L, Pinet C, Jebrak G, Roche N, Burgel P-R. Relationship between blood eosinophils, clinical characteristics, and mortality in patients with COPD. *International Journal of COPD*. (2017) 12 1819–1824. <http://dx.doi.org/10.2147/COPD.S129787>.



## Sarah HUOT-MARCHAND

### Etude de l'implication des récepteurs NLRP3 et NLRP6 ainsi que de la Gasdermine D dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition à la fumée de cigarette ou à l'ozone.

Dans le cadre de notre projet, nous avons étudié l'implication des récepteurs NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 et 6 (NLRP3 et NLRP6) et de la Gasdermine D dans l'inflammation pulmonaire induite par une exposition à la fumée de cigarette d'une part et à l'ozone d'autre part, chez la souris.

Dans une première partie, nous avons montré que l'inflammation pulmonaire induite par une exposition à la fumée de cigarette était dépendante de NLRP3 puisque les souris déficientes (*Nlrp3<sup>-/-</sup>*) et sauvages traitées avec un inhibiteur de NLRP3 ont une inflammation réduite. L'activation de la Gasdermine D dans les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages recrutés au niveau de l'espace bronchoalvéolaire dépend de NLRP3.

Dans une seconde partie, nous avons mis en évidence que l'inflammation pulmonaire induite par une exposition à l'ozone était dépendante de NLRP6 puisque les souris déficientes (*Nlrp6<sup>-/-</sup>*) ont une diminution de cette inflammation, des paramètres de fibrose et d'emphysème. L'activation de la Gasdermine D dans les pneumocytes de type 1 et une proportion réduite de macrophages recrutés dans l'espace bronchoalvéolaire dépend de NLRP6 et de l'activation de la caspase 11.

**Mots Clés :** Inflammasome, NLRP3, NLRP6, Gasdermine D, Pneumocytes de Type 1, Macrophages, Fumée de Cigarette, Ozone, Souris.

### Study of NLRP3 and NLRP6 receptors as well as Gasdermin D involvement in smoke cigarette or ozone induced pulmonary inflammation.

In our project, we studied NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 et 6 (NLRP3 et NLRP6) and Gasdermin D implications in smoke cigarette or ozone induced pulmonary inflammation in mice.

First, we showed that NLRP3 is involved in lung inflammation induced by smoke cigarette exposure and deficient mice (*Nlrp3<sup>-/-</sup>*) or wild type treated with NLRP3 inhibitor display a reduced inflammation. Gasdermin D activation in bronchial epithelial cells and airway recruited macrophages depends on NLRP3.

In a second part, we highlighted NLRP6 is involved in lung inflammation induced in by ozone exposure and deficient mice (*Nlrp6<sup>-/-</sup>*) display a decrease of inflammation, fibrotic foci and emphysema. Gasdermin D activation in type 1 pneumocytes and a reduced proportion of airway recruited macrophages depends on NLRP6 and caspase 11 activation.

**Key words:** Inflammasome, NLRP3, NLRP6, Gasdermine D, Type 1 Pneumocyte, Macrophages, Smoke Cigarette, Ozone, Mice.



Laboratoire d'Immunologie et  
Neurogénétique Expérimentales et  
Moléculaires UMR7355 - CNRS  
d'Orléans

