

Ce mémoire s'intitule :  
**Caractérisation de la dysfonction de l'inflammasome au cours du déficit en XIAP**

Présenté par :  
**Sandrine Beauregard**

Microbiologie, Immunologie et Infectiologie/ Université de Montréal/CHU Ste-  
Justine/Faculté Médecine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Directeur de recherche :  
**Dr. Fabien Touzot, MD, Ph.D.**

Président rapporteur:  
**Dr. Roger Lippé, Ph.D.**

Membre du jury:  
**Dr. Jean-Sébastien Delisle, MD, Ph.D.**

**17 juillet 2022**

## Identification des membres du jury:

Président Rapporteur :

Dr. Roger Lippé Ph.D

CHU Ste-justine

Directeur de recherche :

Dr. Fabien Touzot M.D. Ph.D

CHU Ste-justine

Membre du jury :

Dr. Jean-Sébastien Delisle M.D. Ph.D

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

## Résumé:

L'inhibiteur de l'apoptose lié au chromosome X (XIAP) est une protéine anti-apoptotique exprimée de manière ubiquitaire et est un puissant inhibiteur de l'apoptose en bloquant les formes actives des caspases-3, -7 et -9. D'autres fonctions de XIAP reposent sur son activité d'ubiquitine ligase impliquée dans la régulation d'importantes voies de signalisation et la transduction du signal des récepteurs de type NOD ; NOD1 et NOD2, jouant un rôle central dans l'immunité innée. Les mutations hémizygotiques résultant en une perte de fonction du gène *XIAP* sont responsables de la survenue d'une maladie auto-inflammatoire dont le phénotype clinique englobe plusieurs de ces caractéristiques : une lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH), un syndrome d'activation macrophagique (MAS), une maladie inflammatoire de l'intestin mimant la maladie de Crohn. Bien que certaines études antérieures montrent que la suppression de XIAP induit l'activation de l'inflammasome NLRP3, les mécanismes physiopathologiques par lesquels ce déficit induit un syndrome auto-inflammatoire ne sont pas définis. Ce projet vise à créer et caractériser une lignée cellulaire monocyte/macrophage THP-1 avec délétion de *XIAP* pour étudier les mécanismes moléculaires responsable de l'auto-inflammation dans les macrophages en utilisant le système CRISPR-Cas12. J'ai pu montrer que le déficit en XIAP est responsable de l'activation de l'inflammasome NLRP3 et d'un état auto-inflammatoire macrophagique indépendant de l'activité ubiquitine ligase de XIAP. Il m'a aussi été possible d'élucider la rétroaction positive de l'IL-1 $\beta$  et NF- $\kappa$ B sur l'inflammation. L'étude de ce modèle cellulaire nous permettra une meilleure compréhension des processus régulant l'activation de l'inflammasome et l'apoptose dans les macrophages déficients en XIAP.

Mots Clés : Immunodéficiência, apoptose, inflammasome, XIAP, macrophage

## Abstract:

The X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein is an anti-apoptotic protein. It is ubiquitously expressed and is a potent inhibitor of programmed apoptosis by blocking the activated forms of caspases-3, -7, and -9. Additional functions of XIAP rely on its ubiquitin ligase activity involved in regulating important signaling pathways. Among other important functions is the role of XIAP in the signal transduction of the NOD-like receptors; NOD1 and NOD2, which play a pivotal role in innate immunity. Hemizygous loss of function mutations in *XIAP* leads to XIAP deficiency. It can be considered as an autoinflammatory disease since the clinical phenotype encompasses several auto-inflammatory features: Haemophagocytic Lymphohistiocytic syndrome (HLH), macrophage activation syndrome (MAS), an inflammatory bowel disease, mimicking Crohn's disease. Interestingly, while some earlier reports have shown that deletion of XIAP induces NLRP3 inflammasome activation, the precise mechanisms by which XIAP deficiency induces an autoinflammatory syndrome are not defined. This project aims to create and characterize a THP1 monocyte / macrophage cell line with a deletion of *XIAP* to show the state of hyperinflammation in macrophages using the CRISPR-Cas12 system to study the role of different domains of the gene. I have shown that XIAP deficiency triggers the NLRP3 inflammasome in THP-1 macrophages independently of its ubiquitin ligase activity. In addition, it was possible to elucidate the role of the IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B backloop on inflammation. Studying this cell model will help us refine a better understanding of the dynamics of inflammasome and apoptosis in macrophages with *XIAP* deficiency.

Keys words: immunodeficiency, apoptosis, inflammasome, XIAP, macrophages

## Table des matières

Identification des membres du jury:.....	2
Résumé: .....	3
Abstract: .....	4
Liste de tableaux.....	7
Liste de figures.....	8
Abréviations.....	9
Remerciements :.....	11
1. Introduction :.....	12
Projet : .....	12
1.1 Système immunitaire.....	12
1.1.1 Aperçu du système immunitaire.....	12
1.1.2 Maladies auto-inflammatoires.....	15
1.1.3 Déficience en XIAP.....	16
1.2 Inflammation.....	18
1.2.1 Inflammasomes : .....	18
1.2.2 Inflammasome NLRP3 :.....	21
1.3 Apoptose.....	23
1.3.1 Introduction de l'apoptose :.....	23
1.3.2 Protéines de la famille inhibitrice d'apoptose : .....	27
1.3.3 Rôles et fonctions cellulaires de XIAP.....	29
1.4 Projet de recherche : .....	33
2. Matériel et méthodes .....	35
2.1 Culture cellulaire.....	35
2.2 CRISPR/Cpf1 .....	35
2.3 Génération de lignées cellulaires par transfection lentivirale .....	37
2.4 Essai de sécrétion des macrophages THP-1.....	37
2.5 Immunobuvardage .....	37
2.6 LDH assay .....	38
2.7 Essai de l'activité transcriptionnelle des gènes IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 et NLRP3 par qPCR .....	38
3. Résultats .....	40
3.1. Génération des lignées cellulaires nécessaires au projet.....	40

3.2 Caractérisation des lignées cellulaires .....	42
4. Discussion:.....	49
5. Conclusion: .....	54
Bibliographie:.....	55

## Liste de tableaux

Tableau I : Prévalence des symptômes cliniques observés chez les patients déficients en XIAP .....	17
Tableau II : Caractéristiques principales des différentes morts cellulaires.....	24
Tableau III : Programme d'amplification XIAP.....	36
Tableau IV : Lignées cellulaires générées selon les plasmides utilisés .....	37
Tableau V : Séquences d'amorce utilisées pour les différentes réactions de qPCR .....	39
Tableau VI : Programme d'amplification qPCR.....	39

## Liste de figures

Figure 1 : Correspondance entre les différents PRR macrophagiques et leurs ligands.....	14
Figure 2 : Schématisation de l'implication du macrophage dans l'immunité innée et l'immunité adaptative.....	15
Figure 3 : Composantes protéiques des différents inflammasomes .....	20
Figure 4 : Assemblage de l'inflammasome suite à son activation .....	21
Figure 5 : Activation de l'inflammasome NLRP3 en deux étapes .....	23
Figure 6 : Les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques.....	27
Figure 7: Rôle des différents domaines de la protéine XIAP .....	29
Figure 8 : Activation de l'apoptose par la voie mitochondriale.....	30
Figure 9 : Implication de la protéine XIAP lors de reconnaissance d'un motif moléculaire par le récepteur NOD .....	32
Figure 10 : Implication de la protéine XIAP lors de reconnaissance d'un motif moléculaire par le récepteur TLR4.....	33
Figure 11: Production de lignées cellulaires par édition génique CRISPR/Cpf1 et transduction lentivirale .....	41
Figure 12: Effet de la surexpression de la protéine XIAP sur l'inflammation .....	42
Figure 13 : Le déficit en XIAP semble activer l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages THP-1 de manière indépendante de l'activité ubiquitine ligase de XIAP. ....	43
Figure 14 : Fonction des cIAPs en absence de la protéine XIAP.....	45
Figure 15 : Rôle de la « backloop » auto-paracrine d'IL-1 $\beta$ et de la signalisation NF- $\kappa$ B sur la réponse inflammatoire.....	47

## Abréviations

Apaf-1: *apoptotic protease activating factor-1*

ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*

ATP: Adénosine triphosphate

ATCC: *American Type Culture Collection*

BIR: *Baculovirus LAP repeats*

BRCC3: *BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

cIAP: *cellular Inhibitor of Apoptosis Protein*

CLR : *C-type lectin*

CMH II : *Complexe majeur d'histocompatibilité II*

CPA: *Cellule présentatrice d'antigène*

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

DAMP: *Danger Associated Molecular Pattern*

FADD: *Fas associated protein with death domain*

GAPDH: *Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase*

GSDMD: *Gasdermine D*

HLH: *lymphohistiocytose hémophagocytaire*

K.O: *Knock-out*

LLR: *Leucine-rich repeat*

LPS: *Lipopolysaccharide*

LUBAC: *E3 ligase linear ubiquitin chain assembly complex*

MAPK : *MAP Kinase*

MAS : *macrophage activation syndrom*

MDP: *Muramyl Dipeptide*

MICI: *maladie inflammatoire chronique de l'intestin*

MyD88: *myeloid differentiation primary response 88*

NATCH: *central nucleotide-binding and oligomerization*

NF- $\kappa$ B: *nuclear factor-kappa B*

NLR: *nucleotide-binding domain and leucin-rich repeats containing receptors*

NLRP3: *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*

PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PMA: *phorbol myristate acetate*

PTPN22 : *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*

PRR: *Pattern recognition receptors*

PYD: *N-terminal pyrin domain*

RLR : *RIG-I-like*

Smac/DIABLO: *second mitochondria-derived activator of caspase/ direct LAP binding protein with low pI*

TLR: *Toll-like receptors*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TRIF: *TIR domaincontaining adapter-inducing interferon- $\beta$*

XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis*

WT : *wild type*

## Remerciements :

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dr. Touzot de m'avoir permis de travailler sur un aussi beau projet. Merci aussi de votre confiance envers moi et de vos conseils. Vous avez toujours été à l'écoute et disponible en cas de problème lors de ces deux dernières années, me motivant à être résiliente et me pousser au bout de mes capacités.

Merci aux membres de mon jury, Dr. Lippé et Dr. Delisle, qui ont accepté de réviser mon mémoire.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire qui ont toujours été d'un support incroyable. Blandine Monjarret et Lorie Marchitto ont toujours été les premières à me conseiller tout au long de ce projet, à m'aider lors de difficultés, me féliciter lors de mes réussites, mais principalement à être présente comme support moral. Merci aussi aux plus récentes membres du laboratoire, Sara Shour et Laura Watteyne, pour leur support et leur aide lors de mes derniers mois de ma maîtrise.

Merci à ma meilleure amie, Mégane Mercier, qui a toujours été présente pour moi, à l'écoute de mes problèmes et à me conseiller même si le domaine de l'immunologie n'est pas familier pour elle. Merci aussi à Josiane Hawkins et Emmy L'espérance qui connaissent maintenant mon projet par cœur et qui ont toujours su être présente pour moi et me conseiller.

Merci aussi à ma famille sans qui il m'aurait été impossible de continuer. Leur soutien à toujours été de grande valeur pour moi et ils ont su m'écouter et me conseiller, jours après jours, lors de mes moments plus difficiles mais aussi mes journées victorieuses. Merci d'avoir écouté mes pratiques de présentations orales, en comprenant probablement que la moitié de mon exposé, mais merci surtout de m'avoir poussé à devenir la personne que je suis aujourd'hui.

Un merci spécial à mes chiens, Ellie et Leyla, qui m'accueillaient toujours beaucoup trop heureuse à la maison, me permettant d'oublier et de laisser de côté plus facilement les journées plus difficiles.

## 1. Introduction :

### Projet :

Afin de maintenir une réponse immune adéquate, il est important que l'expression génique des cellules immunitaires soit bien régulée. Effectivement, une simple délétion ou mutation d'une base d'un gène peut mener à une maladie grave chez un patient, comme c'est le cas de déficience en XIAP.

Cette protéine anti-apoptotique est exprimée de façon ubiquitaire au niveau des cellules immunitaires, notamment les macrophages. Elle est impliquée dans différentes cascades de signalisation aboutissant à l'apoptose cellulaire et la réponse inflammatoire par activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, comme observée chez les patients, une mutation du gène *XIAP* menant à une absence de fonction de la protéine entraîne une hyperinflammation macrophagique résultant en une sécrétion accrue de cytokines proinflammatoires. Le but de mon projet est de caractériser une lignée cellulaire de monocytes/macrophages présentant une délétion du gène *XIAP* afin de préciser les mécanismes physiopathologiques responsables du syndrome auto-inflammatoire observé chez les patients.

### 1.1 Système immunitaire

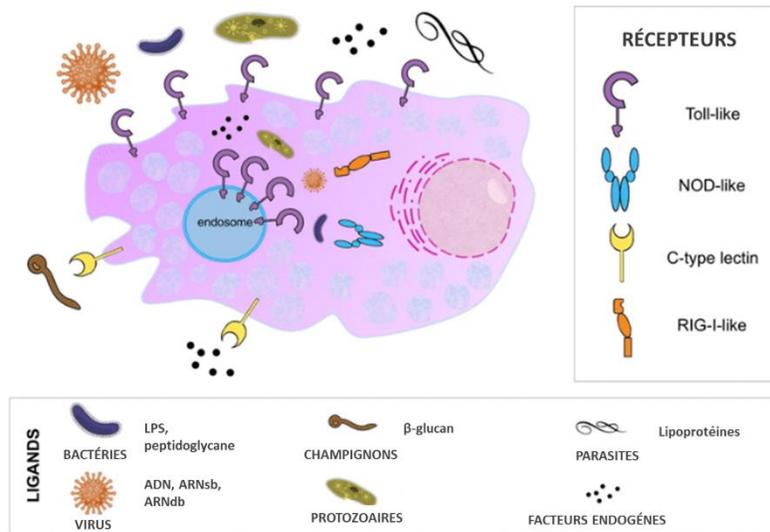
#### 1.1.1 Aperçu du système immunitaire

Étant constamment exposé à différents pathogènes environnants, notre corps est muni d'un système immunitaire ayant comme fonction principale de reconnaître et d'éliminer ces corps étrangers dans le but de prévenir une infection. Ce système est un grand réseau interactif de cellules immunitaires, d'organes lymphoïdes, de cytokines et de chemokines qui se divise en deux parties; le système immunitaire inné, acquis depuis la naissance, et le système immunitaire adaptatif qui développe une mémoire suite à une exposition microbienne (Parkin and Cohen, 2001).

D'un côté, le système immunitaire inné est le premier à être sollicité afin d'empêcher l'introduction de pathogènes dans le corps par une barrière physique ou chimique, comme la peau ou les muqueuses. Si les pathogènes réussissent à passer cette barrière, une première ligne de défense interne empêchera la prolifération de ces agents infectieux. Cette ligne de défense

implique l'action de plusieurs cellules spécifiques, mais de manière principale les cellules phagocytaires comme les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Kelly and O'Neill, 2015). En réponse à des signaux inflammatoires, les monocytes sanguins sont recrutés par chimiotaxie au site d'infection et se différencieront en macrophages ou en cellules dendritiques, jouant un rôle prédominant dans la réponse inflammatoire. Effectivement, ces cellules reconnaissent non spécifiquement les pathogènes en les discriminant des molécules du soi lors de la reconnaissance de structures moléculaires microbiennes « *Pathogen Associated Molecular Pattern* » (PAMPs) ou des signaux de danger « *Danger Associated Molecular Pattern* » (DAMPs) par l'entremise de leur « *Pattern recognition receptor* » (PRRs). Ceci leur permet alors de répondre rapidement à l'infection lorsque les pathogènes passent la barrière physique et d'éliminer le pathogène en question par un processus de phagocytose (Linehan and Fitzgerald, 2015).

Différents types de PRR existent, comme les « *Toll-like receptor* » (TLRs) et les « *C-type lectin receptor* » (CLRs) qui se trouvent au niveau de la surface cellulaire et à la surface de compartiments intracellulaires comme les endosomes. Les TLRs reconnaissent différentes composantes virales, bactériennes ou parasitaires permettant d'activer par la suite les facteurs de transcriptions comme NF- $\kappa$ B et AP-1, tandis que les CLRs sont impliqués au niveau de la reconnaissance fongique (Jamilloux and Henry, 2013). Parmi la famille des PRRs existent aussi les récepteurs de type NOD; « *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats containing receptors* » (autrement appelé NLRs) et les récepteurs « *RIG-I-like* » (RLRs) exprimés de façon intracellulaire dans le cytoplasme. Les récepteurs de type NOD reconnaissent des PAMPs et des DAMPs, permettant ensuite la formation des inflammasomes, tandis que les RLRs reconnaissent de l'ARN viral (Hirayama et al., 2018) (Figure 1). Lors de la phagocytose par les macrophages ou cellules dendritiques, certains de ces récepteurs peuvent reconnaître leur ligand, permettant l'activation de voies intracellulaires menant à une réponse proinflammatoire par la sécrétion de médiateurs antimicrobiens comme des cytokines et chemokines. De plus, étant des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs), ces cellules phagocytaires font le pont entre l'immunité innée et adaptative. Effectivement, les protéines phagocytosées seront digérées en peptides. Ces peptides antigéniques vont alors être présentés par l'entremise du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> permettant leur activation et ainsi la mise en place d'une réponse immunitaire acquise (Cobb et al., 2004).

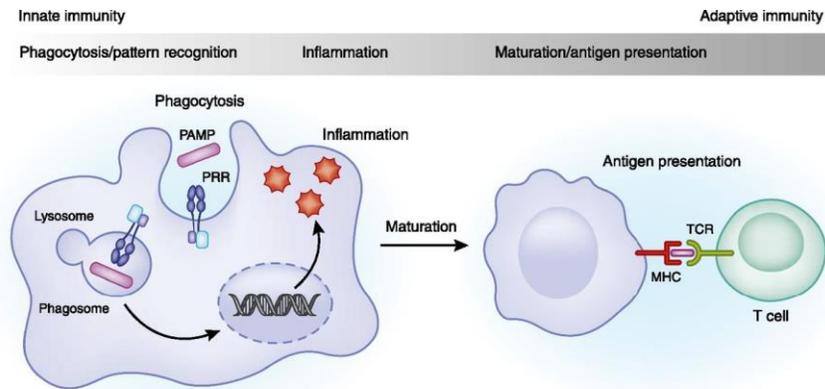


**Figure 1 : Correspondance entre les différents PRR macrophagiques et leurs ligands**

Les TLRs se trouvent au niveau de la surface cellulaire et des endosomes et ont différents ligands, tandis que les NLR sont au niveau du cytoplasme avec les RLR et reconnaissent des ligands bactériens. Pour leur part, les RLR ont comme ligands les virus et finalement, les CLR, se trouvant à la surface cellulaire, lient les champignons (par exemple le  $\beta$ -1,3-glucan présent à la membrane cellulaire) et facteurs endogènes.

Modifié à partir de : (Agier et al., 2018)

D'un autre côté, l'immunité adaptative requiert l'interaction avec le peptide antigénique de l'agent pathogène présenté par une CPA et nécessite plusieurs jours avant d'être activée (Figure 2). Cette immunité est dite spécifique, car les cellules impliquées, par exemple les lymphocytes, réagiront différemment selon l'antigène rencontré. Les lymphocytes T  $CD8^+$  sont en mesure de cibler et détruire le pathogène lorsque celui-ci n'a pas été éliminé par les cellules du système immunitaire inné. Les lymphocytes T  $CD4^+$ , pour leur part, contribuent à activer les  $CD8^+$ , mais aussi les lymphocytes B qui eux produiront des anticorps spécifiques contre l'antigène. Certains de ces lymphocytes B deviendront des lymphocytes T mémoire, ayant la capacité de reconnaître l'antigène qui les ont activés, permettant ainsi une réponse encore plus rapide et efficace lors d'une réinfection (Schenten and Medzhitov, 2011).



**Figure 2 : Schématisation de l'implication du macrophage dans l'immunité innée et l'immunité adaptative**

Le PRR retrouvé à la surface du macrophage reconnaît un pathogène environnant exprimant un PAMP, déclenchant ainsi le processus de la phagocytose (immunité innée). Ceci permettra une augmentation de l'inflammation et une digestion de la protéine pathogénique en peptide. Le macrophage peut alors présenter ce peptide à un lymphocyte, permettant de faire le pont vers l'immunité adaptative.

Tiré de : (Hato and Dagher, 2014)

Ainsi, pour assurer la protection du corps humain contre les pathogènes environnant et assurer l'homéostasie, notre système immunitaire joue un rôle vital. Afin de maintenir une réponse immune adéquate, il est important que l'expression des gènes impliqués dans son fonctionnement soit bien régulée, car une simple délétion ou mutation d'une base d'un gène au niveau d'une cellule immunitaire pourrait mener à une maladie grave chez un patient.

### 1.1.2 Maladies auto-inflammatoires

Les cellules immunitaires, tant les lymphocytes que les macrophages, sont en mesure de distinguer les cellules du soi et les cellules du non-soi pour diriger une réponse envers les cellules reconnues comme du non-soi. Par contre, chez certaines personnes, il arrive que ces cellules reconnaissent des cellules du soi comme étant du non-soi, attaquant ainsi ses propres cellules saines. On parle alors de maladie auto-immune lorsqu'il s'agit des cellules du système immunitaire adaptatif qui réagissent envers ses propres cellules et de maladie auto-inflammatoire lorsque des cellules du système immunitaire inné sont impliquées. Dans tous

les cas, ceci peut mener à une inflammation accrue ainsi qu'à des dommages au niveau d'organes spécifiques ou de la fièvre par exemple (Arakelyan et al., 2017).

Dans le cas des maladies auto-inflammatoires, la plupart de celles-ci sont caractérisées par une mutation ou une délétion d'un gène régulant la fonction du système immunitaire inné, qui se transmet de façon héréditaire. Ladite mutation peut causer un gain ou une perte de fonction entraînant ainsi divers symptômes chez les patients atteints. Il existe un large spectre clinique de maladies auto-inflammatoires. Dans certains cas, une personne peut être porteuse d'un gène muté sans avoir aucun symptôme et dans d'autres cas, on peut observer un état d'auto-inflammation sans aucun stimulus antigénique menant à une sécrétion importante de cytokines proinflammatoires (Rubartelli et al., 2013). Dans des cas extrêmes, la maladie auto-inflammatoire peut poser un grave dysfonctionnement du système immunitaire, comme c'est le cas du syndrome d'activation macrophagique (*macrophage activation syndrome* » ou MAS), encore appelé lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH).

Le MAS est une complication potentiellement mortelle qui peut être primitive, par mutation génique, ou secondaire résultant d'une exposition microbienne ou d'une pathologie tumorale ou auto-immune (Filipovich, 2009). Le MAS est le résultat d'une activation continue des macrophages à la suite d'un dysfonctionnement de la réponse inflammatoire (Bracaglia et al., 2017; Filipovich, 2009). En plus d'une activation excessive de macrophages, ces syndromes montrent une grande sécrétion de cytokines proinflammatoires entre autres l'interleukine [IL]-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-18, le « *tumor necrosis factor* » [TNF] et l'interféron gamma [IFN $\gamma$ ] (Henderson and Cron, 2020).

### 1.1.3 Déficience en XIAP

La déficience en XIAP (« *X-linked inhibitor of apoptosis* ») est un syndrome héréditaire primaire qui a été caractérisé pour la première fois en 2006 par une dérégulation immunitaire, notamment une auto-inflammation (Latour and Aguilar, 2015). Cette protéine exprimée de manière ubiquitaire est impliquée au niveau de différentes voies cellulaires et a comme rôle principal d'inhiber l'apoptose de la cellule. Le syndrome auto-inflammatoire causé par une mutation ou une délétion hémizygote du gène *XIAP* au niveau du chromosome X n'ayant pas d'équivalent sur le chromosome Y. Cette déficience survient à une fréquence d'environ un à

deux garçons par million (Mudde et al., 2021). Ceci se manifeste lorsque la mère est porteuse de la mutation sans exhiber aucun symptôme et que cette dernière transmet à son fils le chromosome affecté. Étant une mutation récessive, ce garçon montrera divers symptômes lors des premières années de sa vie pouvant avoir une issue fatale dans certains cas. Le seul traitement curateur est, actuellement, la greffe de cellules souches hématopoïétiques (Rigaud, 2010). Ainsi, une absence de fonction de la protéine entraîne une inflammation accrue et une auto-inflammation dans les cellules macrophagique, où XIAP est habituellement exprimée (Parackova et al., 2020).

Les phénotypes cliniques chez les patients varient beaucoup entre eux. Ceci est causé par un concept de « *gene modifier* » où un gène peut modeler l'expression de variants délétères. Ainsi, ils peuvent être transmis différemment entre individus, causant une augmentation ou une diminution de la sévérité de la maladie (Rahit and Tarailo-Graovac, 2020). Les symptômes observés dans la majorité des cas sont des syndromes d'activation macrophagique (MAS), des splénomégalies, des cytopénies, des hypogammaglobulinémies ou encore une susceptibilité accrue à l'infection par le virus de l'EBV dont les mécanismes sont encore flous (Tableau I) (Latour and Aguilar, 2015; Mudde et al., 2021). Dans certains cas, il est aussi possible d'observer une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) se caractérisant par une inflammation de la paroi du tractus intestinal résultant d'une réponse inflammatoire inappropriée des cellules immunitaires, notamment les macrophages, pouvant s'apparenter à la maladie de Crohn (Nielsen and LaCasse, 2017).

**Tableau I : Prévalence des symptômes cliniques observés chez les patients déficients en XIAP**

<b>Nombre total de patients</b>	<b>226</b>
MAS	137 (61%)
Splénomégalie	108 (48%)
Cytopénie	48 (21%)
MICI	51 (23%)
Infections récurrentes	22 (10%)
Hypogammaglobulinémie	32 (14%)

Tiré de : (Mudde et al., 2021)

## 1.2 Inflammation

### 1.2.1 Inflammasomes :

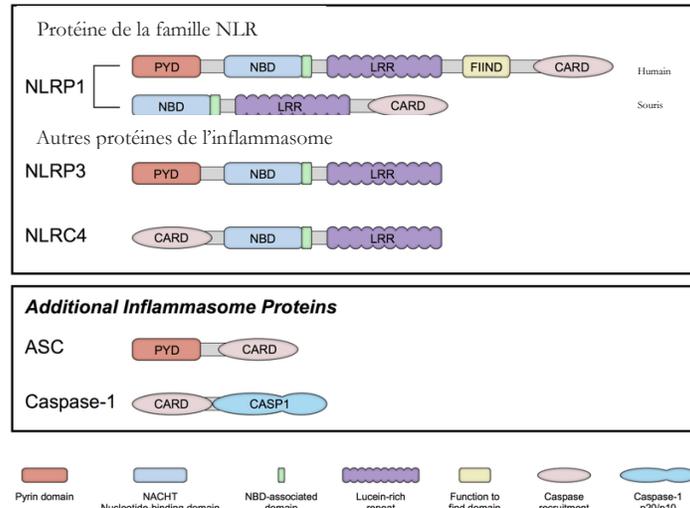
L'inflammation est un mécanisme de défense biologique essentiel à notre santé qui peut être de cause infectieuse ou non. Cette réponse inflammatoire se fait suite à la rencontre d'un stimuli nocif, tel un agent pathogène, des toxines, une brûlure de la peau ou des cellules endommagées, et est étroitement régulée par le système immunitaire (Punchard et al., 2004). Effectivement, la réponse du système immunitaire envers l'inflammation consiste à l'engagement d'une cascade de signalisation permettant l'activation des cellules immunitaires innées. Ces cellules ont alors comme rôle d'éliminer le stimulus en question et d'amorcer un processus de guérison, comme la réparation des tissus endommagés et la résolution de l'inflammation (Chen et al., 2018b). Ainsi, le système immunitaire inné est la première ligne de défense mise en action lors d'une infection et permet de répondre contre des signaux de danger, comme des pathogènes ou des signaux de stress cellulaire. Outre la phagocytose et l'activation du complément, une des stratégies mises en place par le système immunitaire inné pour combattre les infections est la réponse inflammatoire. L'activation de cette réponse doit être optimale puisqu'une faible réponse inflammatoire mène à des infections persistantes où le système immunitaire est incapable de se débarrasser du pathogène. Ces infections persistantes peuvent mener à des lésions cellulaires ou encore dans certains cas à diverses pathologies tumorales. De plus, une trop grande réponse inflammatoire mène à des maladies auto-inflammatoires, comme c'est le cas avec la déficience en XIAP (Guo et al., 2015). Ainsi, pour une activation optimale de ces inflammasomes, des récepteurs de type PRR exprimés au niveau des cellules immunitaires reconnaissent différents signaux de danger, permettant d'engager un inflammasome spécifique pour une réponse immune dirigée envers le pathogène en question.

Parmi les PRRs existent les récepteurs de type NOD qui reconnaissent les PAMPs et les DAMPs. Les récepteurs de cette famille, après avoir reconnu leur ligand, permettent la formation des inflammasomes, notamment les inflammasomes NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM2. À titre d'exemple, l'inflammasome NLRP1 est formé suite à la reconnaissance d'une toxine bactérienne (*Bacillus anthrax*), le NLRC4 s'assemble suite à la reconnaissance de flagelline bactérienne, le AIM2 s'engage suite à la reconnaissance de l'ADN double brin viral ou bactérien et le NLRP3 s'engage pour différents signaux de danger comme les cristaux d'acide urique, la nigéricine ou la relâche d'ATP par les cellules infectées (Zheng et al., 2020).

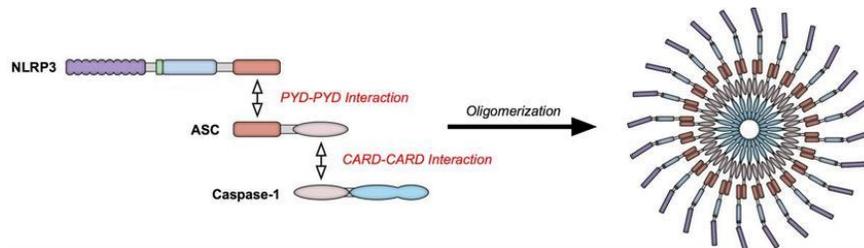
La majorité des inflammasomes sont de types canoniques, c'est-à-dire que lorsqu'activés, ils mènent à l'activation de caspase-1 (Zheng et al., 2020). Cette enzyme a une implication majeure dans la réponse inflammatoire par son action de protéolyse de cytokines proinflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-18) et elle est aussi impliquée dans un mécanisme de mort cellulaire inflammatoire programmée spécifique; la pyroptose. Les inflammasomes non canoniques ont pour leur part recouru à d'autres caspases, notamment la caspase-8 et la caspase-11 (Jamilloux and Henry, 2013).

Les inflammasomes sont des plateformes protéiques qui s'assemblent au niveau du cytosol à la suite d'un stress cellulaire ou à une infection. Ils permettent la maturation de cytokines proinflammatoires pour engager les défenses immunitaires. Leur dénomination est basée sur le PRR qui est impliqué dans leur activation. La plupart des inflammasomes canoniques sont formés de différentes protéines, tel un membre de la famille NLR, la protéine « *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain* » (ASC) et la pro-caspase-1 (Figure 3, A). Ces protéines contiennent différents domaines leur permettant de se lier pour former l'inflammasome. Les NLR sont généralement composés d'un domaine de liaisons centrales des nucléotides et d'oligomérisation (NATCH) qui contient un domaine de liaison nucléotidique (NBD). De plus, ils sont aussi composés d'un domaine CARD ou PYR au niveau N-terminal et une répétition riche en leucine (LRR) au niveau C-terminal agissant comme un capteur de signaux provenant de DAMPs ou PAMPs (Figure 3, A). Ainsi, lors de l'activation de l'inflammasome, le domaine PYR de la protéine NLR va permettre une interaction homotypique avec le domaine PYR de la protéine ASC. Ensuite, avec son domaine CARD, la protéine ASC permet le recrutement de la pro-caspase-1 et l'assemblage final de l'inflammasome (Kantono and Guo, 2017) (Figure 3, B). D'autres inflammasomes sont indépendants des NLRs, par exemple l'inflammasome « *absent in melanoma 2* » (AIM2) qui est formé par la protéine AIM2, ASC et la pro-caspase-1.

A



B



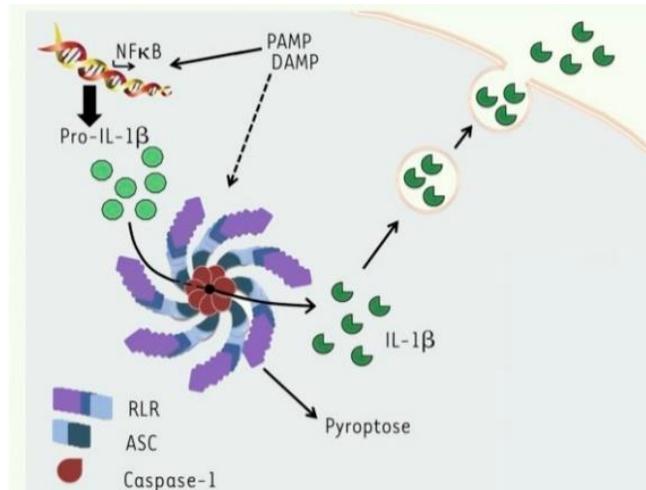
**Figure 3 : Composantes protéiques des différents inflammasomes**

Les inflammasomes canoniques sont formés du PRR qui l'active contenant des domaines différents entre eux, ce qui rend chacun d'entre eux unique. La plupart des inflammasomes NLR contiennent un domaine NBD pour la liaison nucléotidique, un domaine PYD permettant l'interaction avec la protéine ASC et un domaine LRR reconnaissant les DAMPs et les PAMPs. Autrement, ces inflammasomes contiennent tous la protéine ASC, avec ces domaines PYD et CARD, en plus de la pro-caspase-1, contenant un domaine CARD.

Modifié à partir de : (Yaron, 2015)

Certains inflammasomes, comme NLRP1 et NLRP3 vont s'auto-oligomériser suite à la reconnaissance d'un signal de danger via leur domaine NATCH (Latz et al., 2013). À la suite de la liaison entre les protéines NLR et ASC, le domaine CARD de la protéine ASC met à proximité les monomères de la pro-caspase-1, permettant à celle-ci de s'auto-cliver et ainsi devenir la forme active de la caspase-1. La liaison entre ces protéines forme ainsi un grand complexe de signalisation. La caspase-1 à son tour clive de façon protéolytique différentes cytokines incluant la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18. Ceci mène à la sécrétion de cytokines proinflammatoires via une voie de sécrétion non classique (Latz et al., 2013; Liu et al., 2017a). La caspase-1 active est aussi en mesure de cliver d'autres protéines, comme la Gasdermin-D.

(GSDMD). Lorsqu'activée, cette protéine permet la formation de pores au niveau de la membrane cellulaire, permettant la sécrétion des cytokines inflammatoires et l'induction de la pyroptose (Figure 4) (Heilig et al., 2018).



**Figure 4 : Assemblage de l'inflammasome suite à son activation**

Après la détection d'un ligand, la protéine NLR s'oligomérisent permettant la liaison avec la protéine ASC via leurs domaines PYR. Par la suite, la protéine pro-caspase est recrutée par la protéine ASC à l'aide d'une interaction entre leurs domaines CARD menant à la formation complète de l'inflammasome. La pro-caspase peut ensuite s'auto-cliver pour donner forme à une protéine protéolytique qui peut cliver différentes protéines comme des cytokines proinflammatoires et la GSDMD. Suite à la formation de pores membranaires par la GSDMD, les formes actives des cytokines peuvent être relâchées hors de la cellule.

Tiré de : (Jamilloux and Henry, 2013)

### 1.2.2 Inflammasome NLRP3 :

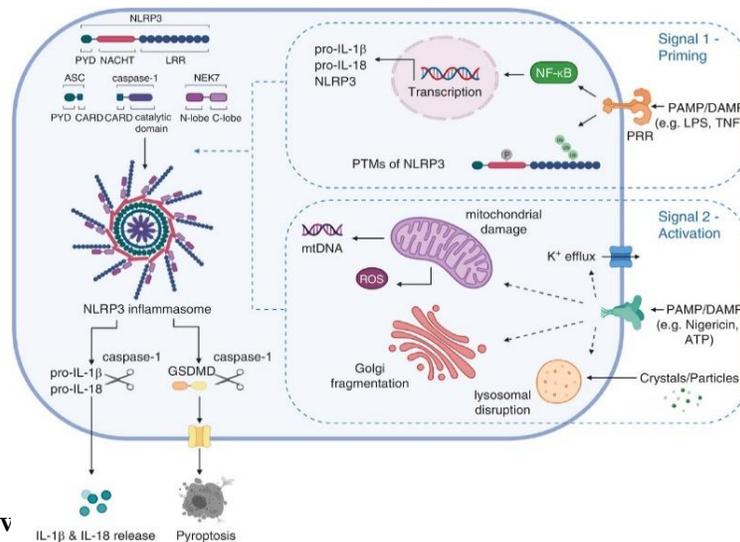
L'inflammasome NLRP3 est l'inflammasome le mieux caractérisé à ce jour. La « *NOD, LRR- and pyrin domain-containing protein 3* » (NLRP3) est une protéine de type NLR contenant un domaine extracellulaire ayant un motif LRR pour la détection du ligand et un domaine NATCH pour l'activation du complexe de signalisation par oligomérisation dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP). L'activation de l'inflammasome NLRP3, qui nécessite deux étapes, peut se faire en réponse à de nombreux stress cellulaires. Par exemple, l'inflammasome

peut s'activer suite à la formation de pores dans la membrane plasmique (toxine bactérienne, la GSDMD clivée, activation du complément), à la libération de cathepsines et de  $Ca^{2+}$  lysosomiaux dans le cytosol (amiante, silice, cristaux de cholestérol) ou encore à la perturbation du fonctionnement mitochondrial (Gros Lambert and Py, 2018).

La première étape d'activation de l'inflammasome NLRP3 est appelée le « *priming* », et consiste en l'augmentation de la transcription génique de NLRP3. Celle-ci résulte de l'activation d'un PRR ou d'un TNFR par des cytokines (exemple l'IL-1 $\beta$ ) ou un PAMP/DAMP (Gritsenko et al., 2020a). L'exemple le plus commun est la reconnaissance d'un lipopolysaccharide (LPS) par le récepteur TLR4 à la surface de cellules comme les macrophages. La reconnaissance du stimulus permet d'activer une voie de signalisation dépendante de la protéine MyD-88, activant par la suite le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Maintenant active, cette protéine migre au noyau et induit la transcription de gènes codant pour l'inflammation, comme la pro-IL-1 $\beta$ , la pro-IL-18 ou encore la protéine NLRP3 (Guo et al., 2015).

La seconde étape, appelée activation, consiste à la reconnaissance par les PRRs cytosoliques NLRP3 de divers stimuli, tel la nigericine, l'ATP, des toxines bactériennes et fongiques ou un dysfonctionnement mitochondrial (Liu et al., 2017a). Par contre, il est connu que cet inflammasome n'agit pas directement avec ces agonistes, suggérant un intermédiaire cellulaire commun qui fait encore l'objet de débat pour son identité (Kelley et al., 2019). Comme mentionné plus tôt, ceci permet différentes modifications post-transcriptionnelles et changements de conformation du NLRP3. Effectivement, le NLRP3 doit être déubiquitiné au niveau des chaînes L63 de son domaine LRR par l'enzyme BRCC3 (« *BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3* »), ainsi que déphosphorylé au niveau de la tyrosine Y861 dans son domaine LRR par la phosphatase PTPN22 (« *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22* ») et déphosphorylé au niveau de la sérine S5 de son domaine PYD (Vucic, 2018). Ces diverses modifications permettent l'auto-oligomérisation du NLRP3 (Gritsenko et al., 2020b). Le NLRP3 pourra ensuite polymériser avec la protéine ASC par interaction avec leurs domaines PYD. Le domaine de cette protéine permet séquentiellement le recrutement de la pro-caspase-1 et éventuellement son auto-clivage. La caspase-1 active permet finalement de cliver la pro-IL1 $\beta$  et la pro-IL18 ainsi que la GSDMD, dont le fragment N-terminal permettra la formation de pores membranaires cellulaires aboutissant ultimement à la mort cellulaire pyroptotique.

(Zhao and Zhao, 2020). Ceci permettra l'amorçage d'une réponse immunitaire et le recrutement de cellules immunitaires, comme les neutrophiles et les macrophages, au site de l'inflammation (Figure 5).



**Figure 5 : Activ**

Lors de l'étape de « *priming* », le PRR à la surface cellulaire reconnaît un signal de danger, ce qui induit l'activation de la voie NF-κB, menant à la transcription de cytokines proinflammatoires, et de la protéine NLRP3. En réponse au premier signal, l'activation de l'inflammasome se fait lors de la reconnaissance d'un deuxième stimulus, permettant le recrutement de la protéine ASC et de la pro-caspase-1. La caspase-1 une fois active clive ses précurseurs, menant à la pyroptose et une sécrétion d'IL-1β et d'IL-18.

Tiré de : (McKee and Coll, 2020)

## 1.3 Apoptose

### 1.3.1 Introduction de l'apoptose :

La mort cellulaire est un processus biologique qui se produit normalement dans la cellule et jusqu'à aujourd'hui, différents processus de mort cellulaire sont caractérisés, comme l'apoptose, la nécroptose et la pyroptose. La grande différence entre ces types de morts cellulaires dépend des stimuli externes/internes et des enzymes impliquées. L'apoptose, aussi appelée la mort cellulaire programmée, est un processus essentiel qui peut être déclenché par différents stimuli, comme des dommages à l'ADN, certaines drogues, des agents infectieux, l'hypoxie ou encore la radiation, ou simplement dans le cas où la cellule n'est plus d'utilité. Ce

processus physiologique permet de conserver l'homéostasie puisqu'il est en constant équilibre avec la prolifération cellulaire. Ainsi, une grande quantité de cellules meurent chaque jour au même rythme des nouvelles cellules qui sont générées, permettant un bon développement cellulaire, un fonctionnement adéquat du système immunitaire et encore l'élimination de cellules endommagées et auto-réactives. Le mauvais fonctionnement de l'apoptose peut mener à différentes maladies, tel le syndrome d'immunodéficience acquise (AIDS SIDA), des maladies auto-immunes, des cancers, des infections virales et plus encore (Renehan et al., 2001).

L'apoptose diffère de la nécrose, car cette dernière est un procédé non contrôlé entraînant des modifications irréversibles, comme la perte d'intégrité membranaire, qui est toxique pour l'organisme. De plus, elle est différente de la pyroptose, qui est déclenchée en réponse à des DAMPs ou PAMPs et dépend de l'inflammasome et de la caspase-1 (Gritsenko et al., 2020b) (Tableau II). Dans le cas de la pyroptose, l'activation de la GSDMD permet la formation de pores au niveau de la membrane plasmique, provoquant l'influx d'eau, le gonflement cellulaire et éventuellement la lyse osmotique (Man et al., 2017). La rupture de la membrane plasmique va permettre la sécrétion de substances proinflammatoires et le clivage de l'ADN. La fréquence de la pyroptose semble corrélée avec l'importance de la stimulation de l'inflammasome (Schroder and Tschopp, 2010).

**Tableau II : Caractéristiques principales des différentes morts cellulaires**

<b>Caractéristiques principales</b>	<b>Apoptose</b>	<b>Nécrose</b>	<b>Pyroptose</b>
Condensation de la chromatine/cytoplasme	Oui	Non	Oui
Intégrité de l'ADN compromise	Oui	Oui	Oui
Corps apoptotiques	Oui	Non	Non
Perméabilisation membranaire	Non	Oui	Oui
Augmentation de l'inflammation	Non	Oui	Oui
Mort cellulaire programmée	Oui	Non	Oui
Activation de caspases	Oui (Caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9)	Non	Oui (Caspase-1)

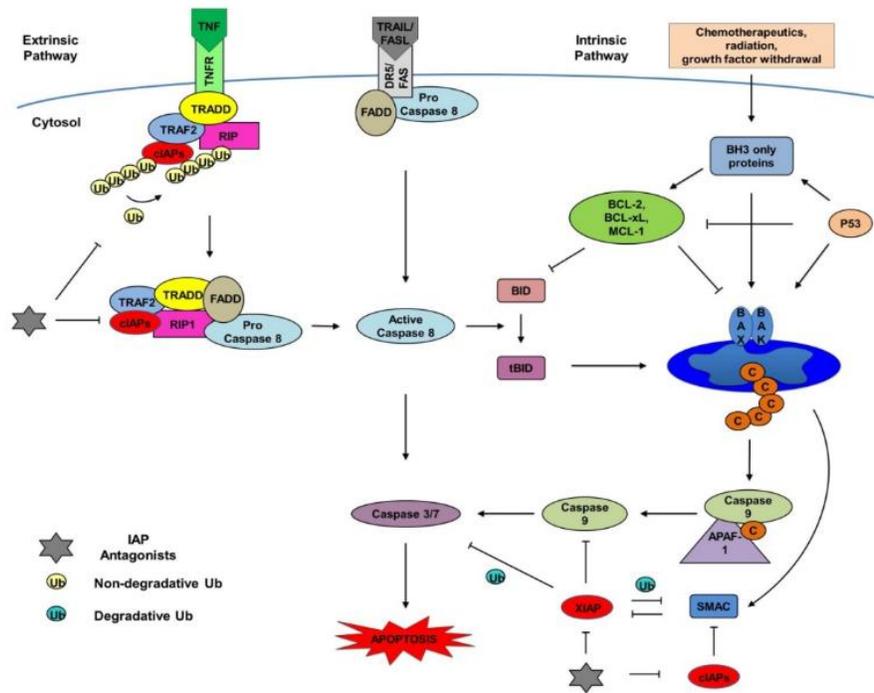
Tiré de : (Man et al., 2017; Su et al., 2016)

Le fonctionnement optimal de l'apoptose requiert une étroite régulation faisant intervenir l'activation de caspases spécifiques (les caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10) (Kumar, 2007). Ces protéines sont des protéases dont la forme inactive, la pro-caspase, est clivée au niveau d'un acide aspartique pour aboutir à la forme active. La caspase, une fois activée, peut à son tour cliver une autre pro-caspase ou d'autres protéines cibles, engageant une cascade protéolytique. Il est donc essentiel que l'activité protéolytique de ces protéines soit hautement régulée pour éviter une trop grande ou trop faible activation de la voie apoptotique (Albert et al., 2002).

Il existe deux voies apoptotiques; la voie extrinsèque (la voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (la voie mitochondriale). Ces deux voies, bien que distinctes, sont liées et peuvent s'influencer mutuellement. La voie extrinsèque, pour sa part, implique des récepteurs transmembranaires, comme les récepteurs de mort de la famille TNF, notamment le TNFR1 («*Tumor necrosis factor receptor 1*») (Elmore, 2007). Les récepteurs TNFR1 et TNFR2 sont coexprimés sur les macrophages. Le TNF- $\alpha$  est une cytokine qui permet d'induire une signalisation menant à des signaux contradictoires; un signal de survie par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induisant une réponse inflammatoire ainsi qu'un signal de mort incluant la caspase-8 menant à l'apoptose et la nécroptose (Feoktistova et al., 2021). Pour sa part, le TNFR1 est un récepteur membranaire contenant un domaine de mort dans sa partie cytoplasmique qui permet la transmission du signal. L'engagement du TNFR1 par la reconnaissance du TNF- $\alpha$  va permettre d'activer des voies apoptotiques ainsi que des voies transcriptionnelles comme la voie NF- $\kappa$ B, la voie MAP kinase (MAPK) ou la transcription de gènes proinflammatoires (Wajant and Siegmund, 2019b). Le TNFR2 est aussi récepteur membranaire qui a comme ligand le TNF- $\alpha$  et forme un hétérodimère avec le TNFR1. Cependant, contrairement au TNFR1, il ne contient pas de domaine de mort, mais peut recruter TRAF2. Cette protéine peut à son tour recruter TRAF1 ou encore les protéines cellulaires inhibitrices d'apoptose 1 et 2 (cIAP1/cIAP2), permettant aussi d'activer la voie NF- $\kappa$ B (Yang et al., 2019). La signalisation reliée au TNFR2 ressemble beaucoup à celui au TNFR1; les protéines TRAF1, cIAP1 et cIAP2 s'assemblent avec le récepteur et permet le recrutement de LUBAC, mais de façon moins efficace que le TNFR1. À titre d'exemple, lorsque le récepteur TNFR1 est engagé par son ligand, la protéine TRADD («*TNFR type 1-associated death domain protein*») est recrutée au récepteur, permettant aussi le recrutement des

protéines RIPK1 (« *receptor interacting protein-1* ») et TRAF-2 (« *TNF receptor-associated factor-2* »), formant le complexe de signalisation I. Ce complexe permet alors une autre modification de RIPK1 par ubiquitination de son site K627 sur son domaine de mort, menant ainsi à la transcription de différents gènes, notamment des cytokines proinflammatoires, via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Li et al., 2020). Par contre, lorsque la protéine RIPK1 n'est pas ubiquitinée, la voie du TNF mènera à la mort cellulaire. Les mécanismes précis permettant d'activer cette voie sont encore inconnus, mais dans cette situation, le complexe de signalisation I migre dans le cytoplasme (Li et al., 2020). Ceci permet le recrutement de la protéine FADD, RIPK3 et la procaspase-8, formant le complexe de signalisation II, aussi appelé le ripoptosome (Wajant and Siegmund, 2019a). La maturation de la procaspase-8 en caspase-8 permet par la suite l'activation de l'apoptose. Si cette maturation est impossible, la cellule va mourir par nécroptose; une forme programmée de nécrose créant de l'inflammation (Figure 6) (Cabon et al., 2013; Wajant and Siegmund, 2019a).

L'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque se fait par différents stimuli, mais principalement lorsque la cellule est stressée ou endommagée. En résumé, la compromission de l'intégrité mitochondriale permet le relargage de différentes protéines au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial, comme le cytochrome c et le Smac/DIABLO (Shanmugam and Sethi, 2022). Ceci aboutit à la formation de l'apoptosome; un complexe formé du cytochrome c, de la protéine Apaf-1 et de la pro-caspase-9 qui a comme fonction d'activer la caspase-9 suivie de la caspase-3 et de la caspase-7, menant à l'apoptose de la cellule (Rizzuto and Mammucari, 2014). Cette voie apoptotique est régulée par une famille de protéines ayant pour rôle d'inhiber l'apoptose. Dans cette famille se trouvent les protéines cIAP1 et cIAP2 et la protéine inhibitrice d'apoptose liée au chromosome X (XIAP) (Albert et al., 2002).



**Figure 6 : Les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques**

Voie extrinsèque : L'engagement du récepteur TNFR1 recrute principalement des protéines TRADD, FADD et pro-caspase-8, permettant l'activation de cette caspase. La caspase-8 active alors les caspases-3 et -7, menant à l'apoptose de la cellule. Voie intrinsèque : Différents stimuli, comme la radiation, déstabilisent la membrane mitochondriale, résultant en un relargage de cytochrome c et de Smac/DIABLO. Il y aura alors formation de l'apoptosome avec le cytochrome c, Apaf-1 et la pro-caspase-9. La caspase-9 active peut alors cliver les pro-caspase-3 et -7 menant à l'apoptose de la cellule.

Tiré de : (Rebecca T. Marquez, 2013)

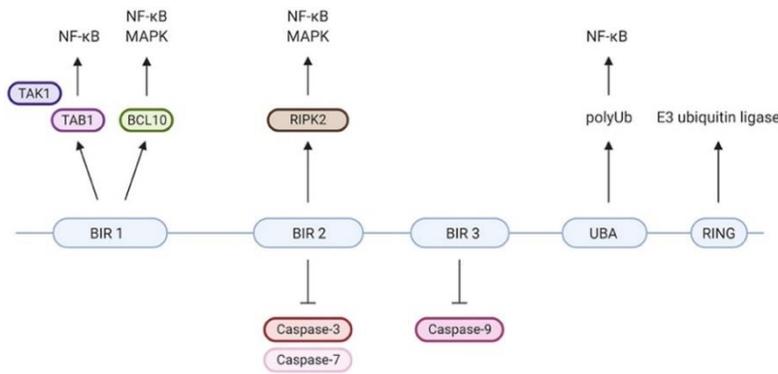
### 1.3.2 Protéines de la famille inhibitrice d'apoptose :

Les protéines de la famille inhibitrice d'apoptose sont exprimées aussi bien chez la levure que chez les mammifères et leur expression est ubiquitaire. Leur rôle premier est l'inhibition de l'apoptose, mais elles sont aussi impliquées dans les processus de division cellulaire ou de dégradation protéique par le protéasome (Lu et al., 2007). Parmi cette famille se trouvent les protéines cIAP1, cIAP2 et XIAP. Ces protéines contiennent trois domaines BIR, chacun au niveau de la portion N-terminale, qui sont responsables de l'inhibition de

l'apoptose en plus d'un domaine RING *finger* au niveau de la portion C-terminale qui agit en tant que E3 ubiquitine ligase, pouvant même s'auto-ubiquitiner dans le cas de XIAP et de cIAP1. Les protéines de cette famille sont aussi connues pour leur implication au niveau de différentes voies de signalisation intracellulaires, comme la voie NF- $\kappa$ B ou la voie des kinases c-Jun N-terminale (JNK) (Galbán and Duckett, 2010b).

L'inhibition de l'apoptose peut se faire de manière directe ou indirecte. En tant qu'E3 ubiquitine ligase, les cIAP1 et cIAP2 vont inhiber l'apoptose de façon indirecte, en ubiquitinant leur substrat. Comme énoncé précédemment, lorsque le TNFR1 s'engage en raison de la reconnaissance à son ligand, différentes protéines y sont recrutées et forment les complexes de signalisation I et II, permettant finalement la mort par apoptose de la cellule. Les cIAPs, lorsque recrutés au complexe de signalisation I, ont pour rôle d'ubiquitiner la protéine RIPK1, créant ainsi un site de liaison pour LUBAC. Ceci permet ainsi d'inhiber l'apoptose de la cellule en engageant la voie MAPK ainsi que la voie NF- $\kappa$ B, ayant comme résultat la transcription de gènes de survie et de gènes proinflammatoires. Ainsi, en absence des cIAPs, le complexe de signalisation II, incluant la pro-caspase-8, pourra être recruté menant à l'apoptose de la cellule (Wajant and Siegmund, 2019c).

Dans le cas de XIAP, un de ses rôles principaux est d'inhiber l'apoptose en agissant directement sur les caspases, contrairement aux cIAP1/2. Pour ce faire, XIAP se lie sur le site actif des caspases-3 et -7 à l'aide de son domaine BIR2 et peut se lier, avec son domaine BIR3, sur le site actif de la caspase-9, ayant ainsi comme effet d'inhiber le rôle apoptotique de ces protéines en empêchant leur homodimérisation les rendant actives (Figure 7) (Vucic, 2018). Lors de l'induction de l'apoptose, la fonction de XIAP est inhibée par la protéine SMAC qui interagit avec les domaines BIR2 et BIR3 de XIAP, permettant la libération des caspases (Galbán and Duckett, 2010b). Parmi ses autres rôles, XIAP peut agir sur différentes voies de signalisation immunitaires à l'aide de ses domaines BIR qui peuvent interagir avec des IAP-*binding motif* (IBM), ou encore avec son domaine UBA permettant sa liaison à des protéines ubiquitinées. Son domaine RING a pour sa part une fonction E3 ubiquitine ligase permettant la dégradation de certaines protéines cibles par le protéasome (Yang and Li, 2000).



**Figure 7: Rôle des différents domaines de la protéine XIAP**

Les domaines BIR de la protéine XIAP sont impliqués au niveau de l'inhibition directe des caspases, tandis que ses domaines UBA, BIR1 et RING sont impliqués au niveau de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Finalement, son domaine RING joue aussi un rôle d'E3 ubiquitine ligase.

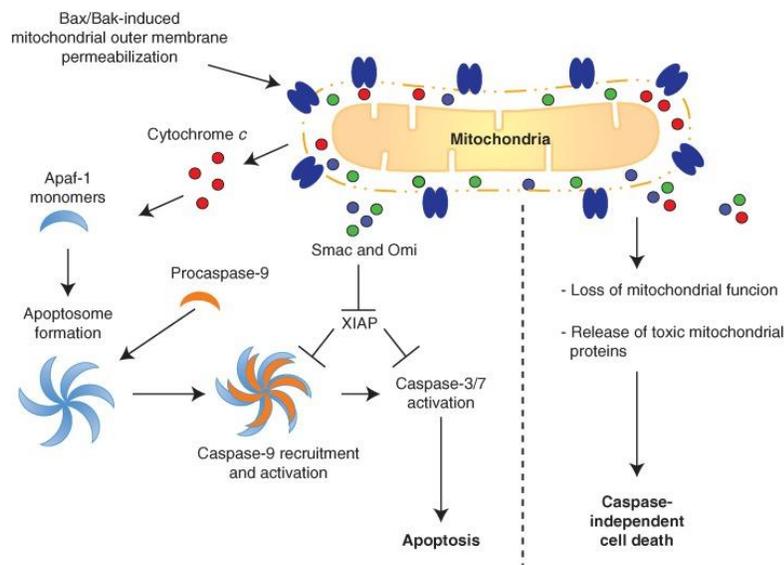
Tiré de : (Mudde et al., 2021)

### 1.3.3 Rôles et fonctions cellulaires de XIAP

Les fonctions de la protéine XIAP sont impliquées dans de multiples voies de signalisation cellulaires se rapportant à l'inflammation et l'apoptose. Effectivement, cette protéine est notamment impliquée au niveau de la voie mitochondriale, de la voie des récepteurs de morts (TNF) et lors de la reconnaissance d'un motif moléculaire. Bien qu'il soit clair que cette protéine y joue un rôle clé, les cascades de signalisation dont elle fait partie sont complexes et encore mal connues aujourd'hui.

L'activation de la voie mitochondriale se fait par la reconnaissance d'un stress cellulaire, notamment le stress oxydatif, la radiation ou encore le stress génotoxique. Le stress cellulaire cause l'activation et la modification transcriptionnelles des protéines de la famille Bcl-2, comme les protéines Bax et Bak (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016). Ces protéines vont alors s'oligomériser au niveau de la membrane mitochondriale externe, permettant une augmentation de la perméabilité membranaire interne et externe ainsi qu'un gonflement osmotique de la matrice mitochondriale (Peña-Blanco and García-Sáez, 2018). Ainsi, la mitochondrie libèrera différentes protéines, comme le cytochrome c, l'endonucléase G et le Smac/DIABLO. Lorsque le cytochrome c se trouve dans le cytosol, il forme un complexe avec la protéine Apaf-1 (« *apoptotic protease activating factor-1* ») et la pro-caspase-9; l'apoptosome.

Ceci permet alors l'activation de la caspase-9 qui va à son tour activer les caspases-3, -6 et -7 menant à l'apoptose de la cellule (Chen et al., 2018a). Dans le but d'inhiber l'apoptose, la protéine XIAP se lie sur les domaines actifs des caspases-3, -7 et -9, mais la protéine Smac/DIABLO a comme rôle de séquestrer XIAP, permettant la libération des caspases (Figure 8). Une autre méthode utilisée par XIAP pour inhiber l'apoptose est de dégrader les protéines Smac et Bcl-2. Effectivement, à l'aide de son domaine RING lui conférant une activité E3 ubiquitine ligase, XIAP pourrait médier la dégradation de Smac et Bcl-2 par le recrutement d'endolysosomes et de protéasomes respectivement (Chen et al., 2018a).



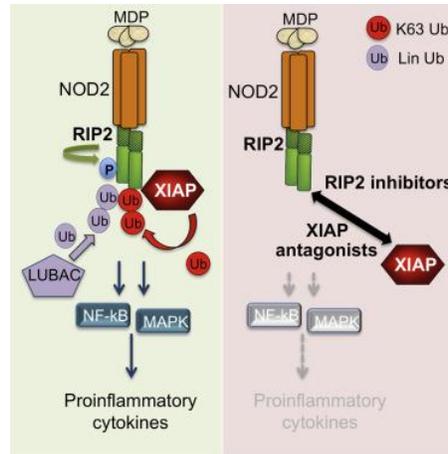
**Figure 8 : Activation de l'apoptose par la voie mitochondriale**

Un stress cellulaire permet d'activer les protéines Bax/Bak, menant à une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ceci induit alors le relâchement du cytochrome c et de la protéine Smac au niveau du cytosol. Il y aura alors formation de l'apoptosome (cytochrome c, procaspase-9 et Apaf-1) permettant l'activation de la caspase-9, suivi des caspases-3 et -7. Dans le but d'inhiber l'apoptose, XIAP a comme rôle de se lier aux caspases. Par contre, la protéine pro-apoptotique Smac libérée par la mitochondrie permet de séquestrer XIAP, libérant ainsi les caspases menant à l'apoptose de la cellule.

Tiré de : (Tait and Green, 2013)

La protéine XIAP est aussi impliquée au niveau de la voie des récepteurs de mort, soit la voie du TNF. Comme exposé auparavant, l'engagement du TNFR1 par son ligand TNF- $\alpha$  permet l'activation d'une voie apoptotique avec la formation du ripoptosome, mais aussi d'une voie inflammatoire avec la transcription de cytokines proinflammatoires (Wajant and Siegmund, 2019a). Suite à l'engagement de la voie des récepteurs de mort, XIAP a un effet anti-apoptotique sur celle-ci en inhibant le ripoptosome. Effectivement, XIAP se lie sur RIPK1 et l'ubiquitine de façon inhibitoire dépendamment de RIPK3. Ainsi, lorsque XIAP est délété, il y aura recrutement des protéines RIPK1, FADD et caspase-8 menant à la formation du ripoptosome, permettant la mort cellulaire par apoptose (Marivin et al., 2012).

Finalement, la protéine XIAP est grandement impliquée au niveau de la voie des PRRs lors de la reconnaissance d'un motif moléculaire. Comme mentionné plus tôt, les récepteurs de type NLR et TLR reconnaissent différents substrats, notamment le MDP et le LPS respectivement. Tout d'abord, lorsque leur ligand active les récepteurs NOD1 et NOD2, ils vont s'oligomériser et recruter les protéines RIPK2, cIAP1, cIAP2 et XIAP (Damgaard et al., 2013). XIAP va alors ubiquitiner avec son domaine RING la protéine RIPK2, permettant de recruter LUBAC au récepteur et menant aussi à l'activation de la voie MAP kinase et à la transcription du facteur NF- $\kappa$ B (Figure 9). L'activation de ces voies permet ultimement la transcription de gènes proinflammatoires, de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion de cytokines proinflammatoires, menant à la survie de la cellule (Mudde et al., 2021).



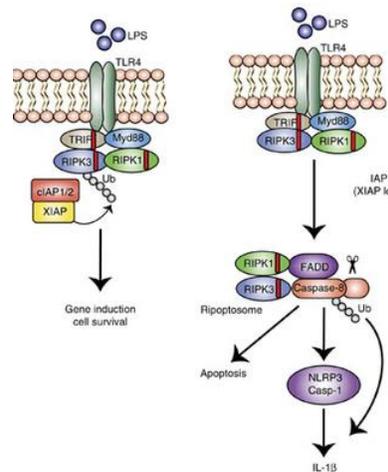
**Figure 9 : Implication de la protéine XIAP lors de reconnaissance d'un motif moléculaire par le récepteur NOD**

Suite à la reconnaissance du MPD par le récepteur NOD2, la protéine RIPK2 (RIP2) sera recrutée au récepteur et ubiquitinée par la protéine XIAP. Ceci permet le recrutement de LUBAC au récepteur et l'activation des voies MAP kinase et NF- $\kappa$ B. Sans le bon fonctionnement de XIAP, il serait impossible de générer la sécrétion de cytokines proinflammatoires.

Tiré de : (Goncharov et al., 2018)

La protéine XIAP est également impliquée lors de la reconnaissance d'un motif moléculaire par les récepteurs TLR, notamment le TLR4 suite à son engagement par le LPS. En effet, l'activation de la signalisation du TLR4 permet le recrutement non seulement de molécules de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (MyD88 et TRIF), mais également dans certaines circonstances, des protéines nécroptotiques RIPK1 et RIPK3 (Pálsson-McDermott and O'Neill, 2004). XIAP est capable d'ubiquitiner RIPK3, inhibant le processus nécroptotique et activant la voie NF- $\kappa$ B. En absence de XIAP, il y aura formation du ripoptosome, menant à la fois à la nécroptose de la cellule et à l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui peut mener à la pyroptose suite à une augmentation de l'inflammation entraînée par l'activation de la caspase-1 et l'IL-1 $\beta$  (Figure 10) (Knop et al., 2019). XIAP est aussi impliquée directement dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Effectivement, à l'aide de son domaine BIR1, XIAP lie la protéine TAB1, formant un complexe avec TAK1 et TAB1. XIAP peut alors ubiquitiner TAK1 et l'activer, permettant à cette dernière d'activer à son tour la kinase I $\kappa$ B, menant à la

phosphorylation de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  (Lu et al., 2007). Cette protéine, qui normalement séquestre le NF- $\kappa$ B au niveau du cytosol, sera dégradée et le relâchera. Il se fera alors phosphoryler, permettant sa translocation au noyau et l'activation de la transcription de différents gènes, comme ceux codant pour les cytokines proinflammatoires (Liu et al., 2017a).



**Figure 10 : Implication de la protéine XIAP lors de reconnaissance d'un motif moléculaire par le récepteur TLR4**

Lorsque XIAP est présent suite à l'engagement du TLR4, il est responsable de l'ubiquitination de RIPK3 ce qui permet l'activation de la voie le NF- $\kappa$ B et la survie de la cellule. Sans son bon fonctionnement, il y aura formation du ripoptosome et éventuellement l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'apoptose de la cellule.

Tiré de : (Lawlor et al., 2015)

#### 1.4 Projet de recherche :

La régulation de l'inflammation et de l'apoptose est un processus hautement régulé au niveau cellulaire. Différentes protéines y jouent un rôle essentiel et sans leur bon fonctionnement, il est possible d'observer des syndromes auto-inflammatoires chez les patients. C'est le cas avec la protéine XIAP, exprimée au niveau de cellules immunitaires comme les macrophages, qui est impliquée au niveau de différentes voies de signalisation inflammatoire avec son rôle anti-apoptotique. La mutation ou la perte de fonction du gène qui code pour cette protéine conduit à un déficit en XIAP, pouvant être considérée comme une maladie auto-inflammatoire. Cependant, les mécanismes précis par lesquels ce déficit induit

un syndrome auto-inflammatoire ne sont pas définis et aucun modèle cellulaire macrophagique n'existe comprenant une délétion de ce gène. Ainsi, le but de mon projet est de caractériser une lignée cellulaire de monocytes/macrophages comportant une délétion au niveau du gène *XIAP* reflétant un syndrome auto-inflammatoire observé chez les patients.

Pour ce faire, différentes lignées cellulaires de monocytes/macrophages THP1 ont été générées. Premièrement, une lignée *XIAP*<sup>KO</sup> a été créée par édition génique utilisant la technique CRISPR-Cpf1. Deuxièmement, différents isoformes de *XIAP*, une comportant délétion du domaine Ring (*XIAP*<sup>ΔRING</sup>), une autre présentant une mutation dominante dans ce même domaine (*XIAP* DN4) et une forme de *XIAP* sauvage (Wild-Type ou WT), ont été exprimées dans la lignée *XIAP*<sup>KO</sup> par transduction lentivirale.

L'hypothèse est qu'en fabricant ces différentes lignées cellulaires, il sera possible d'observer que notre modèle de déficience en *XIAP* affiche un état hyperinflammatoire combiné à une mort cellulaire accrue.

Le but de mon projet a été de caractériser la réponse inflammatoire et la mort cellulaire par apoptose survenant dans ces différentes lignées cellulaires en évaluant le niveau de sécrétion d'IL-1 $\beta$  et celui de la lactate déshydrogénase (LDH) lors d'induction de stress au niveau cellulaire. Ceci nous permet de préciser la fonction de *XIAP* dans la régulation de la réponse inflammatoire et la mort cellulaire dans les cellules phagocytaires.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Culture cellulaire

Les cellules THP-1 humaines sont maintenues au compte de  $0,2 \times 10^6$  cellules/mL à  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans un milieu complet de RPMI 1640 (GIBCO, Thermofisher Scientific) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SFV) (MULTICELL Technologies), de 1% de Pénicilline et Streptomycine (Pen/Strep GIBCO, Thermofisher Scientific), de 0,01% d'HEPES (GIBCO, Life technologies) ainsi que 0.05 mM de 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Ces THP-1 proviennent de *l'American Type Culture Collection (ATCC) (ATCC-TIB-202)* et elles sont sous-cultivées tous les trois/quatre jours. Pour ce faire, les cellules sont centrifugées à 400g pour 5 min, puis le culot de cellules est resuspendu dans 20 mL de milieu frais. Lors de la différenciation des monocytes en macrophages, une concentration de 100 ng/mL de PMA (Sigma-Aldrich) est utilisée pendant 48h.

Les cellules HEK293T humaines provenant d'ATCC sont maintenues à confluence maximum de 90% dans des pétris 10 cm contenant un milieu de DMEM (GIBCO, Thermofisher Scientific) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (MULTICELL Technologies). Elles sont cultivées tous les trois/quatre jours. Pour ce faire, 3mL de trypsine-EDTA (GIBCO, Thermofisher Scientific) est ajoutée, puis incubé 2 minutes à 37 degrés. Les cellules sont ensuite récupérées et centrifugées à 400g pour 5 min, puis une fraction du culot est resuspendu dans 10 ml de milieu frais.

### 2.2 CRISPR/Cpf1

Un complexe CRISPR a été fait, composé du guide crARN XIAP<sup>KO</sup> (séquence cible : CCTTAGACAGGCCATCTGAGACA, synthétisé chez IDT) (20 nmol/ $\mu$ l), de la protéine Cpf1 (Cas12) (40 pmol/ $\mu$ l) et de 2,5  $\mu$ l de PBS. Ce complexe a été incubé 20 minutes à température pièce avant d'être ajouté aux cellules *wild type* (WT) THP1 ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml), puis le tout a été électroporé à l'aide de la Lonza Nucleofector 2b. Les cellules électroporées sont mises en culture et un essai de T7EN1 est effectué. Ainsi, les cellules sont lysées avec du DNazol (Thermofisher Scientific) au nombre de  $0,5 \times 10^6$  cellules dans le but d'extraire l'ADN afin d'amplifier la région codante de XIAP au niveau des THP-1 muté et WT par PCR à l'aide

de la Taq Platinum (Thermofisher Scientific) avec les amorces suivantes : XIAP\_F (5' GCA CGA GCA GGG TTT CTT TA 3') et XIAP\_R (5' CTG CCA TGG ATG GAT TTC TT 3') (Tableau III). La taille de l'amplicon a été vérifiée sur gel d'agarose 1% par migration à 100 volt pour 30 minutes pour valider l'absence de la séquence d'ADN de XIAP au niveau des cellules mutées. Ensuite, 5 µl du produit PCR de l'ADN muté est mélangé à 5 µl du produit PCR de l'ADN WT. Ceci est ajouté à 2 µl du NEB buffer 2 (New England BioLabs) et 7 µl d'eau pour dénaturer et réhybrider l'ADN dans ces conditions : 95°C 10 minutes, 85° 2 minutes, 85°C 1 minute, 75°C 1 seconde, 75°C 1 minute, 65°C 1 seconde, 65°C 1 minute, 55°C 1 seconde, 55°C 1 minute, 45°C 1 seconde, 45°C 1 minute, 35°C 1 seconde, 35°C 1 minute, 25°C 1 seconde, 25°C 1 minute, 4°C. Par la suite, 1 µl de l'endonucléase T7 (New England BioLabs) est ajouté au mélange et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Les bandes d'ADN sont révélées par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5% pour vérifier la présence de doubles bandes d'ADN au niveau des cellules mutées suite au clivage de l'ADN par la T7 après avoir reconnu une mutation dans celle-ci.

**Tableau III : Programme d'amplification XIAP**

Étapes	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycle
Dénaturation	94	15	1
Hybridation	58	17	1
Élongation	68	20	1
Conservation	4	∞	1

} 40x

Les cellules électroporées sont ensuite placées en dilution limite dans le but d'avoir 1 cellule par puit contenant 100 µl de milieu de culture dans une plaque 96 puits. Trois semaines plus tard, les clones sont transférés dans une plaque 24 puits contenant 1 mL de RPMI complétement et au bout de trois autres semaines, ces clones sont transférés dans une plaque 6 puits contenant 3 mL de RPMI. Pour sélectionner les clones ayant la délétion génique de XIAP, une extraction d'ADN est effectuée ainsi qu'un essai de T7EN1, comme mentionné plus tôt. Les clones montrant la délétion génique sont tous envoyés au séquençage SANGER confirmant le génotype.

### 2.3 Génération de lignées cellulaires par transfection lentivirale

Des cellules HEK 293T sont transfectées avec les plasmides pMD2.VSVG et pS-PAX2 pour une production lentivirale, ainsi qu'avec les vecteurs PLVX-XIAP-DeltaRING PGK, PLVX-XIAP-DN H467A PGK ou encore pLenti FLAG3X XIAP en utilisant 60 µl de Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Invitrogen). Le milieu de culture contenant la production virale est récolté et filtré 48h suite à la transfection au travers de filtres 0,22 µm. Les cellules THP-1 cibles sont ensuite infectées au nombre de  $0,5 \times 10^6$  cellules/ml avec 500 µl de virus et 1,5 µl de protamine sulfate (concentration finale de 5 µg/ml) dans un volume total de 3 mL de RPMI. 72h après l'infection, les cellules sont sélectionnées à l'aide de puromycine (2,5 ng/ml, Sigma-Aldrich) pour les lignées cellulaires Δ-Ring et DN4 H467A.

**Tableau IV : Lignées cellulaires générées selon les plasmides utilisés**

Lignée cellulaire	Plasmide
DN4 H467A	PLVX-XIAP-DN H467A PGK
Δ-Ring	PLVX-XIAP-DeltaRING PGK
Rescue	pLenti FLAG3X XIAP

### 2.4 Essai de sécrétion des macrophages THP-1

Après 48h de différenciation des THP-1 ( $0,2 \times 10^6$  cellules/ml) utilisant la PMA (100 ng/ml, Sigma-Aldrich P1585) avec l'ajout de différents inhibiteurs de l'inflammasome tel l'anakinra (Sobi), MCC950 (Invivogen), YVAD (Cayman chemical), pan-caspase, la cytokine IL-1β est mesurée au niveau du surnageant des cellules contrôles, XIAP<sup>KO</sup>, DN4 H467A, Δ-RING et rescue à l'aide de la trousse ELISA IL-1β humain (88-7261-88). Cette trousse provient de ThermoFisher Scientific et ont été utilisées selon le manuel du manufacturier.

### 2.5 Immunobuvardage

Les cellules sont lysées à une concentration de  $0,2 \times 10^6$  cellules/mL dans un tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Triton) avec l'ajout de phosphatase inhibiteur 50 x (Roche) et de protéase inhibiteur 20 x (Roche). Les protéines sont séparées sur gels SDS-polyacrylamide de 8% ou 12% et transférées par la suite sur membrane de PVDF (Biorad Laboratories). La membrane est bloquée avec 5% de sérum d'albumine

bovin (BSA, Bioshop Canada Inc.) dans du PBS Tween (PBS contenant 0,01% Tween 20) pendant 30 minutes avant d'ajouter l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage toute la nuit à 4 degrés. Par la suite, l'anticorps secondaire est dilué dans du PBS-lait (PBS contenant 5% de lait écrémé en poudre) et est ajouté à la membrane pendant 45 minutes à température pièce. La membrane est finalement lavée 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS Tween après les incubations des anticorps primaires et secondaires. La lecture est faite par détecteur de luminescence.

Les anticorps primaires utilisés sont : FLAG: (dilution 1 :5000, Sigma M2, F1804), GAPDH (dilution 1 :5000, EMD Millipore Corp, MAB374) et XIAP (dilution 1 :3000, BD transduction Laboratories, 610716). Les anticorps secondaires utilisant le système de chemiluminescence (ECL) sont: M-Goat Anti-Mouse IgG HRP conjugate (dilution 1 :5000, Biorad Laboratories, 1706516) R-Goat Anti-Rabbit IgG HRP conjugate (dilution 1 :5000, Biorad Laboratories, 1706515). Le signal protéique est ensuite révélé par luminescence.

## 2.6 LDH assay

Des cellules THP-1 sont mises en différenciation à l'aide de PMA à une concentration de  $0,01 \times 10^6$  cellules/ml. Après 48h, les surnageants des cellules contrôles, XIAP<sup>KO</sup> sont récoltés pour la détection de la lactate déshydrogénase (LDH). La trousse provient de ThermoFisher Scientific et a été utilisée selon le manuel du manufacturier.

## 2.7 Essai de l'activité transcriptionnelle des gènes IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 et NLRP3 par qPCR

Après 48h de différenciation des THP-1 ( $0,2 \times 10^6$  cellules/ml) utilisant la PMA, l'ADN complémentaire est produit à l'aide du SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) suite à l'extraction de l'ARN des cellules en utilisant le RNeasy mini Kit (Qiagen) selon le manuel du manufacturier. La qPCR a été faite à l'aide de la Reverse Transcriptase M-MLV (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (Tableau V et Tableau VI).

**Tableau V : Séquences d'amorce utilisées pour les différentes réactions de qPCR**

Amorces	Séquences
IL-1 $\beta$ _F	5'-CTG CTC TGG GAT TCT CTT CAG-3'
IL-1 $\beta$ _R	5'-ATC TGT TTA GGG CCA TCA GC-3'
IL-6_F	5'-CCA CTC ACC TCT TCA GAA CG-3'
IL6_R	5'-CAT CTT TGG AAG GTT CAG GTT GC-3'
TNF- $\alpha$ _F	5'-CAG CCT CTT CTC CTT CCT GAT -3'
TNF- $\alpha$ _R	5'-GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA-3'
NLRP3_F	5'-CAC CTG TTG TGC AAT CTG AAG-3'
NLRP3_R	5'-GCA AGA TCC TGA CAA CAT GC-3'

**Tableau VI : Programme d'amplification qPCR**

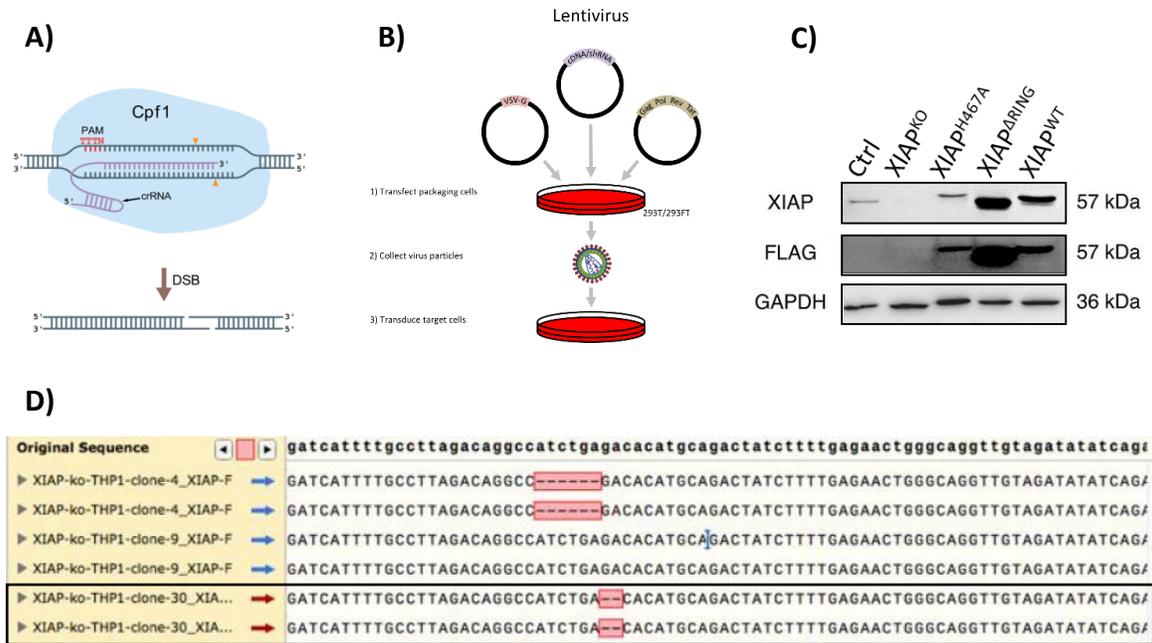
Étapes	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95	120	1
Dénaturation	95	15	1
Hybridation	60	60	1
Élongation	60-95	300	1
Conservation	4	$\infty$	1

} 40x

### 3. Résultats

#### 3.1. Génération des lignées cellulaires nécessaires au projet

La première étape du projet consiste à créer des lignées cellulaires monocytaires/macrophagiques permettant l'étude fonctionnelle de la protéine XIAP. Tout d'abord, j'ai créé une lignée cellulaire monocyttaire THP-1 XIAP<sup>KO</sup> à l'aide du système CRISPR/Cpf1 (Figure 11, A). Pour ce faire, des cellules THP-1 ont été électroporées avec un complexe nucléoprotidique contenant l'enzyme Cpf1 et d'un guide crARN XIAP<sup>KO</sup>, permettant l'entrée de ce complexe dans la cellule pour éditer le gène *XIAP*. Suite à cela, un test T7EN1 est effectué sur l'ADN cellulaire. Cette enzyme reconnaît les *mismatches* au niveau de l'ADN et la clive à cet endroit, montrant une jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) de l'ADN suite à l'induction d'une mutation. Il est alors possible d'observer suite à une migration sur gel d'agarose deux bandes d'ADN correspondant à la longueur de XIAP clivé en deux, montrant que ces cellules sont mutées. Ainsi, les cellules mutées sont mises en dilution limite, ce qui consiste à mettre dans une plaque 96 puits 1 cellule par puits dans le but que plusieurs clones grossissent. Une fois l'obtention des clones, un deuxième test T7EN1 est effectué et les clones montrant une coupure d'ADN sont envoyés au séquençage. Il a été possible de valider la présence d'une délétion entraînant la formation d'un codon stop au niveau du gène *XIAP*. Par la suite, les lignées XIAP<sup>H467A</sup>, XIAP<sup>ΔRING</sup> et XIAP<sup>WT</sup> ont été générées par transduction lentivirale à l'aide de plasmides contenant les isoformes de la protéine XIAP suivante : une isoforme comportant une mutation dominante négative H467A inhibant la fonction ubiquitine ligase de la protéine (XIAP<sup>H467A</sup>) (Wilkinson et al., 2004), une isoforme tronquée du domaine RING (XIAP<sup>ΔRING</sup>) et une isoforme sauvage de XIAP (XIAP<sup>WT</sup>). Toutes ces protéines expriment également un Tag FLAG conçu facilitant leur détection (Figure 11, B). Une fois générées, j'ai pu valider ces lignées en analysant par immunobuvardage l'expression ou non des différentes protéines par utilisant d'anticorps spécifiques reconnaissant directement XIAP ou son tag FLAG (Figure 11, C).



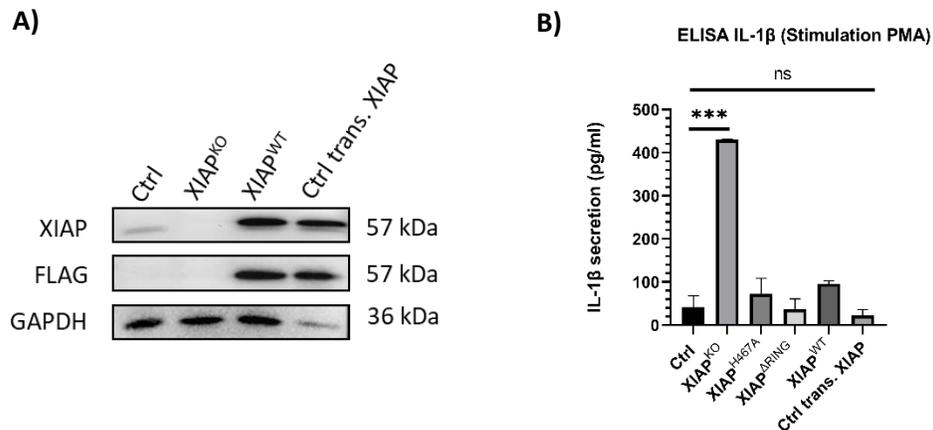
**Figure 11: Production de lignées cellulaires par édition génique CRISPR/Cpf1 et transduction lentivirale**

**A)** Électroporation de cellules THP-1 avec une nucléase CRISPR-Cpf1 complexée avec un guide ARN spécifique ciblant le premier exon de *XIAP*. **B)** Schéma de la production lentivirale avec des plasmides contenant la séquence sauvage (“wild type”) de *XIAP*, une mutation dominante négative ou délétion du domaine RING. **C)** Expression de la protéine XIAP évaluée par western blot au niveau des différentes lignées cellulaires. **D)** Résultat du séquençage SANGER du clone THP1 XIAP<sup>KO</sup>-30.

Il est possible de constater que la lignée XIAP<sup>KO</sup> ainsi que la lignée scramble ne montrent aucune bande au niveau de l’anticorps anti-XIAP (57 kDa), tandis que la lignée contrôle ainsi que les lignées transduites par lentivirus dévoilent une bande au niveau de cet anticorps. De plus, on remarque que les lignées XIAP<sup>WT</sup> et XIAP<sup>ΔRING</sup> présentent une bande au niveau de l’anticorps anti-XIAP de plus forte intensité que celui de la lignée contrôle. Je détecte également une bande à la taille de 57kDa avec l’anticorps anti-FLAG dans les lignées transduites avec les lentivirus codant pour les protéines XIAP<sup>WT</sup>, XIAP<sup>H467A</sup> et XIAP<sup>ΔRING</sup>, ainsi qu’une bande à la taille de 37 kDa avec l’anticorps GAPDH comme contrôle de charge (Figure 11, C). Finalement, les résultats de séquençage SANGER montrent que le clone 30 à une délétion de deux nucléotides (Figure 11, D).

### 3.2 Caractérisation des lignées cellulaires

Tout d'abord, suite aux résultats de l'immunobuvardage montrant entre autres des bandes de fortes intensités pour la lignée XIAP<sup>ΔRING</sup>, une lignée cellulaire comportant une surexpression du gène XIAP est générée. Cette lignée est faite par transduction lentivirale où le plasmide contenant le gène XIAP utilisé plus tôt est inséré au niveau de cellules contrôle THP-1 et elle a pour but d'évaluer si une surexpression de la protéine peut accentuer le phénotype d'hyperinflammation. Pour valider la lignée, un immunobuvardage est effectué avec les anticorps anti-XIAP et anti-FLAG (Figure 12, A) ainsi qu'un essai de sécrétion d'IL-1 $\beta$  évalué par ELISA à la suite d'une différenciation à la PMA (Figure 12, B).

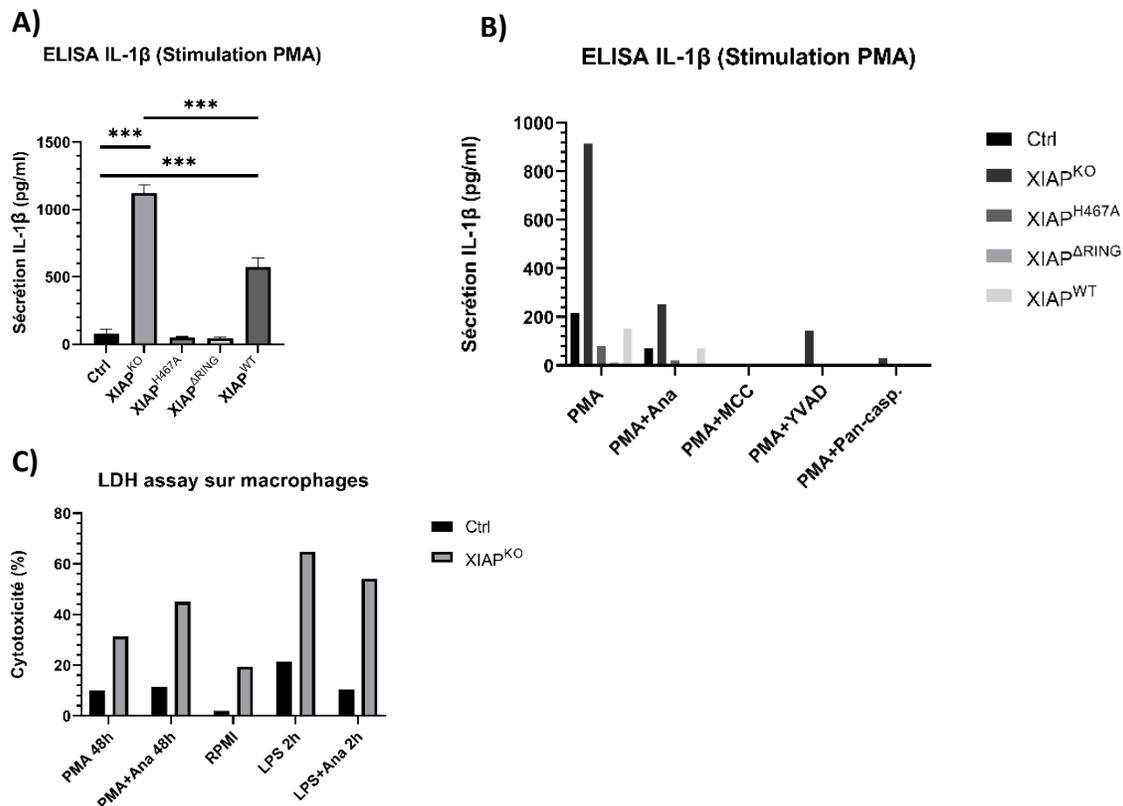


**Figure 12: Effet de la surexpression de la protéine XIAP sur l'inflammation**

**A)** Expression de la protéine XIAP évaluée par western blot au niveau des différentes lignées cellulaires. **B)** La sécrétion d'IL-1 $\beta$  est mesurée par ELISA à la suite d'une différenciation en macrophages en utilisant de la PMA (10 ng/ml). Les barres d'erreur représentent la distribution de type SEM et un test de type One-way ANOVA a été utilisé pour faire les statistiques (\*\*\*)  $p < 0,001$  ; ns non-significatif; N=2).

On peut voir que seulement la lignée XIAP<sup>KO</sup> montre une absence de signal au niveau de l'anticorps anti-XIAP et que la lignées XIAP<sup>WT</sup> tout comme la lignée contrôle transduite avec XIAP montrent une bande de plus forte intensité pour l'anticorps anti-XIAP comparativement aux cellules contrôles. En plus, toutes les lignées montrent une bande au niveau de l'anticorps de charge GAPDH (Figure 12, A). Finalement, on remarque que la lignée contrôle transduite avec XIAP, suite à une différenciation à la PMA, ne montre aucune différence significative de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  lorsque comparé aux cellules contrôles (Figure 12, B).

Suite à la validation des lignées cellulaires par immunobuvardage, il a été possible de commencer la caractérisation fonctionnelle de celles-ci. Tout d'abord, les différentes lignées cellulaires sont mises en différenciation (de monocytes à macrophages) en présence de 10 ng/mL de PMA sans aucun inhibiteur (Figure 13, A) ou avec différents inhibiteurs de la réponse inflammatoire : l'anakinra qui est un antagoniste du récepteur d'IL-1 $\beta$  bloquant la boucle de rétroaction positive, le MCC950 qui est un inhibiteur de NLRP3, l'YVAD qui inhibe la caspase-1 et le Z-VA-DL-D(OMe)-FMK qui est un inhibiteur pan-caspase (Figure 13, B). La sécrétion d'IL-1 $\beta$  est mesurée par ELISA dans le surnageant des THP-1 48H après l'induction de la différenciation. Ensuite, la mort cellulaire est évaluée en mesurant la quantité de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture, un enzyme sécrété hors de la cellule lorsque celle-ci meurt. J'ai également effectué le test LDH sur les lignées différenciées contrôle et XIAP<sup>KO</sup> suite à une stimulation de 2 heures au LPS comme premier signal d'activation de l'inflammasome (Figure 13, C).



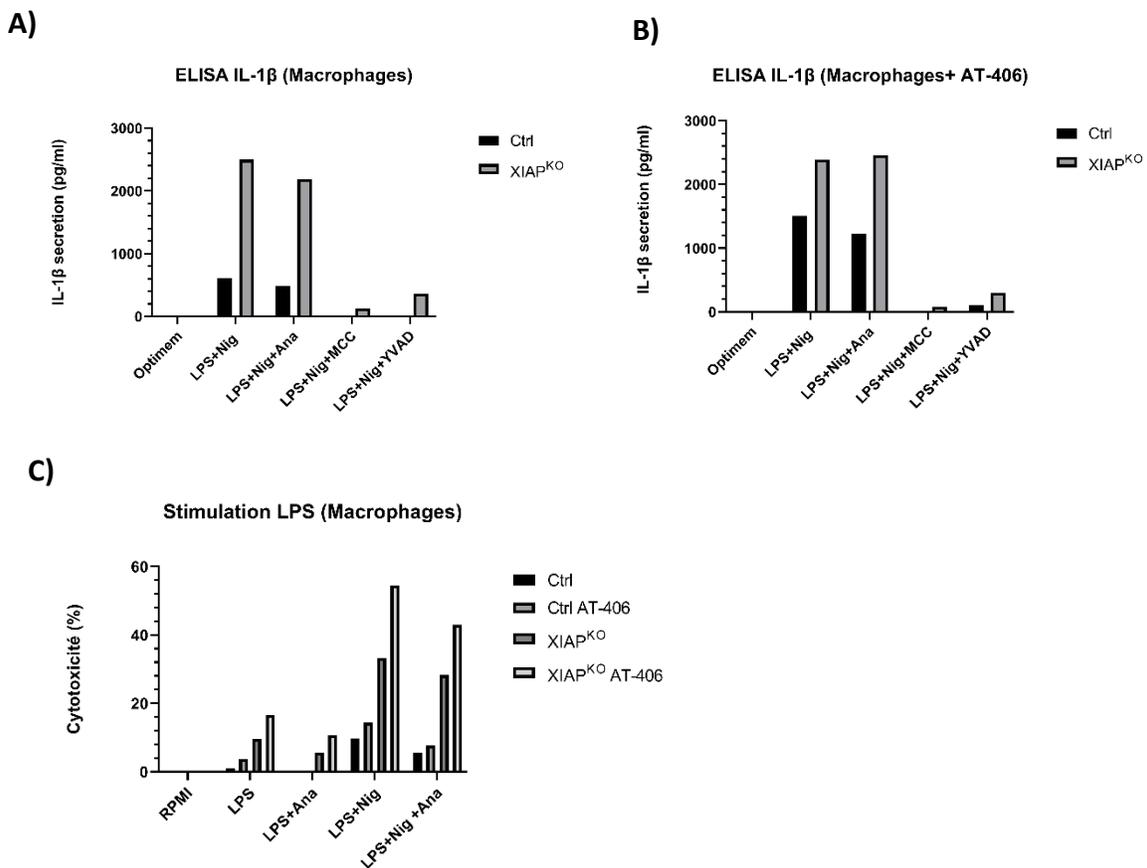
**Figure 13 : Le déficit en XIAP semble activer l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages THP-1 de manière indépendante de l'activité ubiquitine ligase de XIAP.**

**A)** La sécrétion d'IL-1 $\beta$  est mesurée par ELISA à la suite d'une différenciation en macrophages des différentes lignées en utilisant de la PMA (10 ng/ml). Les barres d'erreur représentent la distribution de type SEM et un test de type One-way ANOVA a été utilisé pour faire les statistiques (\*\* $p < 0,001$ ; ns non-significatif ; N=3) **B)** La sécrétion d'IL-1 $\beta$  est mesurée par ELISA suite à une différenciation en macrophages utilisant de la PMA (10 ng/ml) et différents inhibiteurs; anakinra (400 ng/ml), MCC950 (5  $\mu$ M), YVAD (10  $\mu$ M) et pan-caspase (5 mg/ml). N=1 **C)** Le pourcentage de mort cellulaire est mesuré par un assay LDH sur des macrophages différenciés avec de la PMA (10 ng/ml) pendant 48h avec ou sans anakinra (400 ng/ml). Ensuite, le milieu de culture est changé et les cellules sont stimulées au LPS pendant 2 heures (1  $\mu$ g/ml) avec ou sans anakinra (400 ng/ml). N=1

On peut s'apercevoir que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les macrophages XIAP<sup>KO</sup> est plus importante que celles des autres lignées cellulaires macrophagiques et que la réexpression de la forme sauvage de XIAP dans les cellules XIAP<sup>KO</sup> permet une diminution significative la sécrétion de cette cytokine suggérant que l'activation excessive de l'inflammasome est effectivement liée à l'absence d'expression et de fonction de XIAP (Figure 13, A et B) et semble indépendante de son activité ubiquitine ligase. De plus, on remarque une nette diminution de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  lorsque la différenciation des monocytes XIAP<sup>KO</sup> en macrophages est effectuée en présence d'anakinra, MCC950, YVAD et de l'inhibiteur pan-caspase. (Figure 13, B). Ceci démontre que la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  est bien dépendante de l'inflammasome NLRP3 (voir l'effet du MCC950), de son substrat la Caspase 1 (voir effet de YVAD) et que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  joue un rôle prépondérant dans la persistance du processus inflammatoire par une action auto/paracrine (voir l'effet de l'anakinra). Finalement, on remarque dans toutes les conditions que la lignée XIAP<sup>KO</sup> manifeste un plus grand pourcentage de mort cellulaire comparativement à la lignée contrôle (Figure 13, C). Cette mort cellulaire semble être plus secondaire à un processus d'apoptose que de pyroptose au vu de l'absence d'effet d'un traitement par anakinra.

Afin d'établir une potentielle redondance des cIAPs dans mon modèle cellulaire, des THP-1 contrôles et XIAP<sup>KO</sup> sont mises en différenciation avec de la PMA en ajoutant de l'anakinra pour inhiber le rôle auto/paracrine de l'IL-1 $\beta$  et du MCC950 pour inhiber la formation du NLRP3 pour la première condition (Figure 14, A). Puisque cette expérience consiste à évaluer la sécrétion d'IL-1 $\beta$  suite à une stimulation sur macrophages, l'ajout de ces deux inhibiteurs lors de la différenciation a pour but d'empêcher l'activation de l'inflammation, prévenant l'épuisement des cellules lors de ces 48h. Dans la deuxième condition, j'ai ajouté le

mimétique Smac AT-406, inhibant les cIAPs et séquestrant XIAP, à la PMA et l'anakinra (Figure 14, B). Après 48h, le milieu de culture est changé par de l'optimem et une stimulation au LPS et à la nigéricine (deuxième signal d'activation de l'inflammasome) est réalisée en présence ou non d'AT-406 selon la condition. De plus, différents inhibiteurs de l'inflammation sont ajoutés pour en voir l'effet, tel l'anakinra, le MCC950 et l'YVAD. Finalement, le milieu de culture est récupéré après stimulation dans le but de mesurer le taux de sécrétion de l'IL-1 $\beta$  par ELISA (Figure 12 A et B). Une expérience en parallèle est effectuée dans les mêmes conditions dans le but d'évaluer le taux de cytotoxicité en mesurant la LDH (Figure 13, C).



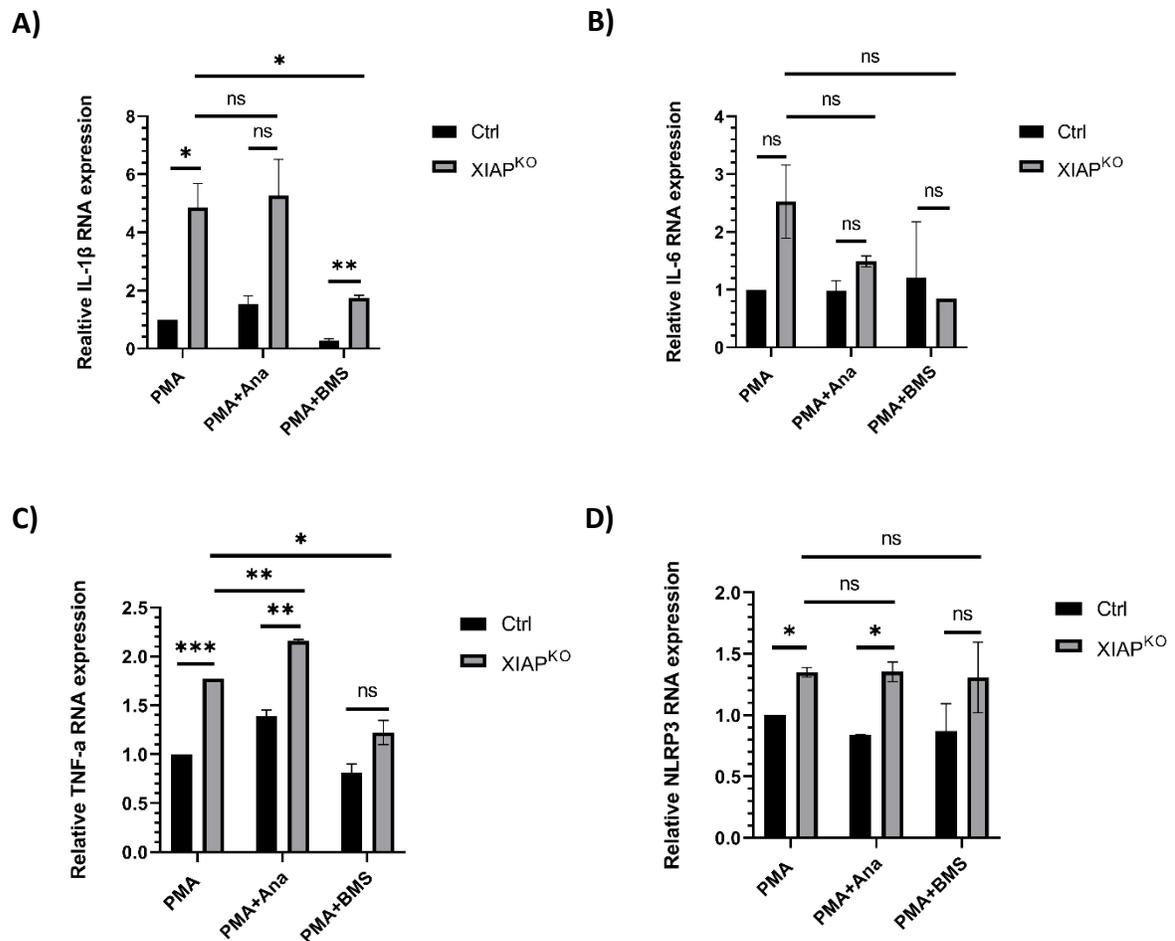
**Figure 14 : Fonction des cIAPs en absence de la protéine XIAP**

**A)** La sécrétion d'IL-1 $\beta$  est mesurée par ELISA après une différenciation des monocytes en macrophages en utilisant de la PMA (10 ng/ml), de l'anakinra (400 ng/ml) et du MCC950 (5  $\mu$ M) suivi d'une stimulation au LPS pendant 3 heures (100 ng/ml) avec nigéricine pendant une heure supplémentaire (40  $\mu$ M) avec différents inhibiteurs; anakinra (400 ng/ml), embrel (500 ng/ml), MCC950 (5 $\mu$ M) et YVAD (10  $\mu$ M). **B)** La sécrétion d'IL-1 $\beta$  est mesurée par ELISA à la suite d'une différenciation en macrophages en utilisant de la PMA (10 ng/ml), de l'anakinra (400 ng/ml), du MCC950 (5  $\mu$ M) et de l'AT-406 (250  $\mu$ M), suivi d'une stimulation au LPS

pendant 3 heures (100 ng/ml) avec nigéricine pendant une heure supplémentaire (40  $\mu$ M) avec différents inhibiteurs; anakinra (400 ng/ml), embrel (500 ng/ml), MCC950 (5 $\mu$ M) et YVAD (10  $\mu$ M). **C)** Le pourcentage de mort cellulaire est mesuré par un test LDH sur des macrophages différenciés avec de la PMA (10 ng/ml) avec ou sans AT-406 (250  $\mu$ M), suivi d'une stimulation au LPS pendant 3 heures (100 ng/ml) avec nigéricine pendant une heure supplémentaire (40  $\mu$ M) avec ou sans anakinra (400 ng/ml). N=1

Il est possible de remarquer que les macrophages contrôles sécrètent plus d'IL-1 $\beta$  lorsque l'AT-406 est ajouté lors de la stimulation LPS et nigéricine, tandis que les macrophages XIAP<sup>KO</sup> exhibent un taux de sécrétion similaire avec ou sans le Smac mimétique. De plus, on observe que l'ajout du MCC950 ou de l'YVAD réduit considérablement la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , tant au niveau de cellules contrôle que XIAP<sup>KO</sup> (Figure 14, A et B) confirmant que notre système de stimulation active bien l'inflammasome NLRP3. Par ailleurs, l'ajout d'AT-406 n'entraîne pas d'augmentation importante de la mort cellulaire chez les macrophages contrôles, tandis qu'elle induit un accroissement considérable de la mort dans les cellules XIAP<sup>KO</sup>, suggérant qu'elle a des fonctions différentes que les IAPs dans le processus de mort cellulaire inflammatoire qui n'est pas redondant (Figure 14, C). Finalement, on peut noter une grande augmentation du pourcentage de cytotoxicité pour les deux lignées cellulaires lorsqu'on compare la condition LPS avec la condition LPS + nigéricine (Figure 14, C). Cette augmentation qui pourrait être liée à une augmentation de la pyroptose.

Finalement, j'ai étudié l'impact d'un déficit en XIAP sur la transcription des gènes codant pour les cytokines proinflammatoires l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  ainsi que pour la protéine NLRP3 afin de préciser les conséquences de ce déficit sur le priming de l'inflammasome (à travers la transcription des gènes *IL1B* et *NLRP3*) et sur la signalisation de la voie NF- $\kappa$ B (à travers la transcription des gènes *IL6* et *TNFA*). Pour ce faire, les lignées contrôle et XIAP<sup>KO</sup> ont été mises en différenciation à l'aide de PMA et trois différentes conditions sont testées ; soit seulement la PMA, soit la PMA avec de l'anakinra, qui bloque une éventuelle action auto/paracrine de l'IL-1 $\beta$  sur son récepteur, ou la PMA associé au BMS-345541, un inhibiteur du site allostérique de la kinase I $\kappa$ B. Les cellules sont collectées après 48h et une qPCR est effectuée pour regarder l'expression de l'ARN des gènes encodant l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et le NLRP3 (Figure 15).



**Figure 15 : Rôle de la « backloop » auto-paracrine d'IL-1 $\beta$  et de la signalisation NF- $\kappa$ B sur la réponse inflammatoire.**

L'expression relative d'ARN de cytokines proinflammatoires a été mesurée par qPCR suite à une différenciation en macrophages utilisant de la PMA (10 ng/ml, 48h) et différents inhibiteurs; anakinra (400 ng/ml) et BMS-345541 (200 ng/ml) **A.** Expression relative de l'ARN d'IL-1 $\beta$  **B.** Expression relative de l'ARN d'IL-6. **C.** Expression relative de l'ARN du TNF- $\alpha$ . **D.** Expression relative de l'ARN de NLRP3. Les barres d'erreur représentent la distribution de type SEM et un test de type T-test a été utilisé pour faire les statistiques (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001 ; ns non-significatif; N=2)

Dans les macrophages différenciés avec la PMA seulement, il est possible d'observer une transcription plus élevée de l'ARN de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et le NLRP3 pour les macrophages XIAP<sup>KO</sup> comparativement aux contrôles (Figure 14 A, C et D), même si ces différences ne sont significatives que pour l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le NLRP3. Si l'exposition à l'anakinra ne permet qu'une diminution non significative de la transcription du gène *IL6*, un traitement BMS permet une diminution de la transcription de l'ARN encodant l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6

et le TNF- $\alpha$  dans les macrophages XIAP<sup>KO</sup> (Figure 14 A, B et C), cette diminution est significative pour les gènes codant pour l'IL-1 $\beta$ , et le TNF- $\alpha$ . Ceci tend à montrer que le déficit en XIAP s'accompagne d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes *IL1B*, *IL6*, *TNFA* et *NLRP3*. Cette activation transcriptionnelle semble NF- $\kappa$ B dépendante sans contribution de la signalisation via le récepteur à l'IL-1.

## 4. Discussion:

Le gène *XIAP* est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules immunitaires et la protéine qu'il encode joue un rôle clé au niveau de l'apoptose et de l'inflammation cellulaire. Une déficience en ce gène mène à un syndrome auto-inflammatoire chez les patients qui en sont atteints. Les mécanismes pathophysiologiques menant à ce syndrome inflammatoire restent incertains. Puisqu'aucun modèle d'étude de ce déficit n'existait jusqu'à présent chez l'homme, le but de mon projet a consisté à caractériser une lignée cellulaire de monocytes/macrophages THP-1 comportant une délétion au niveau du gène *XIAP* reflétant cette déficience observée chez les patients.

Pour ce faire, j'ai généré une lignée cellulaire comportant une délétion au niveau du gène *XIAP* en utilisant la lignée THP1 qui provient d'une lignée cellulaire de monocytes immortalisés leucémiques dérivés du sang périphérique. Cette lignée cellulaire a l'avantage d'être une lignée mâle, contenant donc un chromosome X et un chromosome Y, et donc permettant la reproduction d'une mutation hémizygote du gène.

La lignée cellulaire THP-1 *XIAP*<sup>KO</sup> que j'ai générée à l'aide du système CRISPR-Cpf1, comporte une délétion de deux nucléotides (Figure 11, A). Le système CRISPR-Cpf1 a été utilisé pour générer la lignée cellulaire THP-1 *XIAP*<sup>KO</sup>. L'enzyme Cpf-1 est plus petite que la Cas9 et nécessite une seule molécule d'ARN pour cliver l'ADN, rendant son activité plus rapide et facile que la Cas9. La Cpf-1 reconnaît en plus une séquence PAM (*protospacer-adjacent motif*) sur sa cible d'ADN la rendant plus spécifique et il a été montré que son activité génère moins de coupures hors-cible que la Cas9. Par contre, il est connu que le système CRISPR comporte tout de même des effets hors-cible. Alors, il peut être intéressant de générer une lignée cellulaire déficiente en XIAP à l'aide de différentes méthodes, tel un siRNA, et comparer les résultats obtenus. Lors de mon projet, la lignée générée par CRISPR-Cpf1 comporte une délétion de deux nucléotides entraînant un décalage de cadre de lecture nucléotidique, aboutissant à la formation d'un codon stop (TGA), entraînant l'arrêt de la traduction de la protéine (Figure 11, D). Cette mutation stop provoque une absence d'expression de la protéine comme objectivée par immunobuvardage avec un anticorps monoclonal anti-XIAP (Figure 11, C). Par la suite, j'ai généré d'autres lignées cellulaires contrôles par transduction lentivirale (Figure 11, B). L'une d'entre elles exprime une mutation dominante négative H467A (*XIAP*<sup>H467A</sup>) comportant une substitution d'une histidine en

alanine (CAT à GCT). Cette mutation a pour effet d'inhiber l'activité E3 ubiquitine ligase de la protéine sans inhiber les interactions de XIAP au niveau de ce domaine. Une autre lignée consiste en un mutant XIAP<sup>ΔRING</sup> qui comporte une délétion du domaine RING *finger* qui a abouti également à abolir l'activité E3 ubiquitine ligase tout en prévenant les interactions protéiques liées à ce domaine. Finalement, j'ai généré une lignée XIAP<sup>WT</sup> par transduction de la forme sauvage du gène *XIAP* dans la lignée *XIAP*<sup>KO</sup> afin de restaurer le phénotype de base. Ceci permet de montrer que la mutation générée par le système CRISPR/Cpf1 affecte seulement le gène *XIAP* et qu'aucun effet délétère hors cible n'a été engendré par cette technique.

Suite à la conception des différentes lignées cellulaires, j'ai pu confirmer la bonne expression des différents transgènes XIAP<sup>H467A</sup>, XIAP<sup>ΔRING</sup> et XIAP<sup>WT</sup> par immunobuvardage en utilisant les anticorps dirigés contre la protéine XIAP ou le marqueur FLAG. Nous pouvons remarquer une surexpression de la protéine XIAP au niveau des trois lignées transduites par rapport aux cellules THP-1 contrôles. Ceci s'explique essentiellement par le fait que le plasmide est fabriqué sous le contrôle d'un promoteur fort (promoteur EF1) (Figure 11, C). De manière intéressante, on observe une expression beaucoup plus forte de XIAP<sup>ΔRING</sup> comparativement aux autres isoformes transduites. Ceci peut être expliqué par une transduction plus efficace qui peut être validée par qPCR en mesurant les nombres de copies de vecteurs pour évaluer le niveau d'intégration du lentivirus. Il est aussi possible qu'ayant perdu son action d'E3 ubiquitine ligase, XIAP n'a plus la capacité d'auto-ubiquitination, résultant en une augmentation de la quantité de la protéine (Galbán and Duckett, 2010a). Ayant observé une surexpression de la protéine XIAP dans les cellules transduites comparativement au contrôle, j'ai également généré par transduction lentivirale une lignée cellulaire THP-1 surexprimant la forme sauvage XIAP afin de vérifier que la surexpression protéique de XIAP ne perturbe pas également la dynamique de réponse inflammatoire. J'ai pu validé par immunobuvardage la bonne expression du transgène XIAP<sup>WT</sup> à l'aide des anticorps anti-FLAG et anti-XIAP (Figure 12, A). Dans cette lignée, la sécrétion d'IL-1β après différenciation macrophagique par la PMA est comparable aux cellules THP-1 contrôle n'exprimant que le XIAP endogène (Figure 12, B). Ceci tend à montrer qu'une surexpression de cette protéine ne semble pas exacerber la réponse inflammatoire. Ainsi, le phénotype

observé lors de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  pour les lignées XIAP<sup>H467A</sup>, XIAP <sup>$\Delta$ RING</sup> et XIAP<sup>WT</sup> n'est pas une conséquence de la surexpression de XIAP.

Dans le but d'étudier l'état hyperinflammatoire et l'activation macrophagique excessive causée par la déficience en XIAP, j'ai entrepris d'étudier l'impact de l'absence d'expression de XIAP sur la réponse inflammatoire induite par la différenciation des monocytes en macrophages sous l'effet de la PMA. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence une sécrétion accrue d'IL-1 $\beta$  – reflet de l'activation de la caspase-1 par les inflammasomes – en l'absence d'expression de XIAP comparativement aux autres lignées cellulaires exprimant soit une isoforme sauvage, soit une isoforme dépourvue d'activité E3 ubiquitine ligase (Figure 13 A). Ceci montre qu'effectivement, la fonction de XIAP dans la régulation de la réponse inflammatoire est indépendante de son activité E3 ubiquitine ligase ou d'une éventuelle interaction protéique avec le domaine RING. J'ai pu également observer que la fonction régulatrice de l'inflammation de XIAP semblerait s'exercer via l'activation de l'inflammasome NLRP3, puisque l'ajout du MCC950 permettait une réversion du phénotype inflammatoire observé dans les cellules XIAP<sup>KO</sup> (Figure 13, B). Pour renforcer ces résultats, il aurait été intéressant d'utiliser une méthode non pharmaceutique, par exemple un siRNA, pour inhiber la fonction du NLRP3. De plus, il aurait été intéressant de générer une lignée « *scrambled* » comme contrôle négatif des lignées XIAP<sup>H467A</sup>, XIAP <sup>$\Delta$ RING</sup> et XIAP<sup>WT</sup>. En effet, les cellules « *scrambled* » devraient être transduites d'un plasmide vide ; n'ayant aucun ajout de protéine. Ceci aurait permis de valider que le phénotype observé est seulement causé par l'insert protéique au niveau du plasmide, non par la transfection lentivirale ou encore le lentivirus lui-même. Parallèlement, j'ai pu confirmer un excès de mortalité cellulaire des macrophages en absence d'expression de XIAP comparativement au contrôle. Ceci est observable tant au niveau basal (RPMI) que lorsque les cellules sont stimulées par LPS (Figure 13, C). Cet excès de cytotoxicité pourrait résulter soit de l'absence d'inhibition de l'apoptose cellulaire, soit d'un excès de pyroptose (processus de mort cellulaire dépendant des caspase 1, 4 et 5 (Man et al., 2017)). Si la concordance entre la sécrétion accrue d'IL-1 $\beta$  et l'excès de cytotoxicité laisse effectivement suggérer une pyroptose accrue, la confirmation de l'implication de ce processus pourrait être prouvée en répliquant cette expérience en utilisant une lignée cellulaire XIAP dans laquelle la pyroptose serait inhibée par répression de son effecteur terminal la Gasdermine D (par un RNA inhibiteur par exemple).

Les cIAPs1/2 ainsi que XIAP sont impliqués au niveau de voies de signalisation communes visant à inhiber l'apoptose cellulaire (Herrera et al., 2002). Cependant, les publications scientifiques se contredisent quant à une potentielle redondance des cIAPs et XIAP. J'ai essayé d'adresser cette question dans le modèle que j'ai généré. Les Smac/DIABLOs sont des antagonistes endogènes de cIAP1, cIAP2 et XIAP et différents mimétiques de Smac existent pour des conditions thérapeutiques (Brunckhorst et al., 2012). Xevinapant (AT-406) est un mimétique Smac qui permet d'inhiber XIAP, cIAP1 et cIAP2 avec une valeur  $K_i$  (constante inhibitrice) de 66.4, 1.9 and 5.1 nM respectivement. La valeur  $K_i$  permet de dire la concentration à utiliser pour inhiber de moitié l'activité enzymatique de la protéine. Ainsi, l'AT-406 est notamment moins efficace pour XIAP qu'il ne l'est pour les cIAPs 1/2, potentiellement dû à son action sur ces protéines. Effectivement, l'AT-406 permet la dégradation au protéasome des cIAPs 1/2 tandis qu'il se lie simplement sur la protéine XIAP, la séquestrant, pour empêcher son activité enzymatique (Perimenis et al., 2016). Cependant, puisque la concentration d'AT-406 utilisée est saturante, il serait judicieux d'optimiser celle-ci avec une courbe de concentration dans le but de voir l'effet de plus petites concentrations. Concernant la signalisation apoptotique, j'ai pu montrer que l'inhibition des cIAPs dans la lignée THP1 XIAP<sup>KO</sup> entraînait une augmentation de la mortalité cellulaire (Figure 14, C) suggérant une redondance des cIAPs et XIAP dans le contrôle des processus d'apoptose cellulaire. Par ailleurs, l'utilisation du mimétique Smac, m'a permis de confirmer que l'inhibition des XIAP, cIAP1 ou cIAP2 entraînait effectivement une exacerbation de la réponse inflammatoire, mis en évidence par une sécrétion accrue de l'IL-1 $\beta$  lorsque le mimétique Smac est ajouté au traitement par LPS. Dans la condition XIAP<sup>KO</sup>, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  suite au traitement de LPS est similaire en présence ou non d'AT-406 (Figure 14, A et B) montrant que si les cIAPs et XIAP ont effectivement une activité redondance dans le contrôle des mécanismes apoptotiques, la fonction régulatrice de la réponse inflammatoire est restreinte à XIAP. L'accroissement de la mortalité cellulaire dans la condition XIAP<sup>KO</sup> lors du traitement par AT-406 laisse également suggérer que l'excès de mortalité cellulaire macrophagique observée en absence de XIAP en présence des cIAPs proviendrait d'un excès de pyroptose. Comme discuté précédemment, ceci pourrait être confirmé en analysant la mortalité cellulaire macrophagique dans une lignée cellulaire XIAP dans laquelle la pyroptose serait inhibée par répression de son effecteur terminal la Gasdermine D (par un RNA inhibiteur par exemple).

Finalement, il m'a été possible d'étudier l'impact du déficit en XIAP sur la transcription des gènes *IL-1B*, *IL-6*, *TNFA* et *NLRP3* qui est en partie régulée par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. J'ai pu, tout d'abord, montrer une activité transcriptionnelle plus importante des gènes *IL1B*, *NLRP3* dans les macrophages XIAP<sup>KO</sup> comparativement au contrôle (Figure 15), confirmant un priming excessif de l'inflammasome dans cette condition. Ceci s'accompagne d'une augmentation de la transcription des gènes *IL6* et *TNFA* suggérant que l'ensemble de la voie NF- $\kappa$ B est activée dans les macrophages XIAP<sup>KO</sup>. L'hyperactivation de la voie NF- $\kappa$ B est objectivée par l'effet d'un traitement au BMS 345541 qui permet une diminution significative de la transcription de l'ARN encodant l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  ainsi qu'une diminution non significative de la transcription du gène encodant l'IL-6 (Figure 15 A, B et C). Le BMS 345541 est effectivement un inhibiteur du site allostérique de la kinase I $\kappa$  $\beta$ , une protéine essentielle à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Le manque de significativité observé dans la réduction d'activité transcriptionnelle, notamment pour le gène *IL6*, est probablement dû au nombre faible de réplicas de l'expérience. La signalisation des cytokines proinflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  s'effectuant à travers la voie NF- $\kappa$ B (Liu et al., 2017b), il est possible que l'augmentation transcriptionnelle observée dans les macrophages XIAP<sup>KO</sup> soit le reflet de l'hypersecrétion d'une de ces cytokines. Ayant montré dans un modèle précédent (déficit en NOX2 (Benyoucef et al., 2020)) que l'hypersecrétion d'IL-1 $\beta$  peut rendre compte de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle NF- $\kappa$ B dépendante par une action autocrine/paracrine de l'IL-1 $\beta$ , j'ai testé l'effet de l'inhibition de la signalisation à travers le récepteur de l'IL-1 $\beta$  sur l'activité transcriptionnelle des gènes *IL1B*, *IL6*, *TNFA* et *NLRP3* en utilisant l'anakinra qui est un antagoniste de ce récepteur. L'absence d'effet d'un traitement par anakinra sur l'activité transcriptionnelle des gènes *IL1B*, *TNFA* et *NLRP3* dans les macrophages XIAP<sup>KO</sup> suggère que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B observée s'effectue de manière indépendante de la signalisation du récepteur de l'IL-1 (Figure 13, B et Figure 15, A). Puisque le domaine RING de la protéine XIAP est reconnu pour jouer un rôle au niveau de la voie NF- $\kappa$ B, il serait intéressant d'évaluer l'activité transcriptionnelle de ces gènes dans nos lignées transduites (XIAP<sup>H467A</sup>, XIAP <sup>$\Delta$ RING</sup> et XIAP<sup>WT</sup>). Ainsi, on s'attend à observer une activité transcriptionnelle similaire avec et sans ajout du BMS pour les lignées dépourvues de leur activité E3 ubiquitine ligase (XIAP<sup>H467A</sup> et XIAP <sup>$\Delta$ RING</sup>) et un niveau de transcription similaire entre les lignées contrôle et XIAP<sup>WT</sup>.

## 5. Conclusion:

L'ensemble de mon travail a permis de préciser les mécanismes physiopathologiques responsables du syndrome auto-inflammatoire observé au cours du déficit en XIAP. La création d'une lignée de monocytes/macrophages *knock-out* pour le gène *XIAP* à l'aide de la technique CRISPR/Cpf1 m'a permis de mettre en évidence plusieurs observations majeures : (i) l'auto-inflammation observée dans les macrophages XIAP déficients est liée à une hyperactivation de l'inflammasome NLRP3; (ii) la régulation de la réponse inflammatoire par XIAP est indépendante de sa fonction ubiquitine ligase ou d'une interaction protéine-protéine dépendante de son domaine RING, et n'est pas une fonction redondante des IAP, et enfin (iii) la réponse inflammatoire excessive des macrophages XIAP<sup>KO</sup> est associée à une hyperactivation de la voie NF-KB qui est indépendante du récepteur à l'IL-1.

## Bibliographie:

Agier, J., Pastwińska, J., and Brzezinska-Blaszczyk, E. (2018). An overview of mast cell pattern recognition receptors. *Inflammation Research* 67.

Arakelyan, A., Nersisyan, L., Poghosyan, D., Khondkaryan, L., Hakobyan, A., Löffler-Wirth, H., Melanitou, E., and Binder, H. (2017). Autoimmunity and autoinflammation: A systems view on signaling pathway dysregulation profiles. *PloS one* 12, e0187572.

Benyoucef, A., Marchitto, L., and Touzot, F. (2020). CRISPR gene-engineered *CYBB*<sup>ko</sup> THP-1 cell lines highlight the crucial role of NADPH-induced reactive oxygen species for regulating inflammasome activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145, 1690-1693.e1695.

Bracaglia, C., Prencipe, G., and De Benedetti, F. (2017). Macrophage Activation Syndrome: different mechanisms leading to a one clinical syndrome. *Pediatric rheumatology online journal* 15, 5.

Brunckhorst, M.K., Lerner, D., Wang, S., and Yu, Q. (2012). AT-406, an orally active antagonist of multiple inhibitor of apoptosis proteins, inhibits progression of human ovarian cancer. *Cancer biology & therapy* 13, 804-811.

Cabon, L., Martinez-Torres, A.-C., and Susin, S.A. (2013). La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Med Sci (Paris)* 29, 1117-1124.

Chen, C., Liu, T.S., Zhao, S.C., Yang, W.Z., Chen, Z.P., and Yan, Y. (2018a). XIAP impairs mitochondrial function during apoptosis by regulating the Bcl-2 family in renal cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine* 15, 4587-4593.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., and Zhao, L. (2018b). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204-7218.

Cobb, B.A., Wang, Q., Tzianabos, A.O., and Kasper, D.L. (2004). Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell* 117, 677-687.

Damgaard, R.B., Fül, B.K., Speckmann, C., Yabal, M., zur Stadt, U., Bekker-Jensen, S., Jost, P.J., Ehl, S., Mailand, N., and Gyrd-Hansen, M. (2013). Disease-causing mutations in the XIAP BIR2 domain impair NOD2-dependent immune signalling. *EMBO molecular medicine* 5, 1278-1295.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.

Feoktistova, M., Makarov, R., Yazdi, A.S., and Panayotova-Dimitrova, D. (2021). RIPK1 and TRADD Regulate TNF-Induced Signaling and Ripoptosome Formation. *Int J Mol Sci* 22.

Filipovich, A.H. (2009). Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematology* 2009, 127-131.

Galbán, S., and Duckett, C.S. (2010a). XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ* 17, 54-60.

- Galbán, S., and Duckett, C.S. (2010b). XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death & Differentiation* *17*, 54-60.
- Goncharov, T., Hedayati, S., Mulvihill, M.M., Izrael-Tomasevic, A., Zobel, K., Jeet, S., Fedorova, A.V., Eidenschenk, C., deVoss, J., Yu, K., *et al.* (2018). Disruption of XIAP-RIP2 Association Blocks NOD2-Mediated Inflammatory Signaling. *Molecular cell* *69*, 551-565.e557.
- Gritsenko, A., Green, J.P., Brough, D., and Lopez-Castejon, G. (2020a). Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *55*, 15-25.
- Gritsenko, A., Yu, S., Martin-Sanchez, F., Diaz-del-Olmo, I., Nichols, E.-M., Davis, D.M., Brough, D., and Lopez-Castejon, G. (2020b). Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Frontiers in Immunology* *11*.
- Gros Lambert, M., and Py, B.F. (2018). NLRP3, un inflammasome sous contrôle. *Med Sci (Paris)* *34*, 47-53.
- Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine* *21*, 677-687.
- Hato, T., and Dagher, P.C. (2014). How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, CJN.04680514.
- Heilig, R., Dick, M.S., Sborgi, L., Meunier, E., Hiller, S., and Broz, P. (2018). The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 $\beta$  secretion in mice. *European journal of immunology* *48*, 584-592.
- Henderson, L.A., and Cron, R.Q. (2020). Macrophage Activation Syndrome and Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Childhood Inflammatory Disorders: Diagnosis and Management. *Paediatric drugs* *22*, 29-44.
- Herrera, B., Fernández, M., Benito, M., and Fabregat, I. (2002). cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes. *FEBS letters* *520*, 93-96.
- Hirayama, D., Iida, T., and Nakase, H. (2018). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* *19*, 92.
- Jamilloux, Y., and Henry, T. (2013). Les inflammasomes. *Med Sci (Paris)* *29*, 975-984.
- Kantono, M., and Guo, B. (2017). Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development. *Frontiers in Immunology* *8*.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., and He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* *20*.
- Kelly, B., and O'Neill, L.A.J. (2015). Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Research* *25*, 771-784.

- Knop, J., Spilgies, L.M., Rufli, S., Reinhart, R., Vasilikos, L., Yabal, M., Owsley, E., Jost, P.J., Marsh, R.A., Wajant, H., *et al.* (2019). TNFR2 induced priming of the inflammasome leads to a RIPK1-dependent cell death in the absence of XIAP. *Cell Death & Disease* *10*, 700.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death & Differentiation* *14*, 32-43.
- Latour, S., and Aguilar, C. (2015). XIAP deficiency syndrome in humans. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *39*, 115-123.
- Latz, E., Xiao, T.S., and Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology* *13*, 397-411.
- Lawlor, K.E., Khan, N., Mildenhall, A., Gerlic, M., Croker, B.A., D'Cruz, A.A., Hall, C., Kaur Spall, S., Anderton, H., Masters, S.L., *et al.* (2015). RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nature communications* *6*, 6282.
- Li, X., Zhang, M., Huang, X., Liang, W., Li, G., Lu, X., Li, Y., Pan, H., Shi, L., Zhu, H., *et al.* (2020). Ubiquitination of RIPK1 regulates its activation mediated by TNFR1 and TLRs signaling in distinct manners. *Nature communications* *11*, 6364.
- Linehan, E., and Fitzgerald, D. (2015). Ageing and the immune system: focus on macrophages. *European Journal of Microbiology and Immunology* *5*, 14-24.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017a). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2*, 17023.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.C. (2017b). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* *2*, 17023-.
- Lu, M., Lin, S.C., Huang, Y., Kang, Y.J., Rich, R., Lo, Y.C., Myszka, D., Han, J., and Wu, H. (2007). XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Molecular cell* *26*, 689-702.
- Man, S.M., Karki, R., and Kanneganti, T.D. (2017). Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological reviews* *277*, 61-75.
- Marivin, A., Berthelet, J., Plenchette, S., and Dubrez, L. (2012). The Inhibitor of Apoptosis (IAPs) in Adaptive Response to Cellular Stress. *Cells* *1*, 711-737.
- McKee, C.M., and Coll, R.C. (2020). NLRP3 inflammasome priming: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Journal of Leukocyte Biology* *108*, 937-952.
- Mudde, A.C.A., Booth, C., and Marsh, R.A. (2021). Evolution of Our Understanding of XIAP Deficiency. *Frontiers in Pediatrics* *9*.
- Nielsen, O.H., and LaCasse, E.C. (2017). How genetic testing can lead to targeted management of XIAP deficiency-related inflammatory bowel disease. *Genetics in Medicine* *19*, 133-143.
- Pålsson-McDermott, E.M., and O'Neill, L.A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* *113*, 153-162.

- Parackova, Z., Milota, T., Vrabcova, P., Smetanova, J., Svaton, M., Freiburger, T., Kanderova, V., and Sediva, A. (2020). Novel XIAP mutation causing enhanced spontaneous apoptosis and disturbed NOD2 signalling in a patient with atypical adult-onset Crohn's disease. *Cell Death & Disease* *11*, 430.
- Parkin, J., and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet* *357*, 1777-1789.
- Peña-Blanco, A., and García-Sáez, A.J. (2018). Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal* *285*, 416-431.
- Perimenis, P., Galaris, A., Voulgari, A., Prassa, M., and Pintzas, A. (2016). IAP antagonists Birinapant and AT-406 efficiently synergise with either TRAIL, BRAF, or BCL-2 inhibitors to sensitise BRAFV600E colorectal tumour cells to apoptosis. *BMC cancer* *16*, 624.
- Punchard, N.A., Whelan, C.J., and Adcock, I. (2004). *The Journal of Inflammation*. *Journal of Inflammation* *1*, 1.
- Rahit, K., and Tarailo-Graovac, M. (2020). Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes* *11*.
- Rebecca T. Marquez, B.W.T., Nicholas F. Faust and Liang Xu (2013). Drug Resistance and Molecular Cancer Therapy: Apoptosis Versus Autophagy. IntechOpen *Apoptosis*, 204.
- Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1863*, 2977-2992.
- Renehan, A.G., Booth, C., and Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *BMJ (Clinical research ed)* *322*, 1536-1538.
- Rigaud, S. (2010). Humain X-linked variable immunodeficiency caused by a hypomorphism mutation in XIAP in association with a rare polymorphism in CD40LG.
- Rizzuto, R., and Mammucari, C. (2014). Mitochondrial Calcium Homeostasis in Cell Health and Disease. In *Pathobiology of Human Disease*, L.M. McManus, and R.N. Mitchell, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 124-130.
- Rubartelli, A., Lotze, M., Latz, E., and Manfredi, A. (2013). Mechanisms of Sterile Inflammation. *Frontiers in Immunology* *4*.
- Schenten, D., and Medzhitov, R. (2011). Chapter 3 - The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 87-124.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* *140*, 821-832.
- Shanmugam, M.K., and Sethi, G. (2022). Chapter 3 - Molecular mechanisms of cell death: a brief overview. In *Mechanisms of Cell Death and Opportunities for Therapeutic Development*, D. Liao, ed. (Academic Press), pp. 65-92.
- Su, Z., Yang, Z., Xie, L.P., DeWitt, J.P., and Chen, Y. (2016). Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death and Differentiation* *23*, 748 - 756.

- Tait, S.W., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Vucic, D. (2018). XIAP at the crossroads of cell death and inflammation.
- Wajant, H., and Siegmund, D. (2019a). TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7.
- Wajant, H., and Siegmund, D. (2019b). TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol* 7, 91.
- Wajant, H., and Siegmund, D. (2019c). TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7.
- Wilkinson, J.C., Wilkinson, A.S., Scott, F.L., Csomos, R.A., Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2004). Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *The Journal of biological chemistry* 279, 51082-51090.
- Yang, S., Xie, C., Chen, Y., Wang, J., Chen, X., Lu, Z., June, R.R., and Zheng, S.G. (2019). Differential roles of TNF $\alpha$ -TNFR1 and TNF $\alpha$ -TNFR2 in the differentiation and function of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induced Treg cells in vitro and in vivo periphery in autoimmune diseases. *Cell Death & Disease* 10, 27.
- Yang, Y.L., and Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Research* 10, 169-177.
- Yaron, J. (2015). Ion Flux Regulates Inflammasome Signaling.
- Zhao, C., and Zhao, W. (2020). NLRP3 Inflammasome—A Key Player in Antiviral Responses. *Frontiers in Immunology* 11.
- Zheng, D., Liwinski, T., and Elinav, E. (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discovery* 6, 36.