

# Hala AWINA

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

Jeudi 19 Décembre 2019 à 9h30

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Importance des jonctions adhérentes et la polarité cellulaire dans la régulation des signaux engendrés par le récepteur Fas/CD95

### devant le jury composé de :

Pr Jean Paul BORG

Dr. Daniel BOUVARD

Dr. Philippe Philipe NAQUET

Dr. Laurent GAGNOUX-PALACIOS

Dr. Anne-Odile HUEBER

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de Thèse

Directrice de Thèse

### Résumé

---

*Fas* (CD195/TNFRSF6) est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des tumor necrosis factor receptor (TNFR). Même si la signalisation induite par ce récepteur suite à la liaison avec son ligand FasL (CD178/TNFSF6), a surtout été étudiée dans un contexte de mort cellulaire, on sait à présent qu'elle conduit aussi, notamment dans un contexte cancéreux, à la survie de la cellule en induisant sa prolifération ou sa migration. L'équipe du Dr. AO Hueber s'efforce depuis plusieurs années de disséquer les mécanismes moléculaires sous tendant la versatilité de ce récepteur. En effet, comprendre le contrôle des signaux émis par Fas dans le contexte de l'équilibre de la décision mort/vie de la cellule, est crucial pour le développement de stratégies thérapeutiques anti cancéreuses et notamment pour le cancer colorectal, qui est la troisième cause la plus courante de cancer dans le monde et au 2ème rang des décès par cancer.

S'il était connu que les cellules intestinales, en perpétuel renouvellement, mourraient suite à la perte des contact cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire, le rôle possible des jonctions intercellulaires et de la polarité cellulaire dans le contrôle de la signalisation du récepteur de mort

Fas avait été jusqu'à présent largement inexploré. L'objectif principal de mon sujet de doctorat a été d'étudier le rôle des jonctions adhérentes et de la polarité cellulaire dans la modulation de la mort cellulaire induite par FasL dans des cellules épithéliales de côlon.

Nous avons pu démontrer que l'établissement de la polarité cellulaire et la formation de jonctions adhérentes contrôlaient la signalisation pro-apoptotique du récepteur Fas en montrant que : (i) le récepteur Fas se concentrent avec l'E-cadhérine aux jonctions intercellulaires ; (ii) l'association Fas-cadhérine protège les cellules de la mort cellulaire induite par Fas.

Une approche protéomique nous a permis d'identifier plusieurs nouveaux partenaires interagissent avec un site d'interaction à domaine PDZ localisé dans la partie C-terminale du récepteur. Parmi ceux-ci se trouve la molécule de polarité/échafaudage Dlg1. Nous avons démontré que Dlg1 interagit directement avec Fas et réduit la formation du complexe de mort suite à l'engagement avec le ligand, ce qui constitue un mécanisme supplémentaire de protection contre la mort cellulaire.

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à proposer que le complexe Fas-cadherin-Dlg1 en contrôlant l'inhibition de la mort cellulaire induite par Fas non seulement participer à l'homéostasie épithéliale en protégeant l'épithélium de l'apoptose mais également participer à l'élimination des cellules endommagée non-polarisées freinant ainsi le développement de cellules cancéreuses.

Dans la deuxième partie de mon doctorat, j'ai étudié le rôle de plusieurs partenaires de Fas identifiés dans notre analyse protéomique, et notamment de l'E3 ubiquitine ligase LNX2. J'ai pu montrer que (i) LNX2 se liait directement à Fas (ii) induisait la dégradation du récepteur activé par son ligand au niveau des lysosomes, conduisant à une inhibition des signaux de mort. L'ensemble de ces résultats suggèrent que LNX2 protège les cellules épithéliales coliques de la mort cellulaire induite par FasL. La protéine LNX2 étant surexprimée dans le cancer du côlon, le mécanisme d'action de LNX2 identifiée sur la signalisation Fas pourrait expliquer la résistance des cellules cancéreuses du côlon à la mort par Fas.

Mots Clefs : Mort cellulaire, le récepteur Fas, jonction adhérente, polarité cellulaire, épithélium.

## Abstract

---

Fas is a transmembrane cell death receptor mostly known for its function in inducing cell death through apoptosis, but it is also recognized to be implicated in a wide range of non-death functions in various cell types and contexts. The disequilibrium between cell death and survival signals due to defective apoptosis is a key factor in tumorigenesis. Fas is found ubiquitously expressed in

human tissues including many epithelia such as in the intestine. Thus, the activation of Fas signaling in this tissue should be rigorously regulated in order to maintain the balance between cell death and non-death signaling.

At a cellular level, the choice of life and death, is regulated by different environmental cues including cell-cell junctions and cell polarity through the involvement of various sets of specialized macromolecules. The possible role of cell-cell contacts and cell polarity in the control of Fas signaling has been largely unexplored. Therefore, the main aim of my PhD was to investigate the role of adherens junction and cell polarity in the modulation of the FasL- induced cell death signaling in colon epithelial cells.

We were able to demonstrate that both cell polarity establishment and adherens junction formation control the pro-apoptotic signaling of the death receptor Fas. We found that the Fas receptors concentrate at cell-cell junctions together with E-cadherin and that Fas-cadherin association protects cells from FasL- induced cell death. Using a proteomic approach, we identified several novel partners of Fas that interact with the C-terminal PDZ-binding site of Fas including the polarity/scaffold molecule Dlg1. We demonstrated that Dlg1 interacts directly with Fas and decrease the death- inducing complex formation upon Fas activation, therefore, providing an additional mechanism to protect against cell death. Altogether, our data show that inhibition of FasL- induced cell death by Fas-cadherin-Dlg1 complex helps to maintain epithelial homeostasis by protecting normal epithelia from apoptosis and promotes elimination of compromised non-polarized cells to avoid development of pathological conditions such as cancer development.

In the second part of my PhD, I investigated the role of several partners of Fas identified in our proteomic analysis, including the E3 ubiquitin ligase LNX2. I demonstrate that LNX2 binds directly Fas, and targets activated Fas to lysosomal degradation, therefore preventing FasL- induced cell death. My results suggest that LNX2 protects colon epithelial cells against FasL- induced cell death. Interestingly, LNX2 is found overexpressed in colon cancer, which may explain how colon cancer cells evades Fas-mediated apoptosis by promoting Fas degradation following its activation.

Keywords: Apoptosis, Fas receptor, adherens junction, cell polarity, epithelium

# Antoine BERGER

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

Mardi 12 Mars 2019 à 9h00

Institut Sophia Agrobiotech - SOPHIA ANTIPOLIS

## Contribution des phytoglobines et des nitrate réductases à la régulation de l'oxyde nitrique et de la fixation de l'azote dans la symbiose *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium meliloti*

### devant le jury composé de :

Pr. David WENDEHENNE	Président du Jury
Dr. Maria ROMERO-PUERTAS	Rapporteuse
Dr. Marc LEPETIT	Rapporteur
Dr. Eliane MEILHOC	Examinatrice
Dr. Alexandre BOSCARI	Examineur
Dr. Renaud BROUQUISSE	Directeur de Thèse

### Résumé

---

La symbiose fixatrice d'azote entre les légumineuses et les bactéries du sol de type Rhizobium permet de réduire l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) en ammoniac (NH<sub>3</sub>) grâce à la présence de la nitrogénase bactérienne au sein d'un organe racinaire appelé nodosité. Dans le modèle symbiotique *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium meliloti*, l'oxyde nitrique (NO) est produit tout au long du processus symbiotique, du début de l'interaction entre la plante et les bactéries jusqu'à la sénescence de la nodosité. Les effets toxiques, de signal ou de métabolite du NO dépendent principalement de sa concentration à son site d'action. Sa concentration au sein des cellules des nodosités doit être régulée afin de limiter ses effets toxiques et lui permettre de remplir ses fonctions de signalisation et de métabolite. Chez les plantes, les principales sources de NO identifiées sont la nitrate réductase (NR) et la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale (ETC). Par ailleurs, les phytoglobines sont connues pour être impliquées dans le catabolisme du NO. D'après leur homologie de séquence et leur affinité pour l'oxygène, trois classes de Phytogb ont été décrites chez les légumineuses : les Phytogb non-symbiotiques (Phytogb1), les leghémoglobines (Lb) -spécifiques des légumineuses- et les Phytogb tronquées (Phytogb3).

Les principaux objectifs de cette thèse ont été, d'une part, de caractériser et étudier le rôle des NR et des Phytogb dans la régulation du NO lors de la symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti* et, d'autre part, d'analyser le rôle du NO dans le développement et le fonctionnement du processus symbiotique.

Chez *M. truncatula*, 3 gènes codent pour des NR et 17 pour des Phytogb. L'étude phylogénétique des séquences de Phytogb de *M. truncatula* a permis d'identifier 12 Lb, 3 Phytogb1 et 2 Phytogb3. L'analyse de l'expression des gènes de NR et de Phytogb, ainsi que la mesure de l'activité totale des NR et la production du NO a permis de suivre le niveau de NO durant la symbiose fixatrice d'azote, ainsi que le rôle respectif des différentes NR et Phytogb dans sa régulation. Au cours du processus symbiotique, quatre pics de production de NO ont été observés, correspondant à quatre étapes du processus symbiotique, pendant (1) l'établissement de l'interaction la plante et la bactérie, (2) le début de l'organogénèse de la nodosité, (3) le fonctionnement de la nodosité mature et (4) lors de l'entrée en sénescence des nodosités. Lors de ces différentes étapes, la production de NO a pu être particulièrement corrélée à l'expression des gènes des NR1 et NR2, d'une Phytogb1 (Phytogb1.1) et d'une Phytogb3 (Phytogb3.1). L'utilisation de divers inhibiteurs des voies de synthèse du NO a montré que la production de NO dépend principalement de l'activité NR et de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale. L'utilisation de donneurs de NO a permis de montrer que, lors du développement nodulaire, le NO induit l'expression des Phytogb1 et de plusieurs gènes de défense, mais réprime celle des Lb et Phytogb3. Une analyse fonctionnelle de Phytogb1.1 pendant l'établissement, le fonctionnement et la sénescence de la nodosité, a été initiée via la production de plants de *M. truncatula* sur-exprimant ou sous-exprimant ce gène. La surexpression et la sous-expression de ce gène ont abouti respectivement à une diminution et une augmentation du niveau de NO dans les nodosités, mais s'est traduit dans les deux cas par une diminution du nombre de nodosités par plante. L'analyse de l'expression d'un certain nombre de gènes marqueurs de l'interaction symbiotique, des réponses de défense, du métabolisme azoté et de l'hypoxie, et les mesures de fixation de l'azote dans les nodosités matures ont mis en évidence le rôle particulier de Phytogb1.1 dans la régulation du NO au cours du développement nodulaire et lors de l'entrée en sénescence des nodosités.

## Abstract

---

Contribution of phytohemoglobins and nitrate reductases to the nitric oxide regulation and nitrogen fixation in *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. The nitrogen-fixing symbiosis between legumes and soil bacteria of Rhizobia type reduces atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>) to ammonia (NH<sub>3</sub>) through the presence of bacterial nitrogenase in a root organ, called nodule. In the symbiotic model *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium meliloti*, nitric oxide (NO) is produced throughout the symbiotic process, from the beginning of the interaction between the plant and the bacteria until the senescence of the nodule. The toxic, signal or metabolite effects of NO

depend mainly on its concentration at the action site. Its concentration within the nodule cells must be regulated in order to limit its toxic effects and leads its signaling and metabolite functions. In plants, the main sources of NO identified are nitrate reductase (NR) and the mitochondrial electron transfer chain (ETC). In addition, phytoglobins (Phytogb) are known to be involved in the catabolism of NO. According to their sequences homology and affinity for oxygen, three classes of Phytogb have been described in legumes: non-symbiotic Phytogb (Phytogb1), legume-specific leghemoglobin (Lb) and truncated Phytogb (Pgb3).

The main objectives of this PhD were, on the one hand, to characterize and study the role of NR and Phytogb in the NO regulation, during the symbiosis between *M. truncatula* and *S. meliloti* and, on the other hand, to analyse the role of NO in the development and in mature nodule during the symbiotic process.

In *M. truncatula*, 3 genes code for NR and 17 for Phytogb. The phylogenetic study of *M. truncatula* Phytogb identified 12 Lb, 3 Phytogb1 and 2 Phytogb3. Analysis of NR and Phytogb gene expression, as well as measurement of total NR activity and NO production, allowed to monitor the level of NO during the N<sub>2</sub>-fixing symbiosis, and to determine the respective roles of the different NR and Phytogb in the NO regulation. During the symbiotic process, four peaks of NO production were observed, corresponding to four periods of the symbiotic process, during (1) the establishment of the interaction between the plant and the bacteria, (2) at the setup of the nodule organogenesis (3) inside the functioning and mature nodule and (4) at the onset of nodule senescence. During these different periods, the production of NO is particularly correlated with the expression of the NR1 and 2, one Phytogb1 (Phytogb1.1) and one Phytogb3 (Phytogb3.1) genes. The use of various inhibitors of NO synthesis pathways has shown that NO production depends mainly on NR activity and the mitochondrial electron transfer chain. The use of NO donors has shown that, during nodular development, NO induces the expression of Phytogb1 and several defence genes but represses Lb and Phytogb3 genes. Functional analysis of Phytogb1.1, during nodule establishment, functioning and senescence, was initiated via the production of *M. truncatula* plants overexpressing or silencing this gene. Overexpression and under-expression of this gene resulted, respectively, in a decrease and an increase in the NO level in the nodules, but in both cases resulted in a decrease in the number of nodules per plant. Analysis of the expression of several marker genes of the symbiotic interaction, defence responses, nitrogen metabolism and hypoxia, and analysis of nitrogen fixation in mature nodules highlight the particular role of Phytogb1.1 in the NO regulation during nodule development and during the senescence process.

# Sara CASTAGNOLA

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Vendredi 28 Juin 2019 à 14h00

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

## Le rôle de la signalisation calcique dans le Syndrome de l'X fragile

### devant le jury composé de :

Dr. Michèle STUDER	Présidente du Jury
Dr. Nicoletta LANDSBERGER	Rapportrice
Dr. Séverine MASSENET	Rapportrice
Dr. Alessandra FOLCI	Examinatrice
Dr. Thomas MAURIN	Examineur
Dr. Barbara BARDONI	Directrice de Thèse

### Résumé

---

Le syndrome de l'X fragile (FXS) est la forme héréditaire la plus commune de retard mental (RM) et la première cause de troubles du spectre de l'autisme (TSA). Il est causé par la perte d'expression du gène FMR1 qui code la protéine Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). FMRP est une protéine capable de se lier aux ARNs, et elle est impliquée dans différentes étapes du métabolisme de l'ARN allant du transport des ARNs au contrôle de la traduction des ARNm au niveau du soma et des synapses. Pour identifier les différents ARNm ciblés par FMRP, nous avons séquencé à haut-débit les ARNs isolés par « crosslinking » immunoprécipitation (HITS-CLIP ou CLIP-seq). Cette technique nous a permis d'identifier 1065 ARNm liés par FMRP avec une forte affinité. Un nombre remarquable de ces ARNm code des régulateurs de l'homéostasie ionique, et plus particulièrement l'homéostasie calcique.

A partir de ces données, j'ai développé le premier axe de ma thèse, ciblé sur la compréhension de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  dans le FXS. Je me suis plus particulièrement focalisée sur l'une des cibles principales de FMRP, appelée Cacna1a. Ce gène code la sous-unité formant le pore du canal calcique voltage-dépendant de type P/Q (VGCC) Cav2.1, qui est localisé dans les neurones au niveau du compartiment somato-dendritique et de l'axone. Le canal Cav2.1 laisse entrer le calcium dans le cytosol des neurones lors de la dépolarisation de la membrane, et de nombreux

changements intra-cellulaires découlent de cet influx de calcium, en particulier la libération de neurotransmetteurs et la transcription calcium-dépendante. Mon but était d'analyser la corrélation entre l'absence de FMRP et l'expression de *Cacna1a* dans des cultures primaires de neurones afin de déterminer le rôle de ce gène et de cette protéine dans la physiopathologie du FXS. Pour cela, j'ai réalisé une analyse fonctionnelle de la régulation calcique en utilisant une méthode d'imagerie calcique sur des neurones en culture *Fmr1*-Knock-Out (KO) corticaux et hippocampaux. J'ai ainsi pu observer que ces neurones ont un influx de calcium plus faible et plus lent que les neurones sauvages (WT) en réponse à une dépolarisation KCl-dépendante. De plus, j'ai également montré que la protéine codée par *Cacna1a* a une activité et une synthèse réduite à la membrane plasmique des souris *Fmr1*-KO par rapport aux wild-type (WT). Mes résultats mettent donc en évidence un nouveau phénotype pour les neurones *Fmr1*-KO en culture et montrent que le défaut d'homéostasie calcique est un nouveau biomarqueur de ce modèle cellulaire.

Dans le second axe de mon travail, j'ai étudié le rôle de l'homéostasie calcique dans les différentes populations cellulaires qui composent le cerveau en présence et en absence de FMRP. Pour mieux décrire la diversité des différents types cellulaires observés en imagerie calcique et définir quelles caractéristiques moléculaires appartiennent à chaque sous-groupe neuronal, j'ai développé un nouvel outil d'analyse appelé aiFACS pour «agonist-induced Functional Analysis and Cell Sorting». Cette technique permet de stimuler individuellement les neurones et d'analyser leur réponse à un agoniste pharmacologique et de les trier simultanément. Différentes analyses «-omics» permettent ensuite de définir l'identité des différentes cellules et les éléments moléculaires qui caractérisent la réponse des neurones WT par rapport aux *Fmr1*-KO. Grâce à cette méthode, j'ai mis en évidence une dérégulation de l'excitabilité des interneurones, ce qui permet de mieux caractériser le schéma chimique du cerveau de ces souris.

Mots Clefs : Syndrome de l'X Fragile, retard mental, troubles du spectre de l'autisme, FMRP, signalisation calcique, *Cav2.1*, hétérogénéité, interneurones, agonist-induced Functional Analysis and Cell Sorting (aiFACS).

## Abstract

---

Fragile X Syndrome (FXS) is the most common form of inherited intellectual disability (ID) and the primary cause of autism spectrum disorder (ASD). It originates from the lack of expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene which encodes the Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). FMRP is an RNA-binding protein involved in different steps of RNA metabolism, ranging from RNA transport to translational control of mRNAs at soma and at synapses. To identify the repertoire of mRNA targets of FMRP, we used the high-throughput sequencing of RNAs isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP or CLIP-seq), resulting in the identification of 1065

mRNAs bound by FMRP with high affinity. Remarkably, a number of them encode regulators of ion homeostasis and, in particular, several calcium homeostasis players.

I started from these findings to develop the first axis of my thesis focused on the understanding of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in FXS. In particular, I focused on one of the most enriched mRNA targets of FMRP, namely *Cacna1a*. This gene encodes the pore-forming subunit of the P/Q type Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) Cav2.1, which is particularly expressed in neurons, both in axon terminal and somato-dendritic compartments. The Cav2.1 channel allows the entry of calcium in the cytosol of neurons upon membrane depolarization and several intracellular changes derive from this calcium influx, notably neurotransmitter release and calcium-dependent gene transcription. My goal was to analyze the correlation between the lack of FMRP and the expression of *Cacna1a* in primary neuronal cultures, in order to define the role of this gene and its protein in the pathophysiology of FXS. For this purpose, I carried out a functional analysis of calcium regulation using a calcium-imaging approach in mouse cultured *Fmr1*-Knock-Out (KO) cortical/hippocampal neurons, and I observed that these neurons display a weaker and slower Ca<sup>2+</sup> response to KCl-dependent depolarization than wild-type (WT) neurons. Consistent with these findings, I also showed that the protein product of *Cacna1a* has a reduced activity/expression at the plasma membrane of mutant mice compared to WT. Altogether, my results pinpoint a new phenotype for cultured *Fmr1*-KO neurons and describe calcium homeostasis impairment as a new biomarker in this cellular model.

In the second axis of my work, my interest further expanded toward the study of the role of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in different cellular populations that compose the brain in the presence and in the absence of FMRP. To better describe the cell type diversity observed during the previous neuronal imaging and define which molecular characteristics belong to which neuronal sub-group, I developed a new powerful tool called “agonist-induced Functional Analysis and Cell Sorting” (aiFACS). This technique allows to stimulate and analyze a neuronal response to a pharmacological agonist at a single-cell level and to simultaneously sort cells accordingly. Subsequent “-omic” investigation can then define the cell identity and the molecular determinants that characterize the response of WT versus *Fmr1*-KO neurons. By doing so, I was able to highlight a marked deregulation of interneuron excitability, which adds a step in the direction of drawing a detailed chemical map of the rodent brain.

Keywords: Fragile X syndrome, intellectual disability, autism spectrum disorder, FMRP, calcium signaling, Cav2.1, heterogeneity, interneurons, agonist-induced Functional Analysis and Cell Sorting (aiFACS)

# Anil Mahaveer CHOUGULE

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

Vendredi 1er Mars 2019 à 14h00

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Rôle des régulateurs de l'actine dans la mise en place de l'asymétrie gauche-droite chez la Drosophile : la formine DAAM est essentielle pour l'asymétrie gauche-droite

(Role of actin regulators in Drosophila Left-Right asymmetry: the Drosophila actin nucleator DAAM is essential for Left-Right asymmetry)

### devant le jury composé de :

Dr. Bénédicte DURAND

Rapportrice

Dr. Frederique PERONNET

Rapportrice

Dr. Maximilian FURTHAUER

Examineur

Dr. Stephane NOSELLI

Directeur de thèse

### Résumé

---

Quoiqu'apparemment symétriques vus de l'extérieur, la plupart des animaux montrent des asymétries droite-gauche (DG) au niveau de leurs organes internes. L'asymétrie des organes viscéraux est contrôlée par des voies de signalisation dont la dérégulation entraîne des désordres congénitaux sévères. L'asymétrie DG chez les vertébrés et les invertébrés est régulée par différents éléments du cytosquelette : les vertébrés utilisent les microtubules et des cils motiles, alors que les invertébrés, dont la Drosophile, emploient le cytosquelette d'actine. Quoique le cytosquelette d'actine soit considéré comme important pour l'asymétrie DG, à ce jour, les régulateurs de l'actine impliqués dans ce processus n'ont pas été identifiés.

Chez la Drosophile, l'asymétrie dextrale est déterminée par un seul gène, codant pour la myosine conservée Myosin1D (Myo1D), découverte par l'équipe de S. Noselli. *myo1D* est un gène situs inversus et déterminant DG unique. La perte de fonction de *myo1D* entraîne une inversion totale de l'asymétrie DG, aboutissant à un phénotype sinistral. Les bases génétiques du développement sinistral sont inconnues. Des études chez le zebrafish et le xénope ont montré que l'orthologue de *myo1D* contrôle aussi l'asymétrie chez les vertébrés, la fonction de *myo1D* étant ainsi conservée évolutivement. Des travaux récents du laboratoire ont montré que *myo1D* est non seulement nécessaire mais aussi suffisant pour induire l'asymétrie DG de novo à toutes les échelles biologiques. Cette activité naît d'une interaction chirale entre Myo1D et l'actine filamentueuse, comme montré in vitro dans un modèle non cellulaire. Afin de définir le mécanisme d'action de Myo1D in vivo, il est donc essentiel de comprendre le rôle de l'actine et de ses régulateurs dans l'asymétrie DG.

Dans ce but, j'ai réalisé un crible RNAi afin de tester le rôle du cytosquelette dans les voies dextrale et sinistrale. Mon travail a permis d'identifier le gène DAAM, codant pour un nucléateur d'actine de la famille des formines, comme un facteur essentiel pour l'asymétrie DG chez la Drosophile. Des mouches mutantes pour DAAM deviennent symétriques. De façon intéressante, j'ai pu montrer que DAAM est nécessaire aux deux voies dextrale et sinistrale. L'analyse génétique révèle que le développement dextral requiert un réseau de F-actine assemblé par l'activité coordonnée des formines Diaphanous et DAAM. De plus, DAAM est requis pour l'asymétrie DG de novo, suggérant que le réseau d'actine assemblé par DAAM est essentiel à la chiralité induite par Myo1D. La surexpression de DAAM amplifie la chiralité induite par Myo1D, suggérant que DAAM est un facteur limitant pour l'asymétrie DG. Les résultats montrent aussi que DAAM interagit avec l'homologue Drosophile de la Profiline, Chickadee (Chic), et que la réduction de l'activité de Chic mime celle de DAAM. Par ailleurs, le crible a permis de mettre en évidence le rôle de nouveaux facteurs de régulation de l'actine dans l'asymétrie DG, à savoir *fli*, *Lg(2)*, *Tec29*, *Dizzy*,  $\beta$ PS, *mys*, *rhaetRap1*, agissant dans un réseau régulant l'asymétrie. Dans leur ensemble, ces résultats originaux montrent le rôle fondamental de l'actine et de la formine DAAM dans le contrôle de l'asymétrie DG, révélant ainsi de nouveaux mécanismes de régulation contrôlant l'asymétrie chez les animaux.

Mots-clés: Actin, DAAM, Myosin 1D, left-right asymmetry, de novo asymmetry, Drosophila

## Abstract

---

Besides their external bilateral symmetry, most of the animals display left-right (LR) asymmetry of their internal organs. The asymmetric shapes and positions of the visceral organs are regulated by LR asymmetry signaling pathways and their disturbance results in severe congenital disorders. LR patterning in vertebrates and in invertebrates is regulated by different cytoskeletal elements: vertebrates employ microtubules and cilia, while in invertebrates, including *Drosophila*, the actin cytoskeleton has a prominent role. The actin system has long been proposed to play an important role in animal LR asymmetry. To date, the proteins that are directly involved in the regulation of actin dynamics in establishing LR asymmetry have not been identified.

In *Drosophila*, dextral anatomical handedness is determined by a single gene, the conserved type 1D myosin (Myo1D), discovered by the Noselli laboratory. *myo1D* is a unique situs inversus gene and a key LR determinant. Loss of *myo1D* function leads to a totally inverted LR organ asymmetry in flies (Sinistral). The genetic and developmental basis of sinistral asymmetry is unknown. Studies in zebrafish and *Xenopus* have shown that the *myo1D* orthologs control LR asymmetry indicating its evolutionarily conserved function in LR patterning in *Drosophila* and vertebrates. Further recent work by the Noselli laboratory has discovered that Myo1D is not only necessary for establishing LR asymmetry in *Drosophila* but also sufficient to generate de novo LR asymmetries at multiscale levels. This de novo asymmetry is assumed to result from a chiral interaction of Myo1D and actin filaments based on non-cell-based assays. Defining this mechanism in vivo is critical to understanding the role of actin and its regulators as a reinforcing link between Myo1D and the actin cytoskeleton in animal LR asymmetry.

To characterize the role of actin cytoskeleton in LR asymmetric development, I performed an RNA interference-based genetic screen down-regulating the functions of cytoskeletal genes in both Dextral and Sinistral genetic backgrounds. My study identifies the main actin nucleator formin DAAM as an essential component for LR asymmetry determination in *Drosophila*. Flies lacking DAAM show symmetrical morphogenesis of LR organs indicating the loss of LR asymmetry. Notably, DAAM is required for both dextral and sinistral development in *Drosophila*. In addition, genetic analysis revealed that dextral development requires the F-actin network constructed by coordinated activities of the formins Diaphanous and DAAM. Moreover, DAAM is also required for de novo formation of LR asymmetry, suggesting that the DAAM nucleated F-actin network acts as an essential structural component required for chirality determination involving Myo1D activity. DAAM overexpression enhances these asymmetries further adding an extra chiral twist, reflecting that a pool of DAAM decorated actin filaments acts as limiting factor for organ looping in LR asymmetry. In this setting, DAAM molecularly interacts with the *Drosophila* homolog of Profilin, chickadee (*chic*) and silencing *chic* mimics the DAAM loss-of-function phenotype. I also uncovered roles for a subset of actin regulators *fli*, *Lg(2)*, *Tec29*, *Dizzy*,  $\beta$ PS *mys*, *rhea* and *Rap1* in LR asymmetry, indicating they functionally act in the same actin regulatory pathway. Altogether, these original findings clearly demonstrated the fundamental role of actin and its regulation by formins in LR asymmetry and provide insight into the molecular basis underlying animal asymmetry.

Keywords: Actin, DAAM, Myosin 1D, left-right asymmetry, de novo asymmetry, *Drosophila*

# Tomás DE GARAY HERRERA

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

Mercredi 27 Mars 2019 à 14h00  
Amphithéâtre 1 - Faculté de Médecine – Nice

## Découverte et implications dans la régulation transcriptionnelle d'un nouveau variant protéique du régulateur des intégrines et du transport des acides aminés CD98hc

devant le jury composé de :

Dr. Bruno ANTONNY  
Dr. Ambra MARI  
Dr. Marta MUZIO  
Dr. Chloé FERAL

Président de Jury  
Rapporteuse  
Rapporteuse  
Directrice de thèse

### Résumé

---

La protéine ubiquitaire CD98hc (SLC3A2, 4F2hc), présente chez tous les vertébrés, est impliquée dans un large éventail de processus, tels que l'homéostasie tissulaire, le développement ou la protection contre le stress. Elle constitue la chaîne lourde d'une famille de transporteurs d'acides aminés (SLC7) et est aussi un co-récepteur des intégrines. En régulant la signalisation associée à l'adhésion des intégrines ainsi que le transport des acides aminés, le niveau d'expression de CD98hc contrôle la prolifération cellulaire qui joue un rôle crucial dans l'expansion clonale des lymphocytes, le renouvellement des épithéliums et la tumorigenèse. Le travail présenté dans cette thèse identifie un nouveau variant de la protéine CD98hc. Ce variant est transcrit à partir d'un site d'initiation de la transcription qui se situe en amont du site d'initiation de la transcription canonique. Cette thèse démontre également la capacité promotrice de la région génomique d'environ 1000bp en amont du codon d'initiation alternatif identifié. La combinaison d'analyse de séquence et d'études fonctionnels de la région promotrice alternative, fournit un aperçu des potentiels éléments cis-régulateurs gouvernant l'expression du variant alternatif de CD98hc. Cela suggère fortement que la régulation de son expression est différente de celle de la forme canonique. Comprendre cette différence aidera à expliquer la complexité de la régulation des taux d'expression de CD98hc ainsi que la capacité des cellules à moduler ces taux d'expression en fonction de leurs besoins et des signaux fournis, à la fois dans un contexte homéostatique et

pathologique. De plus, l'analyse de séquence du variant alternatif de CD98hc ouvre la voie pour la future caractérisation fonctionnelle de cette protéine.

C'est la première fois que le variant protéique alternatif de CD98hc est identifiée, venant ainsi enrichir les connaissances acquises pour une meilleure compréhension des travaux existants et à venir sur CD98hc. L'ensemble de ces travaux contribue donc à la compréhension de cette régulation complexe de l'expression de CD98hc, ainsi que son effet sur la prolifération cellulaire via la signalisation outside-in des intégrines et le transport des acides aminés chez les mammifères.

Mots clés : CD98hc, prolifération, intégrine, transporteur des acides aminés, régulation de la transcription, promoteur

## Abstract

---

CD98hc (CD98hc (SLC3A2, 4F2hc) is a ubiquitous protein present in vertebrates and implicated in a wide range of processes such as tissue homeostasis, development or stress protection. It constitutes the heavy chain of a family of amino acid transporters (SLC7) and an integrin co-receptor. By regulating integrin adhesive signaling and amino acid transport, CD98hc level of expression controls cell proliferation and has a crucial role in lymphocyte clonal expansion, epithelium renewal, and tumorigenesis. The work in this thesis identifies a novel, alternative CD98hc protein variant conserved in the mammalian CD98hc locus. The transcription of this variant initiates from an alternative transcription start site located upstream of the canonical start site. We also demonstrate the promoter capacity of the  $\approx 1000$ bp 5' flanking genomic region. The combination of sequence analysis and promoter functional assays provides a wide view of the potential cis-regulatory elements governing CD98hc alternative variant and strongly suggests a different expression regulation as compared to the canonical variant. Understanding this difference will help to explain the complexity of the regulation of CD98hc expression levels and the cellular capacity to modulate them according to cellular needs and signals, both in homeostasis and disease. Additionally, sequence analysis of CD98hc alternative protein variant opens the door to a future protein functional characterization. This is the first time CD98hc alternative protein variant is identified, and it enriches the framework for the interpretation of existent and future work on CD98hc. Altogether, it contributes to understanding the complex regulation of CD98hc expression, and its effect upon cell proliferation through integrin outside-in signaling and amino acid transport in mammals.

Keywords: CD98hc, proliferation, integrin, amino acid transporter, transcription regulation, promoter

# Gerogios EFTHYMIOU

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

Jeudi 19 Décembre 2019 à 13h30

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Etude d'assemblage et des fonctions des isoformes oncofoetales de la fibronectine

### devant le jury composé de :

Dr. Robert ARKOWITZ

Président du Jury

Dr. Corinne ALBIGES-RIZO

Rapporteuse

Dr. Patricia ROUSSELLE

Rapporteuse

Dr. Ellen VAN OBBERGHEN-SCHILLING

Directrice de Thèse

### Résumé

---

La matrice extracellulaire (MEC) constitue une plateforme fibrillaire intégrant l'action des signaux chimiques et mécaniques de l'environnement. La fibronectine (FN), un composant majeur de la MEC, est au centre de cette plateforme de biorégulation et module de nombreuses actions biologiques telles que l'adhésion et la motilité cellulaires, la prolifération et la différenciation, ainsi que la structure et le dépôt de la MEC. La FN se présente sous deux formes : la FN plasmotique (pFN) et la FN cellulaire (cFN), dite « oncofoetale ». Cette dernière est nommée ainsi pour son expression uniquement au cours du développement et dans certaines conditions physiopathologiques (réparation tissulaire, inflammation et cancer). La différence entre les deux est l'existence dans la cFN des domaines supplémentaires EDB et EDA, qui résultent d'un épissage alternatif. Comment la présence de ces « extra-domaines », EDA et EDB, régit l'assemblage des FN et comment les variantes assemblées régulent le comportement des cellules est en grande partie inconnu. Des études de délétion ciblées d'un seul domaine chez la souris ont révélé le rôle de l'EDA dans des phénomènes très variés dont la morphogénèse des valves lymphatiques, l'athérosclérose et la cicatrisation / fibrose. Au niveau moléculaire, l'inclusion de l'EDA élargit le répertoire des récepteurs cellulaires de la FN (intégrines  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$  et TLR4). A ce jour, aucun récepteur n'a été rapporté pour l'EDB. De ce fait il a été proposé que sa présence modifierait la conformation du site

de liaison de FN aux cellules et faciliterait ainsi l'assemblage fibrillaire induit par les intégrines via des mécanismes qui restent à établir.

Le but des travaux de cette thèse était de décoder les rôles de l'EDA et de l'EDB de la FN, et plus précisément de : 1) étudier l'impact de la présence des domaines EDA et EDB sur l'assemblage fibrillaire de la FN à la surface de cellules compétentes pour l'assemblage, et 2) déterminer comment la présence de l'EDB et de l'EDA influence les propriétés biochimiques, physiques et fonctionnelles de la matrice, qui à leur tour affectent le comportement des cellules qui y sont attachées.

Dans un premier temps l'équipe a développé un ensemble d'outils biologiques composé de : i) vecteurs lentiviraux hébergeant la séquence codante complète du gène de la FN humaine contenant l'un, les deux ou aucun des « extra-domaines » alternativement épissés, ii) des variants de FN recombinants purifiés, iii) des fibroblastes embryonnaires de souris FN -/- (Fn1 -/- MEF), et iv) des MEF exprimant des variantes de FN. Cette batterie d'outils uniques a été utilisée pour étudier l'assemblage spécifique de variantes par les fibroblastes et les effets de réseaux de cFN homogène sur le comportement cellulaire.

Nos résultats ont montré que les « extra-domaines » de la FN sont responsables au niveau des fibroblastes du réglage fin de l'amplitude de plusieurs réponses dont l'assemblage de la matrice, la croissance et le métabolisme énergétique. En utilisant une approche informatique « non-biaisée », nous avons démontré que la présence des « extra-domaines » modifie la structure de la matrice de la FN déposée par les fibroblastes. Ceci témoigne d'événements de signalisation cellulaire différents, qui sont susceptibles de modifier aussi bien les réponses précoces que tardives induites par la FN. Les matrices variant-spécifiques que nous avons développées représentent des outils très puissants pour décrypter les fonctions des « extra-domaines » de la FN dans les multiples types de cellules impliquées non seulement dans des réponses physiologiques mais également dans des situations pathologiques.

Mots Clefs : matrice extracellulaire, fibronectine, extra-domaines, EDB, EDA, intégrines, fibroblastes embryonnaires de souris, cancer

## Abstract

---

The Extracellular Matrix (ECM) constitutes a fibrillar platform that integrates the action of chemical and mechanical cues from the environment. Fibronectin (FN), a major component of the ECM, is at the center of this bioregulatory stage, modulating numerous biological procedures such as cell adhesion and motility, cell proliferation and differentiation, as well as ECM deposition and structure. FN is found in two forms: plasma FN (pFN) and cellular FN (cFN). cFN differs from pFN by the presence of alternatively spliced Extra Domains, namely EDB and EDA. Each of these

alternatively spliced regions is encoded by a single exon, the regulation of which is strictly regulated and limited to embryonic tissues, as well as pathophysiological conditions such as wound healing, inflammation, and cancer. The term “oncofetal” was coined in order to describe FN isoforms harboring either of the Extra Domains, that are normally absent in adult tissues.

How the presence of EDA and EDB regulates FN assembly and how the assembled variants regulate cell behavior is largely unknown. Single Extra Domain-targeted deletion studies in the mouse have revealed roles for EDA in the morphogenesis of lymphatic valves, atherosclerosis, and wound healing/fibrosis. Mechanistically, the inclusion of EDA expands the repertoire of cellular FN receptors ( $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$  integrins and TLR4). To date, no ligand has been reported for EDB. Rather, its presence has been postulated to alter the conformation of the cell-binding domain of FN and to facilitate integrin-driven fibrillar assembly by mechanisms that remain to be established.

The aim of this dissertation is to provide more insight regarding the roles of the FN Extra Domains EDA and EDB, and more specifically: 1) To investigate how the presence of alternatively spliced EDA and EDB domains affect the fibrillar assembly of FN at the surface of assembly-competent cells, and 2) To determine how the presence of EDB and EDA influences the biochemical, physical, and functional properties of the matrix that in turn affect the behavior of cells attached to it.

Here we present a biological toolset composed of : i) lentiviral vectors harboring the full-length coding sequence of human cFN containing one, both, or none of the alternatively spliced Extra Domains, ii) purified recombinant FN variants, iii) FN-null mouse embryo fibroblasts (MEFs) and iv) FN variant-expressing MEFs. These unique tools were used to study variant-specific assembly by fibroblasts and the effects of homogeneous cFN networks on cell behavior.

Utilizing an unbiased computational approach, we document that the presence of the Extra Domains results in a distinct pattern of FN deposition and assembly that in turn influences both early and late signaling events that control cell proliferation as well as cell contractility. Finally, we present a series of novel data that point towards a FN-impacted control of cell energetics.

We conclude that FN Extra Domains are responsible for the fine-tuning of the extent of several cellular processes that can reflect strict regulation in pathophysiological procedures such as tissue repair, fibrosis, and tumor progression.

Keywords: extracellular matrix, fibronectin, extra domains, EDB, EDA, integrins, mouse embryo fibroblasts, cancer

# Gaia FABRIS

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

Vendredi 7 Juin 2019 à 10h00  
Amphithéâtre 1 - Faculté de Médecine - Nice

## Rôle des microARNs et de leur machinerie dans les hépatocytes et les cellules béta pancréatiques

(Role of microRNAs and their machinery in hepatocytes and  
pancreatic beta cells)

### devant le jury composé de :

Pr. Emmanuel VAN OBBERGHEN

Dr. Francesco BEGUINOT

Dr. Magalie RAVIER

Pr. Giulia CHINETTI

Président du Jury

Rapporteur

Rapportrice

Directrice de Thèse

### Résumé

---

Dans le foie normal de l'adulte les hépatocytes sont dans un état de quiescence, sauf lors d'une situation d'agression physique ou toxique. Dans ces cas-là, afin de pouvoir maintenir leur rôle dans l'homéostasie de l'organisme les hépatocytes endommagés ou sauvés vont proliférer. Un des facteurs limitants pour la prolifération est la présence d'acides aminés, qui sont nécessaires pour la synthèse des protéines au cours de la prolifération et division cellulaire, et pour l'activation de la voie mTOR, qui joue un rôle clef dans la régulation de la prolifération cellulaire. Le but de mon projet de thèse était d'étudier dans des hépatocytes adultes le rôle des acides aminés dans la régulation de la transition entre l'état de quiescence et la croissance cellulaire. Pour cela nous avons utilisé comme modèle de foie partiellement reséqué des hépatocytes de rats adultes en culture primaire non-confluente. J'ai découvert que l'absence d'acides aminés induit l'entrée des hépatocytes dans un état de quiescence couplée à une augmentation de la protéine Drosha; cet accroissement étant indépendant de la voie mTOR. Inversement, la réduction de Drosha permet aux hépatocytes de proliférer, et cet effet semble indépendant des microARNs, qui

sont les partenaires classiques de Drosha. L'ensemble de nos résultats révèlent dans les hépatocytes adultes l'existence d'effets non-classiques de Drosha dans le contrôle de la régulation de la croissance suite un stress nutritionnel. Un tel mécanisme pourrait être ciblé pour la prévention et/ou le traitement de l'insuffisance hépatique.

Le second projet de ma thèse concerne le rôle du microARN-375 dans la régulation de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose dans les îlots de Langerhans de rats et d'origine humaine. Le métabolisme glycolytique et oxydatif sont nécessaires pour la réponse sécrétoire au glucose. Alors que plusieurs microARNs sont connus pour moduler l'homéostasie des cellules bêta, le microARN-375 se démarque par sa forte expression dans les cellules bêta dans lesquelles il régule le fonctionnement, la prolifération et la différenciation. Sachant que le métabolisme du glucose est au centre de toutes les fonctions de la cellule bêta, nous avons étudié son impact sur le métabolisme dans des îlots humains et murins. Notre approche a fait appel soit à la surexpression du microARN-375, soit à sa réduction dans des îlots humains ou murins. Ensuite nous avons analysé la sécrétion de l'insuline et le métabolisme. De plus, nous avons regardé l'expression du microARN-375 et la réponse sécrétoire au glucose dans des îlots de rats à différents stades de leur développement. Nous avons trouvé que la surexpression du microARN-375 dans les îlots murins et humains diminuait la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose, mais pas celle au  $\alpha$ -cétoisocaproate ou au KCl. De plus, le microARN-375 réduit la consommation d'O<sub>2</sub> engendrée par la glycolyse et le métabolisme du pyruvate, mais pas celle en réponse au  $\alpha$ -cétoisocaproate. En même temps, la production de lactate est augmentée suggérant que le pyruvate est détourné des mitochondries. Enfin, la réduction du niveau du microARN-375 est associée à la maturation des cellules bêta de rat foetal et l'apparition d'une réponse sécrétoire au glucose. Pris dans leur ensemble nos résultats identifient le microARN-375 comme étant un régulateur central du métabolisme du glucose et de la sécrétion de l'insuline, et ainsi il pourrait être un rouage déterminant pour la maturation fonctionnelle de cellules bêta.

Mots Clefs : hépatocytes, prolifération cellulaire, acides aminés, Drosha; diabète, métabolisme du glucose, sécrétion de l'insuline, îlots pancréatiques, microARNs

## Abstract

---

In an adult healthy liver, hepatocytes are in a quiescent stage unless a physical injury, such as ablation, or a toxic attack occurs. However, to maintain their important organismal homeostatic role, the damaged or remaining hepatocytes will start proliferating to restore their functional mass. One of the limiting conditions for cell proliferation is amino acid (aa) availability, necessary both for the synthesis of proteins important for cell growth and division, and for the activation of the mTOR pathway, known for its considerable role in the regulation of cell proliferation. The aim of my main PhD project was to investigate the role of amino acids in the regulation of the switch between quiescence and growth of adult hepatocytes. To do so I used non-confluent primary adult

rat hepatocytes as a model of partially ablated liver. I discovered that the absence of aa induces in primary rat hepatocytes the entrance in a quiescence state together with an increase in Drosha protein, which does not involve the mTOR pathway. Conversely, knockdown of Drosha allows the hepatocytes to proliferate and this effect appears to be independent of miRNAs, the canonical downstream partners of Drosha. Taken together, these observations reveal an intriguing non-canonical effect of Drosha in the control of growth regulation of adult hepatocytes responding to a nutritional strain, and they may help to design novel preventive and/or therapeutic approaches for hepatic failure.

A side project of my PhD involved the role of microRNA-375 in the regulation of glucose-induced insulin secretion in rat and human pancreatic islets. Enhanced  $\beta$ -cell glycolytic and oxidative metabolism are necessary for glucose-induced insulin secretion. While several microRNAs modulate  $\beta$ -cell homeostasis, microRNA-375 stands out as it is highly expressed in  $\beta$ -cells where it regulates  $\beta$ -cell function, proliferation and differentiation. As glucose metabolism is central in all aspects of  $\beta$ -cell functioning, we investigated the role of microRNA-375 in this process using human and rat islets; the latter being an appropriate model for in depth investigation. We used forced expression and repression of microRNA-375 in rat and human primary islet cells followed by analysis of insulin secretion and metabolism. Additionally, microRNA-375 expression and glucose-induced insulin secretion were compared in islets from rats at different developmental ages. We found that overexpressing of microRNA-375 in rat and human islet cells blunted insulin secretion in response to glucose, but not to  $\alpha$ -ketoisocaproate or KCl. Further, microRNA-375 reduced O<sub>2</sub> consumption related to glycolysis and pyruvate metabolism, but not in response to  $\alpha$ -ketoisocaproate. Concomitantly, lactate production was augmented suggesting that glucose-derived pyruvate is shifted away from mitochondria. Finally, reduced microRNA-375 expression was associated with maturation of fetal rat  $\beta$ -cells and acquisition of glucose-induced insulin secretion function. Altogether our findings identify microRNA-375 as an efficacious regulator of  $\beta$ -cell glucose metabolism and of insulin secretion and could be determinant to functional  $\beta$ -cell developmental maturation.

Keywords: hepatocytes, cell proliferation, amino acids, Drosha; diabetes, glucose metabolism, insulin secretion, pancreatic islets, microRNAs.

# Aidan FALVEY

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Mardi 2 Avril 2019 à 14h00

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

## Étude du rôle du nerf sinuso-carotidien dans l'inflammation

### devant le jury composé de :

Dr. Abdelilah WAKKACH	Président du Jury
Dr. Wouter DEJONGE	Rapporteur
Dr. Maria PEDRO GUARINO	Rapportrice
Dr. Silvia CONDE	Examinatrice
Dr. Philippe BLANCOU	Directeur de Thèse
Dr. Nicolas GIAICHENHAUS	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Les corps carotidiens sont des structures bilatérales situées au niveau de la bifurcation de l'artère carotide. Ils sont capables de détecter divers stimuli physiologiques tels que la concentration de gaz dans le sang et la pression sanguine. Suite à la variation de ces paramètres au-delà d'une valeur consigne, le corps carotidien, via un nerf afférent appelé nerf sinuso-carotidien (NSC), déclenche une réponse riposte par des voies nerveuses ou hormonales efférentes. De récentes études ont suggéré l'existence d'une relation entre le système immunitaire et le corps carotidien. Il a en particulier été démontré que le corps carotidien est capable de détecter des effecteurs de l'inflammation tels que les cytokines. En outre, des données in vivo démontrent que la résection bilatérale du NSC diminue la survie suite à un choc endotoxémique. Notre étude a porté sur les capacités immunomodulatrices du corps carotidien. Pour mener à bien cette étude, nous avons utilisé une approche d'électrostimulation du NSC plutôt qu'une approche pharmacologique moins spécifique. Nous avons en particulier développé une méthode chirurgicale pour isoler le NSC, implanter des électrodes puis stimuler le nerf. Nous avons pu constater que la stimulation électrique du NSC atténuait l'expression des cytokines pro-inflammatoires induites par injection de lipopolysaccharide (LPS), en particulier le Tumor Necrosis Factor (TNF). Par la suite nous avons pu montrer que l'effet de la stimulation du nerf sinusal de la carotide n'était médié ni par des nerfs

sympathiques, ni par des nerfs parasympathiques efférents. En revanche, nous avons découvert que la stimulation du NSC augmentait le taux de corticostérone, une hormone anti-inflammatoire qui active le récepteur des glucocorticoïdes. L'antagoniste du récepteur des glucocorticoïdes, abolit les effets de l'atténuation des cytokines pro-inflammatoires par l'électrostimulation du NSC. De plus, l'utilisation de souris transgéniques ayant des cellules immunitaires myéloïdes dépourvues de récepteurs aux glucocorticoïdes, a montré que l'effet de la stimulation nerveuse du NSC était également perdu indiquant le rôle crucial joué par ces cellules et ce récepteur. Enfin, nous avons pu montrer que la stimulation du NSC conduisait à l'augmentation de l'activité de décharge spontanée des neurones hypothalamiques évoquant un lien entre le NSC et l'axe hypothalamo-hypophysaire. Au final, ces résultats indiquent que l'électrostimulation du NSC atténue l'inflammation en agissant sur l'hypothalamus qui, en augmentant la sécrétion de glucocorticoïdes, conduit à une inhibition de la sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules myéloïdes. D'un point de vue thérapeutique, nous avons pu mettre en évidence que les souris qui avaient reçu une électrostimulation du NSC avaient un taux de survie plus important après injection d'une dose élevée de LPS. Ces résultats suggèrent que l'électrostimulation du NSC pourrait être un traitement potentiel considéré par la médecine bioélectronique pour les maladies inflammatoires immunomédiées en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Mot-cles : Corps carotidien, inflammation, électrostimulation, souris, nerf sinuso-carotidien, endotoxémie, glucocorticoïdes, cellules myéloïdes, hypothalamus, médecine bioélectronique

## Abstract

---

The carotid bodies (CB) are located bilaterally at the carotid artery bifurcation. They are polymodal sensors capable of detecting various physiological stimuli – blood gas concentration and blood pressure. The carotid body, via its innervating nerve – the carotid sinus nerve (CSN), signals to the brain to modulate these physiological stimuli through efferent activity. Recent evidence has suggested that there is a relationship between the immune system and the carotid body. It has been shown that the carotid body detects inflammation and functionally responds. Additionally, there is *in vivo* data, demonstrating that bilateral removal of the CSN decreases survival to endotoxemic shock. We hypothesized that activation of the carotid body would attenuate inflammation. To carry out this study, we electrostimulated the CSN instead of using a non-specific pharmacological approach. A surgical method was developed to isolate the CSN, implant electrodes and then stimulate the nerve. We found that electrical stimulation of CSN attenuated the expression of pro-inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide (LPS) injection, including Tumor Necrosis Factor (TNF). The mechanism by which electrical activation of the CSN attenuated inflammation was unknown. It was investigated if the effect of CSN stimulation was mediated via efferent parasympathetic or sympathetic nerves - it was found that it was not mediated via these nerves. In contrast, it was discovered, that CSN stimulation increased

corticosterone – an anti-inflammatory hormone, which activates the glucocorticoid receptor. An antagonist for the glucocorticoid receptor abolished the attenuation of pro-inflammatory cytokines by CSN electrostimulation. This indicated that corticosterone is the mediator of the effect of CSN stimulation. In addition, we found that the stimulation of the CSN led to the increase of the spontaneous discharge activity of the hypothalamic paraventricular nucleus likening the CSN activity to the hypothalamic-pituitary adrenal axis. Using transgenic mice with no glucocorticoid receptor on their myeloid immune cell, it was found that effect of CSN stimulation was additionally prevented. Finally, we were able to show that the stimulation of the CSN led to the increase of the spontaneous discharge activity of the hypothalamic neurons suggesting a link between the CSN and the hypothalamus-pituitary axis. Overall, these results indicate that electrostimulation of CSN attenuates inflammation by acting on the hypothalamus which, by increasing the secretion of glucocorticoids, leads to an inhibition of the secretion of inflammatory cytokines by myeloid cells. From a clinical perspective, using a high dose of lipopolysaccharide, it was found that mice who had received electrostimulation of the CSN were more likely to survive than control mice. This result is particularly interesting as it demonstrates that electrostimulation of the CSN may be a potential therapeutic in bioelectronic medicine for immune-mediated inflammatory diseases.

Keywords: carotid body, inflammation, electrostimulation, mouse, carotid sinus nerve, endotoxemia, glucocorticoids, myeloid cells, hypothalamus, bioelectronic medicine

# Racha FAYAD

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Jeudi 7 Mars 2019 à 14h30

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

## Rôle de EFA6B, facteur d'échange d'Arf6, dans la morphogenèse épithéliale et l'invasion collective de cellules mammaires humaines

### devant le jury composé de :

Dr. Ellen VAN OBBERGHEN-SCHILLING	Présidente du Jury
Dr. Cécile GAUTHIER-ROUVIERE	Rapporteuse
Pr. Andrew EWALD	Rapporteur
Dr. Patrick AUBERGER	Examineur
Marc LOPEZ	Examineur
Dr. Frédéric LUTON	Directeur de Thèse

### Résumé

---

L'homéostasie des tissus épithéliaux est fondamentale à la survie et au maintien d'un organisme sain. Au cours de la morphogenèse des glandes mammaires, les cellules épithéliales communiquent avec leur stroma environnant afin d'orchestrer la formation d'un organe fonctionnel en passant par de multiples cycles régulés de prolifération, de transitions épithélio-mésenchymateuse (TME) et mésenchymateuse-épithéliale, de migration et d'invasion. Dans les cellules cancéreuses, ces processus sont dérégulés. Il est donc important d'étudier comment les cellules mammaires normales conservent leur homéostasie au cours du développement pour appréhender les événements moléculaires induisant le cancer du sein. L'homéostasie de l'épithélium repose sur le contrôle de propriétés spécifiques : polarité apico-basale, cohésion cellulaire et formation de lumen. Notre protéine d'intérêt EFA6B, facteur d'échange d'Arf6, se trouve au cœur de ces caractéristiques structurelles, d'où mon intérêt à étudier son rôle dans les cellules épithéliales mammaires. Au cours de mes travaux de thèse, j'ai étudié l'impact de la perte d'EFA6B sur l'intégrité épithéliale.

En utilisant des cellules épithéliales normales mammaires invalidées pour EFA6B par la technique de CRISPR/Cas9, j'ai démontré que la perte d'EFA6B dérégule fortement l'homéostasie épithéliale à différents niveaux. Premièrement, sa déplétion entraîne la formation d'invadopodes riches en intégrine ITGB1 et en métalloprotéase MMP14. Mes résultats indiquent que l'invasion des cellules EFA6B knock-out dépend de l'activation de Cdc42. Elle est soutenue par une contractilité accrue des cellules et la formation de structures branchées protrusives contrôlées par les voies de signalisation Cdc42/MRCK/P-MLC et Cdc42/N-WASP/Arp2/3. Deuxièmement, nous avons montré que la perte d'EFA6B est associée à l'engagement des cellules EFA6B knock-out dans une TME, révélée par un échange de cadhérine et une augmentation de l'expression de facteurs de transcription mésenchymateux. Troisièmement, conformément au rôle d'EFA6B dans l'assemblage des jonctions serrées, sa déplétion empêche les cellules de se polariser et de former des acini avec un lumen central. Collectivement, nos données sont en accord avec des résultats précédemment publiés montrant une corrélation entre la perte d'EFA6B et le sous-type de cancer du sein invasif Claudin-low défini par une signature TME et une perte d'expression des protéines des jonctions serrées.

J'ai aussi contribué à la caractérisation du rôle de l' $\alpha$ -actinine 1 comme effecteur d'EFA6A dans des cellules épithéliales normales (MDCK) et d'EFA6B dans une lignée cellulaire mammaire tumorigène (MCF7). Je montre qu'EFA6B et l' $\alpha$ -actinine 1, en régulant la contractilité cellulaire apicale, coordonnent l'établissement de la polarité apico-basale, la formation des jonctions serrées et du lumen.

L'ensemble de ces résultats démontre que la perte d'EFA6B stimule les propriétés invasives de cellules épithéliales normales et impacte leur microenvironnement (contractilité, dégradation de la matrice, altération du matrisome). Nous proposons que le gène PSD4 codant pour EFA6B est un gène suppresseur d'invasion qui contribue à préserver l'intégrité des tissus épithéliaux.

Mots Clefs : EFA6B, homéostasie épithéliale, cancer du sein, invasion, invadopodes, Cdc42.

## Abstract

---

Epithelial tissue homeostasis is fundamental for the survival and maintenance of a healthy organism. During mammary gland morphogenesis, epithelial cells communicate with their surrounding stroma in order to orchestrate the formation of a functional organ by undergoing multiple cycles of controlled proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-epithelial transition, migration and invasion. In cancer cells, these processes are dysregulated. Thus, understanding how normal mammary cells preserve their homeostasis during development is crucial to identify the molecular events inducing breast cancer. Homeostasis of epithelia relies on key specific features: apico-basal polarity, cell cohesion and lumen formation. Here stands our protein of interest, EFA6B, exchange factor for Arf6, hence my interest in studying

its role in mammary epithelial cells. During my PhD work, I investigated the role of EFA6B on epithelial integrity.

Using CRISPR/Cas9 EFA6B knock-out cells, I showed that the loss of EFA6B deregulates the homeostasis of normal mammary epithelial cells at different levels. First, deleting EFA6B allows the formation of invadopodia rich in integrin ITGB1 and metalloprotease MMP14. My results indicate that EFA6B KO cells invasion is Cdc42-dependent, supported by increased cell contractility and the formation of protrusive branched structures through the Cdc42/MRCK/pMLC and Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathways. Second, we showed that the loss of EFA6B is associated with the engagement of cells into EMT, revealed by a cadherin switch and an upregulation of EMT transcription factors. Third, coherently with EFA6B roles on junction assembly, its depletion prevented cells from polarizing and forming normal acini with central lumens. Collectively, our data are in agreement with previous results showing a correlation between the loss of EFA6B and the breast cancer claudin-low subtype defined by EMT properties, invasion capacities and a decrease in TJ proteins expression.

I also contributed to the characterization of the role of  $\alpha$ -actinin1 as an effector of EFA6A in normal epithelial cells (MDCK), and of EFA6B in a tumorigenic mammary cell line (MCF7). I show that EFA6B and  $\alpha$ -actinin1 by regulating together the apical cellular contractility coordinate the establishment of apico-basal polarity and luminogenesis, two essential processes for functional epithelia.

Altogether, these results demonstrate that the loss of EFA6B triggers invasive potentials in normal epithelial cells, and modifies their microenvironment (contractility, degradative invadopodia, alteration of the matrisome). We propose the gene PSD4 encoding for EFA6B as an invasion-suppressor gene that will preserve cells from losing their epithelial features in order to maintain tissue integrity.

Keywords: EFA6B, epithelial homeostasis, breast cancer, invasion, invadopodia, Cdc42

# Torsten FELSKE

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

Vendredi 29 Mars 2019 à 14h00

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Reprogrammation efficace en neurones de projection corticofuges aux stades embryonnaires et postnatals chez la souris

### devant le jury composé de :

Pr. Thomas LAMONERIE

Dr. Fanny MANN

Dr. Benedikt BERNINGER

Dr. Michèle STUDER

Président du Jury

Rapportrice

Rapporteur

Directrice de Thèse

### Résumé

---

Le néocortex des mammifères est tangentiellement organisé en aires fonctionnelles et radialement divisé en six couches de neurones qui présentent chacune des projections, des morphologies et des patterns d'expression distinctes. Alors que les neurones de projection des couches supérieures projettent leurs axones dans d'autres couches du cortex ou vers l'hémisphère controlatéral, tel que les neurones calloseux, la plupart des neurones des couches inférieures, nommés neurones corticofuges, innervent des structures sous-corticales à travers la voie pyramidale. La perte de neurones corticofuges peut conduire à des désordres neurologiques sévères, tel que la sclérose latérale amyotrophique ou d'autres maladies et/ou lésions impliquées dans le tractus cortico-spinal. Étant donné que le cerveau adulte des mammifères ne dispose pas d'une capacité de régénération efficace et que, par conséquent, la perte de neurones devient permanente, des nouvelles méthodes de remplacement de neurones sont indispensables.

Des études récentes ont révélé une plasticité surprenante des neurones post-mitotiques, qui peuvent être convertis en types cellulaires d'une lignée neuronale différente. Cette approche, appelée reprogrammation directe, contourne un état de pluripotence intermédiaire, est assez rapide et susceptible de conserver une signature épigénétique. L'expression forcée de facteurs de

transcriptions, connu pour agir comme principaux régulateurs du destin cellulaire pendant le développement, est la meilleure stratégie pour convertir un type cellulaire en un autre. Cependant, il est encore difficile de comprendre dans quelle mesure des neurones, généré par reprogrammation directe, acquièrent les caractéristiques moléculaires du type cellulaire souhaité, jusqu'au stade de la spécification précise du sous-type. Le facteur de transcription FEZF2 est connu pour son rôle dans la spécification des neurones de projections sous-corticales de la couche 5, et une surexpression ectopique de Fezf2 peut convertir les couches supérieures ou les neurones striataux en neurones corticofuges de projection, même si cela est à faible efficacité. Durant ma thèse, j'ai utilisé Fezf2 et le co-adaptateur nucléaire Lmo4 pour reprogrammer efficacement les neurones calloseux de la couche supérieure en neurones corticofuges de la couche inférieure, à la fois, au stade embryonnaire et postnatale. Les cellules reprogrammées avec succès régulent négativement les marqueurs de la couche supérieure, alors que les marqueurs de la couche inférieure sont surexprimés considérablement. De plus, en utilisant des méthodes de traçage avancées, les cellules reprogrammées ont la capacité de projeter vers des cibles sous-corticales, tels que le thalamus, le peduncule cérébrale et la moelle épinière. Ces données démontrent un rôle synergique inattendu de Lmo4 avec Fezf2 dans la reprogrammation neuronale et révèlent un cocktail efficace pour la conversion de cellules neuronales en sous-types de neurones corticofuges de projection.

Mots clés : Reprogrammation, Fezf2, Lmo4, Néocortex, Neurones de projection corticofuges

## Abstract

---

The mammalian neocortex is tangentially organized into functional areas and radially subdivided into six layers of neuronal populations with distinct projections, morphology and expression patterns. While neurons in the upper layers project within the neocortex or towards the contralateral hemisphere, such as callosal projection neurons, most lower layer neurons, named corticofugal projection neurons, innervate subcerebral targets via the corticospinal tract. Injuries or loss of these neurons can lead to severe neurological disorders, such as Amyotrophic Lateral Sclerosis or other diseases and/or lesions implicating the corticospinal tract. Since the adult mammalian brain lacks a significant regenerative capacity and thus, damage or loss of neurons is permanent, methods for restoring neurons are urgently needed.

Recent studies revealed an unexpected plasticity of post-mitotic neurons, which can be converted into cell-types of other neuronal lineages. This approach, called direct neuronal reprogramming, bypasses an intermediate pluripotent state. Direct reprogramming is fast, likely to keep epigenetic hallmarks and it can be conducted in vivo. Forced expression of transcription factors, known to act as master regulators of cell fate during development, is one of the best strategies for directly converting one cell-type into another one. However, it is still not clear to which extent neurons,

generated by direct reprogramming, acquire authentic molecular signatures of the desired cell type, down to the point of precise subtype specification. The transcription factor FEZF2 is known for its role in cell fate specification of layer 5 subcerebral projection neurons and high ectopic Fezf2 expression can convert upper layer or striatal neurons into a corticofugal fate, even if at low efficiency.

During my PhD thesis, I used Fezf2 and the nuclear co-adaptor Lmo4 to efficiently reprogram upper layer projection neurons into corticofugal lower layer projection neurons, at both, embryonic and postnatal stages. The successful reprogrammed cells downregulated upper layer markers, while lower layer markers were drastically increased. Additionally, by using advanced tracing methods, we showed that reprogrammed neurons projected towards subcerebral targets, including the thalamus, cerebral peduncle and spinal cord. These data demonstrate an unexpected synergistic role of Lmo4 with Fezf2 in neuronal reprogramming and reveals an effective cocktail for the conversion of neuronal cells into corticofugal neuronal subtypes.

Keywords: Reprogramming, Fezf2, Lmo4, Neocortex, corticofugal projection neurons

# Joana FERNANDES MENDES JUSTINO

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Lundi 2 Décembre 2019 à 14h00

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

## Autoanticorps dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse associée à PLA2R1 : épitopes, immunodominance et implication clinique

### devant le jury composé de :

Dr. Véronique BRAUD

Présidente du Jury

Prof. An DE VRIESE

Rapportrice

Dr. Jérôme NIGOU

Rapporteur

Prof. Noémie JOURDE-CHICHE

Examinatrice

Prof. Jack WETZELS

Examineur

Dr. Gérard Lambeau

Directrice de Thèse

### Résumé

---

La glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est une maladie auto-immune rénale rare (1,2/100.000 nouveaux cas par an), mais grave. C'est la principale cause de syndrome néphrotique chez l'adulte. L'évolution clinique des patients est variable, de la rémission spontanée à l'insuffisance rénale terminale. Malgré les recommandations internationales (KDIGO), le traitement de la GEM reste controversé et difficile. De meilleurs biomarqueurs sont nécessaires pour identifier les patients à risque de développer une maladie sévère, orienter le traitement et prédire sa réponse.

D'un point de vue physiopathologique, la GEM est caractérisée par la formation de dépôts immuns le long la membrane basale glomérulaire, associés à des lésions podocytaires et une forte protéinurie. La double identification du récepteur des phospholipases A2 sécrétées (PLA2R1) comme l'auto-antigène majeur de la GEM pour environ 70% des patients puis de la

thrombospondine 7A contenant des domaines de type 1 (THSD7A) comme second autoantigène pour un autre groupe de 2 à 5% des patients est considérée comme une avancée majeure. Ces découvertes ont non seulement apporté une nouvelle base moléculaire pour mieux comprendre la pathogénèse de la GEM, mais ont aussi rapidement fourni des essais cliniques pour mieux diagnostiquer et suivre la maladie. Des titres élevés d'anticorps anti-PLA2R1 sont associés à la gravité de la maladie et sont de mauvais pronostic.

PLA2R1 est un récepteur membranaire glycosylé de 180 kDa comprenant 10 domaines extracellulaires dont un domaine riche en cystéine (CysR), un domaine fibronectine de type II (FnII) et huit domaines lectine de type C (CTLD). PLA2R1 lie et inhibe l'activité enzymatique des sPLA2 et joue un rôle dans différentes conditions inflammatoires. PLA2R1 pourrait également agir comme suppresseur de tumeurs. Cependant, sa fonction dans les podocytes reste inconnue. Plusieurs types d'autoanticorps ciblant trois domaines distincts de PLA2R1 (CysR, CTLD1 et CTLD7) ont été identifiés. Ces autoanticorps sont probablement produits par un mécanisme d'étalement épitopique et leur présence simultanée est associée à la gravité de la maladie et à un mauvais pronostic.

L'objectif principal de cette thèse était de caractériser l'ensemble des épitopes PLA2R1 et d'évaluer leur pertinence clinique, en particulier comme prédicteurs d'évolution de la maladie et de la réponse au traitement. En utilisant différents outils de biologie moléculaire et cellulaire, nous avons montré que les autoanticorps de patients peuvent reconnaître jusqu'à 5 des 10 domaines PLA2R1. Le criblage par ELISA d'une cohorte de 142 patients ayant une GEM associée à PLA2R1 pour leur réactivité contre chacun des 10 domaines de PLA2R1 révèle différentes prévalences. Le titre des anticorps et la positivité pour certains épitopes apparaissent comme des biomarqueurs pertinents pour prédire le devenir des patients et la réponse au traitement. Nous avons également identifié les domaines CysR et CTLD1 comme deux épitopes immunodominants alternatifs, suggérant que la réponse autoimmune peut progresser de deux façons différentes. D'un intérêt clinique potentiel, les patients présentant une immunodominance CysR semblent avoir une évolution clinique plus favorable et une meilleure réponse au traitement que les patients présentant une immunodominance CTLD1. En conclusion, ces travaux permettent de mieux comprendre comment se développe la réponse auto-immune contre PLA2R1 et pourraient contribuer au développement de nouveaux tests diagnostiques vers une médecine plus personnalisée de la GEM.

Mots Clefs : glomérulonéphrite extra-membraneuse, PLA2R1, épitopes, immunodominance, diagnostic, pronostic

## Abstract

---

Membranous Nephropathy (MN) is a rare (1.2/100,000 new cases per year) but severe autoimmune kidney disease. It is also a common cause of nephrotic syndrome in adults. The clinical outcome of patients is complex and variable, going from spontaneous remission to end-stage renal disease (ESRD), with persistent high levels of proteinuria. Despite international KDIGO recommendations, MN treatment remains highly controversial and challenging. Better biomarkers are needed to identify patients at risk of severe disease, orient treatment decision and predict response to therapy.

From the pathophysiological point of view, MN is characterized by the formation of immune complex deposits at the glomerular basement membrane leading to podocyte injury and proteinuria. A major breakthrough was the identification of phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) as the main autoantigen of MN for about 70% of the patients, followed by the identification of thrombospondin-type 1 domain containing 7A (THSD7A) as a second autoantigen in another group of 2-5% of patients. These discoveries not only gave a new molecular basis to better understand MN pathogenesis but also rapidly provided clinical assays to diagnose MN and monitor disease activity. Anti-PLA2R1 titers correlate with disease activity and have a prognostic value. Another major discovery was the identification of three distinct epitope-containing domains in PLA2R1-associated MN: CysR, CTLD1 and CTLD7. The severity of the disease and poor clinical outcome were found to be associated with multiple autoantibodies targeting these domains. These autoantibodies are likely produced by a mechanism of epitope spreading.

PLA2R1 is a 180 kDa glycosylated transmembrane receptor with a large extracellular region comprising 10 distinct domains: a cysteine-rich domain (CysR), a fibronectin type II domain (FnII) and eight different C-type lectin-like domains (CTLDs). PLA2R1 binds sPLA2 and inhibits their enzymatic activity, thereby playing a role in immune and inflammatory conditions. PLA2R1 may also act as a tumor suppressor in cancer. However, its biological function in podocytes is largely unknown.

The major aim of my thesis was to characterize the full set of PLA2R1 epitopes, and analyze their clinical relevance, in particular as predictors of clinical outcome and response to treatment. Using different molecular and cellular biology techniques, we have demonstrated that patients' autoantibodies can recognize multiple epitopes in up to 5 of the 10 PLA2R1 domains. Further screening of a cohort of 142 PLA2R1-associated MN patients by ELISA, with each of the 10 individual domains of PLA2R1 indicated different prevalence towards each domain. In this cohort, anti-PLA2R1 titer and epitope positivity appear as relevant biomarkers to predict clinical outcome and response to treatment. We also identified the CysR and CTLD1 domains as two alternative immunodominant epitope-domains, suggesting that the driving force of the autoimmune response may progress towards two different pathways. Of potential clinical interest, patients with a CysR

versus CTLD1 immunodominance had different response to treatment and clinical outcome. Together, this work provides a better understanding of the trajectory of the PLA2R1 autoimmune response within the pathogenesis of PLA2R1-associated MN, and might contribute to the development of specific diagnosis tests towards more personalized medicine.

Keywords: membranous nephropathy, PLA2R1, epitopes, immunodominance, diagnosis, prognosis

# Nadia FORMICOLA

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

Jeudi 10 Octobre 2019 à 14h00

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Remodelage des granules ARN en réponse à l'activité neuronale

devant le jury composé de :

Pr. Thomas LAMONERIE

Dr. Michael KIEBLER

Dr. Florence RAGE

Dr. Arnaud HUBSTENBERGER

Dr. Emmanuel PERISSE

Dr. Florence BESSE

Président du Jury

Rapporteur

Rapportrice

Examineur

Examineur

Directrice de Thèse

### Résumé

---

Le Une des questions les plus fascinantes – et les plus ouvertes – en neuroscience est de comprendre comment les cellules neuronales contribuent à la formation, le maintien puis le rappel des souvenirs. Des travaux antérieurs ont montré que la formation de la mémoire à long-terme (MLT) requiert la synthèse de novo de protéines, impliquant non seulement la traduction d'ARNs nouvellement transcrits, mais aussi la traduction locale, induite par l'expérience, d'ARNms latents transportés et stockés dans les synapses. En vue de leur transport et du contrôle de leur traduction, les ARNms sont empaquetés avec des protéines de liaison aux ARNs (RBP), qui sont majoritairement des répresseurs de traduction, dans des granules ribonucléoprotéiques (RNP). La manière dont les granules RNP neuronaux sont remodelés en réponse à l'activité neuronale pour lever la répression traductionnelle des ARNms est pour l'instant peu claire. En outre, l'impact fonctionnel d'un tel remodelage sur l'établissement de la MLT reste à démontrer in vivo. L'objectif de mon doctorat était 1) d'étudier les mécanismes in vivo qui sous-tendent le remodelage des granules RNP neuronaux ; 2) de tester l'hypothèse que les granules RNP pourraient être impliqués dans les mécanismes de renforcement de la MLT en régulant l'expression génétique. Dans cette optique, j'ai utilisé comme modèle des granules RNP contenant la RBP conservée Imp chez la drosophile. Tout d'abord, j'ai étudié l'impact de l'activité neuronale sur les propriétés des granules RNP Imp, en traitant des explants de cerveau soit avec du KCl, soit avec le

neuromodulateur Tyramine. Dans les deux cas, un désassemblage des granules RNP Imp - caractérisé par une dé-granulation à la fois de Imp et d'autres composants - est observé. Le désassemblage des granules RNP est réversible après retrait de la tyramine, et n'a pas été observé dans les neurones hyperpolarisés. Il ne dépend pas strictement du domaine de type prion qui se trouve à l'extrémité carboxy-terminale de Imp, un domaine connu pour être impliqué dans l'homéostasie des granules RNP. De plus, mes données suggèrent que ce désassemblage soit lié à une augmentation de la traduction des ARNm associés, ce qui est cohérent avec un modèle dans lequel le remodelage des granules RNP induit par l'activité des neurones induit une dé-répression de la traduction.

Ensuite, j'ai recherché les mécanismes contrôlant le remodelage des granules RNP. Un candidat pour cette régulation était CamkII, une kinase conservée activée par le calcium, et identifiée comme partenaire de Imp dans une analyse d'immunoprécipitation-spectrométrie de masse. Au cours de mon doctorat, j'ai pu valider l'interaction Imp-CamkII et montrer qu'elle n'est pas médiée par l'ARN, mais dépend de l'activité de CamkII. De plus, j'ai montré qu'inhiber l'activité de CamkII empêche le désassemblage des granules RNP Imp observé lors de l'activation neuronale, suggérant que CamkII pourrait être impliquée dans le remodelage des granules RNP Imp induit par l'activité neuronale. Ces résultats sont particulièrement intéressants dans le contexte de l'établissement de la MLT, car CamkII est depuis longtemps reconnue comme y étant essentielle. Plus encore, nous avons récemment démontré chez la drosophile qu'inactiver la fonction de Imp dans une population de neurones du cerveau central impliquée dans l'apprentissage et la mémoire - les neurones du Mushroom Body - altère radicalement la MLT. En conclusion, mes résultats sont cohérents avec un modèle où le remodelage des granules RNP Imp en réponse à l'activation neuronale dépend de CamkII, et pourrait contribuer à la formation de la MLT *in vivo*.

Mots Clefs : Drosophile, protéines de liaison à l'ARN, granules RNP neuronaux, activité neuronale, MLT

## Abstract

---

One of the most fascinating – and still open – questions in neuroscience is how neuronal cells can form, store and then recall memories. Previous work has shown that Long-term memory (LTM) formation requires *de novo* protein synthesis, involving not only translation of newly transcribed RNAs, but also local, experience-induced translation of quiescent mRNAs carried and stored at synapses. For their transport and translational control, mRNAs are packaged with regulatory RNA binding proteins (RBPs), mainly translational repressors, into ribonucleoprotein (RNP) granules. To date, how neuronal RNP granules are remodelled in response to neuronal activity to relieve translation repression of mRNAs is unclear. Furthermore, the functional impact of such a

remodelling in the establishment of long-term memories remains to be demonstrated in vivo. The objective of my PhD was to 1) investigate the in vivo mechanisms underlying activity-dependent remodelling of neuronal RNP granules; 2) test the hypothesis that RNPs could be involved in LTM-underlying mechanisms by regulating gene expression. To this end, I used as paradigm RNPs containing the conserved RBP Imp in *Drosophila*. First, I studied the impact of neuronal activity on Imp RNP properties by treating *Drosophila* brain explants with either KCl or the tyramine neuropeptide. In both cases, a disassembly of Imp RNPs was observed, characterized by a loss of both Imp and other RNP-component granular patterns, and a de-clustering of RNP-associated mRNA molecules. RNP disassembly could be reverted upon Tyramine withdrawal and was not observed in hyperpolarized neurons. Furthermore, my data suggest that RNP-disassembly is linked to increased translation of associated mRNAs, consistent with a model in which activity-induced RNP remodelling would lead to translational de-repression. Second, I investigated the mechanisms controlling RNP remodelling. A candidate regulator was CamkII, a conserved Ca<sup>2+</sup>-activated kinase identified as a partner of Imp in an IP-Mass Spectrometry analysis. During my PhD, I could validate the Imp-CamkII interaction and showed that it is not mediated by RNA but depends on CamkII activity. Furthermore, I showed that inactivating CamkII function prevents the disassembly of Imp RNPs observed upon neuronal activation of brain explants, suggesting that CamkII may be involved in the activity-dependent remodelling of Imp RNP granules. These results are particularly interesting in the context of establishment of LTM, as CamkII has long been recognized as essential for LTM. Moreover, we recently showed in *Drosophila* that interfering with Imp function in a population of CNS neurons involved in learning and memory – the Mushroom Body  $\gamma$  neurons -, dramatically impairs LTM and that this effect relies on Imp C-terminal Prion-like domain, a domain known to be involved in RNP homeostasis. Altogether, my thesis work suggests a model where CamkII-dependent remodelling of Imp RNPs in response to neuronal activation might underlie LTM formation in vivo.

Keywords: *Drosophila*, RNA binding proteins, neuronal RNP granules, neuronal activity, LTM

# Laïla GIORDANO

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

Lundi 16 Décembre 2019 à 14h00

Salle A010 - Institut Sophia Agrobiotech - SOPHIA ANTIPOLIS

## Le récepteur IOS1 d'*Arabidopsis thaliana* : modulateur de l'homéostasie protéique du réticulum endoplasmique en réponse au stress biotique

### devant le jury composé de :

Dr Béatrice BAILLY-MAITRE  
Dr. Sylvie GERMAN-RETANA  
Dr. Aurélien BOISSON-DERNIER  
Dr. Benoit LEFEBVRE  
Dr. Harald KELLER

Présidente du Jury  
Rapportrice  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de Thèse

### Résumé

---

Les cellules végétales possèdent un nombre éminent de récepteurs localisés à la membrane plasmique. Ils sont spécialisés dans la détection des changements environnementaux et permettent à la plante de s'adapter en conséquence. Environ 200 de ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire avec des répétitions riches en leucine (LRR) et d'un domaine kinase intracellulaire. Nous avons préalablement identifié un membre de cette famille de récepteurs chez *Arabidopsis*, qui contribue au succès d'infection par des agents pathogènes filamenteux biotrophes, comme l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*). Une plante mutante pour le gène du récepteur perd sa sensibilité à l'infection et d'après ce phénotype le récepteur a été nommé "Impaired Oomycete Susceptibility 1" (IOS1). IOS1 régule négativement la voie de signalisation à l'hormone acide abscissique (ABA) au cours de l'infection. De plus, il a été démontré que le récepteur fait partie d'un complexe de récepteurs du plasmalemme qui détecte les infections bactériennes et déclenche les réactions de l'immunité innée. La région extracellulaire de l'IOS1 contient un domaine supplémentaire appelé « Malectin-Like Domain » (MLD). Le MLD

présente de fortes similitudes structurales avec la malectine animale qui réside dans le réticulum endoplasmique (RE), où elle interagit avec les ribophorines du complexe oligosaccharyltransférase (OST). Les protéines de ce complexe assurent la maturation post-traductionnelle des protéines en ajoutant des N-glycosylations. Les ribophorines surveillent le repliement correct des glycoprotéines néo-synthétisées. Les changements environnementaux modifient fréquemment le taux de protéines produites qui nécessitent une maturation. Si le système de surveillance n'est pas efficace, des protéines néo-synthétisées s'accumulent dans le RE et génèrent l'« Unfolded Protein Response » (UPR). Le mécanisme de contrôle de la maturation des glycoprotéines et les mécanismes de l'UPR existent également chez les cellules végétales. Afin de caractériser les fonctions du domaine extracellulaire (ED) de l'IOS1, nous montrons par microscopie confocale à balayage laser que le MLD est le médiateur de la rétention du récepteur dans la RE. Ici, le MLD du récepteur atténue l'UPR déclenché par l'infection avec l'oomycète. Nous avons identifié la ribophorine végétale HAP6 et l'atténuateur de mort cellulaire Bax-Inhibitor-1 (BI-1) comme protéines résidant dans la RE qui interagissent avec l'ED de l'IOS1. Dans des expériences de complémentation fonctionnelle impliquant le mutant *ios1-1* transformé avec des domaines IOS1 individuels, nous avons évalué le rôle de IOS1 et du MLD dans les réponses d'*Arabidopsis* à la signalisation de stress. Nous montrons que le MLD atténue l'UPR pendant l'interaction plante-oomycète, favorisant ainsi une infection réussie. Nous montrons également que la signalisation ABA est en corrélation positive avec l'UPR, indiquant que l'interférence de IOS1 avec la signalisation hormonale est une conséquence de l'interférence avec l'UPR. Ensemble, nos données suggèrent que les différents domaines du récepteur IOS1 ciblent des fonctions distinctes dans différents compartiments subcellulaires.

Mots clés : Interaction Plante-Agent Pathogène, Récepteur LRR-RLK, Domaine Malectin-Like, Stress du Réticulum Endoplasmique, UPR, Ribophorine, Bax Inhibitor-1, Signalisation ABA.

## Abstract

---

Plant cells have a diversifying number of plasma membrane-localized receptors, which are specialized in detecting environmental changes and allow the plant to adapt accordingly. About 200 of these receptors are composed of an extracellular domain with leucine-rich repeats (LRR) and an intracellular kinase domain. We have previously identified a member of this receptor family in *Arabidopsis*, which contributes to the infection success by biotrophic filamentous pathogens, such as the oomycete *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*). The plant mutant for the receptor gene loses its susceptibility to infection, and according to this phenotype the receptor has been named "Impaired Oomycete Susceptibility 1" (IOS1). IOS1 negatively regulates the abscisic acid (ABA) hormone signaling pathway upon infection. In addition, the receptor has been shown to be part of a plasma membrane receptor complex that detects bacterial infections and triggers innate immunity. The extracellular region of IOS1 harbors an additional so-called Malectin-Like Domain

(MLD), which has strong structural similarities to animal malectin. Animal malectin resides in the endoplasmic reticulum (ER), where it interacts with ribophorins from the oligosaccharyltransferase (OST) complex. Proteins from this complex ensure post-translational protein maturation by adding N-glycosylations. Ribophorins monitor the correct folding of neo-synthesized glycoproteins. Environmental changes frequently alter the rate of proteins that are produced and require maturation. If monitoring system is not efficient, neo-synthesized proteins accumulate in the ER and generate the "Unfolded Protein Response" (UPR). The mechanism for controlling glycoprotein maturation and the UPR also exist in plant cells. In order to characterize the functions of the extracellular domain (ED) of IOS1, we show by confocal laser-scanning microscopy that the MLD mediates a retention of the receptor in the ER. Here, the MLD of the receptor attenuates the UPR, which is triggered by the oomycete infection. We identified the plant ribophorin HAP6 and the cell death attenuator Bax-Inhibitor-1 (BI-1) as ER-residing proteins that interact with the ED of IOS1. In functional complementation experiments involving the *ios1-1* mutant transformed with individual IOS1 domains, we further evaluated the role of IOS1 and the MLD in the plant responses to ER and ABA stress signaling. We show that the MLD attenuates the UPR during the plant-oomycete interaction, thus promoting successful infection. We also show that ABA signaling correlates positively with the UPR, indicating that the observed IOS1-mediated regulation of hormone signaling is a consequence of interference with the UPR. Taken together, our data suggest that individual domains of the IOS1 receptor target distinct functions in different subcellular compartments.

Keywords: Plant-Pathogen Interaction, LRR-RLK Receptor, Malectin-Like Domain, Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, Ribophorin, Bax Inhibitor-1, ABA signaling

# Maria João GONÇALVES MAIA

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

Vendredi 14 Juin 2019 à 14h00

Faculté de Médecine - Nice

## Le syndrome Xeroderma Pigmentosum : Un nouveau modèle pour l'étude du rôle des fibroblastes dans la modulation de la réponse immunitaire innée contre les cellules cutanées cancéreuses

devant le jury composé de :

Dr Véronique BRAUD	Présidente de Jury
Pr. Marie-Dominique GALIBERT	Rapportrice
Pr. Alain SARASIN	Rapporteur
Pr. Alexander STEINLE	Examineur
Dr. Thierry MAGNALDO	Directeur de thèse

### Résumé

---

L'étiologie des cancers cutanées est liée à des mutations génétiques résultant de l'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) émis par le soleil. La propagation des cellules cancéreuses dépend aussi des interactions avec les cellules présentes dans le microenvironnement circulant, notamment des fibroblastes associés au cancer (FAC) et des cellules immunitaires. Xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie génétique qui comprend 7 groupes de complémentation génétique (XP-A à XP-G). Les patients XP présentent une déficience du mécanisme de réparation des lésions de l'ADN provoquées par les UV. Ces patients sont susceptibles au développement précoce de très nombreux cancers cutanées. XP-C est le groupe de complémentation le plus représenté en Europe. Chez ces patients, les carcinomes spino-cellulaires (CSC) sont plus fréquents que les carcinomes baso-cellulaires (CBC) (taux 5 : 1). Les CSC ont un potentiel métastatique plus élevé que les CBC. Des travaux précédents ont suggéré que la réponse immunitaire chez les patients XP pouvait être altérée, incluant un déficit de l'activité cytolytique des cellules Natural Killer (NK) et une diminution du nombre des lymphocytes T circulants.

L'objectif central de cette thèse était, d'identifier des facteurs du microenvironnement impliqués dans la progression des cancer cutanées agressifs, en prenant comme modèle de susceptibilité au cancer, des cellules de patients XP-C. Une analyse transcriptomique comparant les fibroblastes WT et des patients XP-C a permis d'identifier que CLEC2A, un ligand activateur du récepteur NKp65 des cellules NK, est exprimé par les fibroblastes WT mais pas par les fibroblastes XP-C. Nos travaux ont pu montrer une diminution du niveau d'expression de CLEC2A au cours de la sénescence répliquative ; une absence dans les FAC et dans les CSC et que, des facteurs solubles sécrétés para

les CSC diminuent l'expression de CLEC2A. Ces résultats suggèrent que la perte de CLEC2A peut induire un déficit d'activation des cellules NK au sein du microenvironnement tumoral et dans les dermes des patients XP-C. Par la suite, nous avons élaboré un modèle de culture de peau 3D, dans lequel nous avons introduit des cellules NK, en présence ou absence d'anticorps bloquants CLEC2A. Ce modèle nous a permis de montrer que l'interaction CLEC2A/NKp65 régule l'invasion des CSC via un dialogue entre fibroblastes et cellules NK. Nos résultats suggèrent que l'expression de CLEC2A dans les fibroblastes WT contribue à la surveillance immunitaire dans la peau et que son absence, par des facteurs encore inconnus, favorise le développement des cancers agressifs chez les patients XP-C. CLEC2A peut être une cible dans le combat contre la progression des CSC.

Mots Clefs : Xeroderma pigmentosum; carcinomes spino-cellulaires ; microenvironnement tumoral ; surveillance immunitaire ; CLEC2A

## Abstract

---

Skin cancer etiology is related to genetic mutations arising after ultraviolet (UV) sun exposure. The propagation of cancer cells is also dependent of a crosstalk with cells present in the surrounding microenvironment, mainly cancer associated fibroblasts (CAF) and immune cells. Xeroderma pigmentosum (XP) is a genetic disease that comprises seven groups of genetic complementation (XP-A to XP-G). XP patients present a default in the mechanism responsible for the repair of UV-induced DNA lesions. They are prone to develop skin cancers with high frequencies early in their life. XP-C is the most represented complementation group in Europe and in XP-C patients squamous cell carcinoma (SCC) are more frequent than basal cell carcinoma (BCC) (ratio 5:1). SCC have high metastatic potential compared to BCC. Previous studies suggested that the immune responses in XP patients could be altered with defects in their NK lytic activity and a decrease in the levels of circulating T lymphocytes.

The main objective of this thesis was to identify microenvironment factors that could contribute to the progression of aggressive skin cancers using XP-C disease cells as a model of skin cancer susceptibility. Comparative transcriptomic analysis of WT and XP-C dermal patient's fibroblasts revealed that CLEC2A, a ligand of the activating NK receptor NKp65 implicated in the activation of the innate immune system, is expressed in WT fibroblasts and absent in XP-C fibroblasts. Additional work showed that CLEC2A level is decreased in WT fibroblasts during replicative senescence, is absent in CAF and SCC, and is downregulated by soluble factors secreted by SCC cells. These results suggest that the loss of CLEC2A may induce a deficit of NK cell activation in the tumor microenvironment of SCC and in the dermis of XP-C patients. Elaboration of 3D skin culture models including NK cells and, in the presence or absence of blocking anti-CLEC2A antibody, allowed us to show that CLEC2A/NKp65 interaction regulates SCC cell invasion through a crosstalk between fibroblasts and NK cells. Our results suggest that the expression of CLEC2A in fibroblasts contributes to skin immune surveillance while, conversely, its absence under yet unidentified factors, favors the development of aggressive cancers in XP-C patients. CLEC2A could be a potential target in the fight against SCC progression.

Keywords: Xeroderma pigmentosum; squamous cells carcinoma; tumoral microenvironment; immune surveillance; CLEC2A

# Anaëlle GRABEK

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

Mardi 16 Avril 2019 à 9h00

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Dimorphisme sexuel du cortex surrénalien dans le renouvellement cellulaire et les pathologies

(The adrenal cortex exhibits sexually dimorphic tissue renewal  
and disease development)

devant le jury composé de :

Pr. Nick HASTIE

Rapporteur

Dr. Amanda SWAIN

Rapportrice

Pr. Serge NEF

Examineur

Dr. Andreas SCHEDL

Directeur de Thèse

Dr. Marie-Christine CHABOISSIER

Directrice de Thèse

### Résumé

---

Des différences importantes sont observées dans la prévalence des maladies du cortex surrénalien entre hommes et femmes. En particulier les femmes ont jusqu'à 6 fois plus de probabilités de développer un cancer de la corticosurrénale que les hommes. Malgré cela, les différences et similitudes du renouvellement cellulaire dans le cortex surrénalien ont jusqu'à présent été peu étudiées. La glande surrénale est un organe essentiel au maintien de l'homéostasie corporelle qu'elle régule grâce à la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Elle est composée d'une médulla et d'un cortex qui est sous-divisé en plusieurs couches concentriques, de la plus externe à la plus interne : la zone glomérulée, la zone fasciculée et enfin la zone X chez la souris. Le cortex surrénalien est de plus enrobé d'une capsule et d'un mésenchyme. Tout au long du stade adulte, il subit un renouvellement cellulaire important avec des cellules progénitrices localisées au sein de la zone glomérulée qui sont capables de se renouveler et de générer de nouvelles cellules stéroïdogéniques qui vont ensuite migrer de façon centripète puis entrer en apoptose lorsqu'elles atteignent la médulla. Au cours de mes travaux de thèse, j'ai pu mettre en évidence la présence

d'un renouvellement cellulaire important du cortex surrénalien et sexuellement dimorphe avec un cortex renouvelé en 3 mois chez la femelle et environ 9 mois chez le male. De plus, alors que le renouvellement cellulaire du male repose sur les cellules progénitrices présentes dans la zone glomérulée, chez les femelles, le cortex recrute également des cellules de la capsule. Enfin, des expériences avec des modèles d'inversion de sexe, des gonadectomies et des traitements à la dihydrotestostérone ont pu identifier un effet inhibiteur des androgènes sur le recrutement et la prolifération des cellules progénitrices de la capsule. En parallèle, j'ai étudié un modèle murin exprimant *Rspo1* de façon ectopique dans les cellules stéroïdogéniques. L'analyse de ce modèle a permis de mettre en évidence le développement, chez ces souris, d'hyperplasie précoce du cortex surrénalien et le développement de tumeurs corticosurréaliennes avec l'âge, phénotype qui s'est avéré être nettement plus prononcé chez les femelles à partir de la puberté. De plus, les males présentent des signes de dégénération cellulaire dès 6 semaines d'âge avec l'apparition de cellules vacuolisées. Ensemble, ces résultats mettent en avant de profondes différences entre mâles et femelles dans l'homéostasie cellulaire du cortex surrénalien et le développement de phénotypes, différences qui pourraient être à l'origine des prévalences plus importantes chez les femmes du développement des maladies de la corticosurrénale.

Mots clés : Glande surrénale, renouvellement cellulaire, hormones sexuelles, cellules progénitrices

## Abstract

---

Significant differences between men and women are observed in terms of prevalence to adrenal cortical diseases. In particular, women are up to 6 times more likely than men to develop tumors of the adrenal cortex. Despite those striking disparity, differences and similarities in adrenal cortex renewal between sexes have yet to be investigated. The adrenal gland is a vital organ maintaining body homeostasis through the secretion of steroid hormones. It is composed of two endocrine glands, the medulla and the cortex, that is further divided into concentric zones, from the outer to the inner: the zona glomerulosa, the zona fasciculata and a zona reticularis in human or an X-zone in mice. The cortex is surrounded by a capsule that is further enveloped by a layer of mesothelial cells. In the adult stage, the adrenal cortex undergoes constant cellular renewal. Progenitor cells, located in the outer cortex, proliferate and give rise to new steroidogenic cells that centripetally migrate within the cortex, transdifferentiating along the way until they reach the border with the medulla and enter into apoptosis. During my thesis, I have shown that cell renewal in the adrenal cortex is highly sexually dimorphic with the female cortex being fully replaced in less than 3 months, while in males tissue renewal takes about 9 months. In addition, while male cortical renewal relies on progenitors located in the zona glomerulosa, the female cortex also recruits cells from the capsule to replenish the steroidogenic cell population. Finally, using sex reversal mouse models, gonadectomy and dihydrotestosterone treatments, I have identified an inhibitory role of male androgens on the proliferation and recruitment of capsular cells. In parallel, I have also studied a mouse model ectopically expressing *Rspo1* in steroidogenic cells. Careful analysis of this

model has evidenced the development of cortical hyperplasia and tumors in aging mice, a phenotype that was found to be significantly more pronounced in female than male. In addition, while male adrenals show signs of cellular degeneration in the adrenal cortex as early as 6 weeks of age, this histology is only observed in females of 12 months of age. Together, these results highlight profound differences between male and female in tissue homeostasis and phenotype development. These differences could offer an explanation to the unequal prevalence to adrenal diseases in men and women.

Keywords: Adrenal gland, tissue homeostasis, sex hormones, progenitor cells

# Simon HEEKE

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

Vendredi 6 Décembre 2019 à 14h30

Amphithéâtre - Centre Antoine Lacassagne - Nice

## Développement et implémentation de nouveaux biomarqueurs prédictifs dans le cancer du poumon non à petites cellules - du tissu à la biopsie liquide

### devant le jury composé de :

Dr Nathalie MAZURE	Présidente du Jury
Dr. Catherine ALIX-PANABIERES	Rapportrice
Pr. Benjamin BESSE	Rapporteur
Prof. Angela MÄRTEN	Examinatrice
Prof. Albrecht STENZINGER	Examineur
Pr. Paul HOFMAN	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Le cancer du poumon est la principale cause de décès liés au cancer dans le monde, tant chez les hommes que chez les femmes. Cependant, le traitement du cancer du poumon a radicalement changé au cours de ces dernières années avec la mise en place de chimiothérapies plus efficaces, mais surtout le développement de traitements ciblés qui permettent une approche thérapeutique personnalisée et avec l'introduction de l'immunothérapie qui a considérablement prolongé la survie de certains patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Bien que ces nouvelles approches thérapeutiques aient permis d'obtenir des réponses parfois spectaculaires, un nombre assez important de patients sont réfractaires à ces traitements. Dans ce contexte, le développement de nouveaux biomarqueurs permettant de sélectionner le meilleur traitement pour le bon patient et au bon moment est crucial pour améliorer les résultats cliniques des patients atteints de CPNPC. Tous les biomarqueurs actuellement à l'étude ne sont pas en mesure d'améliorer cette prédiction, en particulier, la mise en place de certains biomarqueurs en routine clinique est souvent difficile, alors que les résultats préliminaires obtenus in vitro ou même

dans les essais cliniques initiaux étaient prometteurs. L'objectif de la thèse a été d'évaluer et d'implémenter de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie et aux thérapies ciblées pour la sélection thérapeutique des patients atteints de CPNPC. Dans la première partie de la thèse, est abordé l'importance des biobanques et de la maîtrise des ressources biologiques comme pierre angulaire du développement de ces nouveaux biomarqueurs. Nous avons mis en place un mode de fonctionnement qui permet d'entreposer en toute sécurité des collections biologiques d'intérêt et de les utiliser pour les études de recherche de biomarqueurs. Nous décrivons comment une biobanque dédiée à une seule pathologie peut être instaurée et utilisée à des fins de recherche.

Au cours de cette thèse est abordée l'évaluation génomique de l'ADN libre plasmatique (cell-free DNA : cfDNA) pour la détection des mutations spécifiques du récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal growth Factor Receptor : EGFR) est étudiée et évaluée. Nous avons analysé rétrospectivement 324 patients sur une période de trois ans à partir de trois tests biologiques utilisés en routine clinique et nous avons pu démontrer que ces tests sont très « robustes » mais doivent être étroitement contrôlés afin d'éviter de faux résultats positifs ou négatifs. Nous avons ensuite évalué le séquençage à haut débit de l'ADN plasmatique chez ces patients à l'aide d'un test interne développé au laboratoire et d'un test externe et nous avons pu démontrer que ces deux tests étaient fiables pour la détection des altérations génomiques du plasma en routine clinique. Dans la dernière partie de la thèse, je décris comment l'évaluation de grands panels de séquençage ciblés capables d'évaluer la charge tumorale mutationnelle peut être utilisée pour sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une immunothérapie anti-tumorale et quels pièges doivent être évités afin d'utiliser ce biomarqueur en routine clinique. En résumé, cette thèse montre la place croissante des nouveaux biomarqueurs permettant la stratification des patients atteints CPNPC pour adapter rapidement leur traitement et décrit les différentes étapes de l'implémentation de ces biomarqueurs tissulaires et circulants dans les soins cliniques courants.

Mots clé : Biobanque, biopsie liquide, CPNPC, charge mutationnelle, thérapie ciblée

## **Abstract**

---

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide for both men and women. However, the treatment of lung cancer has changed radically in recent years with the introduction of more effective chemotherapies, but above all the development of targeted treatments that allow a personalized therapeutic approach and the introduction of immunotherapy that has considerably prolonged the survival of some patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Although these new therapeutic approaches have made it possible to obtain sometimes spectacular responses, a fairly large number of patients are resistant to these treatments. In this

context, the development of new biomarkers to select the best treatment for the right patient at the right time is crucial to improving clinical outcomes for NSCLC patients. Nevertheless, not all biomarkers currently under study are able to improve this prediction, in particular, the implementation of some biomarkers in clinical routine is often difficult, whereas preliminary results obtained in vitro or even in initial clinical trials were promising. The objective of the thesis was to evaluate and implement new biomarkers that predict the response to immunotherapy and targeted therapies for the therapeutic selection of NSCLC patients. The first part of the thesis discusses the importance of biobanks and the control of biological resources as a cornerstone for the development of these new biomarkers. We have implemented an operating procedure that allows us to safely store biological collections of interest and use them for biomarker research studies. We describe how a biobank dedicated to a single pathology can be established and used for research purposes. Additionally, the genomic evaluation of cell-free DNA (cfDNA) for the detection of specific mutations of the Epidermal growth Factor Receptor (EGFR) is studied and evaluated. We retrospectively analyzed 324 patients over a three-year period from three biological tests used in routine clinical practice and were able to demonstrate that these tests are very robust but must be closely controlled to avoid false positive or negative results. We then evaluated the next-generation sequencing (NGS) of plasma DNA using an internal test developed in the laboratory and an external test and were able to demonstrate that both tests were reliable for the detection of genomic alterations in plasma in clinical routine. In the last part of the thesis, I describe how the evaluation of large targeted sequencing panels capable of assessing mutation tumor load can be used to select patients for anti-tumor immunotherapy and what pitfalls should be avoided in order to use this biomarker in clinical routine. In summary, this thesis demonstrates the importance of novel biomarkers for the stratification of patients undergoing therapy in NSCLC and contributed to the implementation of tissue and liquid biopsy-based biomarkers in routine clinical care.

Key words: Biobanking, liquid biopsy, NSCLC, tumor mutational burden, targeted therapy

# Sokchea KHOU

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Jeudi 18 Mars 2019 à 13h30

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

## Contribution des neutrophiles infiltrant les tumeurs dans la progression des carcinomes épidermoïdes cutanés

### devant le jury composé de :

Pr. Paul HOFMAN

Dr. Catherine PAUL

Dr. Antonio SICA

Dr. Marie-Cécile MICHALET

Dr. Julien CHERFILS

Dr. Véronique BRAUD

Président du Jury

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de Thèse

### Résumé

---

Les carcinomes cutanés constituent les cancers les plus fréquents chez l'homme et leur incidence est en constante croissance. Il en existe deux principaux types: les carcinomes baso-cellulaires et les carcinomes épidermoïdes. Les facteurs de risque sont principalement l'exposition aux rayons UV et l'immunosuppression. Ils sont traités par chirurgie ou par radiothérapie mais peuvent parfois évoluer vers des formes incurables. De nouvelles alternatives thérapeutiques sont donc nécessaires.

L'immunothérapie est une récente révolution dans le traitement des cancers qui vise à réactiver l'immunité des patients cancéreux. Les carcinomes cutanés pourraient en bénéficier car ils se développent lors de situations d'immunosuppression.

L'immunosurveillance implique à la fois les cellules immunitaires et le microenvironnement tumoral comme le stroma. Lorsque les réponses anti-tumorales, notamment médiées par les lymphocytes T CD8+ sont efficaces, on parle de phase d'élimination. Puis vient une phase d'équilibre où la tumeur reste stable et enfin, lors de la phase finale d'échappement, des mécanismes d'immunosuppression permettent à la tumeur de croître.

Les neutrophiles, des cellules immunitaires de type myéloïde, sont recrutées très rapidement aux sites d'inflammation et au sein des cancers. Une méta-analyse récente sur 39 types de cancers

humains a pu associer ces cellules aux plus mauvais pronostics cliniques. Elles sont impliquées dans des fonctions anti-tumorales et pro-tumorales. Cette polarisation semble induite respectivement par l'interféron de type I et le TGF- $\beta$ . Leur rôle lors de cancers et en particulier dans les carcinomes cutanés reste encore largement incompris. Notre objectif a été de caractériser les fonctions des neutrophiles et leur contribution au développement des carcinomes épidermoïdes.

Pour cela, nous avons utilisé premièrement, un modèle de carcinogénèse cutanée chimio-induite. La tumorigénèse est séquentielle et donc très représentative du carcinome cutané chez l'homme. Dans ce modèle, nous observons une infiltration massive des neutrophiles au stade précancéreux et cancéreux. Une analyse de l'expression génique des neutrophiles isolés des lésions précancéreuses et cancéreuses et des peaux environnant ces lésions a été réalisée, qui montre une signature génique spécifique des neutrophiles des lésions, comparée aux peaux environnantes. Des comparaisons d'expression génique différentielle illustrent que les neutrophiles des lésions possèdent des fonctions pro-tumorales comparés aux neutrophiles des peaux.

Deuxièmement, nous avons mis en place un modèle de greffe intradermique d'une lignée de carcinome épidermoïde. Une déplétion spécifique des neutrophiles retarde significativement la croissance tumorale, ce qui confirme le caractère pro-tumoral des neutrophiles. Nous avons caractérisé les mécanismes mis en jeu, qui incluent la génération de ROS et iNOS favorisant la croissance tumorale et une suppression de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T CD8+ anti-tumoraux. Les neutrophiles produisent de l'arginase 1 qui dégrade l'arginine et inhibe la prolifération des lymphocytes T. Par ailleurs, l'environnement tumoral induit l'expression de PD-L1 en surface des neutrophiles et de PD-1 en surface des lymphocytes T CD8+ et CD4+. Ceci suggère que l'interaction PD-L1/PD-1 contribue à l'immunosuppression. De plus, une corrélation positive et significative a été observée entre la taille des tumeurs et la fréquence des neutrophiles exprimant PD-L1 au sein de ces tumeurs.

Au vu de ces résultats, il semble intéressant d'évaluer les immunothérapies bloquant l'interaction PD-L1/PD-1 dans le traitement des carcinomes cutanés. Ces traitements pourraient être combinés avec ceux qui bloquent le recrutement ou les fonctions des neutrophiles. Il reste à évaluer si la fréquence de neutrophiles exprimant PD-L1 peut être un bon marqueur de prédiction de la réponse aux immunothérapies anti-PD-L1 ou anti-PD-1.

Mots clés : Carcinomes cutanés, Neutrophiles, Protumoral, Immunosuppression, PD-L1, PD-1, Transcriptome

## Abstract

---

Non-melanoma skin carcinomas are the most frequent cancers in Human and their incidence is constantly increasing. Two main types exist: the cutaneous basal cell carcinoma (cBCC) and the cutaneous squamous cell carcinomas (cSCC). Risk factors include sun radiation and immunosuppression. These cancers are mainly treated with surgery and radiotherapy but they can reach an incurable stage. For this reason, novel therapeutic alternatives are needed. At present, immunotherapies constitute a revolution in the treatment of cancers. Its mechanism of action relies on the stimulation of the immune system of cancer patients, so that they develop efficient anti-tumoral immune responses. cSCC may benefit from this type of treatment as they generally develop in the context of an immunosuppression.

Immune surveillance involves both immune cells and the tumor microenvironment, in particular the stroma. During the elimination phase, the anti-tumoral responses, mediated mainly by CD8+ T lymphocytes, are efficient. Then, there is an equilibrium phase in which the tumor is stable before the escape phase, when the tumor can evade immune surveillance and grow. Our research interest focused on neutrophils, a subset of myeloid cells that are very rapidly recruited to the sites of inflammation and inside tumors. A recent meta-analysis of 39 human malignancies showed that neutrophils are associated with the worst clinical outcome. Neutrophils harbor both anti- and pro-tumoral functions. This polarization seems to be dependent on type I interferon and TGF- $\beta$ , respectively. It remains to establish the exact role played by neutrophils in cancer and specifically in skin carcinomas. The aim of our research was to further characterize the functions and the contribution of neutrophils to the development of cutaneous squamous cell carcinomas.

We first used a chemically-induced skin carcinoma mouse model that recapitulates the different stages of skin carcinoma development in Human. In this model, we saw a massive infiltration of neutrophils at the precancerous and cancerous stages. We performed transcriptomic analysis of highly purified neutrophil populations from precancerous, cancerous lesions and from the surrounding skin controls. These data revealed a specific gene signature in neutrophils from lesions compared to surrounding skins. Differential gene expression analysis identified a pro-tumoral phenotype for neutrophils infiltrating lesions compared to skins.

In a second approach, we studied the growth of a cSCC cell line grafted in the dermis of mice. Specific depletion of neutrophils significantly delayed tumor growth, thus indicating that neutrophils were pro-tumoral. Mechanisms of action included the production of ROS and NO that favor tumor growth and the immune suppression of anti-tumoral responses mediated by tumor-associated CD8+ T cells. In the tumor, neutrophils produced arginase 1 which catalyzes the degradation of arginine, thus inhibiting the proliferation of CD8+ T cells.

In addition, we found that the tumor microenvironment induced PD-L1 expression at the cell surface of neutrophils and concomitantly, PD-1 on CD8+ and CD4+ T cells. These results suggested that PD-L1/PD-1 interaction triggers immune suppression and contributes to SCC progression.

Indeed, a positive and significant correlation was observed between tumor size and frequencies of PD-L1-expressing neutrophils inside tumors.

Collectively, these results suggest that it is relevant to assess immunotherapies that block PD-L1/PD-1 interaction for the treatment for cSCC. These approaches could be combined with treatments that aim to block the recruitment or inhibit neutrophils. Moreover, it remains to evaluate whether the frequency of PD-L1-expressing neutrophils could constitute a good predictive marker of the response to anti-PD-L1 and anti-PD-1 immunotherapies.

Keywords: Cutaneous squamous cell carcinomas, Neutrophils, Protumoral, Immunosuppression, PD-L1, PD-1, Transcriptomic analysis

# Chami KIM

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

Vendredi 22 Mars 2019 à 13h00

Institut Sophia Agrobiotech - SOPHIA ANTIPOLIS

## Réponse immunitaire de la drosophile à la guêpe endoparasitoïde *Leptopilina boulardi* : caractérisation d'une réaction de résistance

devant le jury composé de :

Dr. Michèle CROZATIER  
Pr. Istvan ANDO  
Dr. Bernard CHARROUX  
Dr. Raphaël ROUSSET  
Pr. Marylene POIRIE  
Dr. Jean-Luc GATTI

Présidente du Jury  
Rapportrice  
Rapporteur  
Examineur  
Directrice de Thèse  
Directeur de Thèse

### Résumé

---

*Drosophila melanogaster* est un modèle majeur en biologie, notamment l'immunité et l'évolution.

L'immunité innée de la drosophile a été très étudiée dans le cadre de la réponse contre les bactéries et les champignons, mais on en sait moins sur la défense contre les guêpes endoparasitoïdes dont le développement à l'intérieur de l'insecte hôte entraîne sa mort. L'une des interactions les plus étudiées entre drosophiles et guêpes parasites implique *Leptopilina boulardi* qui pond des œufs à l'intérieur des larves hôtes et se développe à leurs dépens. Une fois que l'œuf parasitoïde a été reconnu comme un envahisseur étranger, la larve de drosophile peut déclencher une réponse immunitaire qui mène à l'encapsulation : l'œuf est entouré de plusieurs couches d'hémocytes. La capsule ainsi formée est mélanisée et il y a formation d'espèces réactives de l'oxygène qui participe à la mort du parasitoïde. Alternativement, la réponse immunitaire peut être contournée grâce aux composants du venin injectés par la guêpe femelle en même temps que l'œuf.

Nous avons utilisé deux souches de drosophile, résistante et sensible à *L. boulardi*, ne différant que par une région du chromosome 2R contenant un gène de résistance majeur. La résistance s'est révélée être monogénique, avec deux allèles, l'allèle de résistance étant dominant (R<sub>1b</sub>+ > R<sub>1b</sub>-). L'équipe avait précédemment identifié *edl* / *mae* (allèles R et S) en tant que gène candidat. Mae

(modulateur de l'activité d'ETS) ou edl (ETS-domain lacking) a été décrit comme un médiateur de facteurs de transcription de la famille de l'ETS (E26 transformation-specific) chez la drosophile. Mae interagit avec les facteurs de transcription via son domaine SAM (Steril Alpha Domain), un domaine d'interaction protéine-protéine.

Les objectifs de ma thèse étaient de déchiffrer le rôle possible d'edl/mae et d'identifier les événements moléculaires et cellulaires conduisant au succès ou à l'échec de l'encapsulation. J'ai utilisé diverses approches allant de la génétique des mouches à la cytométrie en flux.

L'implication de edl/mae dans la résistance de la drosophile a été confirmée par surexpression et interférence d'expression de mae. La surexpression de l'allèle résistant dans un fond sensible conduit à un phénotype résistant. L'interférence de l'expression de l'allèle sensible entraîne une augmentation du taux d'encapsulation de parasitoïde. Au niveau cellulaire, une augmentation du nombre d'hémocytes après le parasitisme s'est produite plus tôt dans la souche résistante que dans la souche sensible. Il a également été observé que la glande lymphatique des larves résistantes éclate avant celle des larves sensibles. Au niveau moléculaire, des interactants potentiels de mae ont été identifiés *in silico* et 2 ont été testés en utilisant l'interférence de leur expression qui a conduit à l'observation une augmentation de l'encapsulation.

Dans l'ensemble, un acteur clé du mécanisme de résistance de la drosophile à la guêpe parasite a été identifié au cours de ce travail et permet d'ouvrir des pistes pour des travaux futurs sur le mécanisme de régulation de la réponse au niveau moléculaire.

Mots Clefs : drosophile, parasitoïde, résistance, encapsulation, immunité

## Abstract

---

*Drosophila melanogaster* is a main model in biology, notably immunity and evolution.

Although the *Drosophila* innate immune processes to fight bacteria and fungi have largely been explored, less is known of the defence against endoparasitoid wasps whose successful development inside the insect host leads to its death. One of the most studied *Drosophila* – parasitoid wasp interaction involves *Leptopilina boulardi* that lays eggs inside host larvae and develop at their expense. Once the parasitoid egg has been recognized as a foreign invader, the *Drosophila* larva can mount a successful immune response, the encapsulation: the egg is surrounded by several layers of hemocytes and there is an increase of a specific types of hemocytes, the lamellocytes. The so-formed capsule is melanised and there is formation of reactive oxygen species, which kills the parasitoid. Alternatively, the immune response can be circumvented thanks to the venom components injected by the female wasp together with the egg.

Using two *Drosophila* strains, resistant and susceptible to *L. bouhardi*, which differ only in a region of chromosome 2R containing a major resistance gene. The resistance was found to be monogenic, with two alleles, the resistance allele being dominant (R1b+>R1b). The team previously identified *edl/mae* (R and S alleles) as a candidate gene. *Mae* (Modulator of the Activity of ETS) or *edl* (ETS-domain lacking) was described as a mediator of specific transcription factors of the ETS (E26 transformation-specific) family in *Drosophila*. *Mae* interacts with transcription factors through a SAM (Steril Alpha Domain), a protein – protein interaction domain. *Mae* is known to regulate *yan* and *pnt* P2 transcription factors during the eye development and *yan* and *pnt* P2 appear to have a role during haematopoiesis.

The objectives of my thesis were to decipher the possible role of *edl/mae* and identify the molecular and cellular events leading to success or failure of encapsulation. I used various approaches from fly genetics to flow cytometry.

The involvement of *edl/mae* in *Drosophila* resistance was confirmed by using overexpression and interference of *mae* expression. The overexpression of the resistant allele in a susceptible background leads to a resistant phenotype. The interference of the expression of the susceptible allele results in an increased rate of parasitoid encapsulation. At the cellular level, an increase in the number of hemocytes after parasitism occurred earlier in the resistant strain than in the susceptible strain. It was also observed that the hematopoietic lymph gland of the resistant larvae busted before the one of the susceptible larvae. At the molecular level, potential interactants of *mae* were identified *in silico* and 2 were tested using interference of their expression which led to observing an increase of encapsulation.

Overall, a key player in the resistance mechanism of the *Drosophila* to the parasitic wasp have been identified during this work and it lays the path for future work on regulation mechanism of the response at the molecular level.

Keywords : *Drosophila*, parasitoid, resistance, encapsulation, immunity

# Sanya-Eduarda KUŽET

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

Vendredi 22 Mars 2019 à 14h00

Amphithéâtre 4 - Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement - Nice

## Etude du role de la rigidité matricielle dans la résistance des cellules de carcinomes squameux aux thérapies anti-cancéreuses

### devant le jury composé de :

Dr. Guerrino MENEGUZZI	Président du Jury
Dr. Danijela VIGNJEVIĆ	Rapportrice
Dr. Céline GONGORA	Rapportrice
Dr. Sophie TARTARE-DECKERT	Examinatrice
Dr. Frédérique FALLONE	Examinatrice
Dr. Cédric GAGGIOLI	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Les carcinomes Dans notre modèle de carcinome épidermoïde humain de la tête et du cou (HNSCC), si l'on observe une surexpression du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) dans plus de 15 % des cas, les cellules cancéreuses (SCC) sont réfractaires à un traitement par des inhibiteurs de l'activité Tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR TKI) tels que le Géfitinib et l'AG1478. A ce jour, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la résistance des HNSCC aux EGFR TKI sont encore inconnus. On sait aujourd'hui que les niches tumorales jouent un rôle crucial dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels et que les fibroblastes associés au cancer (CAF) présents dans ces niches, participent très certainement à ce processus. Les CAF sont notamment responsables de la fibrose du tissu tumoral et d'un remodelage excessif de la matrice extracellulaire (MEC) aboutissant à une augmentation de sa rigidité. Dans les cellules de carcinome, l'adhésion sur un substrat rigide déclenche des voies de signalisation intracellulaires mécano- dépendantes qui favorisent la résistance des tumeurs aux chimiothérapies conventionnelles.

Mes travaux démontrent que la rigidification de la MEC est responsable d'une augmentation significative de la survie des cellules de carcinome épidermoïde (SCC) en réponse aux traitements par des ITK de l'EGFR, aux chimiothérapies conventionnelles ou à une combinaison des deux.

Comparé à des cellules ensemencées sur matrice molle, des cellules cultivées sur matrice rigide survivent mieux (+60%) au traitement avec le Gefitinib (EGFR TKI). Le même effet a été observé sur une matrice dérivée de CAF dont on sait qu'elle est plus rigide que celle dérivée de fibroblastes isolés d'une peau normale. Une analyse plus poussée a révélé une induction partielle de la transition épidermo-mésenchymateuse (EMT) dans des cellules SCC étalées sur des matrices rigides. L'EMT joue un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements, j'ai ainsi démontré que la régulation négative des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans l'EMT conduit, dans le cas de cellules ensemencées sur une matrice rigide, à une augmentation de la sensibilité cellulaire aux EGFR TKI.

Pour comprendre plus en détails ce qui induit la résistance des cellules SCC lorsqu'elles sont étalées sur une plaque rigide, nous avons effectué un séquençage d'ARN. Le séquençage de l'ARN des cellules SCC12 étalées sur une matrice souple et rigide a révélé que la protéine AXL pouvait contribuer à la résistance au Gefitinib des HNSCC. J'ai pu démontrer que l'inhibition de l'expression d'AXL dans les cellules SCC ensemencées sur des matrices rigides, réduit totalement la résistance à l'EGFR TKI induite par la niche tumorale. De plus, je montre, en culture cellulaire 3D, l'importance de combiner AXL et EGFR TKI dans le traitement des SCC.

Notre objectif global était d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques présentant une opportunité de résistance réduite. Les recherches présentées dans ce manuscrit ont le potentiel d'établir un biomarqueur de prédiction de la réponse des HNSCC et d'autres types de cancers aux EGFR TKI.

Mots Clefs : remodelage matriciel, EGFR, épidermoïde humain de la tête et du cou, résistance

## Abstract

---

Resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted therapy triggered by the tumor niche in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represents a challenge in research and in clinics. Despite the fact that over 15% of HNSCC overexpress EGFR, HNSCC are refractory to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) targeted therapy and yet the molecular and cellular mechanisms of EGFR- TKIs resistance in HNSCC are unknown. The tumor niche plays an important role in conventional chemotherapeutic resistance. Cancer associated fibroblasts (CAFs), the most prominent stromal cell in tumor niche, participate in this process. Notably, CAFs are responsible for tumor tissue fibrosis an excessive extracellular matrix (ECM) remodeling that increases matrix stiffness. In carcinoma cells, adhesion to stiff substrate triggers mechano-dependent intracellular signaling pathways that favor tumor resistance to conventional chemotherapies.

My work demonstrates that ECM stiffening is responsible for a significant increase of squamous cell carcinoma (SCC) survival upon the treatment with EGFR TKIs, conventional chemotherapies and combination of both. Over 60% more cells survive treatment with the gefitinib EGFR TKI

compared to cells plated on soft matrix. Same effect was observed on matrix derived from CAFs that is known to be stiffer compared to the one derived from fibroblasts isolated from normal skin. Further analysis revealed an induction of partial epidermal-to-mesenchymal transition (EMT) in cells plated on rigid matrices. EMT is known to play a role in resistance of cancer cells to treatments, and I have demonstrated that downregulation of known transcriptional factors involved in EMT leads to an increase of cell susceptibility to EGFR TKI when plated on stiff matrix. To understand in more detail what drives the resistance of SCC cells when plated on stiff we conducted an RNA sequencing.

RNA sequencing of SCC12 cells plated on soft and stiff matrix revealed AXL as main driver of EGFR TKI resistance in HNSCC. I was able to demonstrate that inhibiting AXL in SCC cells, lying on stiff matrices, reverts the EGFR TKI resistance triggered by the tumor niche. Moreover, I show in 3D cell culture the importance of combining AXL and EGFR TKI in treatment of SCCs. Our overall goal was to identify novel therapeutic targets with reduced resistance opportunity.

Finally, research presented in this manuscript carries potential in establishing a prediction biomarker to the response of HNSCCs and other cancers to EGFR TKIs.

Keywords: Extracellular matrix, stiffness, EGFR, head and neck squamous cell carcinoma, resistance

# Pierre LECLERE

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

Lundi 2 Décembre 2019 à 14h00  
Amphithéâtre Rampal - C3M - Nice

## Rôle du facteur de transcription circadien Krüppel-Like Factor-10 (KLF-10) dans le développement des complications hépatiques de l'obésité

### devant le jury composé de :

Dr Frédéric BOST	Président du Jury
Pr Francis LEVI	Rapportrice
Dr Michel SAMSON	Rapporteur
Dr Fabienne Guillaumond	Examinatrice
Pr Michèle TBOUL	Directrice de Thèse
Dr Philippe GUAL	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Les maladies chroniques du foie associées à l'obésité (NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) sont un problème de santé publique mondial. Ces complications sont l'évolution d'un foie sain vers la stéatose hépatique (accumulation de lipides dans les hépatocytes) puis vers la stéatohépatite (NASH) caractérisée par une importante inflammation et une souffrance hépatocytaire. Ce stade peut ensuite évoluer vers des complications plus sévères telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent la transition stéatose/NASH constitue un enjeu majeur pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'horloge circadienne coordonne la plupart des fonctions physiologiques, dont les fonctions hépatiques au cours du cycle jour/nuit. Elle est composée d'une horloge centrale située dans les noyaux supra-chiasmiques de l'hypothalamus et d'horloges périphériques dans toutes les autres cellules de l'organisme. Les altérations de l'horloge circadienne associées à des changements du mode de vie (travail en heure décalées, jet lags chroniques, prises alimentaires irrégulières,

composition des régimes alimentaires, etc.), constituent des facteurs de risque pour le développement de nombreuses pathologies dont le syndrome métabolique. De nombreux et récents éléments laissent présumer que l'altération de l'horloge circadienne jouerait un rôle important dans la pathogenèse des NAFLD. Le facteur de transcription Krüppel like Factor 10 (Klf10) est directement régulé par l'horloge circadienne dans le foie où il régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie glucido-lipidique. KLF10 joue également un rôle dans la régulation de réponses inflammatoires chroniques ainsi que de la mort et de la prolifération cellulaire. Ces données nous ont donc conduits à étudier l'implication du cycle circadien et de KLF10 sur le développement des complications hépatiques.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que la stéatose et l'inflammation hépatiques suivent un rythme circadien à la différence de la souffrance hépatique dans un modèle murin de stéatohépatite (régime déficient en méthionine et choline (MCD)). Cela est associé à des altérations de l'oscillation des gènes horloges dans le foie mais aussi le rein, pouvant suggérer une modification généralisée du système circadien dans ce modèle. De plus, l'expression hépatique de Klf10 perd sa rythmicité avec le développement des complications hépatiques. L'absence de Klf10 chez la souris est associée à une forte augmentation de la souffrance hépatique sans impacter le développement de la stéatose et l'inflammation sous régime MCD. Nous avons montré que l'expression hépatique de Fsp27 gagne de la rythmicité sous régime MCD, augmente avec la sévérité des NAFLDs, favorise la souffrance hépatocytaire, et que ce gène est surexprimé chez les souris déficientes pour Klf10 sous régime MCD. Le rôle protecteur de KLF10 semble spécifique des hépatocytes car les souris déficientes pour Klf10 dans les hépatocytes présentent aussi une cytolysse hépatocellulaire (ALAT) accrue. De plus, la diminution de l'expression de Klf10 dans les hépatocytes primaires de souris diminue la viabilité cellulaire et augmente l'activation de la caspase 3 et de l'apoptose en réponse au TNF $\alpha$ . Enfin, l'expression hépatique de KLF10 corrèle avec les marqueurs circulants de la souffrance hépatique (ALAT) et de la mort hépatocytaire (kératine 18) chez les patients obèses.

Nos données chez la souris, in vitro, et chez l'Homme indiquent que le développement des complications hépatiques pourrait suivre un rythme circadien et que KLF10 a des propriétés hépato-protectrices qui pourraient atténuer le développement des NAFLD.

Mots clés : KLF10, Foie, Rythmes circadiens, NAFLD, stéatohépatite (NASH), Mort cellulaire

## Abstract

---

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the progressive form of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLDs), is a global public health problem without approved pharmacological therapy. NAFLD extend from non-pathogenic lipid accumulation, known as hepatic steatosis to hepatocellular

carcinoma (HCC) through a wide spectrum of stages including NASH and fibrosis. NASH is featured by hepatic inflammation and hepatocyte cell death. Better understand NASH pathogenic cellular and molecular mechanisms is an important clinical requirement.

Circadian timing system (CTS) is the main synchronizer of organismal physiology to environmental light/dark cycles. This CTS is comprised of a central pacemaker in the supra-chiasmatic nucleus of the hypothalamus and peripheral clocks localized in each single cell throughout the brain and body. Western society life style, including junk food consumption and erratic feeding, chronic jet lag, light exposure at night and shift-work, can disrupt the CTS. CTS disruption has been assessed as a risk factor for the development of chronic diseases including metabolic syndrome and cancer. The liver is the most rhythmic organ and evidence for an intricate link between CTS disruption and NAFLD development is most illustrated by (i) the genetic and environmental disruption of the CTS leads to dyslipidemia, hepatic steatosis as well as spontaneous NASH and HCC development (ii) the circadian hepatic transcriptome is rearranged in mice fed high fat diet and displaying hepatic steatosis, showing that metabolic disruption also impacts diurnal oscillation of transcripts. Krüppel-like factor 10 is a circadian transcription factor directly regulated by the circadian clock in the liver and help shaping the hepatic diurnal transcriptome and controlling carbohydrate and lipid metabolism homeostasis. Beside from metabolism, this transcription factor has also been shown to regulate two NASH related processes, in very different contexts, namely inflammation and cell death. We thus aimed to evaluate the implication of circadian rhythms and the role of KLF10 during steatohepatitis

Here, we show that hepatic steatosis and inflammation display diurnal rhythmicity in mice developing steatohepatitis upon feeding with a methionine and choline deficient diet (MCDD). Core clock gene oscillations remained mostly unaffected but rhythmic Klf10 expression was abolished in this model. Klf10 deficient mice (Klf10<sup>-/-</sup>) display enhanced liver injury despite the same level of hepatic steatosis and inflammation that control mice upon MCDD challenge. Specific genetic ablation of Klf10 only in hepatocytes phenocopied the phenotype of Klf10<sup>-/-</sup> mice upon MCDD. Silencing Klf10 in isolated primary hepatocytes also sensitized these cells to apoptosis along with increased caspase 3 activation in response to TNF $\alpha$ . We also show that the hepatic KLF10 expression correlates with liver injury (ALT activity) and the circulating keratin 18 hepatocyte death marker in a cohort of obese patients. Collectively our findings suggest that specific NASH features including steatosis and inflammation display diurnal oscillations and the associated altered circadian expression of Klf10 may aggravate liver injury through hepatocyte sensitization to cell death.

Collectively, our results gathered from cellular and animal experiments as well as correlative study in Human indicate that hepatic steatosis and inflammation could be rhythmic during NASH and that KLF10 could be a hepatoprotective factor that could limit NAFLD progression.

Keywords: KLF10, Liver, Circadian rhythms, Cell death, NAFLD, NASH

# Margot MULLER

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

Mercredi 11 Décembre 2019 à 14h00

Salle de conférence - Centre de biochimie - Valrose - Nice

## Le syndrome Xeroderma Pigmentosum : Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la prédisposition des patients XP-C aux cancers cutanés non mélanocytaires agressifs

### devant le jury composé de :

Dr. Sophie TARTARE-DECKERT	Présidente de Jury
Dr. Giovanna ZAMBRUNO	Rapporteuse
Dr. Matthieu LACROIX	Rapporteur
Dr. Vincent GELI	Examineur
Dr. Soline ESTRACH	Directrice de thèse
Dr. Thierry MAGNALDO	Directeur de thèse

### Résumé

---

La peau est en permanence exposée à des stress extrinsèques notamment aux rayonnements ultraviolets, principale cause de cancer cutané. Les cancers cutanés non mélanocytaires (NMSC) sont divisés en deux types : le carcinome basocellulaire (BCC) et le carcinome spinocellulaire (SCC). Les BCC surviennent après une exposition aiguë et précoce aux UVs au cours de l'enfance et présentent un faible potentiel métastatique. Les BCC dérivent des cellules souches du follicule pileux. Alors que les SCC se développent après une exposition chronique à de faibles doses d'UV et présentent un potentiel métastatique plus élevé. Les SCC dérivent de cellules souches de l'épiderme inter folliculaire. Le ratio BCC/SCC est de 4 pour 1 dans la population générale.

Au laboratoire, nous nous intéressons à la pathologie Xeroderma Pigmentosum (XP). XP est une maladie génétique récessive autosomique rare. En Europe, la majorité des patients XP sont porteurs de mutations du gène XPC entraînant l'absence d'une protéine fonctionnelle. Le rôle canonique de XPC est la reconnaissance des dommages à l'ADN induits par les UVs et permet la réparation de l'ADN par le mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER). Les patients XP-C présentent une hypersensibilité aux rayons UV et développent très précocement des cancers cutanés et particulièrement des SCC avec une incidence plus élevée. L'objectif de ma thèse est d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à la susceptibilité des kératinocytes XP-C au SCC.

En utilisant des kératinocytes primaires humains de patients XP-C ou d'individus sains, nous avons développé un protocole pour mimer une exposition solaire chronique en les exposant de manière récurrente à de faibles doses d'UV. Nous avons choisi d'effectuer une approche non biaisée en effectuant un séquençage génomique entier de kératinocytes XP-C et WT exposés ou non aux UV. Comme attendu, les kératinocytes XP-C chroniquement irradiés présentent de nombreuses mutations particulièrement dans les séquences codantes. L'analyse bio-informatique de ces données révèle un défaut dans des gènes impliqués dans l'organisation de la chromatine. De façon intéressante, chez les kératinocytes non exposés aux UV, nous observons une augmentation de mutation dans les séquences codantes, l'analyse des gènes portant des mutations stop a mis en évidence un défaut dans les réseaux de gènes impliqués dans l'organisation de chromatine. Ces résultats suggèrent un état plus ouvert de chromatine dans les kératinocytes XP-C amenant l'hypothèse que les cellules XP-C présenteraient un phénotype cellule souche de l'épiderme. Pour valider ce modèle, nous avons utilisé des kératinocytes primaires humains issus de patients. Nous avons montré que des kératinocytes sains dont l'organisation de la chromatine a été altérée, présentent un défaut de différenciation terminale comparable à celui observé dans nos cellules XP-C. De plus, ce phénotype est complété par la réexpression de la protéine XPC fonctionnelle. Nous avons montré que les kératinocytes XP-C forment majoritairement des clones issus de cellules souches dans un test de clonogénicité. Ils présentent une expression plus élevée de marqueurs de cellules souches spécifiques de l'épiderme inter folliculaire. Les résultats obtenus au cours de ma thèse, grâce à notre modèle in silico et à nos résultats in vitro, suggèrent une nouvelle piste dans la compréhension de la susceptibilité des patients XP-C à développer des SCC. Le changement d'identité cellulaire lié à XP-C entraîne la présence d'une chromatine plus ouverte et une identité plus proche des cellules souches, cellules à l'origine des SCC. Ce phénotype étant directement lié à l'absence de la protéine XPC fonctionnelle, nous mettons en évidence un nouveau rôle de XP-C dans l'organisation de la chromatine et la régulation de l'expression du génome. Ces travaux ouvrent donc de nouvelles perspectives dans l'approche des pathologies liées à une déficience en XPC.

Mots-clés : carcinome spino cellulaire, cancers cutanés, cellules souches adulte, Xeroderma Pigmentosum XP

## Abstract

---

Skin as the outer layer of the body is constantly exposed to UV, the main cause of skin cancer. Non-Melanoma Skin Cancer are divided in two cancer types: Squamous cell carcinoma (SCC) and Basal cell carcinoma (BCC). BCC arise after early acute UV exposure during childhood and present a low metastatic potential; while SCC arise after low chronic UV exposure during life time, present higher metastatic potential. Ratio between BCC and SCC is 4 to 1 in general population. In the lab, we are interested in Xeroderma Pigmentosum (XP) pathology. XP is a rare autosomal

recessive genetic disease. In Europe, a large majority of XP patients carry a mutation in XPC gene, resulting in the absence of XPC protein. Canonical role of XPC is to recognize UV DNA damage and allowed DNA reparation by Nucleotide Excision Repair mechanism (NER). XP-C patients present a hypersensitivity to UV radiations and develop very early skin cancer with a higher incidence. They develop 10 000 times more non-melanoma skin cancer (NMSC) compare to general population. Interestingly, we observe that XP-C patients develop 1 BCC for 4 SCC. The objective of my PhD is to decipher the molecular mechanisms underlying XP-C keratinocytes susceptibility to SCC.

In our laboratory, we used human primary keratinocytes isolated from biopsies of XP-C patients or healthy individuals. We developed a protocol to mimic chronic solar exposure by exposing primary keratinocytes to chronic low UV irradiation. We have chosen to perform an unbiased approach using whole genomic sequencing (WGS) from XP-C and WT keratinocytes exposed or non-UV exposed. As expected, chronically irradiated XP-C keratinocytes presented an increase of mutation burden particularly in coding sequence. A gene network analysis of UV mutation shows a defect in chromatin organization. Very interestingly, without UV exposure, we saw already an increase of mutation in coding sequence even though no differences in mutation burden was observed. Then performing again, a network analysis focusing only on stop mutations, we highlighted a defect in chromatin organization. These results suggested a chromatin organization defect and a more open state of chromatin in XP-C keratinocytes. Our putative model is that open chromatin could be linked to a more stem cell state of XP-C keratinocytes, suggesting a new role of XPC in chromatin organization.

To validate this putative model, we mimic chromatin organisation defects by using epigenetic modifier drugs on WT primary keratinocytes. After this treatment, WT cells presented terminal differentiation defect. We then checked our XP-C keratinocytes differentiation potential. And we observed a similar phenotype to treated WT cells. XP-C keratinocytes seems to have defect in cell differentiation and cell fate commitment. We showed that XP-C keratinocytes presented a higher percentage of stem cell, a higher expression of interfollicular epidermis markers and presented a defect in terminal differentiation program. These results strongly supported our hypothesis that the absence of XP-C leads to a switch in cell identity.

In conclusion, the absence of XP-C reveals a stem cell like phenotype of XP-C deficient keratinocytes with a more open chromatin that could be linked to the more aggressive type of cancer observed in patients. Indeed, the cell of origin of NMSC are different. Thus, the aggressive one has a progenitor like cell as a cell of origin. Altogether, these data correlate nicely with our putative model, giving a first clue in the explanation of the inverted ratio of cancer in XP-C pathology

Keywords: skin cancer, adult stem cell, Xeroderma Pigmentosum, XP

# Caterina NOVELLI

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

Vendredi 22 Mars 2019 à 14h30

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Rôle des cytonèmes dans la sécrétion de Hedgehog chez *Drosophila melanogaster*

### devant le jury composé de :

Dr. Florence BESSE	Présidente du Jury
Dr. Maria Dolores MARTIN BERMUDO	Rapporteuse
Dr. Marcus BISCHOFF	Rapporteur
Dr. Raphael GAUDIN	Examineur
Dr. Pascal THEROND	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Notre laboratoire étudie une molécule de morphogène appelée Hedgehog (Hh) utilisant *Drosophila melanogaster* comme modèle animal. La voie de signalisation Hh est conservée au cours de l'évolution, des invertébrés aux vertébrés, et joue un rôle régulateur dans divers aspects du développement animal et de l'homéostasie tissulaire, tels que le renouvellement cellulaire, la réparation tissulaire et la régénération d'organes. Hh est une molécule bi-lipidique modifiée par le cholestérol au niveau de son extrémité C-terminale et par l'acide palmitique au niveau de son extrémité N-terminale, et se lie donc étroitement à la membrane plasmique. Bien que la molécule soit hydrophobe, elle exerce sa fonction sur une longue distance. Un moyen particulier utilisé par les cellules pour communiquer repose sur un mécanisme basé sur des contacts directs entre cellules via de longues extensions de filopodes à base d'actine, appelées cytonèmes. Cette nouvelle modalité de transfert d'informations est au cœur de mon projet actuel. Dans ce travail, nous avons étudié le rôle des cytonèmes dans un tissu épithélial polarisé, appelé disque imaginal de l'aile, tissu précurseur de la larve à partir duquel les ailes adultes se développent. Les cytonèmes ont été largement étudiés dans ce tissu avec l'utilisation de la surexpression d'une protéine marquée par fluorescence appelée Interference of Hedgehog (Ihog).

L'expression d'Ihog est une protéine qui peut être utilisée pour stabiliser ces longues extensions membranaires, sans quoi elles sont trop fragiles et détruites par les agents de fixation classiques.

Nous présentons ici Ihog, Hh et Dispatched (Disp) comme des acteurs importants de la croissance des cytonèmes. En l'absence de différents domaines Ihog, nous avons constaté une réduction significative de la longueur et du nombre de cytonèmes. En outre, la perte totale de fonction Ihog et de son homologue Boi, réduit le nombre et la longueur des cytonèmes, sans pour autant affecter l'activité à longue distance de Hh. En absence de Hh, la longueur des cytonèmes est réduite, sans modification du nombre de cytonèmes. Avec ce travail, nous proposons une nouvelle fonction non canonique de Hh sur la croissance du cytonème. Pour comprendre le rôle des cytonèmes dans la sécrétion de Hh, nous avons également analysé des disques entièrement mutants pour disp. Chez les mutants disp, l'activité longue distance de Hh est fortement restreinte aux cellules qui juxtapose la source de Hh. En augmentant le nombre et la longueur des cytonèmes contenant Hh dans le mutant disp, nous montrons que la présence de Hh sur ces structures n'est pas suffisante pour activer la voie à longue distance. En conclusion, bien que les protéines susmentionnées contribuent à la structure des cytonèmes, nous n'avons pu mesurer de corrélation directe entre la longueur des cytonèmes et l'activité à longue distance de Hh.

Enfin, nous avons voulu corrélérer l'apparition des cytonèmes avec l'établissement du gradient de Hh in vivo. Pour ce faire, nous avons développé un deuxième modèle alternatif permettant d'étudier la formation de cytonèmes : le modèle des histoblastes abdominaux, que nous pouvons utiliser pour analyser la formation et la dynamique des extensions de membrane chez les animaux vivants. En particulier, nous avons examiné deux nids d'histoblastes dorsaux (distants de 30 microns), où le groupe de cellules postérieures produit Hh et le groupe de cellules antérieures répond au signal Hh. Nos résultats indiquent que l'établissement du gradient de Hh a lieu avant la juxtaposition des deux nids et en l'absence de cytonèmes. Nous avons donc proposé que les cytonèmes qui dépendent de Ihog ne sont pas impliqués dans les premières étapes de l'établissement du gradient de Hh.

En conclusion, nos travaux montrent que Hh, bien qu'il soit nécessaire à la croissance du cytonème, n'utilise pas cette structure pour un transport à longue distance, mais certainement pour permettre une communication à courte distance.

Mots Clefs : Hedgehog, morphogene, interference hedgehog, cytonemes, *Drosophila melanogaster*

## **Abstract**

---

Our laboratory studies a morphogen molecule called Hedgehog (Hh) using *Drosophila melanogaster* as an animal model. The Hh signaling pathway is evolutionarily conserved from invertebrates to vertebrates, and plays regulatory roles in various aspects of animal development and tissue homeostasis, such as stem cell renewal, tissue repair, and organ regeneration. Hh is a dually lipidated molecule modified by cholesterol at its C-terminus and palmitic acid at its

N-terminus, and therefore tightly binds the plasma membrane. Although the hydrophobic nature of the molecule, Hh exerts its function over a long-range distance. One particular way cells adopted to communicate is through a mechanism based on direct cell-cell contacts via long actin-based filopodia extensions, called cytonemes. This new modality for information transfer is at the core of my present project. In this work, we studied cytoneme role in a polarized epithelial tissue, called the wing imaginal disc, a larval precursor tissue from which the adult wings develop. Cytonemes have been extensively studied in this tissue with the use of the overexpression of a fluorescently tagged protein called Interference of Hedgehog (Ihog). The expression of Ihog protein in the wing disc is necessary and sufficient to stabilize these long plasma membrane extensions, otherwise they would be too fragile and easy to be disrupted by conventional fixatives.

Here we present Ihog, Hh and Disp as important players in cytoneme growth. In absence of different Ihog domains, we found a significant reduction of cytoneme length and numbers. In addition, Ihog/Boi loss of function was able to reduce the number and length of wild type cytonemes, marked with mCD8GFP. Further, we saw that in loss of function and gain of function genotype for Hh, cytoneme length was reduced and increased respectively, without any change at the cytoneme numbers. With this work, we suggest that Hh has a novel, non-canonical function in the cytoneme growth. To understand the role of cytonemes in Hh secretion we also analyzed discs entirely mutant for Dispatched (Disp). In disp mutants, the Hh gradient is strongly restrained, with most of Hh targets expressed only in anterior cells juxtaposing the A/P border. This phenotype could not be rescued by Ihog overexpression, despite the fact that Hh was very abundant on cytonemes in the disp mutant. Additionally, in the absence of Disp, we observed a reduction of cytoneme length, which suggests a role for Disp in the formation of these filaments, which is likely independent from its function in Hh secretion.

In conclusion, although the aforementioned proteins contribute to the structure of cytonemes, we could not measure any direct correlation between the expression of Hh target genes and the simultaneous manipulation of cytoneme length in any mutant condition checked. Finally, we wanted to correlate the time of cytoneme initiation with the establishment of the Hh gradient. In order to do that, we have introduced in the laboratory an alternative system to study cytoneme formation: the abdominal histoblast model, which allowed us to directly analyze the formation and dynamics of membrane extensions in live animals. In particular, we looked at two separated dorsal histoblast nests of the pupal stage (distanced by 30 microns) where the posterior group of cells produces Hh and the anterior cells show expression of various Hh targets. Our results indicate that the establishment of the Hh gradient occurs before the juxtaposition of the two nests and in absence of cytoneme structures. Thus, we propose that within this model, cytonemes depending on Ihog overexpression are not involved in the first steps of Hh gradient establishment. In conclusion, all together these results suggest a new, autocrine role for Hh in the cytoneme growth, which could be independent from the paracrine role of Hh as a morphogene.

Keywords: Hedgehog, morphogene, interference hedgehog, cytonemes, *Drosophila melanogaster*

# Cristina PARASCHIVESCU

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Jeudi 19 Décembre 2019 à 13h30

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

## Le rôle régulateur des cytokines dans le neurodéveloppement et le comportement au début de la période postnatale

### devant le jury composé de :

Dr Jacques BARIK

Président du Jury

Dr Ulrike WEBER-STADELBAUER

Rapportrice

Dr Sophie LAYE

Rapportrice

Dr Jérôme BECKER

Examineur

Dr Laetitia DAVIDOVIC

Directrice de Thèse

Pr Nicolas GLAICHENHAUS

Directeur de Thèse

### Résumé

---

Plusieurs études ont montré que l'activation du système immunitaire maternel (MIA) pendant la grossesse augmentait le risque de troubles neurologiques et d'anomalies du comportement dans la descendance. Afin d'étudier les mécanismes impliqués, plusieurs auteurs ont comparé le comportement de souris nées de mères injectées pendant la grossesse avec du poly(I:C), une molécule mimant une infection par le virus de la grippe, et celui de souris nées de mères injectées avec une solution saline. Bien que ces études aient permis de confirmer que l'activation du système immunitaire maternel pouvait induire des troubles du comportement, la majorité d'entre elles se sont fondées sur des tests comportementaux effectués chez la souris adulte. Ainsi, il reste à déterminer si la modification des niveaux d'autres cytokines pendant la période périnatale peut avoir une incidence sur le neurodéveloppement précoce et sur le comportement de la jeune souris. Pour répondre à cette question, nous avons caractérisé la descendance de plusieurs cohortes de mères injectées avec du poly(I:C) ou avec une solution saline, pour leur comportement entre 5 et 15 jours après la naissance et pour la concentration de plusieurs cytokines dans le sérum. Parce

que le neurodéveloppement et la production de cytokines sont affectés par plusieurs variables, nous avons utilisé une analyse multivariée pour identifier les variables environnementales et biologiques associées au fait d'être le descendant d'une mère injectée avec du poly(I:C) (par opposition au fait d'être le descendant d'une mère injectée avec une solution saline). Nous avons constaté que la diminution du poids et de la température corporelle de la mère après injection de poly(I:C), la taille de la portée, le poids de la souris à 15 jours, le nombre de vocalisations ultrasonores (USV) émises par la souris à 6 jours, la distance parcourue par le souris et le temps passé immobile à 13 jours, ainsi que les concentrations sériques de TNF, IL-5, IL-15 et CXCL10 à 15 jours étaient associés au fait d'être le descendant d'une mère injectée avec du poly(I:C). Pour continuer à explorer le rôle régulateur du TNF, nous avons injecté quotidiennement du TNF recombinant à des souris nouveau-nées entre le jour 1 et le jour 5 après leur naissance, et nous avons étudié leur développement et leur comportement entre le jour 8 et le jour 15. Contrairement à nos attentes, l'injection de TNF à des souris nouveau-nées n'a pas d'impact négatif sur le développement, mais favorise plutôt l'acquisition de réflexes sensorimoteurs et le comportement exploratoire. Pris dans leur l'ensemble, nos résultats confirment que les cytokines jouent un rôle crucial dans le neurodéveloppement et que des variations dans l'abondance de certaines d'entre elles, et notamment du TNF, ont un impact sur l'acquisition de certains réflexes et comportement pendant les premiers jours de la vie. Bien que nos études ne nous aient pas permis d'explorer les mécanismes par lesquels cytokines influent sur le neurodéveloppement, les protocoles que nous avons élaborés et les résultats que nous avons obtenus fournissent un cadre pour d'autres études visant à mieux comprendre ces mécanismes.

Mots Clefs : neurodéveloppement, cytokines, immunité maternelle, inflammation, autisme, protection neuronale, comportement, analyse statistique multivariée

## Abstract

---

Both preclinical and clinical studies have shown that immune activation and inflammation during the early stages of neurodevelopment increase the risk of neurodevelopment disorders and behaviour abnormalities in adults. While the underlying mechanisms have only been partially elucidated, experiments in the maternal immune activation mouse model (MIA) – in which pregnant dams are injected with the viral mimic poly(I:C) – have demonstrated the critical role of two cytokines: interleukin (IL)-6 and IL-17A. However, the vast majority of the studies performed to date have used behavioural tests in adult mice as a read out to study the impact of cytokines on neurodevelopment. Therefore, it is not clear whether altered levels of other cytokines during the perinatal period could impact neurodevelopment and behaviour in infant mice. To address this issue, we have analysed the progeny of several cohorts of poly(I:C)- and saline-injected mothers for behaviour between postnatal day 5 (P5) and P15 and serum cytokine levels at P15. Because

both perinatal neurodevelopment and cytokine production are known or believed to be impacted by many environmental variables, we analysed our data using a multivariable statistical model to identify features associated with being born to a poly(I:C)-injected mother (as opposed to being born to a saline-injected mother). We found that the drop of body weight and temperature of the mother after poly(I:C) injection, the litter size, the pup weight at P15, the number of ultrasonic vocalizations (USV) emitted by the pup at P6, the distance travelled by the pup and the time it spent mobile at P13, as well as serum levels of Tumour Necrosis Factor (TNF), IL-5, IL-15 and C-X-C motif chemokine (CXCL)10 were all associated with altered odds of being born to a poly(I:C)-injected mother. To further explore the role of TNF during the early postnatal period, we injected mouse pups daily from P1 to P5 and assessed these animals for both developmental milestones and behaviour from P8 to P15. Unexpectedly, injection of recombinant TNF did not have a detrimental impact on neurodevelopment but rather promoted sensorimotor reflexes acquisition and exploratory behaviour. Altogether, our results confirm that cytokines play a critical role during neurodevelopment and that altered levels of specific cytokines, and in particular TNF, could regulate the acquisition of developmental milestones and behaviour in infant mice. While we have only obtained preliminary insights into underlying mechanisms, the protocols that we have developed provide a framework for further studies.

Keywords: neurodevelopment, cytokines, maternal immunity, inflammation, autism, neuronal protection, behaviour, multivariable statistical analysis

# Martin PARE

iBV - UMR 7277 CNRS / UMR 1091 INSERM - Institut de biologie Valrose, Faculté de médecine – Nice

Mercredi 10 Avril 2019 à 13h30

Salle de conférence – Faculté de médecine - Nice

## Étude sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la conversion thermogénique des cellules adipocytaires dans différentes situations pathologiques

devant le jury composé de :

Dr. Frédéric LUTON

Président du Jury

Dr. Anne BOULOUMIE

Rapportrice

Dr. Véronique MAGUER-SATTA

Rapportrice

Dr. Adrien ROSSARY

Examineur

Dr. Christian DANI

Directeur de Thèse

Dr. Annie LADOUX

Co-directrice de Thèse

### Résumé

---

Il existe deux types de tissus adipeux (TA). Le tissu adipeux blanc stocke les lipides sous forme de triglycérides. Le tissu adipeux brun possède une signature thermogénique via la protéine UCP1 utilisant les lipides pour former de la chaleur. Il existe aussi des adipocytes qui ont des caractéristiques similaires aux adipocytes bruns (adipocytes beiges) au sein du TA blanc. Le TA sécrète également des hormones lui conférant une fonction endocrinienne. Il maintient l'homéostasie énergétique et peut être altéré de différentes façons, ce qui conduit à des dysfonctionnements métaboliques :

- Une perte importante du TA dans les lipoatrophies est observée lors d'un traitement antirétroviral hautement actif contre le VIH (thérapie HAART). Ceci amène à des modifications métaboliques graves, dues à des niveaux élevés de lipides circulants et à une résistance à l'insuline systémique. Cette thérapie HAART est composée d'inhibiteurs de la protéase du VIH (IPs) ou de la transcriptase inverse (INTI). Les effets inhibiteurs des IPs sur le processus de différenciation adipocytaire blanche sont bien connus. Cependant, les mécanismes spécifiques

qui affectent les différents dépôts adipeux humains distinctement ainsi que la différenciation adipocytaire brune le sont moins.

- Le cancer est une pathologie caractérisée par la prolifération dérégulée de cellules capables de former des métastases. Les cellules tumorales interagissent activement avec leur microenvironnement, notamment avec le TA qui est présent autour de nombreux organes et qui peut favoriser la progression tumorale (tissu adipeux associé au cancer). Le TA promeut la prolifération des cellules cancéreuses par la sécrétion d'adipocytokines. De plus, les cellules tumorales modifient le TA pour tirer leur énergie des lipides ce qui favorise leur expansion et leur dissémination. Nous avons étudié les interactions entre adipocytes et cellules tumorales de sein puisque le TA fait partie intégrante de la glande mammaire.

Mon travail de thèse a consisté à identifier de nouveaux mécanismes moléculaires importants pour le développement physiopathologique et/ou l'altération du TA. Nous avons d'abord étudié les effets des IPs sur la perte de l'auto-renouvellement des progéniteurs adipeux (PAs) (1) et sur les modifications métaboliques des adipocytes (2). Nous étudions aussi les interactions entre les cellules de cancer du sein et le microenvironnement adipeux (3).

Tout d'abord, les IPs inhibent l'auto-renouvellement des PAs en diminuant IER3 ce qui déstabilise en aval la boucle autocrine de l'Activine A. Les IPs bloquent la différenciation des PAs en adipocytes. La perte de ces deux processus indique que les IPs induisent des lipoatrophies retrouvées au cours de la thérapie HAART.

Par la suite, nous observons que les IPs réduisent l'expression des marqueurs thermogéniques dans les adipocytes beiges et bruns par l'inhibition de la transcription d'UCP1. Ils altèrent aussi l'expression des sirtuines, enzymes anti-âge. L'utilisation d'un activateur de la sirtuine 1 permet de renverser partiellement les effets des IPs sur l'expression d'UCP1.

Enfin, nos résultats démontrent que des mammosphères de cancer de sein induisent la protéine UCP1 dans les adipocytes adjacents. L'adrénomedulline produite par les mammosphères participe à ce processus et nous avons pu caractériser son mécanisme d'action.

En conclusion, les travaux réalisés pendant ma thèse ont permis de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les IPs inhibent l'auto-renouvellement des progéniteurs adipeux ainsi que l'altération de la signature thermogénique via la perte d'UCP1 dans les adipocytes bruns. Les cellules tumorales, quant à elles, induisent l'expression d'UCP1 résultant en une conversion métabolique des adipocytes blancs en adipocytes bruns.

Mots Clefs : Tissu adipeux, Progéniteurs adipeux, Activine A, Différenciation adipocytaire, Adipocytes beiges/bruns, UCP1, Inhibiteurs protéases du VIH, Resvératrol, Cancer du sein, Adipocytes associés au cancer, Lipolyse, Conversion métabolique

## Abstract

---

There are two types of adipose tissues (AT). White adipose tissue stocks lipids in the form of triglycerides. Brown adipose tissue possesses a thermogenic signature through the protein UCP1 in order to generate heat by using lipids. Some adipocytes have brown-like adipocyte characteristics (beige adipocytes) and are localized in the white adipose tissue. AT also secretes hormones giving it an endocrine function. AT maintains energetic balance and can be altered in many ways, leading to metabolic dysfunctions:

- Important loss of AT in lipodystrophy are observed during highly active antiretroviral therapy against HIV (HAART therapy). This leads to severe metabolic modifications resulting in high levels of circulating fatty acids and systemic insulin resistance. The HAART therapy is composed of HIV protease inhibitors (PIs) or reverse transcriptase inhibitors (NRTI). PIs inhibitory effects on white adipocyte differentiation are well known. However, specific mechanisms distinctly altering different human adipose depots or brown adipocyte differentiation are less known.
- The pathology of cancer is characterized by upregulated proliferation of cells capable of metastasis. Tumor cells interact with their microenvironment, especially the AT surrounding numerous organs and can promote cancer progression (cancer-associated adipose tissue). AT induces cancer cells proliferation through secretion of adipocytokines. Furthermore, tumor cells modify the AT in order to gain energy from their lipids resulting in tumoral expansion and invasion. We have studied the interactions between adipocytes and breast cancer cells because AT is an integral part of the mammary gland.

My thesis work consists of identifying new molecular mechanisms implicated in the physiopathological development and/or alteration of the AT. We have first studied the PIs effects on the loss of adipose progenitors (APs) self-renewal (1) and the metabolic modifications of adipocytes (2). We also studied the interactions between breast cancer cells and the adipose microenvironment (3).

First, PIs inhibit self-renewal of APs by decreasing IER3 which disrupts the activin A autocrine loop downstream. PIs also block the differentiation of APs into adipocytes. The loss of both processes shows that PIs induce lipodystrophy observed during HAART therapy.

After, we observed that PIs decrease the expression of thermogenic markers in beige and brown adipocytes through inhibition of UCP1 transcription. They also impair the expression of sirtuins, anti-aging enzymes. The use of a sirtuin 1 activator can partially reverse the PIs effects on UCP1 expression.

Finally, our results show that breast cancer mammospheres increase UCP1 protein expression in adjacent adipocytes. Adrenomedullin is produced by the mammospheres and participated in this process and we were able to characterize its mechanism of action.

In conclusion, the work done during my thesis have allowed us to better understand the mechanisms by which PIs inhibit self-renewal of APs as well as the impairment of the thermogenic signature through the loss of UCP1 in beige and brown adipocytes. Tumor cells, however, induce UCP1 expression resulting in the metabolic conversion of white adipocytes into brown adipocytes.

Keywords: Adipose tissue, Adipose progenitors, Activin A, Adipose differentiation, Beige/brown adipocytes, UCP1, HIV protease inhibitors, Resveratrol, Breast cancer, Cancer-associated adipocyte, Lipolysis, Metabolic conversion

# Nainoa RICHARDSON

iBV - UMR 7277 CNRS / UMR 1091 INSERM - Institut de biologie Valrose, Faculté de médecine – Nice

Vendredi 20 Septembre 2019 à 14h00

Salle de conférence – Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Sox8 compense la perte de Sox9 pendant le développement testiculaire physiopathologique chez la souris présentant une perte de fonction du gène R-spondin1

devant le jury composé de :

Pr. Francisco BARRIONUEVO

Dr. Jérôme COLLIGNON

Dr. Marie-Christine CHABOISSIER

Dr. Marie-Cécile DE CIAN

Rapporteur

Examineur

Directrice de Thèse

Co-directrice de Thèse

### Résumé

---

Chez les mammifères, le développement testiculaire des gonades XY est initié par les facteurs de transcription SRY/SOX9 qui promeuvent la différenciation des cellules de Sertoli. Chez l'embryon XX, la signalisation RSPO1/WNT/beta-catenin contrôle la différenciation des cellules de la granulosa et le développement ovarien. De fait, les souris XY n'exprimant pas Sox9 (KO) développent des ovaires et les souris XX n'exprimant pas Rspo1(KO) développent des ovotestis, constitués d'une partie testiculaire et une ovarienne. Leur formation est due à la différenciation précoce de cellules de granulosa et la reprogrammation d'une partie d'entre elles, en cellules de Sertoli. Chez les souris XX Rspo1 KO, SRY n'est pas nécessaire au développement testiculaire.

De plus, les gonades des souris XX et XY présentant une double inactivation des gènes Rspo1 et Sox9 (Double Knockout/DKO) montrent une différenciation testiculaire partielle et complète respectivement, avec un développement d'ovotestis chez les individus XX DKO et un développement de testicules hypoplasiques chez les souris XY DKO. SOX9 et/ou SRY ne sont donc pas nécessaires à la différenciation testiculaire dans ce contexte, suggérant l'implication d'autres facteurs.

L'objectif de ma thèse est de tester l'hypothèse selon laquelle SOX8, un facteur de transcription de la même famille que SOX9, pourrait induire le développement testiculaire chez les souris XX et XY DKO Rspo1 Sox9. Afin d'établir l'existence d'une compensation entre ces gènes SOX, nous avons analysé leur expression et le développement des gonades chez la souris DKO pour les gènes Rspo1 et Sox8 ou Sox9. Nous avons ensuite étudié les souris mutantes simultanément pour les gènes Rspo1, Sox8 et Sox9 (triple knockout/TKO). Notre hypothèse est qu'une perte d'expression des gènes Sox8 et Sox9 chez les souris TKO empêche la reprogrammation des cellules de la granulosa en Sertoli et par conséquent le développement testiculaire. Nous avons donc analysé la morphologie des gonades, les caractères sexuels secondaires, ainsi que l'organisation des gonades avec les différentes populations cellulaires qui les constituent par histologie et immuno-marquages à différents stades : à 17.5 jours de développement embryonnaire (E17.5) où la reprogrammation de cellules de granulosa en Sertoli commence dans la souris XX Rspo1 KO; chez les souris juvéniles au jour 10 (P10) où le développement somatique est achevé; et chez les souris adultes 40 jours après la naissance (P40).

Nos résultats montrent que SOX8 et SOX9 sont exprimés de manière indépendante dans les gonades des souris XY and XX DKO Rspo1 Sox9 et DKO Rspo1 Sox8 à E17.5 et à P10. De plus, les souris XY et XX DKO Rspo1 Sox8 développent des testicules et des ovotestis indiquant que la perte d'un seul facteur SOX n'altère pas la formation des testicules, comme dans les souris XY et XX DKO Rspo1 Sox9. Cependant, chez les souris XX et XY TKO, la reprogrammation des granulosa en Sertoli à E17.5 et le développement testiculaire postnatal ne sont plus observés, démontrant que SOX8 peut compenser la perte de SOX9. De plus, les gonades des souris XY et XX TKO sont des ovaires atrophiques, indiquant que la différenciation ovarienne peut s'opérer.

En résumé, nous avons analysé l'étiologie du développement physiopathologique des gonades chez les souris ayant une perte de fonction de RSPO1. Bien que SOX8 ne soit pas nécessaire à la différenciation testiculaire chez la souris, il peut promouvoir le développement testiculaire en l'absence de SRY et SOX9 en raison de sa redondance fonctionnelle avec SOX9. Chez l'Homme, dans les cas cliniques d'ambiguïtés sexuelles avec différenciation testiculaire, qui ne sont pas expliqués par le défaut d'expression de SRY ou SOX9, SOX8 pourrait ainsi être un facteur causatif.

Mots clés : R-spondin1, Rspo1, Sox8, Sox9, développement des gonades, inversion de sexe, modèle murin

## Abstract

---

There In humans and mice, testicular development in XY gonads involves SRY/SOX9 signaling to promote Sertoli cell differentiation and their formation as testis chords. For ovarian development in XX gonads, RSPO1/WNT/beta-catenin signaling is the main pathway for granulosa cell

differentiation and their subsequent assembly into follicles. Indeed, XY Sox9 mutant mice develop ovaries, and XX Rspo1 mutant mice develop ovo-testes, a gonad containing a testicular and an ovarian part. In XX Rspo1 mutant mice, ovo-testicular development involves precocious differentiation of some granulosa cells and their and reprogramming as Sertoli cells. Thus, these single mutant studies demonstrated that SOX9 and RSPO1 are required for testicular and ovarian development respectively, and that SRY is dispensable for testicular development in XX Rspo1 mice.

Interestingly, gonad development in XY and XX Rspo1 Sox9 double knockout (DKO) mice has challenged the requirement of SOX9 for testicular development. In XX Rspo1 single mutants, it was assumed that Sertoli cell differentiation was SOX9-dependent, but co-inactivation of Sox9 in DKO mice does not impair the ovo-testicular phenotype. For XY Sox9 single mutant mice developing ovaries, co-inactivation of Rspo1 in XY DKO mice rescues the sex reversal, though the testes are hypo-plastic. Thus, in XY and XX Rspo1 Sox9 DKO mice, SOX9 and/or SRY are dispensable for testicular differentiation, indicating that an alternate testis factor exists.

For my research project, we hypothesized that a SOX9-related transcription factor, SOX8, acts redundantly for testicular development in XY and XX Rspo1 Sox9 DKO mice. Thus, to first establish redundancy among the SOX factors, we first analyzed their expression in Rspo1 mutant mice lacking Sox8 or Sox9, and then generated and analyzed gonad development in XY and XX Rspo1 Sox8 DKO mice. Then to test our hypothesis, we studied Rspo1 Sox8 Sox9 triple knockout (TKO) mice. We predicted that a loss of both Sox genes in TKO mice would prevent granulosa cell reprogramming as Sertoli cells and subsequent testicular development. To characterize gonad development and their effects in DKO and TKO mice, we performed analyses in embryonic day 17.5 (E17.5) mice, when granulosa-to-Sertoli cell reprogramming begins in XX Rspo1 single mutants; in juvenile post-natal day 10 (P10) mice, when gonad fate is set; and in young adult P40 mice. We examined a variety of parameters including gonad morphology and secondary sex characteristics, as well as gonad organization and cell population by histological and immunostaining analyses.

We report that SOX8 and SOX9 are expressed independently in XY and XX Rspo1 Sox9 DKO and Rspo1 Sox8 DKO gonads in embryonic and juvenile mice. Next, XY and XX Rspo1 Sox8 DKO mice developed testes and ovo-testes, indicating that loss of one SOX factor does not impair testicular differentiation, as in XY and XX Rspo1 Sox9 DKO mice. In XY and XX Rspo1 Sox8 Sox9 TKO mice, granulosa-to-Sertoli cell reprogramming was impaired at E17.5 and post-natal gonads lacked testicular development. Thus, SOX8 can compensate for the loss of SOX9 in Rspo1 Sox9 DKO mice. In addition, gonads in XY and XX TKO mice developed as atrophied ovaries, indicating that ovarian fate is partially maintained.

In total, we investigated the etiology of pathophysiological testicular development in RSPO1 loss-of-function mice. Remarkably, though SOX8 is dispensable for male sex determination in mice, it can promote testicular differentiation in the absence of SRY and SOX9 because of functional

redundancy with SOX9. Thus, in human cases of sex reversal where testicular development cannot be explained by misexpression of SRY or SOX9, SOX8 could be a causative factor.

Keywords: R-spondin1, Rspo1, Sox8, Sox9, gonad development, sex reversal, mouse model

# Anthony RUBERTO

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

Jeudi 16 Mai 2019 à 14h30

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Rôle du facteur de transcription circadien KLF10 dans la physiologie hépatique

### devant le jury composé de :

Dr. Ez-Zoubir AMRI	Président du Jury
Dr. David JACOBI	Rapporteur
Dr. Jorge MENDOZA	Rapporteur
Dr. Fabienne GUILLAUMOND	Examinatrice
Dr. Michèle TEBOUL	Directrice de Thèse
Dr. Franck DELAUNAY	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Le système circadien des mammifères contrôle la plupart des fonctions physiologiques au cours de la journée de 24 h et est régi par un oscillateur moléculaire présent dans virtuellement toutes les cellules de l'organisme. Des perturbations du système circadien ont été associées à des désordres métaboliques. Notre équipe avait précédemment montré que le facteur de transcription Krüppel-like factor 10 (KLF10) présente une expression rythmique dans le foie de souris et est sous le contrôle de l'oscillateur moléculaire circadien. La comparaison de souris déficientes pour Klf10 et de souris contrôles avait mis en évidence que KLF10 est un relai entre l'horloge moléculaire et le métabolisme dans le foie, contrôlant l'expression de gènes associés au métabolisme glucidique et lipidique. Pour analyser plus précisément le rôle de KLF10 dans la physiologie hépatique circadienne, nous avons généré un modèle de souris présentant une délétion de Klf10 uniquement dans les hépatocytes (hK10). Ces souris présentent des altérations du rythme de glycémie et de glycogène, mais ne présentent pas de changement du rythme d'alimentation ni de la quantité de prise alimentaire. L'analyse du transcriptome hépatique circadien a révélé que la délétion hépatocytaire de Klf10 conduit à une altération du transcriptome avec une perte de la coordination

temporelle de transcrits associés au métabolisme énergétique, sans affecter l'oscillateur moléculaire. Nous avons également montré que l'expression de Klf10 est régulée négativement par les glucocorticoïdes et positivement par le glucose et le fructose. La comparaison d'hépatocytes primaires de souris hK10 et de souris contrôles nous a permis de montrer que KLF10 réprime la production et la captation de glucose et joue un rôle dans la réponse des hépatocytes aux sucres en régulant négativement le catabolisme des acides aminés, la néoglucogenèse, la glycolyse, la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la cétogenèse et la lipogenèse. Collectivement nos résultats indiquent que KLF10 intègre les signaux circadien, endocrinien et métabolique pour permettre aux hépatocytes d'adapter leur métabolisme à la disponibilité des nutriments au cours de la journée de 24h.

Mots Clefs : Horloge circadienne, métabolisme hépatique, facteurs de transcription Krüppel like, RNA seq

## Abstract

---

The circadian timing system (CTS) rhythmically controls most aspects of physiology and behaviour over the 24-hour day and perturbations of the CTS lead to metabolic disorders. All the circadian rhythms are under the control of a molecular clock present in all organs. We previously showed that the transcription factor Krüppel-like factor 10 (KLF10) is a clock-controlled gene in liver. Comparison of Klf10<sup>-/-</sup> and WT mice revealed that KLF10 is a link between the core circadian clock and metabolism in liver as it regulates genes associated with glucose and lipid metabolism. To further decipher the role of KLF10 in hepatic circadian physiology and overcoming the limitations of systemic knockout models, we have generated a mouse model with a conditional hepatocyte specific deletion of Klf10 (hK10). These hK10 mutant mice display altered glycemia pattern and glycogen content, with no change in feeding consumption and behaviour. Analysis of the hepatic circadian transcriptome in these mice revealed that KLF10 deletion in hepatocytes leads to a change of rhythmicity of a significant number of transcripts without affecting expression of core clock genes. Furthermore, enrichment analysis indicates loss of temporal coordination of transcripts involved in energy homeostasis in hK10. When faced with different nutritional challenges, we show that Klf10 expression is downregulated by glucocorticoids and upregulated by carbohydrates. Using primary hepatocytes, we also show that KLF10 repress glucose production and glucose uptake. KLF10 plays a critical role in the response of hepatocytes to high carbohydrates by downregulating genes involved in amino acid catabolism, gluconeogenesis, glycolysis, fatty acid  $\beta$ -oxidation, ketogenesis and lipogenesis. Collectively these results indicate that KLF10 integrates circadian, endocrine and metabolic signaling to allow hepatocytes to adapt their metabolism to nutrient availability over the 24 hr day.

Keywords: Circadian Clock, Liver Metabolism, Krüppel Like Transcription Factor, RNA-seq

# Vishnu SARASWATHY

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

Lundi 9 Septembre 2019 à 14h30

Salle de Conférence - Centre de Biochimie - Faculté des Sciences – NICE

## Identification d'un nouveau rôle de la E3-Ubiquitin ligase Mindbomb1 dans la voie Polarité Cellulaire Planaire

### devant le jury composé de :

Dr. Pascal THERO ND

Dr. Daniela PANÁKOVÁ

Pr. Steffen SCHOLPP

Dr. Maximilian FUERTHAUER

Président du Jury

Rapporteuse

Rapporteur

Directeur de Thèse

### Résumé

---

La morphogenèse est le processus qui définit la forme d'un organisme (ou d'une partie d'un organisme) nécessaire à son bon fonctionnement. Au cours de l'embryogenèse, la morphogenèse d'un organe nécessite des processus incluant la division cellulaire, les mouvements cellulaires et la différenciation cellulaire. Cependant, on sait peu de choses sur la façon dont ces différents processus sont coordonnés au cours de la morphogenèse d'un organe. Au cours de ma thèse, j'ai étudié deux voies de signalisation cellulaire différentes qui régulent la morphogenèse au cours de l'embryogenèse du poisson zèbre. Mon étude a révélé que la voie de signalisation Notch et la voie PCP (Polarité Cellulaire Planaire) contrôlée par Mib1 régulent respectivement la morphogenèse du tube neural et l'extension de l'axe embryonnaire.

Au cours de la première partie de ma thèse, j'ai étudié le rôle de la signalisation de Notch dans la morphogenèse du tube neural du poisson zèbre. La signalisation Notch a déjà été bien étudiée pour son rôle dans la régulation de la neurogenèse lors du développement du poisson zèbre. Cependant, on ne sait pas si et comment la signalisation Notch régule la morphogenèse du tube neural du poisson zèbre. L'épithélialisation et la c-division sont des événements importants au

cours de la morphogenèse du tube neural du poisson zèbre. Nos résultats montrent que, en plus de synchroniser la spécification des cellules neuronales, la suppression de la neurogenèse induite par Notch est essentielle pour l'acquisition de l'architecture neuroépithéliale et pour la réalisation de c-division. Ainsi, la signalisation Notch permet de former la moelle épinière de poisson zèbre.

Les observations de la première partie de ma thèse ont conduit à l'identification du rôle de Mindbomb1 (Mib1) dans la signalisation PCP. Mib1, une ligase ubiquitine-E3 nécessaire à l'activation de Notch, régule les mouvements d'extension convergence (CE) nécessaires à l'élongation de l'axe de l'embryon au cours de la gastrulation du poisson zèbre. De manière intéressante, nous avons montré que Mib1, indépendamment de sa fonction dans la signalisation Notch, agit dans la voie PCP pour réguler l'extension de l'axe de l'embryon. Dans la voie de la PCP, Mib1 agit comme une ligase ubiquitine-E3 et régule l'endocytose du composant de la PCP Ryk afin d'assurer la médiation de la CE lors de la gastrulation. Ainsi, notre étude a révélé que, indépendamment de son rôle dans la signalisation Delta / Notch, Mib1 est important pour la voie PCP lors de la gastrulation du poisson zèbre.

Mots Clefs : La morphogenèse, le tube neural, la moelle épinière, la signalisation de Notch, Polarité Cellulaire Planaire, Mindbomb1, Ryk, La ligase ubiquitine-E3, L'épithélialisation, la neurogenèse, la c-division, les mouvements d'extension convergence, le poisson zèbre.

## Abstract

---

The During my PhD, I studied two different cell signaling pathways that regulate morphogenesis during zebrafish development. I found that the Notch signaling pathway and Mib1 mediated Planar Cell Polarity (PCP) pathway regulate neural tube morphogenesis and embryonic axis extension respectively.

During the first part of my PhD, I addressed the role of Notch signaling in zebrafish neural tube morphogenesis. Notch signaling has been well studied for its role in regulating neurogenesis during zebrafish development. However, whether and how it regulates morphogenesis of the zebrafish neural tube is unknown. Epithelialization and c-division are important events during zebrafish neural tube morphogenesis. Our findings show that, in addition to regulating the timing and identity of neuronal cell fate specification, Notch mediated suppression of neurogenesis is essential for the acquisition of polarized neuroepithelial tissue architecture and the execution specific morphogenetic movements called c-divisions, in order to properly shape the zebrafish spinal cord.

Observations from the first part of my PhD led to the identification of the role of Mindbomb1(Mib1) in PCP signaling. Mib1, an E3-ubiquitin ligase required for Notch activation, regulates convergent extension (CE) movements during zebrafish gastrulation, that are required for the axis elongation of the embryo. Interestingly, I found that Mib1, independent of its function in Notch signaling, act in the PCP pathway to regulate axis extension. In the PCP pathway, Mib1 acts as an E3-ubiquitin ligase and regulates endocytosis of the PCP component Ryk to mediate CE during gastrulation. Thus, my study discovered that independent of its role in Delta/Notch signaling, Mib1 is important for the PCP pathway during zebrafish gastrulation.

Keywords: Morphogenesis, Neural tube, Spinal cord, Notch signalling, Planar Cell Polarity, Mindbomb1, E3-Ubiquitin ligase, Epithelialization, Neurogenesis, C-division, Convergent Extension, Ryk, Zebrafish

# Katharina STOBBE

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Jeudi 31 Octobre 2019 à 14h30

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

## LA CHIMIOKINE CCL5, UN REGULATEUR CLE DE LA NEUROINFLAMMATION ET DU DIABETE DE TYPE 2 ASSOCIE A L'OBESITE NUTRITIONNELLE

### devant le jury composé de :

Pr. Jacques NOEL	Président du Jury
Dr. Nicolas CHARTREL	Rapporteur
Pr. Denis RICHARD	Rapporteur
Dr. Annabelle REAUX-LE GOAZIGO	Examinatrice
Dr. Ariane SHARIF	Examinatrice
Dr. Carole ROVERE	Directrice de Thèse
Dr. Jean-Louis NAHON	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Le mode de vie occidental favorise le développement de l'obésité et du diabète de type 2. Le lien entre l'obésité et le diabète de type 2 est bien établi au niveau épidémiologique. Toutefois, ce lien reste encore mal défini au niveau étiologique. Les marqueurs du diabète de type 2, tels que l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline et à la leptine, peuvent résulter d'un état pro-inflammatoire chronique du tissu adipeux, associé à une sécrétion de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) et chimiokines (RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2) diabétogènes. Ces médiateurs pro-inflammatoires sécrétés seraient les promoteurs de l'inflammation systémique et de la neuroinflammation dans l'hypothalamus, région importante du cerveau, qui contient des réseaux neuronaux impliqués dans le contrôle du métabolisme énergétique et du comportement alimentaire.

Nous nous sommes intéressés à l'impact de régimes riches en lipides sur le développement de l'obésité nutritionnelle et les paramètres métaboliques associés, d'autre part sur la réponse

inflammatoire dans l'hypothalamus et le tissu adipeux. Nous nous sommes focalisés sur le rôle de la chimiokine CCL5 et de son récepteur CCR5. Notre hypothèse est que la chimiokine CCL5 régule l'activité des neurones de l'hypothalamus impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et de l'homéostasie glucidique. Nous proposons d'étudier le rôle de la chimiokine CCL5 dans le contrôle de la balance énergétique, l'obésité, le diabète de type 2 et la neuropathie périphérique diabétique, une des complications diabétiques les plus fréquentes, affectant jusqu'à la moitié des patients atteints de diabète de type 2.

Dans ma thèse, nous avons testé les effets à long terme (16 semaines) du régime hyperlipidique apportant 40% de lipides, comparé au régime standard (contenant 5% de lipides), sur le développement de l'obésité chez les souris invalidées pour le gène de CCL5 (souris CCL5<sup>-/-</sup>) ou le gène de son récepteur CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>) en comparaison aux souris sauvages (contrôles). Dans un premier temps, nous avons confirmé la présence de CCL5 et de son récepteur CCR5 dans l'hypothalamus par hybridation in situ (technologie RNAScope®) chez les souris contrôles. Nous avons alors montré que les souris CCL5<sup>-/-</sup> et CCR5<sup>-/-</sup> semblent plus résistantes à l'obésité et avoir une homéostasie du glucose moins perturbée que les souris sauvages. Pour évaluer l'implication du CCL5 dans la douleur neuropathique associée au diabète, la sensibilité à la douleur thermique des souris CCL5<sup>-/-</sup> et CCR5<sup>-/-</sup> a été mesurée chez chaque groupe de souris. Les souris CCL5<sup>-/-</sup> sous régime hyperlipidique semblent moins sensibles à la douleur thermique que les souris contrôles. De plus, les souris CCL5<sup>-/-</sup> semblent présenter une expression génique des neuropeptides hypothalamiques modifiée par rapport aux souris contrôles.

Nos résultats suggèrent d'une part que l'absence de CCL5 et de son récepteur CCR5 protège contre le développement de l'obésité et le diabète de type 2, d'autre part que l'absence du CCL5 abolit la sensibilité accrue à la douleur thermique observée sous régime hyperlipidique. Ainsi, la cascade de signalisation CCL5/CCR5 pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique pour lutter contre l'obésité.

# Kristel ZAGHRINI

UMR 7275 CNRS – IPMC – Sophia Antipolis

Lundi 6 Mai 2019 à 14h00

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

## THSD7A, le second auto-antigène de la glomérulonéphrite extra-membraneuse : nouveau test diagnostique et identification des épitopes immunodominants

### devant le jury composé de :

Dr. Andreas SCHEDL	Président du Jury
Dr. Sonia BERRIH-AKNIN	Rapportrice
Dr. Marco PRUNOTTO	Rapporteur
Dr. Hanna DEBIEC	Examinatrice
Dr. Véronique BRAUD	Examinatrice
Dr. Gérard LAMBEAU	Directeur de Thèse

### Résumé

---

La glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est une maladie auto-immune rénale rare et une des causes principales de syndrome néphrotique chez l'adulte. La GEM est caractérisée par une accumulation de dépôts immuns sur la membrane basale glomérulaire, ce qui entraîne des lésions podocytaires. Le devenir des patients est variable, depuis une rémission spontanée jusqu'à une insuffisance rénale terminale, avec une forte protéinurie. Récemment, le récepteur des phospholipases A2 sécrétées (PLA2R1) a été identifié comme l'autoantigène majeur pour environ 70% des patients et la thrombospondine 7A contenant des domaines de type 1 (THSD7A) comme le second autoantigène pour 2 à 5% des patients.

Le traitement de la GEM est complexe, avec ou sans immunosuppresseurs. Des biomarqueurs spécifiques pourraient permettre d'identifier les patients présentant un risque de maladie grave et d'adapter le traitement. Par exemple, un fort titre d'anticorps anti-PLA2R1 est associé à une

maladie grave et suggère un mauvais pronostic de la fonction rénale. De plus, les anticorps anti-PLA2R1 ciblent trois domaines distincts de PLA2R1 et sont liés par un mécanisme d'étalement épitopique. La présence de plusieurs anticorps est associée à une aggravation de la maladie et à un mauvais pronostic. Le même mécanisme pourrait exister pour THSD7A.

L'objectif principal de cette thèse était d'identifier les propriétés moléculaires de THSD7A dans le contexte de la GEM. THSD7A est une protéine transmembranaire de type I de 250 kDa, composée d'une alternance de 21 domaines répétés de type thrombospondine-1 comme ceux présents dans la thrombospondine-1 ou dans le facteur du complément C6. Peu de choses sont connues sur THSD7A. Il pourrait être impliqué dans la migration cellulaire et l'angiogenèse mais sa fonction dans le podocyte est inconnue.

Notre premier objectif était de développer le premier test ELISA permettant une détection sensible et quantitative des anticorps anti-THSD7A dans le sérum des patients. Nous avons pu établir la plus grande cohorte de patients GEM associée à THSD7A (49 patients) et analyser leurs caractéristiques cliniques. Nous avons montré que le titre des anti-THSD7A est un biomarqueur fiable de l'activité de la maladie au cours du suivi et du traitement, ainsi que pour le pronostic. Deuxièmement, par mutagenèse dirigée, nous avons identifié 6 domaines immunogéniques de THSD7A ciblés par les autoanticorps, déterminé quels épitopes sont immunodominants ou associés à un mécanisme d'étalement épitopique, et analysé leur valeur clinique. En conclusion, mes travaux de thèse ont contribué à une meilleure compréhension de la GEM associée à THSD7A, et ouvrent de nouvelles perspectives vers une médecine personnalisée de la GEM.

Mots Clefs : glomérulonéphrite extra-membraneuse, PLA2R1, THSD7A, ELISA, diagnostique, épitope.

## Abstract

---

Membranous nephropathy (MN) is a rare autoimmune kidney disease with an incidence of 1.3/100,000 in Europe yet it is a leading cause of nephrotic syndrome in adults. Histologically, MN is characterized by the accumulation of immune deposits along the glomerular basement membrane leading to podocyte injury. Clinically, the outcome of the disease varies from spontaneous remission to end-stage kidney disease, with high proteinuria. Considerable advances have been made in the understanding of the pathophysiology of MN with the identification of the phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) as the major autoantigen for about 70% of patients and of thrombospondin-type 1 domain containing 7A (THSD7A) as a second autoantigen for another group of patients of 2–5%. MN treatment is controversial, and clinical biomarkers of the disease are needed to identify patients at risk of severe disease and to guide therapy. Anti-PLA2R1 titers correlate with disease severity and have a predictive value for prognosis. Moreover, three distinct

epitope domains of PLA2R1 have been identified and linked by a mechanism of epitope spreading. This mechanism was associated with disease worsening and a poor prognosis. We believe that a similar disease mechanism holds for THSD7A.

In this thesis, we focused on the identification of the molecular properties of THSD7A in the context of MN. THSD7A is different from PLA2R1 and is a member of the thrombospondin repeats superfamily. It is a large type I transmembrane protein (250 kDa) with an extracellular region mainly composed of 21 alternating domains of thrombospondin-type 1 like repeat as in thrombospondin-1 or complement component 6. Little is known about THSD7A. It is implicated in cell migration and angiogenesis but its function in the podocyte is unknown.

The first objective was to develop a clinical assay to identify patients with THSD7A-associated MN. We thus designed the first robust ELISA for sensitive and quantitative detection of anti-THSD7A autoantibodies in serum from MN patients. We established and analyzed the largest cohort of 49 patients with THSD7A-associated MN, with different etiologies and clinical outcome. We observed that the anti-THSD7A titer is a relevant biomarker to monitor disease activity during follow-up and treatment and for prognosis. Second, by site-directed mutagenesis, we identified autoantibodies targeting up to 6 distinct immunogenic domains of THSD7A. We investigated which of these epitope domains are immunodominant or part of a mechanism of epitope spreading and analyzed their clinical value. Together, this work has led to a better understanding of THSD7A-associated MN disease, and opens new avenues for personalized medicine in MN.

Keywords: Membranous nephropathy, PLA2R1, THSD7A, diagnosis, ELISA, epitope