Avis de Soutenance

Madame Thi Thom MAC

Biologie-Santé - Spécialité Génétique

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Étude des déficits corticotropes congénitaux grâce à un modèle de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC)

dirigés par Monsieur Thierry BRUE

Thèse soutenue le ***mercredi 28 juin 2023*** à 14h00
Lieu : Faculté de Médecine/ Campus Timone – 27 Bd Jean Moulin - Bâtiment central - 13385 - Marseille
Salle : de thèse 2

Composition du jury proposé

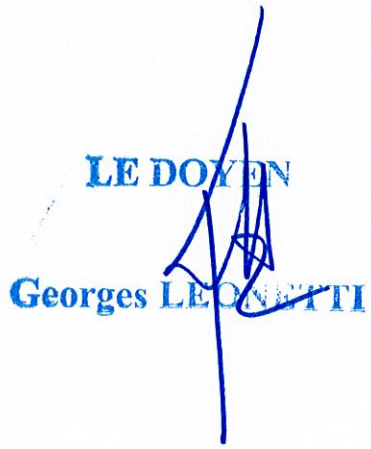
M. Thierry BRUE	Service d'Endocrinologie, Hôpital de la Conception	Directeur de thèse
M. Nicolas DE ROUX	Service de Biochimie – Hormonologie – CHU Paris – Hôpital Robert Debré	Rapporteur
Mme Nelly PITTELOUD	CHU Vaudois, Service d'Endocrinologie, diabétologie et métabolisme	Rapporteure
M. Frédéric CASTINETTI	Service d'Endocrinologie, Hôpital de la Conception	Co-directeur de thèse
M. Emmanuel NIVET	UMR 7051 Institut de NeuroPhysiopathologie (INP)	Examinateur
M. Régis COUTANT	Unité d'Endocrinologie et diabétologie pédiatriques - Département de pédiatrie médicale – CHU d'Angers	Examinateur

Mots-clés : Syndrome DAVID,hiPSC,organoïde hypophysaire,déficit ACTH,NFKB2,CRISPR-Cas9

Résumé :

Le déficit corticotrope congénital est une maladie rare, définie par le déficit de la sécrétion d'ACTH (pour adrenocorticotrophic hormone) et de cortisol, pouvant être à l'origine de 25% de décès néonataux. Notre équipe fait partie du réseau international GENHYPOPIT (hypopituitarisme humain), qui a pour l'objectif de dépister les étiologies génétiques du déficit hypophysaire. Nous avons identifié des mutations des gènes codant pour des facteurs de transcription hypophysaires, qui sont impliqués dans le développement hypophysaire, chez 7% des patients. Le déficit corticotrope isolé est principalement lié à des mutations du facteur de transcription TPIT (TBX19) : notre équipe a ainsi rapporté que 65% des déficits corticotropes néonataux isolés sont liés à des variants pathogènes de TPIT (TBX19). TBX19 joue un rôle essentiel pour la différenciation terminale des cellules corticotropes. De plus, nous avons identifié pour la première fois de nouvelles mutations de NFKB2 dans le cadre du syndrome DAVID, une association du déficit corticotrope et du déficit

immunitaire commun variable. Le mécanisme physiopathologique sous-jacent du déficit corticotrope reste inconnu à ce jour. Il n'est pas déterminé si les mutations de NFKB2 sont à l'origine d'un déficit corticotrope par un mécanisme développemental ou auto-immun. En effet, le modèle de souris Lym1, portant la mutation de NFKB2, présente des fonctions hypophysaires normales. Dans ce contexte, mes travaux de doctorat ont eu pour objectif principal de créer un modèle humain d'étude du déficit corticotrope congénital établi à partir de cellules souches induites pluripotentes différenciées en cellules hypophysaires. Pour atteindre nos objectifs, je me suis appuyée sur des stratégies de modélisations cellulaires basées sur les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC). J'ai combiné des approches d'édition génomique des hiPSC par CRISPR/Cas9 avec la différenciation des hiPSC en organoïdes hypophysaires grâce à une technique de culture en trois dimensions, ciblant d'abord le gène TBX19 pour valider le modèle, puis le gène NFKB2 pour étudier l'impact de NFKB2 sur le développement de cellules corticotropes humaines. La preuve de concept a été validée avec la mutation du TBX19K146R/K146R. Nous avons pu observer un déficit corticotrope dans les organoïdes différenciés à partir des hiPSC porteurs de cette mutation par rapport aux cellules témoins. Ce modèle a été ensuite utilisé pour étudier la mutation NFKB2D865G/D865G. Nos résultats ont révélé une altération du développement des cellules corticotropes dans les organoïdes différenciés à partir des hiPSC porteurs de la mutation de NFKB2. En conclusion, mes travaux ont mis en évidence l'intérêt et la puissance d'un nouveau modèle in vitro pour l'étude du déficit corticotrope congénital grâce auquel nous avons pu ainsi montrer pour la première fois le rôle de NFKB2 dans le développement hypophysaire.



Résumé

Le déficit corticotrope congénital est une maladie rare, définie par le déficit de la sécrétion d'ACTH (pour *adrenocorticotrophic hormone*) et de cortisol, pouvant être à l'origine de 25% de décès néonataux. Notre équipe fait partie du réseau international GENHYPOPIT (hypopituitarisme humain), qui a pour l'objectif de dépister les étiologies génétiques du déficit hypophysaire.

Nous avons identifié des mutations des gènes codant pour des facteurs de transcription hypophysaires, qui sont impliqués dans le développement hypophysaire, chez 7% des patients. Le déficit corticotrope isolé est principalement lié à des mutations du facteur de transcription TPIT (TBX19) : notre équipe a ainsi rapporté que 65% des déficits corticotropes néonataux isolés sont liés à des variants pathogènes de *TPIT* (*TBX19*). TBX19 joue un rôle essentiel pour la différenciation terminale des cellules corticotropes.

De plus, nous avons identifié pour la première fois de nouvelles mutations de *NFKB2* dans le cadre du syndrome DAVID, une association du déficit corticotrope et du déficit immunitaire commun variable. Le mécanisme physiopathologique sous-jacent du déficit corticotrope reste inconnu à ce jour. Il n'est pas déterminé si les mutations de *NFKB2* sont à l'origine d'un déficit corticotrope par un mécanisme développemental ou auto-immun. En effet, le modèle de souris *Lym1*, portant la mutation de *NFKB2*, présente des fonctions hypophysaires normales.

Dans ce contexte, mes travaux de doctorat ont eu pour objectif principal de créer un modèle humain d'étude du déficit corticotrope congénital établi à partir de cellules souches induites pluripotentes différenciées en cellules hypophysaires.

Pour atteindre nos objectifs, je me suis appuyée sur des stratégies de modélisations cellulaires basées sur les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC). J'ai combiné des approches d'édition génomique des hiPSC par CRISPR/Cas9 avec la différenciation des hiPSC en organoïdes hypophysaires grâce à une technique de culture en trois dimensions, ciblant d'abord le gène *TBX19* pour valider le modèle, puis le gène *NFKB2* pour étudier l'impact de NFKB2 sur le développement de cellules corticotropes humaines.

La preuve de concept a été validée avec la mutation du $TBX19^{K146R/K146R}$. Nous avons pu observer un déficit corticotrope dans les organoïdes différenciés à partir des hiPSC porteurs de cette mutation par rapport aux cellules témoins. Ce modèle a été ensuite utilisé pour étudier la mutation $NFKB2^{D865G/D865G}$. Nos résultats ont révélé une altération du développement des cellules corticotropes dans les organoïdes différenciés à partir des hiPSC porteurs de la mutation de *NFKB2*.

En conclusion, mes travaux ont mis en évidence l'intérêt et la puissance d'un nouveau modèle *in vitro* pour l'étude du déficit corticotrope congénital grâce auquel nous avons pu ainsi montrer pour la première fois le rôle de NFKB2 dans le développement hypophysaire.

Mots clés : NFKB2, déficit corticotrope congénital, organoïdes hypophysaires, hiPSC

Abstract

Congenital corticotroph deficiency is a rare disease, defined as a deficiency of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol secretion at birth, which can be responsible for 25% of neonatal deaths. Our team is part of the international network GENHYPOPIT (human hypopituitarism), aimed at looking for new genetic etiologies of constitutional pituitary deficiency.

We identified mutations in genes coding for pituitary transcription factors (involved in pituitary development) in 7% of the patients. Isolated corticotroph deficiency is mainly linked to mutations in genes coding for the transcription factor TPIT (TBX19). Our team has thus reported that the pathogenic variants of *TPIT* (*TBX19*) were found in 65% of isolated neonatal corticotroph deficiency. TBX19 plays an essential role in the terminal differentiation of corticotroph cells.

Moreover, our group described for the first time the association of ACTH deficiency and variable immune deficiency, in a syndrome called DAVID syndrome, due to mutations of *NFKB2*. However, the underlying mechanism of pituitary disorders in DAVID syndrome remains unknown. It is unclear whether *NFKB2* mutations cause a pituitary developmental defect or a hypophysitis due to an autoimmune mechanism. *Lym1* mouse model, carrying inactive *NFKB2*, did not allow to draw any firm conclusion.

In this context, my doctoral work was aimed at creating a human model to study congenital corticotroph deficiency.

To achieve my objectives, I relied on cell modeling strategies based on human induced pluripotent stem cells (hiPSC). I combined the CRISPR/Cas9 gene editing in hiPSC approaches with the differentiation of hiPSC into pituitary organoids using three dimensions culture, first targeting the *TBX19* gene to validate the model, then the *NFKB2* gene to study the role of the gene on corticotrophs development.

Once the proof of concept was validated by the $TBX19^{K146R/K146R}$ mutation (with edited hiPSC showing an abnormal corticotroph development, as anticipated), we used our model to study the $NFKB2^{D865G/D865G}$ mutation. My data showed the defect of corticotrophs in organoids differentiated from hiPSC carrying *NFKB2* mutation.

In summary, my work allowed to create an *in vitro* model of congenital corticotroph deficiency. Using this model, we showed for the first time the role of NFKB2 in pituitary development.

Keywords: NFKB2, congenital corticotroph deficiency, pituitary organoid, hiPSC