



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **22 novembre 2022**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame CHIRITA Daria**

Titre de la thèse : « *L'inflammasome pyrine et la fièvre Méditerranéenne familiale: le rôle du B30.2 et du CHS dans la régulation de pyrine* »

Résumé

Introduction

L'immunité innée représente la première ligne de défense du corps humain contre des pathogènes. Elle se repose sur des récepteurs codés par la lignée germinale qui détectent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRR). Les inflammasomes sont des complexes protéiques dont les récepteurs ou senseurs font partie des PRRs. Un inflammasome est typiquement constitué d'un senseur, un adaptateur et un effecteur. Les senseurs de l'inflammasome sont des PRRs qui détectent les signaux de danger. La détection d'un tel signal enclenche l'oligomérisation du senseur avec l'adaptateur ASC et l'effecteur caspase-1. L'activation de l'inflammasome induit le clivage et l'activation de caspase-1, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 β et IL-18. Parmi les inflammasomes, l'inflammasome pyrine se distingue puisqu'il détecte les modifications de l'homéostasie cellulaire (HAMP) sans interaction directe avec un PAMP ou un DAMP.

La protéine pyrine est une protéine de la famille TRIM de 781 acides aminés, codée par le gène *MEFV*. Comme la plupart des senseurs de l'inflammasome, elle contient un domaine PYD à son extrémité N-terminale qui permet l'interaction et l'oligomérisation avec l'adaptateur ASC. Le PYD de pyrine est suivi d'un domaine contenant deux sites de phosphorylation (S208 et S242) qui sont cruciaux pour la régulation de pyrine. Les résidus de 370 à 412 de pyrine constituent le domaine B-Box qui participe à l'oligomérisation de pyrine. Le domaine B-Box est suivi par une série d'hélices alpha (CHS) qui constitue un support pour le domaine à l'extrémité C-terminale – le B30.2.

RÉSUMÉ

Le B30.2 de pyrine comporte une cavité dont la surface est recouverte de résidus hydrophobes. Cette poche est un site potentiel d'interaction avec un ligand inconnu. La nature de ce ligand fait objet de nombreuses études et plusieurs candidats ont été identifiés. Néanmoins, il reste à confirmer quel est le ligand du B30.2 de pyrine – protéine ou petite molécule non-protéique – et quel est son rôle dans la régulation de l'inflammasome pyrine.

Pyrine est un senseur de l'inhibition de RhoA – une GTPase qui est ciblée par des effecteurs et toxines bactériennes tels que TcdA et TcdB de *C. difficile* ou YopE et YopT de *Y. pestis*. L'inhibition de pyrine à l'état basal est maintenue par la phosphorylation réalisée par les kinases PKN1/2 qui sont des effecteurs de RhoA. Plus récemment, une phosphatase responsable de la déphosphorylation de pyrine - PP2A - a été identifiée. Quand RhoA est inhibée, PKN1/2 sont également inhibées et la pyrine est déphosphorylée. Ceci constitue la première étape de son activation. Il existe un deuxième point de régulation de l'activation de l'inflammasome pyrine probablement lié à la dynamique des microtubules mais qui est mal connu.

Les mutations du gène *MEFV* sont à l'origine de la maladie auto-inflammatoire monogénique la plus répandue dans le monde – la fièvre Méditerranéenne familiale (FMF). La FMF touche en particulier les populations du bassin Méditerranéen. La prévalence de FMF est la plus élevée en Turquie (comprise entre 1 : 400 et 1 : 1000 selon différentes estimations), suivie par l'Arménie (1 : 500). La FMF est caractérisée par des attaques de fièvre stériles récurrentes accompagnées de douleurs abdominales, musculaires ou encore articulaires. Les poussées de FMF peuvent durer entre 12 heures et 3 jours. D'un point de vue moléculaire, les mutations de *MEFV* associées à la FMF diminuent de manière significative le seuil d'activation de l'inflammasome pyrine. *In vitro* la simple déphosphorylation des variants de pyrine associés à la FMF suffit pour déclencher l'activation de l'inflammasome. Le diagnostic de FMF est fait sur la base de critères cliniques et dans certains cas nécessite une confirmation génétique. La FMF est traitée par la colchicine dont la prise débute dès le diagnostic et est poursuivie à vie.

D'autres maladies auto-inflammatoires sont également associées aux mutations dans le gène *MEFV* ou à l'activation anormale de l'inflammasome pyrine. Notamment, l'auto-inflammation associée à la pyrine et dermatose neutrophilique (PAAND) est provoquée par des mutations du gène *MEFV* qui impactent les sites de phosphorylation de pyrine. D'autres, comme le déficit en mévalonate kinase (MKD), ou encore le syndrome PAPA sont liées à des mutations dans d'autres gènes mais qui amènent indirectement à une activation anormale de l'inflammasome pyrine.

Le déclenchement de poussées de FMF est lié aux plusieurs facteurs : la fatigue physique et mentale, le stress, l'exposition au froid. Chez 30-50% des femmes atteintes de FMF, les attaques de fièvre sont

RÉSUMÉ

associées au cycle menstruel et à la menstruation. Dans la population saine la phase lutéale du cycle menstruel est accompagnée d'une augmentation de la température corporelle. De plus, l'accouchement spontané est reconnu comme un état de l'inflammation stérile. En même temps, les hormones sexuelles stéroïdes telle que la progestérone ou la testostérone ont des propriétés anti-inflammatoires : les macrophages activés traités à la testostérone secrètent moins d'IL-1 β . Cependant, le rôle des molécules stéroïdes dans la régulation de l'inflammasome pyrine n'est pas connu.

Résultats

L'activation non-canonique de l'inflammasome pyrine par les catabolites des hormones stéroïdes.

Afin d'étudier la deuxième étape dans l'activation de pyrine nous avons utilisé une lignée cellulaire de monocytes humains (U937) qui expriment un variant de pyrine dont la première étape est constitutivement activée grâce à la mutation d'un des deux sites de phosphorylation – p.S242R. Nous avons effectué un crible chimique dans le cadre duquel les monocytes exprimant p.S242R ont été traités avec une banque de molécules chimiques, puis la mort cellulaire a été mesurée 90 minutes après le traitement. Le crible a permis d'identifier l'étiocolanolone (3 α -hydroxy-5 β -androstane-17-one) et la prégnanolone (3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one), des catabolites de testostérone et de progestérone, en tant qu'activateur de l'inflammasome pyrine. Ni la testostérone, ni la progestérone n'ont induit de mort cellulaire pyrine-dépendante dans les monocytes U937. L'activation de pyrine par l'étiocolanolone et la prégnanolone a été confirmée dans des monocytes primaires préalablement traités avec UCN-01, un inhibiteur de PKN1/2, afin de déphosphoryler pyrine et de répliquer les conditions du crible. Le traitement avec uniquement l'étiocolanolone ou la prégnanolone n'ont pas induit de mort cellulaire dans les monocytes primaires.

Les concentrations peu élevées de étiocolanolone (12 μ M) et prégnanolone (6 μ M) ne suffisent pas pour activer l'inflammasome pyrine sans une déphosphorylation préalable. En revanche, nous avons constaté qu'à forte concentration l'étiocolanolone (100 μ M) et la prégnanolone (50 μ M) seuls activent l'inflammasome pyrine. Cette activation s'accompagne de l'oligomérisation d'ASC pour former une structure dite "speck", du clivage et de l'activation de la caspase-1 ainsi que du clivage et de la sécrétion d'IL-1 β et IL-18. La mort cellulaire induite par l'étiocolanolone et la prégnanolone a été complètement abolie dans les monocytes déficients pour la caspase-1 ou la gasdermine D (GSDMD).

Puisque l'activation de pyrine est dépendante des microtubules, elle est inhibée par la colchicine grâce à son effet inhibiteur sur la dynamique des microtubules. La mort cellulaire pyrine-dépendante induite par les molécules stéroïdes a été également inhibée par la colchicine ce qui suggère que la dynamique des microtubules est indispensable à l'activation de l'inflammasome par ces molécules. En revanche, tandis que l'activation canonique de pyrine est déclenchée par l'inhibition de RhoA, nous avons observé que le traitement avec l'étiocolanolone ou la prégnanolone n'inhibe pas l'activité de RhoA. Par conséquent, l'activation de pyrine par les catabolites d'hormones stéroïdes passe par une voie non-canonique. De plus, nous nous sommes intéressés aux domaines de la protéine pyrine nécessaire à son activation par les molécules dérivées des hormones stéroïdes. Nos

RÉSUMÉ

résultats nous ont permis de conclure que le domaine B30.2 est indispensable à l'activation de pyrine par l'étiocolanolone et la prégnanolone.

Nous avons démontré que l'activation non-canonique de l'inflammasome pyrine par les dérivées d'hormones stéroïdes est spécifique de pyrine humaine puisque les cellules exprimant la pyrine murine ou simienne n'ont pas répondu au traitement avec les dérivés de stéroïdes.

Les monocytes primaires humains isolés à partir du sang de patients atteints de la FMF ont démontré une activation légèrement plus élevée que les monocytes isolés du sang de donneurs sains en réponse aux dérivés d'hormones stéroïdes. En revanche, les monocytes isolés du sang des patients PAAND ont été fortement activés par les dérivés d'hormones stéroïdes ce qui récapitule le phénotype observé dans les monocytes U937 avec un site de phosphorylation muté. Cette dernière observation suggère que les dérivés d'hormones stéroïdes pourraient contribuer au phénotype autoinflammatoire des patients PAAND.

Les mutations dans les domaines B30.2 et CHS altèrent de manière différentielle l'activation de l'inflammasome pyrine

Nous nous sommes intéressés au rôle des différents domaines dans la régulation de l'inflammasome pyrine. Afin de pouvoir l'étudier nous avons créé des lignées cellulaires de monocytes U937 qui expriment pyrine délétée pour chacun des domaines. Nous avons examiné la réponse de ces monocytes face à un stimulus physiologique qui active l'inflammasome pyrine – la toxine bactérienne TcdA. Nous avons constaté que le domaine B30.2 n'est pas nécessaire à l'activation de pyrine par TcdA.

Etant donné que la majorité des mutations associées à la FMF se trouvent au sein du domaine B30.2, et que la mort cellulaire des monocytes isolés à partir du sang de patient atteint de FMF est déclenchée par la simple déphosphorylation de pyrine, nous avons étudié l'impact de la délétion du B30.2 sur l'activation de pyrine suite à la déphosphorylation. L'activation de l'inflammasome pyrine dans les monocytes qui expriment la pyrine Δ B30.2 est induite par l'inhibition de la kinase responsable de sa phosphorylation. Ce résultat démontre que le domaine B30.2 est responsable de la deuxième étape d'activation de l'inflammasome pyrine. De plus, nous avons démontré que la délétion du B30.2 n'impacte pas la phosphorylation de pyrine à l'état basal. L'activation de l'inflammasome pyrine délétée du domaine B30.2 suivie grâce à la formation des specks d'ASC n'est pas été impactée dans les cellules déficientes pour la caspase-1.

La FMF classique est caractérisée par une transmission récessive mais il existe également des mutations capables de provoquer la FMF de manière dominante. Notamment, p.H478Y et p.Q436R

RÉSUMÉ

sont localisées dans le domaine CHS. D'autres mutations pathogéniques mais récessives se trouvent dans ce domaine telles que p.F479L, p.E552D et p.L559F. Afin de mieux comprendre le rôle du domaine CHS dans la régulation de pyrine, nous avons créés des lignées U937 qui expriment les variants de pyrine de CHS mentionnés ci-dessus. Nous avons étudié leurs réponses aux stimuli divers qui ciblent l'inflammasome pyrine en terme de mort cellulaire et de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β et IL-18.

Nous avons constaté des phénotypes variables en réponse à TcdA. Le variant p.H478Y est activé comme le variant typique de FMF – p.M694V, tandis que les variants p.Q426R, p.F479L et p.E552D ont des phénotypes intermédiaires entre le WT et le p.M694V, et le variant p.L559F est activé par TcdA comme la pyrine WT. La déphosphorylation de pyrine par un inhibiteur de kinases PKN1/2 a déclenché la pyroptose dans les cellules qui expriment les variants p.Q426R, p.H478Y et p.F479L de manière comparable au variant de la FMF, p.M694V. Nous avons donc constaté que les mutations du domaines CHS impactent la deuxième étape de régulation de pyrine.

Les mutations dans le domaine CHS impactent différenciellement l'activation de l'inflammasome pyrine par les dérivés d'hormones stéroïdes. Notamment, la dose de prégnanolone nécessaire à l'induction de 50 % de mort cellulaire (EC50) dans les monocytes U937 qui expriment les variants p.Q426R et p.F479L est 50 fois inférieure à la dose nécessaire à l'induction de 50 % de mort cellulaire dans les cellules qui expriment la pyrine WT. Pour l'étiocolanolone, la différence entre les EC50 est moins importante mais les variants p.Q426R et p.F479L sont également plus sensibles. En revanche, les monocytes exprimant la pyrine p.H478Y sont moins sensibles à l'activation par la prégnanolone et l'étiocolanolone que les monocytes exprimant pyrine WT. En accord avec ces observations, nous avons démontré que les variants p.Q426R et p.F479L sont déphosphorylés par des faibles doses de prégnanolone (6 μ M) alors que la pyrine WT et le variant p.H478Y ne le sont pas.

Les mutations sont des mutations très rares mais nous avons réussi à obtenir des échantillons du sang de 6 patients portant la mutation p.F479L. Nous avons isolé les monocytes primaires de l'échantillon, et nous avons analysé la mort cellulaire et la sécrétion d'IL-1 β par ces monocytes en réponse à TcdB, UCN-01 et les dérivés d'hormones stéroïdes : étiocholanolone et pregnanolone, en comparaison avec les monocytes primaires isolés du sang de donneurs sains. Nous avons observé une mort cellulaire et une sécrétion d'IL-1 β comparable au donneur en réponse au traitement avec TcdB. Cependant, en accord avec nos observations dans le modèle U937, les monocytes de patients atteints de FMF avec la mutation p.F479L sont plus sensible à UCN-01, avec un phénotype qui ressemble à celui des monocytes issus des patients FMF avec des mutations classiques telles que p.M694V. Contrairement aux monocytes des donneurs sains, les monocytes primaires avec la

RÉSUMÉ

mutation de pyrine p.F479L sont activés par les faibles doses d'étiocolanolone (12 μ M) et de prégnanolone (6 μ M). Ces observations confirment les phénotypes que nous avons observé dans notre modèle de monocytes U937 et valident que des mutations spécifiques du CHS observées chez certains patients FMF rendent l'inflammasome pyrine hautement réactifs aux catabolites des hormones sexuelles.

Résultats supplémentaires

Des expériences supplémentaires nous ont permis de démontrer que les mutations de pyrine au sein du domaine CHS qui abaissent de manière significative le seuil d'activation de pyrine par les dérivés d'hormones stéroïdes - p.Q426R et p.F479L – élargissent également le spectre de stéroïdes capables d'activer l'inflammasome pyrine. Notamment, les cellules qui expriment les variants p.Q426R et p.F479L mais pas celles qui expriment p.H478Y, subissent une mort cellulaire rapide en réponse au traitement avec la testostérone, la progestérone et l'androstérone. De plus, nous avons découvert que le prétraitement avec la progestérone inhibe l'activation de pyrine WT par la prégnanolone. Cette inhibition est dose-dépendante : elle a lieu si la concentration de progestérone est supérieure à celle de prégnanolone.

La simvastatine est un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, une enzyme impliquée dans la voie de mévalonate kinase. L'inhibition de cette voie inhibe à la fois RhoA et la synthèse de cholestérol. D'autre part la simvastatine est un activateur de l'inflammasome pyrine. Les variants de pyrine avec des mutations dans le domaine CHS répondent différemment au traitement avec la simvastatine. D'une manière qui mime la réponse différentielle de ces variants aux dérivés d'hormones stéroïdes, le seuil d'activation par la simvastatine est plus bas pour les monocytes qui expriment pyrine p.Q426R et p.F479L. Les monocytes exprimant le variant p.H478Y ne subissent pas d'activation de l'inflammasome pyrine.

Discussion

L'activation de pyrine par les dérivés d'hormones stéroïdes est dépendante du domaine B30.2 et à la fois modulée par les mutations au sein du domaine CHS. Les domaines B30.2 et CHS coopèrent pour la transduction de signal perçu par le domaine B30.2, et transmis le long de la protéine grâce à des changements de conformation au niveau du domaine CHS. Le signal est ainsi conduit jusqu'aux sites de phosphorylation de pyrine, la protéine est ainsi déphosphorylée et activée. Un mécanisme de coopération semblable entre un domaine B30.2 et un domaine CHS est décrit dans le cas de la protéine BTN3A1 exprimée par les cellules présentatrices de l'antigène dans le cadre de l'activation des lymphocytes gamma delta.

RÉSUMÉ

La diversité de phénotypes associés aux variants de pyrine avec des mutations dans le domaine CHS met en évidence l'importance et la complexité du rôle de ce domaine dans la régulation de pyrine. Les travaux présentés dans ce manuscrit éclairent un nouveau mécanisme d'activation de l'inflammasome pyrine. Nos observations accordent un nouveau rôle à la pyrine : celui de la surveillance du métabolisme de cholestérol et de l'équilibre des hormones stéroïdes et de leurs dérivés dans la cellule.

Nous proposons un modèle de fonctionnement de pyrine selon lequel le domaine B30.2 sert de site de fixation pour une molécule d'origine stéroïde. Nous ne savons pas si cette interaction a un effet inhibiteur ou activateur sur l'inflammasome à l'état basal, il est en effet possible qu'il existe à la fois des ligands inhibiteurs (comme progestérone) et des ligands activateurs (comme prégnanolone), et qu'il y ait une compétition entre les deux types de ligands dont l'affinité au B30.2 de pyrine ne serait pas égale. Pyrine serait activée par la fixation d'un ligand activateur au B30.2 ou par la perte d'interaction du B30.2 avec un ligand inhibiteur, ce qui provoquerait une cascade de changements de conformations transmise par le CHS. La concentration des dérivés d'hormones stéroïdes utilisée dans nos expériences est supérieure à la concentration physiologique à laquelle sont exposés les monocytes humains circulants. Nous pensons que dans les conditions physiologiques la pyrine est seulement amorcée par des petites quantités de molécules telles que la prégnanolone et l'étiocolanolone, ce qui baisserait le seuil d'activation de l'inflammasome pyrine par d'autres signaux. Il reste à démontrer si l'activation de pyrine par les dérivés d'hormones stéroïdes est médiée par une interaction directe entre le domaine B30.2 et les molécules en question.