

Maria Isabel ACOSTA-LOPEZ

INSERM U 1065 - Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) – NICE

Vendredi 15 Septembre 2017 à 14h00
Amphithéâtre Patrick RAMPAL - C3M - Nice

HACE1 E3 ubiquitine ligase : caractérisation de sa régulation par phosphorylation et mise en évidence de son rôle dans la cohésion cellulaire

(The E3 ubiquitin ligase HACE1 : characterization of its regulation by phosphorylation and demonstration of its role in cellular cohesion)

devant le jury composé de :

Dr. Anne DEBANT	Présidente du Jury
Dr Serge ROCHE	Rapporteur
Dr. René-Marc MEGE	Rapporteur
Dr Emmanuel LEMICHEZ	Directeur de thèse
Dr Orane VISVIKIS	Co-Directrice de thèse

Résumé

La protéine HACE1 est une enzyme de la famille des E3 ubiquitine ligase de type HECT qui joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. Elle contrôle notamment l'activité de la petite GTPase Rac1 en catalysant l'ubiquitination de sa forme activée pour un ciblage au protéasome 26S. *Rac1* est un gène essentiel qui contrôle de nombreux processus cellulaires tels que l'adhérence, la migration et la prolifération. Aussi, la perte d'expression d'HACE1 dues à des altérations génétiques ou épigénétiques est associée à de nombreuses pathologies humaines tels que le cancer, des syndromes neurodégénératifs et des maladies développementales. Pourtant, malgré l'importance de HACE1 en physiopathologie, rien n'est connu à ce jour sur la régulation post-traductionnelle de son activité. Au cours de ce travail, nous avons montré que la serine 385 de HACE1 est phosphorylée par les kinase PAKs de groupe I, en réponse à l'activation de Rac1 et de Cdc42. Nous montrons que le mutant HACE1(S385E), qui mime la forme phosphorylée de HACE1, présente une activité réduite d'ubiquitination de Rac1. De plus, nous mettons en évidence un rôle centrale de la régulation de la Ser-385 par phosphorylation dans l'oligomérisation de HACE1, définissant ainsi les bases moléculaires de la relation entre structure et fonction de HACE1. En parallèle, nous avons déterminé que la perte d'expression d'HACE1 altère la cohésion des jonctions entre cellules épithéliales. Cet effet de dissociation s'apparente à une transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) caractérisée par un échange d'expression de la E-cadhérine par la N-cadhérine régulé au niveau transcriptionnel. L'ensemble de ce travail a donc permis de mettre en évidence un mode inédit de régulation par phosphorylation de l'activité de HACE1 contrôlée par les kinases PAK du groupe I, ainsi qu'un rôle majeur de HACE1 dans la régulation de la cohésion cellulaire et l'EMT.

Abstract

The E3 ubiquitin ligase HACE1 is a key regulator of cellular homeostasis best-characterized for its ability to control the activity of the Rho GTPase Rac1. This GTPase is encoded by an essential gene whose product controls a wide array of cellular processes such as cell adhesion, migration and proliferation. Accordingly, the repression of HACE1 expression due to genetic and epigenetic alterations has been associated with numerous pathologies, including cancer, neurodegenerative and developmental diseases. However, nothing is known about the posttranslational regulation of HACE1 activity. Here, we unveiled that HACE1 gets phosphorylated at serine Ser-385 by Group-I Pak kinases in response to Rac1/Cdc42 activation. Mechanistically, we define that the phospho-mimetic mutant HACE1(S385E) displays a lower capacity to ubiquitinate Rac1 in cells. In addition, our work attributes to the phosphorylation of Ser-385 a pivotal role in the state of HACE1 oligomerization, which sets the basis for deciphering the relationship between HACE1 structure and activity. In parallel, we have found that the loss of HACE1 expression leads to the disruption of epithelial monolayer cohesion characterized by disrupted cell-cell junctions. Accordingly, we determined that loss of HACE1 results in the acquisition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) features, including a transcriptionally regulated switch of expression between E-cadherin and N-cadherin. Altogether, this work reveals a phospho-mediated regulation of HACE1 activity that is under the control of Group I PAKs and implicates HACE1 in the balance between epithelium integrity versus EMT.

Rania BEN JOUIRA

INSERM U 1065 - Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) – NICE

Mardi 19 Décembre 2017 à 14h00

C3M - Nice

Implication de la matrice extracellulaire tumorale dans la transition phénotypique et la résistance aux thérapies ciblées du mélanome

devant le jury composé de :

Madame Ellen VAN OBBERGHEN-SCHILLING	Présidente du Jury
Monsieur Nicolas DUMAZ	Rapporteur
Monsieur Gilles FAVRE	Rapporteur
Madame Marie-Dominique GALIBERT	Examinatrice
Madame Sophie TARTARE-DECKERT	Examinatrice
Monsieur Marcel DECKERT	Directeur de Thèse

Résumé

Le mélanome cutané est le cancer de la peau le plus agressif de par sa grande plasticité phénotypique, son fort caractère métastatique et sa résistance aux traitements. L'émergence d'inhibiteurs ciblant la forme mutée de la kinase BRAF (BRAF V600E) a produit des réponses thérapeutiques spectaculaires, malheureusement suivies par l'apparition rapide de résistances secondaires très agressives. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces résistances constitue donc un prérequis indispensable à l'amélioration de ces thérapies ciblées. A côté des altérations intrinsèques au mélanome, les interactions entre les cellules malignes et leur microenvironnement favorisent la survie tumorale et contribuent à la résistance aux thérapies. En particulier, la matrice extracellulaire (MEC), qui constitue un réseau dynamique de macromolécules de composition et de propriétés physico-chimiques variables, influence l'architecture des tissus tumoraux, l'invasion et la réponse aux traitements. De façon importante, l'acquisition par les cellules de mélanome d'un phénotype mésenchymateux invasif a été décrite comme un mécanisme d'échappement aux thérapies ciblant la mutation oncogénique de BRAF.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été de préciser le rôle de cette signature phénotypique sur les propriétés bio-mécaniques des cellules de mélanome et la réponse aux thérapies ciblées. Dans la première partie de ma thèse, j'ai observé que les cellules résistantes présentant un phénotype invasif mésenchymateux produisent, assemblent et remodelent une matrice ayant des propriétés mécaniques et biochimiques proches de myofibroblastes. Ce phénotype est associé à une activation de la voie YAP/TAZ et une mécano-sensibilité amplifiée. La caractérisation par spectrométrie de masse du matrisome des cellules résistantes a révélé la présence abondante de protéines matricielles comme la Fibronectine, le Collagène 1(I) et la THBS1 mais également de protéines de réticulation du collagène comme LOXL2 et TGM2. Nos données montrent aussi que ces modifications sont conférées de novo par un traitement aux inhibiteurs de BRAF ou de MEK dans des cellules de mélanome mutées BRAF in vitro, et que chez la souris le traitement au Vémurafénib de cellules de mélanome xénotreffées induit l'assemblage de fibres de collagène associé à une rigidification tumorale. Finalement, j'ai pu montrer que la matrice produite par les cellules mésenchymales résistantes protège les cellules de mélanome naïves des effets anti-prolifératifs liés à l'inhibition de BRAF ou MEK.

Dans une deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée à la protéine de réticulation du collagène de la famille des lysyl oxidases (LOX), LOXL2 exprimée par les cellules mésenchymales résistantes. Nos analyses

bioinformatiques et biochimiques montrent que l'expression de cette enzyme est fortement associée à la signature invasive MITFlow AXLhigh des mélanomes. En utilisant des approches d'interférence à ARN, j'ai aussi montré que la suppression de LOXL2 dans les cellules de mélanome invasif diminue la migration cellulaire et augmente la prolifération cellulaire in vitro et in vivo, suggérant un rôle de LOXL2 dans la transition phénotypique du mélanome.

Dans l'ensemble, mes travaux de thèse révèlent un rôle paradoxal de l'inhibition de la voie MAPK qui induit des changements du phénotype tumoral associés à la production autonome par la cellule maligne d'une MEC pathologique capable d'altérer le comportement cellulaire et la réponse au traitement. Cet environnement matriciel 'sanctuaire', associée à une intense hétérogénéité tumorale, pourrait jouer un rôle majeur dans le développement et l'émergence des résistances thérapeutiques du mélanome. Ces résultats permettent une meilleure compréhension du rôle de la MEC du mélanome et devraient proposer de nouvelles pistes pour améliorer les traitements.

Mots clés : Mélanome, Résistance, thérapies ciblées, BRAF, Matrice Extracellulaire, LOXL2

Pierre BOURDELY

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

Mercredi 20 Décembre 2017 à 13h30

Salle de Conférence - Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - Sophia Antipolis

Caractérisation ontogénique, phénotypique et fonctionnelle des cellules dendritiques et des macrophages dans les carcinomes épidermoïdes cutanés

devant le jury composé de :

Dr. Philippe BLANCOU	Président du Jury
Dr. Bertrand DUBOIS	Rapporteur
Dr. Marc GREGOIRE	Rapporteur
Dr. Carole BERRUYER	Examinatrice
Dr. Ellen VAN OBBERGHEN-SCHILLING	Examinatrice
Dr. Fabienne ANJUERE	Directrice de thèse

Résumé

La peau, tissu immunocompétent, comprend les cellules du système phagocytaire mononucléé (MPS) comprenant des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques (DC) qui représentent un ensemble hétérogène de cellules impliquées dans la défense antitumorale innée et adaptative. Les carcinomes épidermoïdes cutanés (CEC) sont des cancers invasifs du kératinocyte qui se développent à partir de lésions pré-cancéreuses suite à la subversion du système immunitaire conduisant à l'évasion des cellules malignes. Une reprogrammation de l'immunité antitumorale par stimulation locale des cellules du MPS pourrait être bénéfique.

Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse a été de comprendre l'hétérogénéité ontogénique, phénotypique et fonctionnelle de ces cellules immunitaires au cours du développement d'un carcinome cutané afin de développer des approches thérapeutiques les stimulant. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les macrophages de la peau de souris et infiltrant les CEC chez l'homme. Nous avons identifié par cytométrie en flux spectrale une population de macrophages matures MHCII+, autofluorescents et résidents de la peau de souris. L'autofluorescence est le premier marqueur phénotypique permettant de distinguer ces macrophages cutanés. Ils ne dérivent pas des monocytes circulants et ne se différencient pas chez l'adulte à partir des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces macrophages résidents présentent une polarisation fonctionnelle d'homéostasie et de réparation tissulaire. Dans les CEC humains, les macrophages autofluorescents semblent avoir les mêmes caractéristiques que leurs équivalents dans la peau de souris.

Dans une seconde étude, nous avons mis en évidence que les différentes populations de DC décrites dans la peau à l'état basal et des DC dérivées des monocytes infiltrent les CEC chez la souris et chez l'homme. Les DC associées aux tumeurs sont dysfonctionnelles, comme en témoigne leur phénotype régulateur et leur capacité altérée à activer des lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un antigène tumoral. Une immunothérapie locale composée d'un agoniste de TLR9 et d'un anticorps bloquant la signalisation sous le récepteur à l'IL-10 induit la régression de tumeurs cutanées. Cette approche permet la reprogrammation fonctionnelle des DC et la génération de lymphocytes T CD8+ producteurs d'IFN γ , de TNF α et d'IL-17.

Ces résultats mettent en évidence l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules du MPS dans la peau et les CEC. Leur reprogrammation fonctionnelle permettrait le développement de nouvelles thérapeutiques contre les CEC chez l'homme.

Fabio DA SILVA

iBV- CNRS UMR 7277- INSERM U 1091 – Institut de Biologie Valrose
Faculté des Sciences – NICE

Vendredi 13 Octobre 2017 à 14h00

Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

Etude du rôle de R-spondin3 dans la formation des artères coronaires et des nouvelles fonctions dans la signalisation de l'acide rétinoïque au cours du développement et de la réparation cardiaques

(The role of R-spondin3 in coronary artery formation and novel roles for retinoic acid signaling in cardiac development and repair)

Devant le jury composé de :

Monsieur Kay D. WAGNER

Monsieur Robert G. KELLY

Monsieur Ramón MUÑOZ-CHÁPULI

Monsieur Pascal DOLLÉ

Madame Sigolène MEILHAC

Monsieur Andreas SCHEDL

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directeur de Thèse

Résumé

Les maladies coronariennes sont l'une des principales causes de décès dans le monde. Comment les artères coronaires sont modelées et quelles sont les molécules de signalisation qui régissent ce processus, sont des mécanismes mal compris. Dans la première partie de ma thèse, j'ai identifié le modulateur de signalisation Wnt Rspo3 comme un régulateur crucial de la formation de l'artère coronaire dans le cœur en développement. Rspo3 est spécifiquement exprimé autour des branches coronaires à des moments critiques dans leur développement. L'ablation temporelle de Rspo3 conduit à une diminution de la signalisation de β -caténine et à une réduction de la prolifération spécifique des artères. En conséquence, les branches coronariennes sont défectueuses et l'arbre artériel ne se forme pas correctement. Ces résultats identifient un mécanisme par lequel l'expression localisée de RSPO3 induit la prolifération des artères coronaires à leurs branches permettant leur formation. Le traitement des patients qui se remettent d'un infarctus du myocarde (IM) est difficile car les cardiomyocytes ont une capacité très limitée à régénérer le cœur endommagé. La voie de signalisation de l'acide rétinoïque (AR) est essentielle pour le développement cardiaque et joue un rôle protecteur dans les cœurs endommagés. Pour la deuxième partie de ma thèse, j'ai utilisé une nouvelle lignée rapportrice de l'AR et j'ai observé une réponse spécifique des cardiomyocytes. L'ablation de la signalisation de l'AR par délétion génétique des enzymes Raldh1/2/3 entraîne une augmentation de l'apoptose myocytaire à la fin du développement tardif et après l'IM. Le séquençage des ARNs des cardiomyocytes primaires révèle que le traitement à l'AR réprime l'expression de Ace1, indiquant un nouveau lien entre la signalisation AR et le système Rénine Angiotensine dans le contexte de la réparation cardiaque.

Abstract

Coronary heart disease is one of the leading causes of death worldwide. How coronary arteries are remodeled and the signaling molecules that govern this process are poorly understood. For the first part of my thesis, I have identified the Wnt-signaling modulator *Rspo3* as a crucial regulator of coronary artery formation in the developing heart. *Rspo3* is specifically expressed around the coronary stems at critical time-points in their development. Temporal ablation of *Rspo3* leads to decreased β -catenin signaling and a reduction in arterial-specific proliferation. As a result, the coronary stems are defective and the arterial tree does not form properly. These results identify a mechanism through which localized expression of *RSPO3* induces proliferation of the coronary arteries at their stems and permits their formation.

Treating patients recovering from myocardial infarction (MI) is difficult since cardiomyocytes have a very limited capacity to proliferate and regenerate the damaged heart. The Retinoic Acid (RA) signaling pathway is essential for cardiac development and plays a protective role in damaged hearts. For the second part of my thesis, I have utilized a novel RA reporter line and I have observed a cardiomyocyte-specific response. Ablation of RA signaling through genetic deletion of the *Raldh1/2/3* enzymes leads to increased myocyte apoptosis both during late development and after MI. RNA sequencing analysis of primary cardiomyocytes reveals that RA treatment represses *Ace1* expression, providing a novel link between RA signaling and the Renin Angiotensin System in the context of heart repair.

Najla EL HACHEM

INSERM U 1065 - Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) – NICE

Vendredi 16 Juin 2017 à 14h00

Amphithéâtre de l'Archet 2 - Niveau -3 - Nice

Rôle pro-tumorigénique de HACE1 dans le mélanome

Devant le jury composé de :

Dr. Ellen VAN OBBERGHEN	Presidente du Jury
Dr. Guillaume BOSSIS	Rapporteur
Pr. Laurence NIETO	Rapporteuse
Dr. Julie CAMEL	Examinatrice
Dr. Robert BALLOTTI	Directeur de thèse

Résumé

L'incidence du mélanome a augmenté de façon considérable lors des trente dernières années avec un doublement tous les dix ans. Le mélanome ne représente que 5% des cancers cutanés mais entraîne 80% de décès, ce qui constitue un problème majeur de santé publique. En effet, cette tumeur est extrêmement agressive et possède un fort potentiel métastatique. Dès l'apparition de métastases, le pronostic vital devient fortement défavorable. Malgré des avancées thérapeutiques majeures, de nombreux patients sont encore réfractaires à ces nouveaux traitements. La compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de cette tumeur restent donc un enjeu de premier ordre. Le séquençage d'exomes a conduit à l'identification d'une mutation dans le gène RAC1 (la mutation P29S) constituant une des mutations somatiques les plus fréquentes dans le mélanome (après les mutations BRAFV600, NRASQ61 et NF1). RAC1 est une petite GTPase qui fonctionne dans plusieurs processus cellulaires. Dans des conditions physiologiques, l'activité de RAC1 est principalement contrôlée par des protéines activatrices de l'activité GTPase (GAPs) et des facteurs d'échange Nucléotidique (GEF). GAPs et GEFs contrôlent le niveau de RAC1-GTP et régulent donc son activité. L'activité de RAC1 est aussi dépendante de son niveau d'expression protéique qui est contrôlé par des E3 ubiquitine ligases, parmi lesquelles HACE1. HACE1 est considérée comme un suppresseur de tumeur. De façon inattendue, les données obtenues montrent clairement que HACE1 favorise les propriétés migratoires et tumorigéniques des cellules de mélanome. En effet, l'inhibition de HACE1 inhibe la migration des cellules de mélanome in vitro, ainsi que la colonisation pulmonaire in vivo chez la souris. L'analyse transcriptomique de 4 lignées de mélanome a démontré que l'extinction de HACE1 inhibe l'expression des intégrines ITGAV et ITGB1. HACE1 exerce ses effets à travers une interaction directe et une ubiquitylation en K27 de la fibronectine. Cette modification post-traductionnelle favorise la sécrétion de la fibronectine qui va en retour activer les intégrines (AV et B1) et réguler l'adhésion et la migration des cellules de mélanome. Ces données ont permis d'identifier une fonction pro-tumorale de HACE1 dans les cellules de mélanome.

Abstract

Melanoma incidence has considerably increased over the last thirty years, with a doubling every ten years. Melanoma accounts for only 5% of cutaneous cancers but causes more than 80% of deaths, which is a major public health problem. Indeed, this tumor is extremely aggressive and has a high metastatic potential. After the onset of metastases, the prognosis becomes highly unfavorable. Despite major therapeutic advances, many patients are still refractory to these new treatments. Understanding the mechanisms involved in the development of this tumor and the identification of new therapies remain a major issue. The sequencing of exomes led to the identification of a mutation in the RAC1 gene (P29S) constituting one of the most frequent

somatic mutations in melanoma (after the BRAFV600, NRASQ61 and NF1 mutations). RAC1 is a small GTPase that is involved in several key cellular processes. Under physiological conditions, the activity of RAC1 is mainly controlled by GTPase activating proteins (GAPs) and Nucleotide Exchange (GEF) exchange factors. GAPs and GEFs control the level of RAC1- GTP and thus regulate its activity. The activity of RAC1 is also dependent on its protein level of expression which is controlled by E3 ubiquitin ligases, including HACE1. HACE1 is considered a tumor suppressor. Unexpectedly, our data clearly show that HACE1 promotes migratory and tumorigenic properties of melanoma cells. Indeed, inhibition of HACE1 alters migration of melanoma cells in vitro, as well as in vivo pulmonary colonization in mice. Transcriptomic analysis of 4 melanoma cell lines demonstrated that HACE1 suppression inhibits ITGAV and ITGB1 expression. HACE1 exerts its effects through a direct interaction and a K27 ubiquitylation of fibronectin. This post-translational modification promotes fibronectin secretion, which will in turn activate integrins (AV and B1) and regulate adhesion and migration of melanoma cells. These data led us to identify a pro-tumor function of HACE1 in melanoma cells.

Ramona Nicoleta GALANTONU

IRCAN – Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement de Nice – CNRS UMR 7284 - INSERM U 1081 – UNS –
Faculté de Médecine – NICE

Lundi 11 Décembre 2017 à 9h30

Amphithéâtre 3 - IRCAN - Nice

Facteurs cellulaires contrôlant la rétrotransposition du L1 humain (Cellular factors controlling human L1 retrotransposition)

devant le jury composé de :

Dr Jean-Ehrland Ricci

Dr. Pascale Lesage

Dr. Séverine Chambeyron

Dr. Gaël Cristofari

Président du Jury

Rapporteuse

Rapporteuse

Directeur de thèse

Résumé

L'abondance d'éléments génétiques mobiles dans le génome humain a un impact critique sur son évolution et son fonctionnement. Même si la plupart des éléments transposables sont inactifs en raison de l'accumulation de mutations, le rétrotransposon LINE-1 (pour Long Interspersed Element-1 ; ou élément L1) continue de se mobiliser et d'influer sur notre génome. Il a ainsi contribué à l'évolution de l'homme moderne, mais aussi à l'apparition de maladies génétiques et est parfois impliqué au cours de la tumorigénèse. Les séquences du rétrotransposon L1 correspondent à 17% de la masse totale de l'ADN humain. Une copie active de L1 est capable de se mobiliser de manière autonome par un mécanisme de type «copier-coller» qui met en jeu un intermédiaire ARN et une étape de transcription inverse. L'élément L1 code deux protéines, ORF1p et ORF2p, qui s'associent à l'ARNm de L1 pour former des particules ribonucléoprotéiques, le cœur de la machinerie de rétrotransposition. Cependant, peu de choses sont connues sur les voies cellulaires impliquées dans la mobilité de L1. Notre laboratoire a découvert, par des cribles double-hybride, une interaction entre la protéine ORF2p de L1 et le récepteur α associé aux œstrogènes (ERR α), un membre de la famille des récepteurs nucléaires. Ici, nous avons confirmé et étendu cette observation à plusieurs autres membres de la superfamille des récepteurs de stéroïdes en utilisant un test de double-hybride fluorescent (F2H) en culture cellulaire. Pour mieux comprendre le rôle potentiel d'ERR α dans le cycle de rétrotransposition de L1, nous avons effectué des expériences de suppression et de surexpression qui suggèrent qu'ERR α est un régulateur positif de la rétrotransposition. En outre, la liaison et la concentration d'ERR α à un locus répété artificiel (LacO array) inhibe la rétrotransposition. Collectivement, ces données relient les voies de signalisation des stéroïdes avec la régulation post-traductionnelle de la rétrotransposition de L1, ce qui suggère un modèle par lequel ERR α et probablement plusieurs autres récepteurs nucléaires peuvent recruter le RNP L1 vers des emplacements chromosomiques spécifiques, agissant comme facteurs de liaison et d'adressage.

Mots clés : génome, éléments transposables, rétrotransposon, cribles, récepteurs nucléaires, récepteurs de stéroïdes, ERR α , régulation, post-traductionnelle

Abstract

The abundance of genetic mobile elements in our DNA has a critical impact on the evolution and function of the human genome. Even if most transposable elements are inactive due to the accumulation of mutational

events, the Long INterspersed Element-1 (LINE-1 or L1) retrotransposon continues to diversify and impact our genome, being involved in the evolution of modern humans and in the appearance of genetic diseases or in tumorigenesis. L1 forms 17% of human DNA. It is autonomously active being replicated through an RNA-mediated 'copy-and-paste' mechanism. The L1 element encodes two proteins, ORF1p and ORF2p, which associate with the L1 mRNA to form L1 ribonucleoprotein particles, the core of the retrotransposition machinery. However, little is known about the cellular pathways involved in L1 replication. Our laboratory has discovered by yeast 2-hybrid screens an interaction between L1 ORF2p and the estrogen-related receptor α (ERR α), a member of the nuclear receptor family. Here, we confirmed and extended this observation to several other members of the steroid receptor superfamily using a fluorescent two-hybrid assay (F2H) in human cultured cells. To get further insight into the potential role of ERR α in L1 replication cycle, we performed ERR α siRNA-mediated knock-down and overexpression experiments, which suggest that ERR α is a positive regulator of retrotransposition. Moreover, the artificial tethering and concentration of ERR α to a large and repetitive genomic array inhibits retrotransposition. Collectively, these data link steroid signaling pathways with the post-translational regulation of L1 retrotransposition, suggesting a model by which ERR α , and probably several other nuclear receptors, can recruit the L1 RNP to specific chromosomal locations, acting as tethering factors.

Keywords : transposable element, nuclear receptor, host factor, tethering, integration

Thomas JUAN

iBV- CNRS UMR 7277- INSERM U 1091 – Institut de Biologie Valrose
Faculté des Sciences – NICE

Mercredi 13 Décembre 2017 à 14h00

Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

Identifications de nouveaux gènes essentiels à la mise en place de la latéralité chez le poisson-zèbre

devant le jury composé de :

Pr Franck Delaunay

Président de Jury

Pr Bénédicte Durand

Rapportrice

Dr Patrick Blader

Rapporteur

Dr Maximilian Fuerthauer

Directeur de thèse

Résumé

Notre fascination pour l'asymétrie droite/gauche (D/G) remonte à plusieurs siècles, avec les premières descriptions de maladies liées à des défauts de latéralité comme la dextrocardie. Ce n'est que récemment cependant que les premières preuves moléculaires à l'initiation d'un développement latéralisé se sont accumulées avec la découverte de l'expression asymétrique du gène nodal chez le poulet. Depuis, des progrès majeurs ont été réalisés avec la mise en évidence de la conservation de nodal et de la voie de signalisation qui s'établit en aval pour permettre une morphogenèse asymétrique chez les vertébrés. Malgré cela, l'évènement initial de brisure de symétrie reste un mystère, et la diversité des mécanismes de mise en place de l'asymétrie dans les différents phylums font s'interroger sur la conservation d'un même évènement initial au cours de l'évolution.

J'ai utilisé au cours de ma thèse le poisson-zèbre comme organisme modèle afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions. J'ai travaillé dans cette optique sur deux projets séparés qui m'ont permis d'étudier de façon indépendante deux aspects du D/G. (1) La façon dont la machinerie cellulaire ESCRT participe à la cassure de symétrie. (2) La conservation des mécanismes de mise en place du D/G à travers l'étude de la protéine Myo1D.

Dans un premier temps, je me suis ainsi intéressé aux premiers évènements de cassure de la symétrie chez les vertébrés. Chez le poisson-zèbre, la région organisatrice de l'asymétrie D/G consiste en un organe embryonnaire transitoire, appelée vésicule de Kupffer (KV), qui apparaît au début des phases de segmentation et se situe au niveau du bourgeon de queue. La KV est formée de cellules épithéliales, qui font face à une lumière sphérique remplie de liquide. Ce liquide est mis en mouvement de façon circulaire antihoraire par les battements de cils motiles présents sur les cellules épithéliales, et le courant ainsi généré est responsable de la cassure de symétrie d'une manière qui reste mal comprise. Nous avons observé dans la lumière de la KV la présence d'exovésicules positives pour la protéine Chmp1B, qui appartient au complexe ESCRT. De plus, la perte de fonction par morpholinos d'un autre composant d'ESCRT, Vps4B, entraîne une diminution du nombre de ces exovésicules et des défauts de latéralité des organes. Ces défauts de latéralité suite à la perte d'un composant ESCRT ont été ensuite confirmés par l'observation du phénotype associé à la mutagenèse de Chmp1a, un paralogue de Chmp1B, qui présente des défauts similaires à Vps4B. Ces observations suggèrent un rôle potentiel des exovésicules dans la mise en place de l'asymétrie D/G, mais soulèvent également la question de leur adressage, comment un flux circulaire peut-il promouvoir leur transport asymétrique ? Pour répondre à cette question, j'ai réalisé une analyse quantitative de la dynamique de transport d'exovésicules dans la KV. Ces mesures m'ont permis de montrer que des gradients de vitesses de déplacement du flux de la

KV étaient responsables du transport directionnel de ces exovésicules. Ainsi, ces résultats permettent de proposer un modèle dans lequel des exovésicules ESCRT-positive assureraient le transport directionnel de signaux essentiels à la cassure de symétrie.

Dans un deuxième temps, je me suis focalisé sur la conservation des événements de cassure de symétrie au cours de l'évolution. J'ai travaillé pour cela sur le phénotype associé à la perte de fonction de la protéine Myo1D, qui entraîne chez la Drosophile une inversion totale de l'axe D/G de tous les organes latéralisés. Myo1D est une myosine non-conventionnelle qui a été montré comme interagissant avec le cytosquelette d'actine afin d'initier une cassure de symétrie à l'échelle de la cellule chez la Drosophile. Ces informations sont ensuite propagées à l'ensemble du tissu par l'intermédiaire de la signalisation PCP. Chez le poisson-zèbre, j'ai montré que la perte de Myo1D avait également un impact sur la latéralité de tous les organes embryonnaires, ainsi que sur les signaux les plus précoces d'initialisation de la latéralité. J'ai ainsi montré que Myo1D interagissait de façon fonctionnelle avec la protéine VanGogh-like2 (Vangl2), un composant de la voie PCP contrôlant le positionnement et l'orientation des cils de la KV pour permettre l'établissement d'un flux fonctionnel. Myo1D, son paralogue Myo1G et leur antagoniste Myo1Cb font partis d'un réseau fonctionnel contrôlant l'asymétrie D/G chez le poisson-zèbre. Ces découvertes établissent ainsi que le système Myo1D représente une machinerie conservée au cours de l'évolution pour l'établissement d'une latéralité chez les animaux.

Scherazad KOOTAR

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

Vendredi 24 Mars 2017 à 13h30

Salle de Conférence - Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - Sophia Antipolis

L'importance des récepteurs aux glucocorticoïdes dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

(Importance of glucocorticoid receptors in the physiopathology of Alzheimer's disease)

devant le jury composé de :

Dr Stéphane Martin

Président de Jury

Dr Alain Buisson

Rapporteur

Dr Ioannis Sotiropoulos

Rapporteur

Dr Hélène Marie

Directrice de thèse

Résumé

Les formes oligomériques du peptide b-amyloïde (oAb) sont toxiques pour les synapses et engendrent la perte de mémoire lors de la phase précoce de la maladie d'Alzheimer (MA). La MA est aussi associée à une dérégulation de l'axe du stress engendrant une augmentation des glucocorticoïdes (GCs) qui activent les récepteurs associés (GRs). Nous avons montré que, dans un modèle murin de la MA, les Tg2576 (Tg⁺), l'inhibition des GRs prévient les déficits de mémoire et de plasticité synaptique (Lanté et al. 2015).

Nous avons continué à étudier le rôle des GRs dans la physiopathologie de la MA. La dérégulation de l'axe du stress dans les souris Tg⁺ est caractérisée par des niveaux élevés de GCs et la perte de la boucle de rétroaction négative. Aussi, nous avons croisé les souris Tg⁺ avec des souris GR floxées pour générer des double mutants GR^{lox/lox} Tg⁺. Ces souris exhibaient plusieurs phénotypes non-anticipés et nous avons décidé de mettre fin à cette lignée de souris. Nous avons aussi analysé la relation fonctionnelle spécifique entre les GRs et oAb à la synapse en utilisant un traitement aigu d'oAb. Dans des cultures de neurones, ce traitement a favorisé une augmentation des niveaux de GRs à la synapse. Aussi, nous avons montré que bloquer l'activité des GRs par pharmacologie ou par ablation génétique neutralise l'effet inhibiteur d'oAb sur la potentialisation synaptique étudiée sur tranches d'hippocampe.

En conclusion, nos résultats sur souris Tg⁺ suggèrent la présence d'une dérégulation en début de MA. Aussi, nous mettons en évidence une relation fonctionnelle entre oAβ et GRs à la synapse, les GRs jouant en rôle clé dans la synapto-toxicité induite par oAβ.

Abstract

Strong evidence shows that oligomeric forms of the amyloid-β peptide (oAβ) cause synapse dysfunction promoting loss of hippocampus-dependent memories in the early phase of Alzheimer's disease (AD). AD is also associated with Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis dysfunction which results in an increase of glucocorticoids (CORT) activating glucocorticoid receptors (GRs). We showed that subchronic GR antagonist in 4 month Tg2576 (Tg⁺) mice could rescue the synaptic deficit and memory impairment (Lanté et al., 2015).

In this context, we studied the contribution of GRs to AD pathophysiology. Dysregulated HPA axis was characterized by increased CORT levels at 4 and 6 months of age and by loss of CORT feedback inhibition in the Tg⁺ mice. We further crossed the Tg⁺ with GR^{lox/lox} to produce GR^{lox/lox}Tg⁺ mice. These mice innately exhibited high CORT levels from weaning period and due to other several unforeseen reasons, we discontinued using this new mouse model. Instead, to identify the functional relationship between the GRs and oAβ at synapses, we shifted to acute oAβ treatment in neurons *in vitro* and *ex-vivo* hippocampus slices. In neuron cultures, GR levels increased in the post synaptic density upon acute oAβ treatment. Further, treatment of oAβ on *ex-vivo* hippocampus slices after either pharmacological blocking of GR or genetic ablation, prevented the oAβ-dependent LTP impairment.

To conclude, our results with the Tg⁺ mice suggest that a neuroendocrine dysregulation occurs during the onset of AD pathology. Additionally, we have evidence for a functional relationship between oAβ and GRs with GRs at the synapse playing an important role in acute Aβ-induced synapto-toxicity.

Loris PRATX

Institut Sophia Agrobiotech - UMR INRA 1355 - UNS - CNRS 7254 – Sophia Antipolis

Jeudi 4 Mai 2017 à 14h00

Salle A010 - Institut Sophia Agrobiotech - SOPHIA ANTIPOLIS

Identification de marques épigénétiques chez le nématode à galles parasites de plantes *Meloidogyne incognita*

devant le jury composé de :

Pr. Cécile Sabourault	Présidente du jury
Dr. Isabelle Fudal	Rapporteuse
Dr. Denis Tagu	Rapporteur
Pr. Stéphane Maury	Examineur
Dr. Nicolas Nègre	Examineur

Résumé

Meloidogyne incognita est le nématode causant le plus de dégâts en agriculture. Une de ses particularités notables est d'être un organisme améiotique à reproduction asexuée obligatoire. Une femelle engendre ainsi des clones *a priori* 100% identiques génétiquement. Pourtant, en dépit de ce mode de reproduction clonal, *M. incognita* est capable de faire preuve d'une grande plasticité phénotypique lui permettant de répondre à de nouveaux environnements. Un exemple de cette plasticité est celui du déterminisme du sexe, un phénotype étroitement lié aux conditions environnementales et pour lequel des données bibliographiques prédisent un rôle de l'état chromatinien. Un autre exemple est la capacité à contourner les résistances des plantes (ou virulence), un caractère héréditaire mais transmissible de manière non-Mendélienne, suggérant que la génétique seule ne serait pas suffisante à expliquer ce phénomène. Dans le cadre de cette thèse, j'ai cherché à tester l'implication des mécanismes épigénétiques dans la plasticité phénotypique, en absence de sexe, de *M. incognita*. Pour ce faire, j'ai évalué, par une approche « genome-wide », l'existence et la conservation des mécanismes épigénétiques chez les nématodes à galles. Cette approche a permis de pointer l'absence probable des phénomènes de méthylation des cytosines de l'ADN chez les nématodes parasites de plantes, et la conservation des mécanismes de modification post-traductionnelle des histones connus chez le nématode modèle *C. elegans*. Sur cette base, une méthodologie d'immuno-précipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-seq) a été mise en place afin de comparer les profils d'accumulation des marques d'histones chez *M. incognita* au cours 1- du développement du nématode et 2- de la réponse aux conditions environnementales. Cette stratégie a permis la mise en évidence de patrons d'histones modifiées marquant spécifiquement le développement du parasite. Sur la base de ces résultats, je propose un modèle pour expliquer le déterminisme du sexe chez *M. incognita*. Des régions génomiques spécifiquement perdues dans le cadre de l'acquisition de la virulence ont également pu être identifiées et comportant plus de 300 gènes dont des candidats facteurs d'avirulence déjà décrits dans la littérature. Ces travaux de thèse présentent un intérêt fondamental sur la compréhension de l'évolution d'un organisme en absence de reproduction sexuée. Ils présentent également un intérêt pratique dans la lutte contre ce parasite majeur en permettant 1- de mieux appréhender les mécanismes de contournement de la résistance des plantes, 2- de poser les bases d'une nouvelle approche de lutte consistant en la masculinisation des individus.

Abstract

Meloidogyne incognita is the most damaging plant-parasitic nematode in agriculture. *M. incognita* reproduces in an asexual way by obligatory parthenogenesis. Genetically identical individuals develop from females and form clonal populations. Although these clones share the same genetic heritage, modifications of their phenotype can be observed when they are exposed to unfavorable environments. This phenotypic plasticity is characterized through two phenotypes of interest: sex-differentiation and virulence (i.e. capacity to parasitize a resistant crop). Sex-differentiation varies among environmental conditions and was reported to be linked to decondensed chromatin regions. Virulence is an heritable character transmitted in a non-Mendelian way (not acquired by 100% of the “clonal daughters”). Our study focuses on identifying the role of epigenome in the generation of phenotypic variability. To this end we detailed the presence of proteins involved in epigenetic regulations in *Meloidogyne* spp. We also developed a ChIP-seq assay to compare post-transcriptional histone modifications between different developmental stages (juveniles, females, males); and between virulent and avirulent near-isogenic lines (NILs) of parasites. Our results allow us to detect specific histone patterns associated with *M. incognita* development. These results lead us to propose a model that could explain sex determination in *M. incognita*. We also could link the virulence acquisition with the loss of some specific genomic regions. These regions contain more than 300 genes including already described potential avirulence factors. This study opens the way for analyzing the role of epigenetic mechanisms at a whole genome scale, and allows to identify novel biological processes involved in phenotypic variation in asexual organisms. In a practical point of view, this study lead us to 1- understand the mechanisms of plant resistance bypassing and 2- open the way for decipher the mechanisms of masculinization, as a new approach to control this important pest.

Tiziana NAPOLITANO

iBV- CNRS UMR 7277- INSERM U 1091 – Institut de Biologie Valrose
Faculté des Sciences – NICE

Mardi 19 Décembre 2017 à 13h30

Bâtiment Fizeau - Faculté des Sciences – NICE

FT1 : une nouvelle cible pour la thérapie du diabète (FT1: a new target for diabetes therapy)

devant le jury composé de :

Dr Ez-Zoubir AMRI	Président du Jury
Pr Ahmed MANSOURI	Rapporteur
Dr HECKSHER-SØRENSEN	Rapporteur
Dr Patrick COLLOMBAT	Directeur de thèse

Résumé

Le pancréas mature est constitué de deux types de tissus : le tissu exocrine, comprenant les cellules acinaires et les canaux pancréatiques, et le tissu endocrine. Les cellules acinaires sont dédiées à la synthèse d'enzymes digestives, qui sont collectées et acheminées via le réseau canalaire à travers l'organe entier. Les cellules endocrines sont organisées en groupes fortement vascularisés, nommés îlots de Langerhans, qui contiennent cinq sous-types cellulaires, les cellules α , β , δ , PP et ϵ sécrétant respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine, le polypeptide pancréatique et la ghréline. L'approche génétique classique a permis de caractériser des facteurs bien connus et étudiés mais de plus en plus de recherches identifient des facteurs nouveaux impliqués dans le développement et la maturation du pancréas. Via des études *in silico*, nous avons accumulé des preuves suggérant un rôle pour FT1 dans le développement et la spécification cellulaire du pancréas. Cette protéine, un facteur de transcription à doigt de zinc, a précédemment été impliquée dans l'hématopoïèse, le développement de l'oreille interne et la maintenance du phénotype des cellules intestinales. Dans cette étude, nous avons examiné le rôle de FT1 dans le pancréas. Dans ce but, nous avons généré une lignée de souris transgénique permettant l'inactivation sélective de FT1 dans le pancréas. Dans l'ensemble, nos observations suggèrent que FT1 est nécessaire pour la maturation complète des cellules acinaires. De façon importante, nous avons démontré que l'ablation de FT1 dans le pancréas est suffisante pour protéger les souris contre deux modèles d'induction du diabète.

Abstract

The mature pancreas consists of two main tissue types: the exocrine tissue, including acinar cells and a ductal tree, and the endocrine tissue. Acinar cells are dedicated to the synthesis of digestive enzymes, which are collected and conveyed to the duodenum by a ductal network running through the entire organ. Endocrine cells are organized into highly vascularized cell clusters, termed islets of Langerhans, which contain five cell subtypes, α -, β -, δ -, PP- and ϵ -cells secreting glucagon, insulin, somatostatin, pancreatic polypeptide and ghrelin, respectively.

Classical genetic approaches have revealed much about individual factors regulating pancreatic development, however, we have yet to understand the regulatory network underlying pancreas formation and all the factors involved. Some of these factors are well known and studied but increasing researches revealed new and unknown factors involved in pancreas development and maturation. Among these, through in silico studies, we accumulated evidences suggesting a role of FT1 in pancreas cell development and specification. This protein, a zinc finger transcription factor, had previously been implicated in hematopoiesis, inner ear cell development, and in the maintenance of intestinal cell phenotypes.

Here, we investigated the role of FT1 in the pancreas. Towards this goal, we generated a transgenic mouse line allowing FT1 inactivation exclusively in the pancreas. Altogether, our observations suggest that FT1 is required for the full maturation of pancreatic acinar cells. Importantly, we demonstrated that the sole loss of FT1 in the pancreas is sufficient to protect mice against two models of diabetes induction.

Rohan WAKADE

iBV- CNRS UMR 7277- INSERM U 1091 – Institut de Biologie Valrose
Faculté des Sciences – NICE

Lundi 4 Septembre 2017 à 9h00
Faculté des Sciences – NICE

Rôle de GTPase de type Rab, Ypt6, chez le pathogène fongique opportuniste de l'homme, *Candida albicans*

(Role of the Rab GTPase, Ypt6, in the human fungal pathogen *Candida albicans*)

devant le jury composé de :

Dr Robert ARKOWITZ

Pr. Jim KRONSTAD

Dr. Dereck Mc CUSKER

Dr. Ellen Van OBBERGHEN

Pr. Miguel PENALVA

Dr Martine BASSILANA

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de Thèse

Résumé

Candida albicans est un organisme commensal présent dans le microbiote, qui peut cependant provoquer des infections superficielles mais aussi systémiques, engageant alors le pronostic vital chez les patients immunodéprimés. La transition entre forme bourgeonnante et forme filamenteuse hyphale hautement polarisée, ce qui nécessite une réorganisation du cytosquelette et un trafic membranaire soutenu, est associée à la virulence. Chez les eucaryotes, les GTPases de la famille Rab (Ras related protein in the brain) et leurs régulateurs jouent un rôle central dans le trafic membranaire.

L'objectif de ce travail est de comprendre le rôle de ces protéines, en particulier de Ypt6, l'homologue de Rab6 humain, dans la transition morphologique et la virulence de *C. albicans*. Dans ce but, j'ai construit des mutants « perte de fonction » et déterminé que YPT6 n'est pas essentiel à la viabilité, mais est critique pour l'intégrité de la paroi cellulaire et la croissance hyphale invasive; les hyphes du mutant ypt6 sont plus courtes que celles de la souche sauvage. En outre, YPT6 est critique pour la virulence dans deux modèles murins de candidose. Lors de la croissance hyphale, Ypt6 est co-localisé avec Arl1, une GTPase de la famille Arf (ADP Ribosylation Factor), également nécessaire pour la croissance hyphale et la virulence de *C. albicans*. De plus, la surexpression de YPT6 compense spécifiquement le défaut de croissance hyphale du mutant de délétion arl1, mais pas l'inverse. La délétion de YPT6 résulte également en une augmentation du nombre de citernes Golgiennes, suggérant que l'intégrité du Golgi est altérée dans ce mutant. Utilisant de l'imagerie sur cellules vivantes, j'ai montré que la distribution d'Abp1 (Actin binding protein 1), qui est un rapporteur des sites d'endocytose, est aussi altérée dans le mutant ypt6, en ceci qu'elle n'est plus restreinte à l'apex de l'hyphale, comme observé dans les cellules sauvages. Ces données suggèrent que le défaut de maintien de la croissance hyphale du mutant ypt6 est au moins en partie associé à une altération de la distribution des sites d'endocytose. En résumé, j'ai identifié le rôle de Ypt6 dans la croissance hyphale invasive et la virulence du pathogène fongique opportuniste de l'homme *C. albicans*, et mis en évidence une interaction entre deux GTPases, Ypt6 et Arl1, lors du processus de croissance hyphale.

Abstract

Candida albicans is a harmless constituent of the human microbiota that causes superficial infections as well as life threatening infections in immune compromised individuals. The transition from a budding form to the highly polarized hyphal form is associated with virulence and requires cytoskeleton reorganization and sustained membrane trafficking. In a range of eukaryotes, Ras related protein in the brain (Rab) G proteins and their regulators have been shown to play a central role in membrane traffic. The objective of this work is to understand the role of Rab proteins, in particular Ypt6, the homolog of Human Rab6, in the morphological transition and virulence of *C. albicans*. To this aim, I generated loss of function mutants and found that YPT6 is not essential for viability, yet was critical for cell wall integrity and invasive hyphal growth, with ypt6 hyphal filaments shorter compared to that of the wild type (WT). Furthermore, YPT6 was important for virulence in two murine candidiasis models. I determined that Ypt6 was localized at the late Golgi compartment during hyphal growth, where it co-localized with Arl1, a small GTPase of the Arf (ADP Ribosylation Factor) family, also required for hyphal growth and virulence. Interestingly, overexpression of YPT6 specifically rescued the hyphal growth defect of the arl1 mutant, but not the converse. Further characterization of the ypt6 deletion mutant showed that the number of Golgi cisternae is increased in this mutant compared to that of WT strain, suggesting an alteration of Golgi integrity. In addition, using live cell imaging I showed that the distribution of Actin binding protein 1 (Abp1), which is a reporter for actin patches, was altered in the ypt6 mutant, in that it was no longer restricted to the tip of the filament, as is observed in WT cells. These data suggest that the defect in hyphal growth maintenance of the ypt6 deletion mutant is at least partly associated with an alteration of the distribution of endocytic sites. Thus, I identified a critical role of Ypt6 during invasive hyphal growth and virulence in the human fungal opportunistic pathogen *C. albicans* and revealed an interaction between Ypt6 and Arl1 in the hyphal growth process.

Keywords : *Candida albicans*, Membrane trafficking, Rab GTPases, Morphogenesis, Virulence, Rab-Arl interactions.