

# Lazaro Emilio AIRA DIAZ

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

Mercredi 25 Avril 2018 à 14h00

Bâtiment Archimède, Hôpital de l'Archet 2 - C3M - Nice

## Nouveaux rôles de la protéine kinase Lyn dans le développement du psoriasis et dans la mort cellulaire

devant le jury composé de :

Dr. Chloé FERAL	Présidente du Jury
Dr. Nicolas CHARLES	Rapporteur
Dr. Serge ROCHE	Rapporteur
Dr. Patrick AUBERGER	Examineur
Dr. Bénédicte PY	Examinatrice
Dr. Sandrine MARCHETTI	Directrice de Thèse

### Résumé

---

La famille des kinases Src, dont Lyn fait partie, joue un rôle clé dans le contrôle de nombreux processus biologiques. Lyn a une fonction bien établie dans les cellules hématopoïétiques, ayant un rôle important dans la régulation des anomalies hématopoïétiques. En fait, Lyn joue un rôle clé dans le maintien de différents phénotypes de leucémie et par ailleurs il a été montré une régulation altérée de la protéine dans les tumeurs solides. Des études ont mis en évidence qu'elle avait un rôle anti-apoptotique. Lyn peut être clivée par les caspases, protéases à cystéine impliquées dans l'apoptose et l'inflammation, ce qui donne une nouvelle protéine avec une localisation subcellulaire, cytosolique, différente de la forme non clivée membranaire. Ainsi, elle pourrait avoir accès à de nouveaux substrats qui expliqueraient son rôle de suppresseur de l'apoptose. Nous avons en effet montré que Lyn cytosolique (cLyn) régulait Bim, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, impliqué dans le contrôle de l'apoptose mitochondriale. Nous avons identifié que Bim est phosphorylé sur les tyrosine 92 et 161 par Lyn, ce qui entraîne une inhibition de sa fonction pro-apoptotique, en augmentant son interaction avec les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-XL, limitant ainsi la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, le relargage de Smac et en fin l'apoptose des cellules.

Lyn possède également un rôle pro-inflammatoire, c'est un régulateur clé des maladies auto-immunes telles que l'asthme. Nous avons également montré que la surexpression de la forme clivée par les caspases, chez la souris, conduit à un syndrome inflammatoire de la peau, ressemblant au psoriasis humain. Sur la base de ce résultat, nous avons voulu savoir si la tyrosine kinase Lyn, sa forme native et sa forme clivée, jouait un rôle dans cette maladie chronique de la peau, qui est caractérisée par une différenciation anormale des keratinocytes

et une augmentation de l'infiltrat immunitaire, conduisant à la formation de plaques de psoriasis, la principale caractéristique clinique de la maladie. L'analyse de l'expression de Lyn chez des patients souffrant de psoriasis a montré que la forme native de Lyn était surexprimée dans la peau lésionnelle par rapport à la peau non lésionnelle ou saine, ce que nous avons par la suite confirmé dans deux modèles de psoriasis chez la souris. Nous n'avons en revanche pas pu mettre en évidence de forme clivée de Lyn, alors que les caspases inflammatoires sont activées. De façon intéressante, nous avons montré que l'augmentation de l'expression de Lyn se situe à la fois dans le derme et dans l'épiderme chez l'homme et chez la souris, indiquant que le recrutement de cellules immunitaires dans la peau lésionnelle mais aussi la modulation de Lyn dans les keratinocytes sont impliqués. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de Lyn a été observée dans les keratinocytes humains stimulés par le TNF- $\alpha$  et l'IL-17, deux cytokines importantes dans le psoriasis. Afin de déterminer le rôle de Lyn dans cette maladie cutanée nous l'avons induit chez des souris déficientes pour Lyn. Une réduction significative du phénotype cutané a été observée dans les souris LynKO par rapport aux souris WT, identifiant Lyn comme un nouvel acteur dans la pathogénie du psoriasis. De plus, nos résultats ont établi que l'expression de Lyn dans les keratinocytes semblait cruciale et suffisante pour le maintien du phénotype psoriasique, indiquant un nouveau rôle de Lyn dans la régulation des keratinocytes.

Au cours de ce travail, nous avons observé que les caspases inflammatoires étaient activées dans la peau lésionnelle de patients atteints du psoriasis. Les caspases inflammatoires, suite à leur activation au sein de l'inflammasome, vont cliver l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18, ce qui conduit à leur maturation. Elles jouent donc un rôle important dans le contrôle de l'inflammation en réponse à un agent pathogène mais participent également à la pathogénie de nombreuses maladies inflammatoires, comme le diabète et l'obésité. Nous avons alors voulu savoir si les caspases participaient au développement du psoriasis. Nous avons pu montrer que lorsque nous induisons une maladie semblable au psoriasis chez des souris, l'inactivation des caspases inflammatoires ou son inhibition pharmacologique réduisait de façon significative le développement de la maladie par rapport aux souris WT. Bien que les cellules immunitaires et les keratinocytes soient capables de sécréter de l'IL-1 $\beta$  via l'activation de l'inflammasome, nos données ont établi que seule l'activation des caspases inflammatoires dans le système immunitaire semblait nécessaire pour une réponse inflammatoire complète.

En résumé, l'ensemble de mon travail de thèse a permis de montrer un mécanisme moléculaire par lequel la tyrosine kinase Lyn régule négativement la voie apoptotique mitochondriale, ce qui peut contribuer à la transformation et/ou la résistance chimio thérapeutique des cellules cancéreuses. D'autre part, nos résultats montrent que Lyn pourrait être un régulateur important du psoriasis et notre étude indique que les caspases inflammatoires activées dans les cellules immunitaires sont impliquées dans la pathogénie du psoriasis. A ce jour, bien que plusieurs traitements aient été développés pour le psoriasis, la maladie reste non résolue, donc le développement de cibles thérapeutiques contre Lyn et les caspases inflammatoires pourraient être intéressants pour le traitement de la maladie.

# Sofia ALMEIDA FIGUEIREDO

Inria – Sophia Antipolis

Lundi 17 Décembre 2018 à 134h00

Kahn Amphitheatre, Inria Sophia Antipolis

## Synchronization of biological oscillators: modeling, analysis and coupling of the mammalian cell cycle and circadian clock

### devant le jury composé de :

Madalena CHAVES

Franck DELAUNAY

Attila CSIKASZ-NAGY

Marc LEFRANC

Annabelle BALLESTA

Jean-Paul COMET

Rui DILÃO

Didier GONZE

### Abstract

---

The cell division cycle and the circadian clock are two fundamental processes of cellular control that generate cyclic patterns of gene activation and protein expression, which tend to be synchronous in healthy cells. In mammalian cells, the mechanisms that govern the interactions between cell cycle and clock are still not well identified.

In this thesis we analyze these two biological oscillators, both separately and as a coupled system, to understand and reproduce their main dynamical properties, uncover essential cell cycle and clock components, and identify coupling mechanisms.

Each biological oscillator is first modeled by a system of non-linear ordinary differential equations and its parameters calibrated against experimental data: the cell cycle model is based on post-translational modifications of the mitosis promoting factor and results in a relaxation oscillator whose dynamics and period are controlled by growth factor; the circadian clock model is transcription-based, recovers antiphasic BMAL1/PER:CRY oscillation and relates clock phases to metabolic states. This model shows how the relative duration of activating and repressing molecular clock states is adjusted in response to two out-of-phase hormonal inputs. Finally, we explore the interactions between the two oscillators by investigating the control of synchronization under uni- or bi-directional coupling schemes. Simulations of experimental protocols replicate the oscillators' period-lock response and recover observed clock to cell cycle period ratios such as 1:1, 3:2 and 5:4. Our analysis suggests mechanisms for slowing down the cell cycle with implications for the design of new chronotherapies.

# Józef Piotr BOSSOWSKI

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

Jeudi 6 Décembre 2018 à 14h00

C3M Bâtiment Archimède, Hôpital de l'Archet 2- Nice

## Induction d'une réponse immunitaire antitumorale par un régime pauvre en protéines

(Low protein diet induced anti-cancer immune response)

### devant le jury composé de :

Dr. Béatrice BAILLY-MAITRE

Présidente de Jury

Dr. Serge MANIE

Rapporteur

Pr. Philippe NAQUET

Rapporteur

Dr. Eric CHEVET

Examineur

Dr. Jean-Ehrland RICCI

Directeur de Thèse

### Résumé

---

Plusieurs arguments de la littérature suggèrent l'importance de l'alimentation dans le développement tumoral et l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Dans différents modèles animaux, la restriction calorique (CR) supprime la prolifération des cellules tumorales et les sensibilise aux thérapies ciblées. Par conséquent, des approches non-pharmacologiques comme la restriction calorique ont un intérêt grandissant en clinique.

Considérant l'addiction des cellules tumorales aux nutriments, nous nous sommes demandé quels macronutriments pouvaient avoir des propriétés anticancéreuses. A partir d'un modèle murin de lymphomes B (modèle transgénique E $\mu$ -Myc) nous avons testé l'impact de deux régimes alimentaires : l'un pauvre en glucides (Low CHO, 25% de réduction en glucides) et l'autre pauvre en protéines (Low PROT, 25% de réduction en protéines). Des souris syngéniques C57BL/6 ont été injectées par voie intraveineuse avec des cellules primaires E $\mu$ -Myc. Malgré un apport alimentaire équivalent entre les groupes, nous avons observé que le régime pauvre en protéines augmente la survie globale des souris C57BL/6 développant un lymphome B E $\mu$ -Myc. De manière intéressante, nous avons démontré que cet effet pro-survie est dépendant du système immunitaire. En effet, la déplétion des cellules T CD8<sup>+</sup> ou l'utilisation d'un modèle murin immunodéficient NSG (NOD-SCID il2 $\gamma$ ), empêche l'effet bénéfique du régime pauvre en protéines sur le développement tumoral. Nous avons reproduit et étendu nos observations en utilisant des lignées modèles de cancéreuses colorectaux (CT26) et de mélanome (B16) injectée dans des souris syngéniques, immunocompétente. Les cellules tumorales étant fortement

dépendantes des nutriments, nous avons émis l'hypothèse qu'un régime pauvre en protéines pourrait induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans ces dernières. En effet, nous avons observé une augmentation des protéines impliquées dans la signalisation du RE : CHOP et sXBP1. Par conséquent, nous avons traité les souris nourries en régime pauvre en protéines avec deux inhibiteurs du stress du RE : TUDCA, inhibiteur générique et MKC4485 qui cible l'activité ribonucléase d'IRE1. Dans les deux cas, ces inhibiteurs ont bloqué l'effet du régime faible en protéines sur le développement tumoral et l'infiltration des T CD8+ au sein de la tumeur. Pour s'affranchir, des potentiels effets secondaires des inhibiteurs chimiques, nous avons invalidé IRE1 dans la lignée CT26 et nous avons obtenu des résultats similaires, démontrant que la voie IRE1 dans les cellules tumorales est une voie centrale dans la réponse immunitaire anticancéreuse induite par un régime pauvre en protéines. En outre, nous avons découvert que l'activation de RIG-I est un événement en aval de l'activation d'IRE1 et que, par analyse bio-informatique nous avons pu corréliser une signature IRE1 à une infiltration immunitaire élevée et à une immunogénicité accrue du cancer chez les patients atteints de mélanome, glioblastome et cancer colorectal. De ce fait, nous avons démontré que la réponse du système immunitaire induite par un régime pauvre en protéines est une conséquence de l'activation accrue de IRE1 dans les cellules cancéreuses.

## Abstract

---

Several arguments from the literature suggested the importance of diets in cancer development and in the efficacy of anti-cancer therapies. Calorie restriction (CR) suppresses cancer growth in various animal models and sensitizes tumor cells to targeted therapies (Meynet & Ricci, 2014). Thus, non-pharmacologic approaches such as CR have a growing interest in the clinic. Considering the nutrient addiction of cancer cells, we wondered which specific macronutrients contribute the most to anti-cancer effects. Therefore, we tested the reduction in specific macronutrient without decrease in general calorie intake on tumor development. We used two diets: reduced in carbohydrates (Low CHO, -25% carbohydrates) and diet reduced in protein (Low PROT, -25% proteins) on the E $\mu$ -Myc transgenic mouse model of B-cell lymphoma. Syngeneic C57BL/6 mice were intravenously injected with primary E $\mu$ -Myc cells. We observed that low PROT-diet, in spite of equal calorie intake among the groups, resulted in increase of the overall survival of E $\mu$ -Myc-bearing C57BL/6 mice. Very importantly, we established that this pro-survival effect is immune system-dependent as both depletion of CD8+ T cells and use of immunodeficient NSG (NOD-SCID il2 $\gamma$ ) mouse model prevented the beneficial effect of the low PROT-diet on the tumor development. We reproduced and further extended our observations using subcutaneous injection of CT26 colorectal cancer cells in syngeneic immunocompetent BALB/c mice and B16 melanoma in C57BL/6 mice.

As tumor cells are highly dependent on nutrients, we speculated that low PROT diet could induce ER stress in tumor cells. Indeed, we observed increase in proteins implicated in ER stress signalling – CHOP and sXBP1. Therefore, we treated low PROT-diet fed mice with two ER stress inhibitors, the general inhibitor TUDCA or MKC4485, which targets IRE1 RNase activity. In both cases, inhibitors significantly prevented the effect of the Low PROT-diet on tumor development and on intratumoral number of CD8+ T cells. To eliminate any side effects of chemical inhibitors, we invalidated IRE1 in CT26 cells and obtained similar results, demonstrating that IRE1 signaling in tumor cells is a central event in the low PROT-diet induced anti-cancer immune response. In

addition, we have uncovered RIG-I activation as a downstream event of IRE1 activation and by bioinformatic analysis correlated high-IRE1 signature with high immune infiltration and enhanced immunogenicity of cancer in patients bearing melanoma, glioblastoma and colorectal cancer. Hence, we have shown that the immune system response elicited under a Low PROT diet is a consequence of increased IRE1 activation in cancer cells.

# Gwenaëlle BOUGET

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

Vendredi 29 Juin 2018 à 14h00

Bâtiment Archimède, Hôpital de l'Archet 2 - C3M - Nice

## Implication de la petite GTPase Rab4b des lymphocytes T dans les complications métaboliques de l'obésité

### devant le jury composé de :

Dr. Abdelilah WAKKACH	Président du Jury
Dr. Soazig LE LAY	Rapportrice
Dr. Jacques NUNES	Rapporteur
Dr. Nicolas VENTECLEF	Examineur
Dr. Mireille CORMONT	Directrice de Thèse
Dr. Jérôme GILLERON	Co-Directeur de Thèse

### Résumé

---

L'obésité est un problème majeur de santé publique associée au syndrome métabolique et caractérisée par la résistance à l'insuline. Ce syndrome augmente le risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Le tissu adipeux (TA) participe à l'homéostasie gluco-lipidique en gérant le stockage ou la libération des lipides en fonction de l'apport alimentaire. Lors d'un excédent chronique en nourriture, le TA atteint sa capacité maximale de stockage des lipides entraînant des dépôts de lipides dans le foie et les muscles. Ces lipides ectopiques sont toxiques et provoquent la résistance à l'insuline hépatique et musculaire. Cette lipotoxicité est entretenue par l'inflammation à bas bruit qui s'installe dans le TA. Elle est due à l'infiltration de cellules immunitaires innées et adaptatives pro-inflammatoires qui inhibent les fonctions métaboliques des adipocytes et donc l'expansion du TA. Les communications intercellulaires entre adipocytes et cellules immunitaires participent au dialogue entre adipocytes et cellules immunitaires à l'origine de l'inflammation à bas bruit. Ces communications dépendent de la composition en protéines de la membrane plasmique, et donc de l'endocytose qui contrôle le trafic des protéines membranaires en les dirigeant vers la dégradation lysosomale, en les recyclant vers la membrane plasmique, ou en les séquestrant dans des compartiments intracellulaires. Ce trafic est contrôlé par plusieurs familles de protéines, dont les petites GTPases Rab qui gouvernent l'endocytose en contrôlant la biogenèse, la fusion, et la motilité des endosomes.

L'équipe avait démontré que l'expression de l'ARNm de la protéine Rab des endosomes précoces, Rab4b, est diminuée dans le TA de patients obèses diabétiques et de souris obèses db/db (Kaddai et al., PloS One, 2009). L'objectif de ma thèse était de déterminer si cette baisse d'expression de Rab4b dans le TA lors de l'obésité participe au développement des complications métaboliques de l'obésité.

Nous avons d'abord démontré que l'expression de l'ARNm de Rab4b est diminuée dans les lymphocytes T du TA et pas dans les adipocytes de souris rendues obèses par un régime riche en lipide. Cette baisse d'expression a été retrouvée dans les lymphocytes T de TA de sujets obèses et obèses/diabétiques. Pour explorer les conséquences de cette réduction, nous avons généré un modèle murin invalidé pour Rab4b dans les lymphocytes T (souris Rab4bTcell KO). Sous régime normal, les souris Rab4bTcell KO deviennent intolérantes au glucose et résistantes à l'insuline en vieillissant, malgré un poids équivalent et une masse grasse équivalente. Les défauts métaboliques sont exacerbés chez les souris Rab4bTcell KO sous régime riche en lipide. Les souris Rab4bTcell KO sous régime normal développent, en vieillissant, une dyslipidémie avec une augmentation des acides gras circulants à jeun et des dépôts de lipides dans le foie et les muscles. La taille des adipocytes du TA épидидymaire est augmentée au détriment de leur nombre à cause d'un défaut d'adipogenèse. Ce défaut d'adipogenèse est la conséquence de la perte d'homéostasie des cellules immunitaires dans le TA et de la production d'un sécrétome qui inhibe la différenciation adipocytaire. Nous montrons que l'absence de Rab4b dans les lymphocytes T diminue, chez la souris jeune, le nombre des Treg et augmente celui des Th17 dans le TA, alors qu'aucun défaut d'adipocyte et métabolique n'est encore observé. Ce changement dans la balance Treg/Th17 dans le TA pourrait en partie être dû à un défaut intrinsèque au lymphocyte causé par la perte de Rab4b. En effet, nous montrons in vitro que l'absence de Rab4b favorise la différenciation en Th17 aux dépens des Treg des Th0. Nous mettons en évidence un nouveau mécanisme, l'inhibition d'expression de Rab4b dans les lymphocytes T, qui participerait aux complications métaboliques de l'obésité en modifiant les sous-populations de lymphocytes T dans le TA.

# Derya DEVECI

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

Mercredi 31 Octobre 2018 à 14h00

Faculté des Sciences – NICE

## La voie de signalisation AstA, qui est conservée au cours de l'évolution, contrôle le déclenchement de la métamorphose et régule la croissance chez *Drosophila melanogaster*

(AstA signaling functions as an evolutionary conserved mechanism timing metamorphosis and growth in *Drosophila Melanogaster*)

### devant le jury composé de :

Dr. Florence BESSE	Présidente du Jury
Dr. María DOMINGUEZ CASTELLANO	Rapporteuse
Dr. Kim Furbo REWITZ	Rapporteur
Dr. Cédric MAURANGE	Examineur
Dr. Pierre LEOPOLD	Directeur de thèse

### Résumé

---

La maturation sexuelle se fait en réponse à l'intégration de divers signaux internes homéostatiques et externes. Jusqu'à présent, on ignore en grande partie quels mécanismes sensoriels internes sont impliqués dans le couplage de ces signaux. Chez les mammifères, le début de la puberté est associé à des pulsations élevées de GnRH conduisant à un pic d'hormone stéroïdienne. Le système ligand/récepteur, KISS/KISSR, est un régulateur en amont des neurones producteurs de GnRH. Chez *Drosophila melanogaster*, un pic d'hormone prothoracicotrope (PTTH) produite par deux paires de neurones (PTTHn) conduit à la production de l'ecdysone, la principale hormone stéroïdienne chez les insectes. PTTH est l'un des premiers signaux à activer la cascade d'événements menant à la maturation. Si la production de PTTH est bloquée, un retard dans le début de la transition du stade juvénile au stade adulte est observé, tandis qu'une maturation précoce est observée lors de la surexpression de PTTH. Ceci indique donc un rôle important des PTTHn dans l'intégration des signaux.

Afin de découvrir les signaux intégrés par les PTTHn, nous avons criblé une collection d'ARN interférents dans les PTTHn. Nous avons ainsi identifié le récepteur à l'allatostatine A (AstA-R1) comme un régulateur positif des PTTHn. La perte de fonction de AstA-R1 retarde la maturation avec une augmentation de la taille finale de l'organisme. Une réduction de la quantité du ligand allatostatine A (AstA) a également une incidence sur le déclenchement de la maturation. AstA est produite dans le cerveau par une paire de neurones bilatéraux qui étendent leurs axones vers les dendrites des PTTHn. De plus, les neurones AstA projettent également leurs axones vers les cellules productrices d'insuline (IPCs), connues pour réguler le taux de croissance larvaire. L'inactivation d'AstA-R1 dans les IPCs donne des organismes plus petits. Nos résultats impliquent que les neurones AstA sont capables de réguler le rythme de croissance ainsi que le déclenchement de la maturation en jouant sur deux circuits différents ciblant les PTTHn et les IPCs. De façon intéressante, AstA/AstAR1 est homologue à KISS/KISSR (GPR54), un facteur d'entrée dans de la puberté humaine. Ceci suggère donc qu'un circuit neuronal est conservé au cours de l'évolution pour l'intégration des signaux qui contrôlent le déclenchement de la maturation sexuelle.

## Abstract

---

The onset of puberty occurs in response to the integration of various internal homeostatic and external signals. Up until now, it remains largely unknown which internal sensory mechanisms are involved in the coupling of those signals. In mammals, the onset of puberty is associated with elevated GnRH pulsations leading to a peak of steroid hormones. The KISS/KISSR system is a pivotal upstream regulator of GnRH producing neurons. In *Drosophila melanogaster* a peak of prothoracicotrophic hormone (PTTH) produced by two pairs of neurons (PTTHn) leads to the production of the insect steroid hormone ecdysone. PTTH is one of the first signals to activate the cascade of events leading to maturation. Once PTTH production is blocked, a delay is observed in the onset of the transition from juvenile to adult stage, whereas precocious maturation is observed upon PTTH over-expression, denoting an important role for PTTHn in the integration of cues. In order to uncover signals integrated by PTTHn we have conducted a biased RNAi screen in PTTHn. After two rounds of screening we identified the GPCR Allatostatin A receptor 1 (AstA-R1) as a positive regulator of PTTHn. AstA-R1 knock down delays maturation with a subsequent increase in final pupal size. Down regulation of its ligand, Allatostatin-A (AstA) on the brain is also affecting the timing of maturation. We found that AstA is produced in the central brain by a bilateral pair of neurons that extend their axons towards the PTTHn dendrites. In addition, AstA neurons also project their axons towards the *Drosophila* insulin producing cells (IPCs) that are known to regulate larval growth. Knockdown of AstA-R1 on the IPCs leads to smaller pupae. These findings imply that the AstA neurons are able to regulate growth and maturation timing by interacting with 2 different circuits: the PTTHn and IPCs. Unexpectedly, AstA-R1 and AstA genes share a common evolutionary origin with KISSR and KISS, respectively, suggesting a common mechanism between insects and mammals for the integration of signals that control the onset of puberty.

# Johan HALLIN

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

Jeudi 22 Mars 2018 à 14h00  
Amphithéâtre 5 - Tour Pasteur - IRCAN - Nice

## Elucider les facteurs génétiques à l'origine de la variabilité des populations par phénomique et génomique de masse

(Elucidating the genetic basis of variation in populations  
by large scale phenomics and genomics)

### devant le jury composé de :

Dr. Etienne DANCHIN

Pr. Daniela DELNERI

Dr. Bertrand LLORENTE

Dr. Gianni LITI

Président du Jury

Rapporteuse

Rapporteur

Directeur de thèse

### Résumé

---

La variabilité phénotypique existante au sein d'une population est d'une importance cruciale ; elle permet l'adaptation à de nouvelles conditions par la sélection naturelle de traits bénéfiques. La variabilité phénotypique est le résultat du polymorphisme génétique de chaque individu, couplé à l'influence de divers facteurs environnementaux. Ces travaux ont pour objectif d'élucider quels sont les facteurs génétiques responsables de la variabilité phénotypique de chaque individu afin de comprendre comment celle-ci évolue de génération en génération et peut s'accroître au-delà des prédispositions parentales. Finalement, les résultats obtenus seront utilisés pour prédire un phénotype à partir d'un génotype inconnu. Nous avons utilisé des techniques de phénomique et de génomique de haut débit pour décomposer avec une précision inédite la variabilité phénotypique d'une large population de souches diploïdes de *Saccharomyces cerevisiae*. Le génotype exact de plus de 7000 souches uniques a ainsi été obtenu via le croisement et le séquençage de souches haploïdes distinctes. Nous avons mesuré la capacité de croissance de ces souches et identifié les composants génétiques influant sur ce trait. De plus, nous avons identifié des «loci de caractères quantitatifs» additifs et non-additifs, et étudié la fréquence du phénomène d'hétérosis et ses mécanismes. Enfin, en utilisant les données phénotypiques et génotypiques de la même

population de levures, nous avons pu prédire les traits de chaque individu avec une presque parfaite exactitude. Ces travaux ont ainsi permis d'identifier avec précision les facteurs génétiques modulant la variation phénotypique d'une population diploïde, et de prédire un trait à partir du génotype et de l'ensemble des données phénotypiques. En plus de ce projet, nous travaillons aussi sur l'identification des bases génétiques à l'origine de la non-viabilité des gamètes, ainsi que sur la compréhension des caractères complexes chez des souches hybrides intra-espèce. De par l'étude de 9000 gamètes séquencés issus de six hybrides différents, nous avons pour objectif de caractériser leur profil de recombinaison et d'observer quelle est l'influence du fond génétique sur ce dernier. De plus, nous avons caractérisé la capacité de croissance de ces gamètes dans neuf conditions environnementales différentes et nous prévoyons de disséquer l'architecture génétique de ces traits dans différents fonds génétiques.

Mots-clés : Caractères quantitatifs, variation, génétique, épistasie, hétérosis, prédictions.

## Abstract

---

The phenotypic variation between individuals in a population is of crucial importance. It allows populations to evolve to novel conditions by the natural selection of beneficial traits. Variation in traits can be caused by genetic or environmental factors. This work endeavors to study the genetic factors that underlie phenotypic variation in order to understand how variation can be created from one generation to the next; to know what genetic mechanisms are most prominent; to learn how variation can extend beyond the parents; and finally, to use this in order to predict phenotypes of unknown genetic constellations. We used large scale phenomics and genomics to give an unprecedented decomposition of the phenotypic variation in a large population of diploid *Saccharomyces cerevisiae* strains. Constructing phased outbred lines by large scale crosses of sequenced haploid strains allowed us to infer the genetic makeup of more than 7,000 colonies. We measured the growth of these strains and decomposed the phenotypic variation into its genetic components. In addition, we mapped additive and nonadditive quantitative trait loci, we investigated the occurrence of heterosis and its genetic basis, and using the same populations we used phenotypic and genetic data to predict traits with near perfect accuracy. By using the phased outbred line approach, we succeeded in giving a conclusive account of what genetic factors define phenotypic variation in a diploid population, and in accurately predicting phenotypes from genetic and phenotypic data. Beyond the phased outbred line project, I am currently investigating the genetic basis of gamete inviability and complex traits in intraspecies yeast hybrids. Using 9,000 sequenced gametes from six different hybrids we aim to characterize their recombination landscape and how the genetic background influences it. Furthermore, we have phenotyped these gametes in nine conditions and will dissect the genetic architecture of these traits across multiple genomic backgrounds.

Keywords: Quantitative traits, genetic variation, epistasis, heterosis, predictions

# Anida HASANOVIC

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

**Judi 15 Mars 2018 à 14h00**

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

## **Patched, une nouvelle cible thérapeutique pour le cancer de la corticosurrénale**

**(Patched as a new target for adrenocortical cancer treatment)**

### **devant le jury composé de :**

Monsieur Thierry VIROLLE	Président du Jury
Madame Annette LARSEN	Rapportrice
Monsieur Antoine MARTINEZ	Rapporteur
Madame Isabelle BROUTIN	Examinatrice
Monsieur Enzo LALLI	Examineur
Madame Isabelle MUS-VETEAU	Directrice de Thèse

### **Résumé**

---

Nous avons récemment démontré que le récepteur du morphogène Hedgehog, Patched, qui est surexprimé dans de nombreux cancers récurrents et métastatiques, est un transporteur de multiples drogues qui contribue à la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Le criblage d'une banque de petites molécules nous a permis d'identifier les molécules P375 et P136, qui inhibent l'activité d'efflux de doxorubicine de Patched. Nous avons montré que ces molécules renforcent les effets cytotoxiques, proapoptotiques, antiprolifératifs et anticlonogéniques de la doxorubicine sur les cellules de cancer de la glande surrénale (surrénalome) qui expriment de façon endogène Patched. De plus, nous avons observé que l'ajout de la molécule P375 au traitement à la doxorubicine inhibe le développement des tumeurs chez des souris ayant reçu une xénogreffe de cellules de surrénalome de façon plus significative que la doxorubicine seule. Nos résultats suggèrent que l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité d'efflux de drogues de Patched en association avec la doxorubicine est une option thérapeutique prometteuse pour le surrénalome, et très probablement pour d'autres cancers exprimant Patched.

Nous avons découvert qu'une petite fraction seulement des cellules de la lignée de surrénalome exprime Patched au niveau de la membrane plasmique (PM-Patched). Nous avons observé que ces cellules sont plus résistantes au traitement à la doxorubicine que les cellules de surrénalome qui expriment Patched uniquement dans les compartiments intracellulaires, et présentent une expression plus élevée de Patched mais aussi de la protéine ABCG2. ABCG2

étant un marqueur de cellules souches cancéreuses (CSC) et la signalisation Hedgehog étant impliquée dans le maintien des CSC, nous pensons que les cellules PM-Patched pourraient être des CSC. D'autres expériences sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Mots clés : Chimiothérapie résistance ; Patched ; signalisation Hedgehog ; transporteur de multiples drogues ; inhibiteurs de l'activité d'efflux de drogues de Patched ; Cancer; surrénalome.

## Abstract

---

We recently demonstrated that the Hedgehog receptor Patched, which is expressed in many recurrent and metastatic cancers, is a multidrug transporter contributing to chemotherapy resistance. The screening of a chemical library allowed us identifying molecules P375 and P136, which inhibit the doxorubicin efflux activity of Patched. We showed that these molecules enhance the cytotoxic, proapoptotic, antiproliferative and anticlonogenic effects of doxorubicin on adrenocortical carcinoma (ACC) cells which endogenously express Patched. Moreover, we reported that the addition of the drug-like molecule P375 to doxorubicin treatment prevents the development of xenograft ACC tumours in mice much more significantly than the doxorubicin alone. Our results suggest that the use of an inhibitor of Patched drug efflux activity in combination with doxorubicin is a promising therapeutic option for ACC and most likely for other Patched-expressing cancers.

We discovered that only a small fraction of the ACC cell line expressed Patched at the plasma membrane (PM). These cells were sorted by FACS and amplified. We observed that these cells are more resistant to doxorubicin treatment than ACC cells that express Patched only in intracellular compartments. Moreover, we estimated that PM-Patched cells have higher expression of Patched but also of ABCG2/BCRP proteins. Based on the fact ABCG2/BCRP is a cancer stem cell (CSC) marker and that Hedgehog signaling is involved in maintenance of CSC, we think that PM-Patched cells could be CSC. More experiments are needed to confirm this hypothesis.

Keywords: Chemotherapy resistance; Patched; Hedgehog receptor; Patched drug efflux inhibitors; doxorubicin; drug efflux pump; cancer; adrenocortical carcinoma

# Denisa JAMECNA

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

Mercredi 12 Décembre 2018 à 14h00

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

## Une région intrinsèquement désordonnée dans OSBP contrôle la géométrie et la dynamique du site de contact membranaire

(An intrinsically disordered region of OSBP controls membrane contact site geometry and dynamics)

devant le jury composé de :

Laurent COUNILLON  
Anne-Claude GAVIN  
Vesa OLKKONEN  
Daniel LÉVY  
Bruno ANTONNY  
Joëlle BIGAY

Président du jury  
Rapporteuse  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-Directrice de thèse

### Résumé

---

La protéine OSBP est un transporteur de lipides qui régule la distribution cellulaire du cholestérol. OSBP comprend un domaine PH, deux séquences « coiled coil », un motif FFAT (deux phénylalanines dans un environnement acide), et un domaine de liaison de lipides (ORD) à son extrémité C-terminale. Le domaine PH interagit avec le PI(4)P et la petite protéine G Arf1-GTP au niveau du Golgi, alors que le motif FFAT interagit avec la protéine VAP-A, résidente du réticulum endoplasmique (RE). En liant simultanément tous ces déterminants, OSBP stabilise des sites de contact membranaire entre RE et Golgi, permettant ainsi un contre-échange cholestérol / PI(4)P par l'ORD.

OSBP contient également une longue séquence N-terminale d'environ 80 aa, intrinsèquement désordonnée, composée principalement de glycine, proline et d'alanine. Nous démontrons que la présence de ce N-terminus désordonné augmente le rayon de Stoke de OSBP tronquée du domaine ORD, et limite sa densité d'association sur la membrane portant le PI(4)P. La protéine dépourvue du N terminus favorise l'agrégation symétrique des liposomes PI(4)P (mimant la membrane du Golgi) par les deux domaines PH du dimère OSBP, alors que la présence de la séquence désordonnée empêche cette association symétrique. De même, nous observons que la distribution d'OSBP sur la membrane de vésicules unilamellaires géantes (GUV) varie selon la présence ou l'absence du N-terminus. En présence de la séquence désordonnée, la protéine

est répartie de manière homogène sur toute la surface du GUV, alors que la protéine sans N-terminal a tendance à s'accumuler à l'interface entre deux GUV de type Golgi. Cette accumulation locale ralentit fortement la mobilité de la protéine à l'interface. Un effet similaire du N-terminal sur la dynamique des protéines est observé lorsque l'association de membranes de type ER et Golgi est assurée par des protéines monomériques (dépourvue du coiled coil) en présence de Vap-A.

Les résultats de nos expériences *in vitro* ont été confirmés en cellules vivantes, où la séquence intrinsèquement désordonnée contrôle le recrutement d'OSBP sur les membranes Golgiennes, sa mobilité et sa dynamique d'activité au cours des cycles de transfert de lipides. La plupart des protéines de la famille d'OSBP contiennent des séquences N-terminales de faible complexité, suggérant un mécanisme général de régulation.

Mots clés : désordre intrinsèque, protéine de transfert de lipides, diffusion membranaire, pontage de membranes

## Abstract

---

Oxysterol binding protein (OSBP) is a lipid transfer protein that regulates cholesterol distribution in cell membranes. OSBP consists of a pleckstrin homology (PH) domain, two coiled-coils, a "two phenylalanines in acidic tract" (FFAT) motif and a C-terminal lipid binding OSBP-Related Domain (ORD). The PH domain recognizes PI(4)P and small G protein Arf1-GTP at the Golgi, whereas the FFAT motif interacts with the ER-resident protein VAP-A. By binding all these determinants simultaneously, OSBP creates membrane contact sites between ER and Golgi, allowing the counter-transport of cholesterol and PI(4)P by the ORD.

OSBP also contains an intrinsically disordered ~80 aa long N-terminal sequence, composed mostly of glycine, proline and alanine. We demonstrate that the presence of disordered N-terminus increases the Stoke's radius of OSBP truncated proteins and limits their density and saturation level on PI(4)P-containing membrane. The N-terminus also prevents the two PH domains of OSBP dimer to symmetrically tether two PI(4)P-containing (Golgi-like) liposomes, whereas protein lacking the disordered sequence promotes symmetrical liposome aggregation. Similarly, we observe a difference in OSBP membrane distribution on tethered giant unilamellar vesicles (GUVs), based on the presence/absence of N-terminus. Protein with disordered sequence is homogeneously distributed all over the GUV surface, whereas protein without N-terminus tends to accumulate at the interface between two PI(4)P-containing GUVs. This protein accumulation leads to local overcrowding, which is reflected by slow in-plane diffusion. The effect of N-terminus is also manifested in monomeric OSBP-derived proteins that tether ER-like and Golgi-like membranes in the presence of VAP-A.

Findings from our *in vitro* experiments are confirmed in living cells, where N-terminus controls the recruitment of OSBP on Golgi membranes, its motility and the on-and-off dynamics during lipid transfer cycles. Most OSBP-related proteins contain low complexity N-terminal sequences, suggesting a general effect.

Keywords : intrinsic disorder, lipid transfer protein, membrane diffusion, membrane tethering

# Cynthia LEBEAUPIN

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

Jeudi 26 Avril 2018 à 13h30

Bâtiment Archimède, Amphi Rampal - C3M - Nice

## Rôles du stress du Réticulum Endoplasmique et de Bax Inhibitor-1 dans les complications hépatiques liées à l'obésité

### (The roles of Endoplasmic Reticulum stress and Bax Inhibitor-1 in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)

#### devant le jury composé de :

Dr. Patrick AUBERGER	Président du Jury
Dr. Eric CHEVET	Rapporteur
Dr. Fabienne FOUFELLE	Rapportrice
Dr. Sandra LACAS-GERVAIS	Examineur
Dr. Bénédicte PY	Examinatrice
Dr. Béatrice BAILLY-MAITRE	Directrice de Thèse

#### Résumé

---

La pandémie de l'obésité entraîne une augmentation de la prévalence des maladies chroniques du foie ou stéatopathies métaboliques (NAFLD). Le spectre des NAFLD va de la stéatose caractérisée par une accumulation de lipides dans le foie à la stéatohépatite (NASH) associant une inflammation, de la mort hépatocytaire et de la fibrose. Lors de l'obésité, l'élévation de signaux de dangers métaboliques perturbe les fonctions du réticulum endoplasmique (RE) essentielles pour l'homéostasie cellulaire. Les perturbations sont transmises par 3 senseurs : IRE1 $\alpha$ , ATF6 et PERK pour activer une réponse adaptative. Si ce stress est sévère ou devient chronique, la cellule enclenchera une réponse terminale apoptotique. La protéine Bax Inhibitor-1 (BI-1) pourrait jouer un rôle hépatoprotecteur en inhibant l'hyperactivation de la voie de signalisation IRE1 $\alpha$ .

En combinant des études chez l'homme et dans des modèles animaux, l'objectif de cette étude était de mieux caractériser l'activation chronique du stress du RE dans les NAFLD. Ce travail a émis l'hypothèse qu'une déficience en BI-1 entraînerait l'activation soutenue de la voie IRE1 $\alpha$  qui serait responsable de la transition de la stéatose à la NASH. Cette étude s'intéresse au dialogue potentiel entre le stress du RE et l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-18) grâce aux caspases pro-inflammatoires (caspase-1, caspase-4/11). L'utilisation d'un inhibiteur global du stress du RE ou des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à la voie IRE1 $\alpha$  améliorerait les caractéristiques pathophysiologiques de la NASH et pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Mots clés : BI-1, IRE1 $\alpha$ , UPR, inflammasome NLRP3, mort cellulaire, foie, stéatopathies métaboliques, traitements pharmacologiques

## Abstract

---

Due to the obesity pandemic, the last decades have been marked by a constantly increasing prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). NAFLD covers a spectrum of hepatic disorders ranging from steatosis, characterized by the ectopic accumulation of lipids in the liver, to steatohepatitis (NASH), featuring inflammation, hepatocellular death and fibrosis. During obesity, an increase in metabolic danger signals leads to disrupted endoplasmic reticulum (ER) function, essential for cellular homeostasis. The resulting ER stress activates a signaling network involving three sensors: IRE1 $\alpha$ , ATF6 and PERK to enforce adaptive programs. If this stress is severe or becomes chronic, the cell will trigger a terminal apoptotic response. The protein Bax Inhibitor-1 (BI-1), as a negative endogenous regulator of the IRE1 $\alpha$  signaling pathway in the liver, may play a hepatoprotective role.

By combining data from obese patients with liver complications and experimental approaches in mice, this thesis aimed to better characterize the chronic activation of ER stress in NAFLD pathogenesis. This work also emitted the hypothesis that a deficiency in BI-1 leads to unrestrained IRE1 $\alpha$  signaling that may be responsible for the steatosis to NASH transition. This study further investigated the potential dialogue between ER stress and the activation the NLRP3 inflammasome, which induces the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-18) by activating pro-inflammatory caspases (caspase-1, caspase-4/11). The administration of a broad spectrum ER stress inhibitor or specific inhibitors of IRE1 $\alpha$  improved the pathophysiological features of NASH and may open novel therapeutic perspectives.

Keywords: BI-1, IRE1 $\alpha$ , UPR, NLRP3 inflammasome, cell death, liver, Non-Alcoholic Steatohepatitis, pharmacological treatments

# Liudmyla LOTOTSKA

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

Lundi 17 Décembre 2018 à 14h00

Faculté de médecine – Nice

## Le rôle de la protéine RAP1 dans la protection des télomères humains

### (Investigation into the role of human RAP1 in telomere protection 2)

devant le jury composé de :

Dr Corine BERTOLOTTO  
Dr Paula MARTINEZ  
Dr Stéphane MARCAND  
Pr. Eric GILSON

Présidente du jury  
Rapportrice  
Rapporteur  
Directeur de thèse

#### Résumé

---

Les télomères sont des séquences d'ADN, généralement répétées en tandem, localisées à l'extrémité des chromosomes linéaires. Une des fonctions principales des télomères est de différencier l'extrémité des chromosomes des cassures double-brin, et ainsi de prévenir l'activation des voies de réparation de l'ADN. Chez les mammifères, cette fonction est plus spécifiquement assurée par le complexe shelterin. Il s'agit d'un complexe hétérogène composé de six protéines distinctes : TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TPP1 et TIN2, qui interagissent spécifiquement avec l'ADN télomérique. Au sein de ce complexe, les protéines RAP1 et TRF2 coopèrent afin d'empêcher l'extrémité des chromosomes d'être perçue comme un dommage de l'ADN, ce qui autrement aboutirait à des fusions inter-chromosomiques suite au processus de réparation. La protéine TRF2 se lie directement à la molécule d'ADN dans laquelle elle s'enroule de façon spécifique. Cette propriété est primordiale pour générer une structure d'ADN en forme de boucle, appelée t-loop, et dont le bon fonctionnement des télomères dépend. Les travaux effectués au cours de cette thèse ont mis en évidence deux scénarios indépendants dans lesquels la protéine RAP1 assure un rôle critique dans la stabilité des télomères. Premièrement, RAP1 peut prévenir les fusions inter-chromosomiques dans des cellules exprimant une forme altérée de TRF2 incapable de former des t-loops. Deuxièmement, l'inhibition de RAP1 dans des cellules en sénescence répliquative conduit à l'activation des voies de réparation de l'ADN et à la formation de fusions inter-chromosomiques. Ces observations font écho à des résultats précédents obtenus dans des cellules HeLa traitées avec l'inhibiteur de la télomérase BIBR1532, et dont l'expression de la protéine RAP1 était abolie par shRNA. De plus, j'ai montré que les fusions inter-chromosomiques engendrées par la perte de RAP1 sont dépendantes de la ligase

IV, qui est un acteur principal de la voie de réparation de l'ADN par recombinaison non-homologue (NHEJ).

Dans l'ensemble, ces travaux démontrent l'importance de la protéine RAP1 dans la stabilité des télomères lorsque la protéine TRF2 est non fonctionnelle, mais aussi dans des situations physiologiques telles que la sénescence réplivative.

Mots-clés: Télomères, RAP1, TRF2, fusions inter-chromosomiques, recombinaison non-homologue (NHEJ), sénescence réplivative

## Abstract

---

In mammals, the shelterin complex is the guardian of telomere stability. It operates through a set of six proteins (TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TPP1 and TIN2) that binds telomeric DNA and protects it from being recognized as DNA double-strand breaks and therefore control DNA repair and DNA damage response pathways.

Among them, RAP1 and TRF2 cooperate and together protect chromosome extremities from end-to-end fusions. TRF2 is seen as a major factor to control telomere DNA topology by wrapping DNA around itself in a right handed manner. This property of TRF2 is required to promote the formation of t-loops, special DNA structures at telomeres that are considered as protective barriers to DNA damage response and fusion.

Here we demonstrate two independent situations where RAP1 dysfunction is critical for telomere protection. First, in cells expressing a wrapping-deficient TRF2 allele that cannot form t-loops, RAP1 appears as a backup anti-fusion mechanism. Second, RAP1 downregulation in replicative senescent cells leads to telomere fusions and DNA damage response activation. This is consistent with similar observations in HeLa cells treated with the telomerase inhibitor BIBR1532, and in which RAP1 expression was abolished by an inducible shRNA system. In addition, we show that fusions triggered by RAP1 loss are dependent upon ligase IV, which is a key player of the classical non-homologous end-joining (c-NHEJ) repair pathway. Altogether, these results indicate that RAP1 takes over telomere protection when TRF2 cannot properly function or in the normal physiological situation, such as replicative senescence.

Key words: telomeres, RAP1, TRF2, chromosome fusions, NHEJ, replicative senescence.

# Raphaël MATEGOT

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

Vendredi 21 Septembre 2018 à 14h00  
Bâtiment Archimed - Archet 2 - C3M - Nice

## Contrôle de l'expression des gènes par les micro-ARN nucléaires : Etude des mécanismes moléculaires

### devant le jury composé de :

Dr. Valérie GRANDJEAN  
Dr. Eléonora LEUCCI  
Dr. Stéfania MILLEVOI  
Dr. Michele TRABUCCHI

Présidente du Jury  
Rapportrice  
Rapportrice  
Directeur de Thèse

### Résumé

---

La découverte de l'ARN interférence et des micro-ARN a permis de définir un principe majeur de régulation de l'expression des gènes, et a produit de nouveaux outils pour la médecine. Chez les mammifères, l'étude des fonctions des micro-ARN a été restreinte au cytoplasme, bien qu'ils soient aussi présents dans le noyau.

Cette thèse présente une série d'expériences visant à caractériser les facteurs moléculaires requis pour l'activité nucléaire des micro-ARN.

Nous avons débuté ce projet en explorant les partenaires ARN-dépendant de la protéine AGO2 par immunoprécipitation et spectrométrie de masse quantitative. Nous nous sommes concentrés sur trois de ces partenaires : SFPQ, PSPC1 et NONO, protéines nucléaires abondantes qui forment la famille de protéines DBHS (drosophila behavior and human splicing). Nous avons démontré que le complexe RISC nucléoplasmique est associé aux protéines SFPQ, PSPC1 et NONO dans plusieurs lignées cellulaires murines et humaines, d'une manière qui dépend de SFPQ.

Des expériences de type HITS-CLIP de la protéine AGO2 et de la protéine SFPQ dans des cellules souches de souris nous ont permis de montrer que SFPQ se lie préférentiellement aux 3'UTR longs en utilisant deux motifs spécifiques. Par l'intermédiaire de ces motifs, SFPQ contrôle significativement environ 20% de l'activité de ciblage de AGO2, ce qui est répercuté au niveau de la stabilité des ARN messagers cibles comme nous l'observons par analyse transcriptomique. Le mode d'action de la protéine SFPQ apparaît local et régule la liaison de AGO2 uniquement lorsque les sites de liaison de SFPQ sont proches (<500 nucléotides).

De plus, bien que SFPQ soit uniquement nucléaire, nous observons que SFPQ agit sur l'expression des ARNm cytoplasmiques. Cela suggère que la liaison et l'agrégation de la protéine SFPQ sur les ARNm programme le ciblage du 3'UTR par les miARN dans le noyau, d'une manière structurale qui semble préservée dans le cytoplasme.

Enfin, nous avons montré que l'expression de SFPQ contrôle en particulier le programme de ciblage par let-7a, et module la transition des cellules souches vers l'état différencié. Ces résultats contribuent à la diversité des mécanismes de régulation de l'activité des miARN.

Dans la deuxième partie du projet, nous avons exploré les partenaires ARN-indépendant de la protéine nucléaire AGO2. Nous avons découvert que la protéine AGO2 interagit avec le complexe CCR4-NOT1 et l'exosome nucléaire d'une manière indépendante de l'ARN. Nous proposons une série d'expériences visant à confirmer ces résultats. Brièvement, l'hypothèse de travail qui semble la plus cohérente avec les données actuelles est la liaison directe de l'exosome au module CNOT2-CNOT3 du complexe CCR4-NOT1. Ce modèle permettrait d'expliquer le mécanisme d'extinction des gènes par les miARN nucléaires qui reposerait donc sur leur interaction avec les complexes CCR4-NOT1 et exosome. Son mode opératoire comprendrait des protéines de liaison à l'ARN et des micro-ARN pour sélectionner les cibles.

Mots-clés : miARN, nucleus, SFPQ, post-transcription, RNA metabolism

# Agustina RAZETTI

UMR7271- Laboratoire d'Informatique, Signaux et Systèmes de Sophia-Antipolis (I3S) – Sophia Antipolis

Vendredi 13 Avril 2018 à 13h30

Salle Euler Violet - Inria Sophia Antipolis – Sophia Antipolis

## Modélisation et caractérisation de la croissance des axones à partir de données in vivo

(Modelling and characterizing axon growth from in vivo data)

devant le jury composé de :

Dr. Michèle STUDER	Président du Jury
Dr. Kristian FRANZE	Rapporteur
Dr. Anuj SRIVASTAVA	Rapporteur
Dr. Alin ACHIM	Rapporteur
Dr. Xavier DESCOMBES	Directeur de Thèse

### Résumé

---

La construction du cerveau et de ses connexions pendant le développement reste question ouverte dans la communauté scientifique. Des efforts fructueux ont été faits pour élucider les mécanismes de la croissance axonale, tels que la guidance axonale et les molécules de guidage. Cependant, des preuves récentes suggèrent que d'autres acteurs seraient impliqués dans la croissance des neurones in vivo. Notamment, les axones se développent dans des environnements mécaniquement contraints. Ainsi, pour bien comprendre ce processus dynamique, il faut prendre en compte les mécanismes collectifs et les interactions mécaniques au sein des populations axonales. Néanmoins, les techniques pour mesurer directement cela à partir de cerveaux vivants sont aujourd'hui insuffisantes ou lourdes à mettre en œuvre.

Cette thèse résulte d'une collaboration multidisciplinaire, pour faire la lumière sur le développement axonal in vivo et les morphologies complexes des axones adultes. Notre travail a été inspiré et validé à partir d'images d'axones  $\gamma$  individuels chez la drosophile, de type sauvage et modifiés génétiquement, que nous avons segmentés et normalisés. Nous avons d'abord proposé un cadre mathématique pour l'étude morphologique et la classification des groupes axonaux. A partir de cette analyse, nous avons émis l'hypothèse que la croissance axonale dérive d'un processus stochastique et que la variabilité et la complexité des arbres axonaux résultent de sa nature intrinsèque, ainsi que des stratégies d'élongation développées pour surmonter les contraintes mécaniques du cerveau en développement.

Nous avons conçu un modèle mathématique de la croissance d'un axone isolé fondé sur des chaînes de Markov gaussiennes avec deux paramètres, représentant la rigidité axonale et

l'attraction du champ cible. Nous avons estimé les paramètres de ce modèle à partir de données réelles et simulé la croissance des axones à l'échelle de populations et avec des contraintes spatiales pour tester notre hypothèse.

Nous avons abordé des thèmes de mathématiques appliquées ainsi que de la biologie, et dévoilé des effets inexplorés de la croissance collective sur le développement axonal in vivo.

## **Abstract**

---

How the brain wires up during development remains an open question in the scientific community across disciplines. Fruitful efforts have been made to elucidate the mechanisms of axonal growth, such as pathfinding and guiding molecules. However, recent evidence suggests other actors to be involved in neuron growth in vivo. Notably, axons develop embedded in mechanically constrained environments. Thus, to fully understand this dynamic process, one must take into account collective mechanisms and mechanical interactions within the axonal populations. However, techniques to directly measure this from living brains are today lacking or heavy to implement.

This thesis emerges from a multidisciplinary collaboration, to shed light on axonal development in vivo and how adult complex axonal morphologies are attained. Our work is inspired and validated from images of single wild type and mutated *Drosophila* axons, which we have segmented and normalized.

We first proposed a mathematical framework for the morphological study and classification of axonal groups. From this analysis we hypothesized that axon growth derives from a stochastic process, and that the variability and complexity of axonal trees result from its intrinsic nature, as well as from elongation strategies developed to overcome the mechanical constraints of the developing brain.

We designed a mathematical model of single axon growth based on Gaussian Markov Chains with two parameters, accounting for axon rigidity and attraction to the target field. We estimated the model parameters from data, and simulated the growing axons embedded in space constraint populations to test our hypothesis.

We dealt with themes from applied mathematics as well as from biology and unveiled unexplored effects of collective growth on axonal development in vivo.

# Sandra RUIZ-GARCIA

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

Mardi 18 Décembre 2018 à 14h00

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

## Appréhender l'hétérogénéité cellulaire et la dynamique de différenciation des épithéliums des voies aériennes au moyen de signatures transcriptionnelles sur cellule unique

(Catching cellular heterogeneity and differentiation dynamics of normal and pathological airway epithelia through single cell transcriptional profilings)

devant le jury composé de ::

Prof. Marc CHANSON

Président du jury

Prof. Pascal CHANEZ

Rapporteur

Dr. David GARFIELD

Rapporteur

Dr. Pascal BARBRY

Directeurs de Thèse

Dr. Laure-Emmanuelle ZARAGOSI

Co-directrice de Thèse

### Résumé

---

Les voies aériennes humaines sont bordées d'un épithélium pseudostratifié composé principalement de cellules basales et de cellules pyramidales parmi lesquelles figurent les cellules sécrétrices de mucus et les cellules multiciliées. Toutes ces cellules contribuent à la clairance mucociliaire des voies respiratoires. Cet épithélium se régénère lentement dans des conditions homéostatiques, mais il est capable de se régénérer rapidement après agression grâce à des processus de prolifération, de migration, de polarisation et de différenciation. Chez les patients atteints de maladies respiratoires chroniques telles que la broncho-pneumopathie chronique obstructive, l'asthme ou la mucoviscidose, la réparation tissulaire est souvent défectueuse, caractérisée par une perte de cellules multiciliées et une hyperplasie des cellules sécrétrices, ayant pour conséquence une clairance mucociliaire affectée. La séquence des événements cellulaires conduisant à un tissu fonctionnel ou remodelé est encore mal décrite. Notre principal objectif a été d'identifier les types cellulaires successifs mis en jeu lors de la régénération tissulaire et les événements moléculaires responsables d'une régénération saine ou pathologique.

Nous avons analysé la composition cellulaire de l'épithélium des voies respiratoires à plusieurs stades de différenciation en utilisant un modèle de culture 3D in vitro qui reproduit la composition cellulaire in vivo. En appliquant une méthode de transcriptomique sur cellule unique couplée à des méthodes bioinformatiques, nous avons établi les hiérarchies cellulaires permettant de reconstruire les différentes trajectoires cellulaires mises en jeu lors de la régénération de l'épithélium des voies respiratoires humaines. Après avoir confirmé les lignages cellulaires qui ont été précédemment décrits, nous avons découvert une nouvelle trajectoire reliant les cellules sécrétrices de mucus aux cellules multiciliées. Nous avons également caractérisé de nouvelles populations cellulaires et de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans le processus de régénération de l'épithélium des voies respiratoires humaines. Enfin, grâce à ces approches, nous avons mis en évidence des réponses spécifiques de chaque type cellulaire survenant dans des situations pathologiques d'hyperplasie sécrétoire. Ainsi, nos données, en apportant d'importantes contributions à la compréhension de la dynamique de différenciation de l'épithélium des voies respiratoires humaines, ouvrent de nouvelles voies vers l'identification de cibles thérapeutiques.

## **Abstract**

---

Human airways are lined by a pseudostratified epithelium mainly composed of basal and columnar cells, among these cells we can find multiciliated, secretory cells and goblet cells. All these cells work together in the mucociliary clearance of the airways. This epithelium regenerates slowly under homeostatic conditions but is able to recover quickly after aggressions through proliferation, migration, polarization and differentiation processes. However, in patients with chronic pulmonary diseases such as chronic obstructive pulmonary disease, asthma or cystic fibrosis, epithelial repair is defective, tissue remodeling occurs, leading to loss of multiciliated cells and goblet cell hyperplasia, impairing correct mucociliary clearance.

The sequence of cellular events leading to a functional or remodelled tissue are still poorly described. Hence, we aim at identifying the successive cell types appearing during tissue regeneration and the molecular events that are responsible for healthy or pathological regeneration.

We have analysed airway epithelial cell composition at several stages of differentiation using an in vitro 3D culture model which reproduces in vivo epithelial cell composition. Applying single cell transcriptomics and computational methods, we have identified cell lineage hierarchies and thus constructed a comprehensive cell trajectory roadmap in human airways. We have confirmed the cell lineages that have been previously described and have discovered a novel trajectory linking goblet cells to multiciliated cells. We have also discovered novel cell populations and molecular interactors involved in the process of healthy human airway epithelium regeneration. Using these approaches, we have finally shed light on cell-type specific responses involved in pathological goblet cell hyperplasia.

# Lenka SCHOROVA

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

Mercredi 28 Mars 2018 à 14h00

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

## Étude des mécanismes de régulation synaptique de la balance sumoylation/désomoylation

(Investigating the molecular pathways driving the  
sumoylation/desumoylation balance in rat hippocampal  
synapses)

devant le jury composé de :

Pr. Jacques NOËL

Président du Jury

Dr. Guillaume BOSSIS

Rapporteur

Pr. Jeremy HENLEY

Rapporteur

Dr. Stéphane MARTIN

Directeur de thèse

### Résumé

---

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle essentielle pour toutes les cellules eucaryotes. C'est un processus enzymatique qui permet la liaison covalente du polypeptide SUMO sur des résidus lysine de protéines cibles.

La SUMOylation est un processus réversible sous l'action de désomoylases appelées SENP. Il est critique de maintenir un équilibre entre forme modifiée et non modifiée d'un substrat donné. En effet, la dérégulation de la balance SUMOylation/désSUMOylation a été mise en évidence dans plusieurs pathologies cérébrales. La synapse est le point de contact entre les neurones où s'effectue la communication synaptique. Ce sont des structures très denses où le processus de SUMOylation régule l'interaction et la fonction de multiples protéines. Durant ma thèse, j'ai combiné l'utilisation de l'imagerie en temps réel sur cellules vivantes avec des approches biochimiques et pharmacologiques pour identifier les mécanismes de régulation du transport de SENP1. J'ai ainsi démontré que l'activation neuronale augmente les niveaux synaptiques de SENP1. Cette augmentation synaptique résulte de la modification de la vitesse de diffusion de l'enzyme SENP1 entre les dendrites et les synapses d'une part, et d'autre part, de l'augmentation importante du temps de rétention synaptique de l'enzyme. Je rapporte également que ce mécanisme de régulation dynamique de SENP1 implique l'activation des

récepteurs métabotropiques du glutamate. De plus, je suggère la participation du processus de phosphorylation dans cette régulation synapto-dendritique de SENP1 mettant ainsi en lumière un nouveau mécanisme de régulation de la balance neuronale entre SUMOylation et désSUMOylation.

## **Abstract**

---

Sumoylation is a vital eukaryotic posttranslational modification. Sumoylation occurs as an enzymatic cycle that conjugates SUMO proteins to target proteins. SUMO proteases (SENP) deconjugate SUMO from modified proteins and thus maintain balanced levels of SUMOylated and un-SUMOylated proteins required for physiological homeostasis. Neuronal synapses are protein-rich structures that underlie synaptic transmission and plasticity. Strong evidence exists that sumoylation occurs in synapses and regulates the function of synaptic proteins. Indeed, distortion of the SUMO balance has been linked to several pathologies of the synapse. Gaining a deeper understanding into the molecular mechanisms regulating the SUMO balance is a prerequisite to envisaging the development of novel therapies.

In my PhD work, I used a combination of live-cell confocal imaging, protein biochemistry and pharmacological approaches to identify SENP1 regulatory mechanisms at synapses. I provided evidence that synaptic activation increases SENP1 protein levels at synapses. I showed that the increase in synaptic SENP1 upon synaptic activation is a result of two processes: Although (a) fewer SENP1 proteins enter into spines at low diffusion speed (b) a significant proportion of SENP1 becomes immobile and is retained in spines. I demonstrate that the regulatory mechanisms of SENP1 dynamics involve a direct activation of mGlu1/5 receptors. Moreover, I suggest that phosphorylation may play an important regulatory role in SENP1 synapto-dendritic diffusion. Altogether, I propose a novel mechanism driving for the SUMO balance at synapses.

# Serena TESTI

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

Vendredi 26 Octobre 2018 à 13h30

Institut Sophia Agrobiotech - SOPHIA ANTIPOLIS

## L'effecteur Avh195 de *Phytophthora parasitica* : antagoniste de l'autophagie chez l'hôte et promoteur du processus infectieux

### devant le jury composé de :

Pr. Pierre FREUDO

Dr. Elodie GAULIN

Dr. Gilles PELTIER

Dr. Franck PANABIERES

Dr. Harald KELLER

Président du Jury

Rapportrice

Examineur

Directeur de Thèse

Directeur de Thèse

### Résumé

---

L'agent pathogène *Phytophthora parasitica* est un oomycète qui a des effets dévastateurs sur l'agriculture et les écosystèmes naturels. En tant qu'organisme hémi-biotrophe, il infecte les racines des plantes en établissant d'abord un contact intime avec les cellules hôtes (biotrophie) avant de les tuer (nécrotrophie) et de terminer son cycle d'infection. Pour contrôler ces processus, les oomycètes sécrètent des protéines effectrices, qui sont internalisées dans les cellules végétales par un motif de translocation (appelé RxLR-EER) pour manipuler la physiologie et les réponses immunitaires de l'hôte. Les études des échanges moléculaires entre *Phytophthora parasitica* et la plante qui ont été menées par le laboratoire d'accueil ont permis d'identifier un effecteur RxLR, dénommé Avh195. La séquence en acides aminés de l'effecteur est caractérisée par la présence de cinq motifs AIM (« ATG8 Interacting Motive ») qui indiquent une interaction potentielle avec la protéine centrale de l'autophagie, ATG8. Avh195 co-localise avec la fraction membranaire de l'ATG8, et un système double-hybride en levure permettant la détermination d'interactions entre protéines membranaires, a confirmé une interaction non sélective entre Avh195 et plusieurs isoformes d'ATG8. La caractérisation de la perturbation de l'autophagie dépendante de Avh195 a été réalisée dans l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* après génération de lignées transgéniques surexprimant l'effecteur. Les analyses par cytométrie de flux ont révélé que Avh195 ne modifie pas la physiologie et la « fitness » de l'algue dans des conditions de croissance normales et pendant l'autophagie induite par la rapamycine. La microscopie électronique à transmission a révélé que l'effecteur provoque dans les cellules de l'algue un retard dans le flux autophagique, se traduisant par une réduction de

la coalescence et de la clairance des vacuoles et une forte accumulation d'amidon dans les chloroplastes. Cependant, ce phénotype est transitoire et seulement légèrement lié aux modifications de la régulation transcriptionnelle de la machinerie autophagique. L'analyse de la fonction effectrice chez les plantes a montré que Avh195 retarde le développement de la mort cellulaire hypersensible, déclenchée par un éliciteur d'oomycète. Cette activité dépend de trois AIM sur cinq, ce qui renforce encore l'importance de l'interaction Avh195-ATG8 pour la fonction de l'effecteur. La surexpression stable d'Avh195 chez *A. thaliana* a permis de déterminer que l'effecteur n'altère pas les réponses immunitaires des plantes, mais favorise globalement le développement de l'agent pathogène, accélérant le passage de la biotrophie à la nécrotrophie au cours de l'infection. À notre connaissance, le travail présenté dans cette thèse représente la première preuve qu'un effecteur d'oomycète possède une activité transitoire, ciblant de manière non sélective la protéine ATG8 dans différents organismes photosynthétiques pour ralentir le flux autophagique, favorisant ainsi le mode de vie hémibiotrophe d'un agent pathogène.

## Abstract

---

The plant pathogen *Phytophthora parasitica* is an oomycete with devastating impact on both agriculture and natural ecosystems. As a hemi-biotrophic organism it infects the roots of plants first establishing an intimate contact with host cells (biotrophy) before killing them (necrotrophy) and completing its infection cycle. To control these processes, oomycetes secrete effector proteins, which are internalized in plant cells by a translocation motif (called RxLR-EER) to manipulate the physiology and the immune responses of the host. Studies of the molecular exchanges between *Phytophthora parasitica* and the plant that were conducted by the hosting laboratory led to the identification of an RxLR effector, designed to as Avh195. The amino acid sequence of the effector is characterized by the presence of five AIMs (ATG8 interacting motifs), that indicate a potential interaction with the autophagic core protein, ATG8. Avh195 colocalizes with the membrane-bound fraction of ATG8, and a yeast two-hybrid system, which allows to determine interactions between membrane proteins, confirmed a non-selective interaction between Avh195 and several ATG8 isoforms. The characterization of Avh195-dependent autophagy perturbation was carried out in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* after generation of transgenic lines overexpressing the effector. Analyses by flow cytometry revealed that Avh195 does not modify the physiology and fitness of the alga, both under normal growth conditions and during rapamycin-induced autophagy. Transmission electron microscopy of cells revealed that the effector provokes a delay in the autophagic flux, manifested as a reduced coalescence and clearance of autophagic vacuoles and a strong accumulation of starch in chloroplasts. However, this phenotype was transient and only slightly related to modifications in the transcriptional regulation of the autophagic machinery. The analysis of effector function in planta showed that Avh195 delays the development of hypersensitive cell death, which is triggered by an oomycete elicitor. This cell death-delaying activity is dependent on three out of five AIMs, further consolidating the importance of the Avh195-ATG8 interaction for the function of the effector. The stable overexpression of Avh195 in *A. thaliana* allowed to

determine that the effector does not impair plant defense responses, but overall promotes the development of the pathogen, accelerating the switch from biotrophy to necrotrophy during infection. To our knowledge, the work presented in this thesis represents the first evidence for an oomycete effector to possess a transitory activity, which targets in a non-selective manner the protein ATG8 in different organisms from the green lineage to slow down autophagic flux, thus promoting the hemibiotrophic life style of a pathogen.

# Nathalie YAZBECK

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

**Mardi 4 Octobre 2018 à 14h00**

Soutenance de Thèse à HUIS CLOS

**devant le jury composé de :**

Monsieur Patrick AUBERGER	Président du Jury
Madame Diane DAMOTTE	Rapportrice
Madame Maria Chiara MAIURI	Rapportrice
Madame Mojgan DJAVAHERI-MERGNY	Examinatrice
Madame Sylvie LANTUEJOUL	Examinatrice
Monsieur Paul HOFMAN	Directeur de Thèse
Madame Baharia MOGRABI	Directrice de Thèse