

# Bénédicte BILLARD DE SAINT LAUMER

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

Vendredi 15 Mai 2020 à 14h00  
en Visioconférence

## Évolution de la plasticité développementale chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

devant le jury composé de :

Dr. Etienne DANCHIN	Président du Jury
Dr. Vincent DEBAT	Rapporteur
Dr. Jean-Michel GIBERT	Rapporteur
Dr. Antoine BARRIERE	Examineur
Dr. Christian BRAENDLE	Directeur de Thèse

### Résumé

---

De nombreuses espèces sont capables d'adopter des phénotypes alternatifs en réponse à des stimuli environnementaux, un phénomène appelé plasticité développementale adaptative. Cette faculté permet aux organismes de faire face à des habitats hétérogènes. De nombreuses études ont montré que le caractère « plasticité » présente une variabilité naturelle, cependant la base génétique et moléculaire de celle-ci a rarement été élucidée.

Cette étude porte sur un exemple de plasticité développementale chez le nématode *Caenorhabditis elegans* qui, lorsque les conditions environnementales sont très défavorables, est capable d'adopter un stade larvaire alternatif de résistance appelé dauer. Nous nous sommes intéressés à un isolat naturel de *C. elegans*, JU751, qui a la capacité inhabituelle d'entrer en dauer en réponse à des stress environnementaux peu intenses (densité de population, température élevée, agents oxydatifs, pathogènes). Une analyse QTL (Quantitative Trait Locus) nous a permis d'identifier la cause génétique de cette hypersensibilité : une délétion de 92 pb qui affecte l'expression du gène *eak-3*. Le gène *eak-3* est exclusivement exprimé dans les cellules endocrines XXX, et semble participer à la production de l'hormone acide dafachronique (DA), un stéroïde inhibiteur de l'entrée en dauer. Une réduction de l'expression de *eak-3* engendre une diminution constitutive de la production de DA, abaissant ainsi le seuil de stress environnementaux nécessaires à l'induction de dauers.

En plus d'affecter la décision d'entrer en dauer, la délétion *eak-3*, réduit la vitesse de développement des larves. Ainsi, en conditions favorables, JU751 atteint la maturité sexuelle avec un retard d'environ trois heures. Ce retard développemental lié à un effet pléiotropique du déficit en DA, suggère que la délétion *eak-3* a conduit à l'émergence d'un trade-off entre durée de développement et plasticité développementale. En accord avec ce scénario, nous avons montré lors d'expériences de compétition, que la délétion *eak-3* était rapidement remplacée par l'allèle de référence en conditions favorables. À l'inverse, la délétion *eak-3* confère un avantage sélectif net en conditions expérimentales stressantes, en facilitant la formation de dauer.

Notre étude figure parmi les rares ayant caractérisé avec succès la base moléculaire de l'évolution de la plasticité développementale adaptative et montre que, du fait de la pléiotropie hormonale, un changement génétique unique peut engendrer un trade-off entre plusieurs traits d'histoire de vie.

Mots Clefs : Plasticité développementale adaptative, sensibilité environnementale, interactions génotype-environnement, pléiotropie hormonale, trade-off, variation naturelle.

## Abstract

---

Adaptive developmental plasticity is a common phenomenon allowing organisms to cope with heterogeneous habitats through sensation of environmental cues inducing alternative phenotypes. While there is increasing information on the molecular mechanisms regulating developmental plasticity as well as ample evidence that such plasticity displays natural genetic variation, we still have limited information on how the degree of sensitivity to environmental cues regulating plasticity evolves through specific changes at the molecular level. Focusing on the plastic life history switch between reproductive and arrested (dauer) developmental stages in the nematode *Caenorhabditis elegans*, we characterized the molecular nature of enhanced sensitivity to dauer-inducing cues in the wild isolate JU751. This isolate has the unique tendency to readily form dauers not only at moderate population density but also in response to an array of diverse, yet relatively mild environmental stressors (high temperature, starvation, oxidative stress, pathogens). Based on QTL mapping, we identified a 92bp deletion in the presumptive promoter region of the gene *eak-3* – drastically reducing *eak-3* expression in JU751 – as the underlying causal variant.

*eak-3* is exclusively expressed in the endocrine XXX cells, indicative of its role in affecting signalling through the steroid hormone dafachronic acid, the central downstream component controlling the binary dauer decision. Constitutively reduced levels of *eak-3* thus reduce steroid hormone levels, hence lowering the environmental sensitivity threshold for dauer induction, consistent with the observed enhancement of JU751 dauer induction in response to any of several different environmental cues. Therefore, evolution of increased environmental sensitivity of the JU751 dauer decision has occurred through modulation of a hormonal level.

Testing for potential pleiotropic consequences of the *eak-3* variant in JU751 using allelic

replacement lines, we find this deletion to cause a subtle, yet significant delay of postembryonic reproductive growth in favourable conditions, delaying age at reproduction by ~3 hours. This developmental delay is indeed due to reduced steroid hormone signalling, suggesting that acquisition of the *eak-3* deletion in JU751 has led to the emergence of a trade-off between developmental timing and environmental sensitivity of a plasticity switch. Consistent with this scenario, we experimentally show the *eak-3* deletion allele to be rapidly outcompeted in environments favouring reproductive (non-dauer) growth; in contrast, the deletion may provide a significant fitness advantage through facilitated dauer production in highly stressful environments.

Together, our results show how a specific molecular change can underlie the evolution of adaptive developmental plasticity, and they further provide a rare example illustrating how seemingly complex life history trade-offs can emerge through hormonal pleiotropy caused by a single genetic change.

Keywords: Adaptive developmental plasticity, environmental sensitivity, genotype-by-environment interactions, hormonal pleiotropy, life history trade-off, natural variation

# Lucie CHAMBON

Inria – Sophia Antipolis

Jeudi 10 septembre 2020 à 15h00  
Amphi Kahn Inria - SOPHIA ANTIPOLIS

## Stratégies de contrôle pour des boucles de rétroaction génétiques

### devant le jury composé de :

Dr. Franck DELAUNAY	Président du Jury
Dr. Mario di BERNARDO	Rapporteur
Dr. Roderick EDWARDS	Rapporteur
Dr. Sylvain BENITO	Examineur
Dr. Jacques-Alexandre SEPULCHRE	Examineur
Dr. Jean-Luc GOUZE	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Les boucles de rétroaction positives et négatives sont les deux motifs principaux et essentiels de régulation génétique, respectivement responsables de la différenciation cellulaire ainsi que de l'homéostasie et des oscillations biologiques. Elles sont couramment modélisées par des systèmes d'équations différentielles ordinaires non-linéaires dont la dynamique reproduit fidèlement leurs comportements biologiques: la bistabilité pour la boucle positive, et la convergence globale vers une orbite périodique ou un unique point d'équilibre pour la boucle négative. Cette thèse propose plusieurs stratégies mathématiques pour contrôler ces deux motifs avec deux objectifs principaux: la stabilisation globale de points d'équilibre instables et la déstabilisation de points d'équilibre stables pour l'émergence d'oscillations soutenues. Ces deux objectifs semblent intéressants et prometteurs d'un point de vue biologique, notamment pour la mise en place de nouvelles thérapies: pour la boucle négative, ils pourraient permettre une compréhension plus aboutie de certaines maladies liées à la dérégulation de l'homéostasie ou d'horloges biologiques, tandis que pour la boucle positive, ces stratégies pourraient aider à concevoir des processus de dédifférenciation cellulaire. Pour répondre à ces attentes, les différentes lois de contrôle sont adaptées petit à petit afin de respecter plusieurs contraintes expérimentales, dont la nature qualitative et incertaine des données biologiques fournies par les appareils de mesures. Pour cela, plusieurs stratégies de contrôle sont présentées dans ce manuscrit: des contrôles linéaires, des contrôles saturés, des contrôles incertains constants par morceaux, ainsi que des modifications intrinsèques des réseaux. Par conséquent, les systèmes dynamiques étudiés sont non-linéaires et de grande dimension, et certains présentent même des discontinuités dans leur champ de vecteurs pouvant générer des comportements particuliers comme les modes glissants, et pour lesquels la théorie classique sur les systèmes

dynamiques monotones et la théorie du contrôle ne s'appliquent pas. Pour cette raison, de nouvelles méthodologies qualitatives, se basant sur la construction de régions répulsives et invariantes, sont présentées et permettent d'établir des résultats de convergence globale et de stabilité au sens de Lyapunov. Ces résultats théoriques sont appuyés par quelques exemples biologiques, dont le Repressilator, le Toggle Switch, la boucle p53-Mdm2 et l'horloge circadienne.

Mots clés : Systèmes non-linéaires, boucles de rétroaction, réseaux de régulation génétique, théorie du contrôle, contrôle qualitatif, mesures discrètes, équations différentielles ordinaires

## Abstract

---

Positive and negative genetic feedback loops are two main and essential gene regulatory motifs, respectively responsible for cell differentiation, and the emergence of both homeostasis and biological oscillations. They are accurately modeled by highly non-linear ordinary differential equations whose dynamics properly capture their biological behaviors: bistability for the positive loop, and global convergence towards either a periodic orbit or a unique steady state for the negative loop. This manuscript proposes different mathematical strategies for the control of both loops with two main objectives: the global stabilization of unstable steady states and the destabilization of stable steady states for the emergence of sustained oscillations. From a biological point of view, both objectives seem promising regarding diseases treatments and conception of new therapies: for the negative loop, such a control objective may allow to better understand and cure diseases induced by a dyshomeostasis or a disrupted clock, while for the positive loop, these strategies may help in grasping and conceiving cell dedifferentiation processes. With these biological applications in mind, the control strategies have been successively improved in order to comply with biological implementations and to take into account more and more biological constraints, including qualitative and uncertain information provided by biological measurement techniques. To reflect this progression, different strategies are introduced in this manuscript: affine control laws, saturated control laws, qualitative and uncertain switched control laws, as well as intrinsic synthetic modifications of networks. This results in the analysis of non-linear and high-dimensional dynamical systems, as well as discontinuous right-hand sides systems for which non-classical behaviors such as sliding modes may emerge, and classical theories on control and monotone dynamical systems do not apply. In order to prove global convergence and Lyapunov stability for these non-trivial systems, original, general, and qualitative methodologies based on the construction of successive repelling and invariant regions are developed. These results are supported and illustrated with a few biological examples such as the Toggle Switch, the Repressilator, the p53-Mdm2 loop or the circadian clock.

Keywords: Non-linear systems, feedback loops, gene regulatory networks, control theory, qualitative control, discrete measurements, ordinary differential equations

# Małgorzata DROZD

UMR 7275 CNRS / UCA – IPMC – Sophia Antipolis

Mardi 29 Septembre 2020 à 9h00  
En salle de visioconférences, IPMC

## Caractérisation fonctionnelle des nouveaux gènes et des voies moléculaires impliquées dans les troubles du développement du cerveau

### devant le jury composé de :

Dr. Massimo MANTEGAZZA

Président du Jury

Dr. Vera KALSCHUEUR

Rapportrice

Dr. Frederic LAUMONNIER

Rapporteur

Pr. Viviana TREZZA

Examinatrice

Dr. Barbara BARDONI

Directrice de thèse

Dr. Enzo LALLI

Directeur de Thèse

### Résumé

---

Les troubles du développement du cerveau (DBD) englobent un groupe très hétérogène de troubles qui se manifestent par des aberrations cognitives, motrices, neurocomportementales, neuroanatomiques et neurophysiologiques provenant du dysfonctionnement cérébral du développement. Les DBD comprennent, entre autres, la déficience intellectuelle, certaines formes d'épilepsie, le trouble du spectre autistique (TSA), le trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention, les troubles de l'apprentissage et du langage et la schizophrénie. Au cours de ma thèse, j'ai participé à deux projets de recherche distincts. Le premier projet visait la caractérisation fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans la schizophrénie à début précoce (SDP), le trouble du spectre autistique et la déficience intellectuelle. Au cours de cette étude, le séquençage de l'exome entier (WES : Whole Exome Sequencing) de 9 trios (enfants touchés et deux parents) a été effectué afin de trouver de nouveaux gènes impliqués dans la pathogenèse de la SDP. Les patients ont été diagnostiqués avec la SDP, qui dans certains cas est associée à d'autres phénotypes tels que le TSA ou la déficience intellectuelle. J'ai trouvé quelques variants très rares qui ont un impact pathologique putatif sur le phénotype des patients selon l'analyse in silico. Un variant a été identifié dans le gène Sérine/thréonine-protéine kinase 33 (STK33) qui est un membre éloigné du groupe CAMK de sérine/thréonine kinases. Les membres de cette famille participent à la régulation de l'homéostasie calcique qui s'est avérée altérée chez les patients atteints de schizophrénie. Pour évaluer l'impact pathologique de la mutation dans STK33, j'ai créé un modèle cellulaire dans la lignée cellulaire

SH-SY5Y par la technique CRISPR-Cas9 imitant la variante trouvée chez le patient. Pour décrire le phénotype de la lignée cellulaire mutée, j'ai effectué l'analyse de l'expression des gènes et des protéines ainsi que des expériences d'imagerie calcique.

Le deuxième projet de ma thèse a été associé à la caractérisation d'une nouvelle mutation spontanée du gène *Kcc2* chez la souris souffrant de crises tonico-cloniques spontanées à partir de l'âge de quatre mois. Le gène *Kcc2* code le cotransporteur neuronal du chlorure de potassium KCC2, qui participe à la sortie des ions chlorure des cellules, à la protection des réseaux neuronaux contre l'excitotoxicité, à la morphogenèse des dendrites et au maintien de l'équilibre excitation/inhibition. Nous pensons que les variants de ce gène ont un fort potentiel de causer des dysfonctionnements neurodéveloppementaux. La plupart d'entre eux sont associés à l'épilepsie de la petite enfance avec crises focales migrantes (EIMFS), qui appartient à un groupe de syndromes épileptiques rares. Nous avons développé la présente étude dans le but de caractériser le premier modèle d'épilepsie spontanée chez la souris due à une mutation du gène *Kcc2* en corrélant l'activité neuronale, l'apparence des crises et le comportement social et cognitif avec l'expression génique. À ce jour, ces études fonctionnelles n'ont pas été réalisées puisque les souris *Kcc2*-KO meurent quelques jours après la naissance et que les animaux hétérozygotes n'ont jamais été étudiés en détail. La mutation identifiée chez nos souris affecte le même acide aminé qui a été trouvé muté chez un patient EIMFS (R857L), offrant une occasion unique d'étudier l'étiologie de l'EIMFS *in vivo*. Jusqu'à présent, nous avons observé que chez les souris mutantes *Kcc2*, la production de la protéine est fortement diminuée dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum. De plus, le cross-linking assay et l'analyse immunohistochimique ont révélé une diminution de la protéine KCC2 au niveau de la membrane. En effectuant une électroencéphalographie intracrânienne, il a été possible d'observer le point typique pour épilepsie chez souris mutantes *Kcc2*. Pour le moment, des études comportementales ont révélé que les souris *Kcc2* mutantes présentaient des déficits d'apprentissage et de mémoire. Ces résultats nous ont donné une solide base pour une évaluation plus approfondie de notre modèle et une possibilité d'obtenir un meilleur aperçu de la pathogenèse des EIMFS avec le but final de définir des interventions thérapeutiques.

Mots Clefs : Troubles développementaux du cerveau, schizophrénie, TSA, déficience intellectuelle, gènes candidats, *STK33*, modèle cellulaire, imagerie calcique, *Kcc2*, épilepsie, modèle de souris, études comportementales, protéomique, signalisation moléculaire

## Abstract

---

Developmental Brain Disorders (DBDs) encompass a highly heterogeneous group of disorders that manifest through cognitive, motor, neurobehavioral, neuroanatomical and neurophysiological aberrations originating from developmental brain dysfunction. DBDs include, among others, Intellectual Disability (ID), some forms of epilepsy, Autism Spectrum Disorder (ASD), Attention Deficit Hyperactivity Disorder, learning and language disorders and Schizophrenia (SCZ). During my thesis, I was involved in two distinct research projects. The first

project aimed at the functional characterization of new genes implicated in Early Onset Schizophrenia (EOS), ASD and ID. During this study, Whole Exome Sequencing of 9 TRIOs (affected child and both parents) was performed in order to find new genes that are involved in the pathogenesis of EOS. Proband was diagnosed with EOS, which in some cases was combined with other phenotypes such as ASD or ID. I found some very rare variants that have a putative pathological impact on the phenotype of the patients according to in silico analysis. One variant was identified in the gene Serine/threonine-protein kinase 33 (STK33) that is a distant member of the CAMK group of serine/threonine kinases. The members of this family participate in the regulation of calcium homeostasis that was shown to be altered in patients with schizophrenia. To further evaluate the pathological impact of mutation in STK33 I created a cellular model in the SH-SY5Y cell line by the CRISPR-Cas9 technique mimicking the potential variant found in the patient. To describe the phenotype of the mutated cell line, I performed the analysis of gene and protein expression as well as calcium imaging experiments. The second project during my thesis was associated with characterization of a novel spontaneous mutation in the *Kcc2* gene in mouse suffering from spontaneous tonic-clonic seizures starting at the age of four months. The *Kcc2* gene codes the neuronal potassium chloride co-transporter KCC2, which participates in extrusion of chloride ions from cells, protection of neuronal networks against excitotoxicity, dendrite morphogenesis and in the maintenance of the excitation/inhibition balance. Variants in this gene are believed to have a strong potential to cause neurodevelopmental dysfunctions. Most of them are associated with Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures (EIMFS), which belongs to a group of rare epileptic syndromes. We developed the present study with the aim of characterizing the first spontaneous epilepsy model in mouse due to a mutation in the *Kcc2* gene by correlating neuronal activity, seizure appearance and social and cognitive behavior with gene expression. To date these functional studies were not performed since *Kcc2*-KO mice die few days after birth and heterozygous animals were never studied in detail. The mutation identified in our mice affects the same amino acid that has been found mutated in an EIMFS patient (R857L), offering a unique opportunity to study the etiology of EIMFS in vivo. So far, we observed that in mutant *Kcc2* mice, production of the protein is strongly decreased in brain cortex, hippocampus and striatum. Moreover, cross-linking assay and immunohistochemical analysis revealed a decrease of the KCC2 protein at the membrane level. By performing intracranial Electroencephalography, it was possible to observe the shape of the typical spike for epileptic mouse. For the time being, behavioral studies revealed that mutant *Kcc2* mice exhibit learning and memory deficits. These findings gave us a strong background for further evaluation of our model and a possibility to get further insight into the pathogenesis of EIMFS with the final purpose to define therapeutic interventions.

Keywords: Developmental Brain Disorders, schizophrenia, ASD, ID, candidate genes, STK33, cellular model, calcium imaging, *Kcc2*, epilepsy, mouse model, behavioral studies, proteomics, molecular signaling.



# Sofia FAZIO

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

Vendredi 11 Décembre 2020 à 11h30  
Salle Informatique et visioconférence - C3M - NICE

## Rôle du complexe Ro60/RNYs dans les macrophages chargés des lipides

(Role of Ro60/RNYs complex in lipid-laden macrophages)

devant le jury composé de :

Dr. Giulia CHINETTI	Présidente du Jury
Dr. Ustéfania MILLEVOI	Rapportrice
Dr. Francesco NICASSIO	Rapporteur
Dr. Stephan WAGNER	Examineur
Dr. Michele TRABUCCHI	Directeur de thèse
Dr. Jean-François TANTI	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Ro60, protéine de liaison à l'ARN qui s'associe aux RNYs pour former le complexe RoRNP, est une cible de la réponse immunitaire chez les patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) et du syndrome de Sjögren (SS). Les autoanticorps anti-Ro60 dans les patients SLE et SS peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules et se localiser dans le noyau. Les souris Ro60<sup>-/-</sup> développent un syndrome auto-immun et un statut pro-inflammatoire avec des caractéristiques de LED, indiquant l'implication de Ro60 dans la pathogenèse de cette maladie. D'autre part, les patients atteints de LED et de SS meurent principalement de troubles cardiovasculaires inflammatoires causés par une athérosclérose accélérée. Sur la base de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'inflammation et les accidents cardiovasculaires chez les patients SLE/SS seraient causés par le dysfonctionnement du complexe Ro60 dans le noyau.

Pendant ma thèse, nous avons montré que dans les macrophages chargés de lipides et dans les cellules THP-1 stimulées par des stimuli pro-inflammatoires, la dégradation des RNYs permettrait à Ro60 de se lier à la chromatine, d'une façon indépendante de l'ARN. Par analyse des données de ChIP-seq, nous avons caractérisé la distribution des sites de liaison Ro60 sur la

chromatine et trouvé une augmentation significative de la liaison de Ro60 lors du traitement à l'acide palmitique (PA) sur des promoteurs de gènes codants, indiquant que Ro60 pourrait être directement impliqué dans leur transcription.

Ensuite, nous avons effectué une analyse Exon-Intron Split (EISA), approche bioinformatique permettant de quantifier les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles à partir de données d'ARN-seq de différentes conditions expérimentales grâce à des expériences en cinétique. L'analyse EISA a été appliquée aux données d'ARN-seq obtenues à partir de cellules THP1 traitées ou non par le PA et en présence ou en absence de Ro60, en réduisant l'analyse sur les gènes ciblés par Ro60 et trouvés par ChIP-seq. Nos résultats indiquent qu'après 6h de traitement avec du PA, Ro60 favorise significativement la transcription de 247 gènes cibles qui régulent la réponse inflammatoire. Nous avons validé le contrôle direct sur trois gènes cibles en utilisant des cellules THP1 où l'expression de la protéine Ro60 a été réduite ou non de manière stable.

Enfin, pour identifier les partenaires moléculaires qui contribueraient à cette nouvelle fonction de Ro60, nous avons réalisé une analyse LC/MS/MS quantitative label-free à partir des complexes immunoprécipités contenant Ro60 dans des cellules THP-1 non traitées ou pas. Nous avons constaté que Ro60 interagit avec les composants des complexes TREX (TRanscription et EXport) et nucléopores (THOC1, THOC4 et TPR). THOC4 interagit directement avec Ro60. Ces résultats ont soulevé la possibilité que Ro60 régulerait la transcription et l'exportation des produits de transcription impliqués dans la réponse inflammatoire dans les macrophages grâce à son association avec le TREX. Nous avons donc effectué l'analyse EISA dans les cellules THP-1 traitées ou pas par le PA, en présence ou en absence de THOC4, et avons constaté que la synthèse de 25 transcrits, y compris TRIM62, ZEB1 et CPT1A, était régulée à la baisse en absence de THOC4 et de Ro60.

En conclusion, nous avons caractérisé une nouvelle fonction associée à la chromatine de Ro60, qui se lie à THOC4 pour réguler le programme d'expression génique des macrophages chargés de lipides. L'altération de ce nouveau mécanisme chez les patients LED/SS pourrait favoriser l'état inflammatoire global et le risque plus élevé de rencontrer des accidents cardiovasculaires. En plus de fournir de nouvelles informations sur la régulation de l'expression génétique, l'impact plus large de ce projet réside dans l'opportunité de fournir de nouvelles données étiologiques pour les patients atteints de LED et de SS.

Mots clés : Ro60, RNY, macrophage, inflammation, régulation transcriptionnelle

## **Abstract**

---

Ro60, an RNA-binding protein that associates with RNAs, is a clinical target of the immune response in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and Sjogren's syndrome (SS). SLE and SS autoantibodies, including the anti-Ro60 autoantibody, penetrate inside the cells and localize in the nucleus. Interestingly, mice lacking Ro60 develop an autoimmune syndrome and pro-inflammatory status with features of SLE, indicating that Ro60 loss-of-function is involved in SLE pathogenesis. SLE and SS patients mainly die of premature inflammatory cardiovascular disorders caused by accelerated atherosclerosis. Based on these observations, we

hypothesized that inflammation and cardiovascular accidents in SLE/SS patients would be caused by the dysfunction of Ro60 complex in the nucleus.

During my PhD, we showed that in human and mouse primary macrophages and THP-1 cells (human monocytic cell line) stimulated with pro-inflammatory and pro-atherogenic stimuli (lipid- laden macrophages), RNY degradation allows Ro60 to bind chromatin in an RNA-independent

fashion. To identify Ro60 binding sites on chromatin, we performed ChIP-seq analysis and found a significant increase of Ro60 binding upon palmitic acid (PA) treatment on promoters of coding genes, indicating that Ro60 could be involved in their transcription. By de novo motif discovery, we found two binding motifs that were significantly enriched in Ro60-binding sites.

Next, to study the function of chromatin-associated Ro60 on its target genes, we performed RNA-seq in time course experiments on PA-treated and untreated THP1 cells, in presence or absence of Ro60. After, on the RNA-seq data obtained, we performed Exon-Intron Split analysis (EISA), a bioinformatic approach to quantify transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression from RNA-seq data of time course experiments. Our results indicate that Ro60 significantly promotes the transcription of 247 target genes that regulate inflammatory response upon 6h of PA treatment. We validated the direct control on three target genes by using a stably viral infected sh-Ro60-THP1 cells and control. On the other hand, by GO-term analysis performed on the RNA-seq data, we found that Ro60 knockdown overall promotes a pro-inflammatory phenotype in PA-treated Mo.

Lastly, to identify Ro60 molecular partners that would contribute to this chromatin-associated function in lipid-laden macrophages, we performed a label-free quantitative LC/MS/MS analysis from the immunoprecipitated Ro60-containing complex in PA-treated and untreated THP-1 cells. We found that Ro60 interacts with components of the TREX (TRanscription and EXport) and nucleopore complexes, including THOC1, THOC4 and TPR. By performing co-IP experiments, we showed that THOC4 directly interacts with Ro60 on the chromatin and full cell extract. These results raised the possibility that Ro60 would directly regulate the transcription and export of transcripts involved in the inflammatory response in lipid-laden macrophages through its association with the TREX complex. We thus performed the EISA analysis in PA-treated and untreated THP-1 cells upon THOC4 knockdown and control and found that the synthesis of 25 transcripts, including TRIM62, ZEB1, and CPT1A, was downregulated in both THOC4 and Ro60 knockdown.

In conclusion, we characterized a novel chromatin-associated function of Ro60, which associates with THOC4 to regulate the gene expression program of lipid-laden macrophages. The impairment of this new Ro60-dependent mechanism in SLE/SS patients by the nuclear penetration of anti-Ro60 autoantibodies in Mo/Ma could promote the overall inflammatory status of these patients and the higher cardiovascular accidents risk. In addition to provide new insights into regulated gene expression programs, the broader impact of this project resides in an opportunity to provide new etiological inputs for SLE and SS patients.

Keywords : Ro60, RNY, macrophages, inflammation, transcriptional regulation

# Anca-Ioana GRAPA

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

Jeudi 11 Juin 2020 à 14h00

En visioconférence

## Characterization of fibronectin networks using graph-based representations of the fibers from 2D confocal images

### devant le jury composé de :

Pr. Isabelle BLOCH

Présidente du Jury

Pr. Alin ACHIM

Rapporteur

Pr. Jean-Pierre DA COSTA

Rapporteur

Dr. Laure BLANC-FERAUD

Examinatrice

Dr. Ellen VAN OBBERGHEN-SCHILLING

Directrice de Thèse

Dr. Xavier DESCOMBES

Directeur de Thèse

### Abstract

---

A major constituent of the Extracellular Matrix is a large protein called the Fibronectin (FN). Cellular FN is organized in fibrillar networks and can be assembled differently in the presence of two Extra Domains, EDA and EDB. Our objective was to develop numerical quantitative biomarkers to characterize the geometrical organization of the four FN variants (that differ by the inclusion/exclusion of EDA/EDB) from 2D confocal microscopy images, and to compare sane and cancerous tissues. First, we showed through two classification pipelines, based on curvelet features and deep learning framework, that the FN variants can be distinguished with a similar performance to that of a human annotator. We constructed a graph-based representation of the fibers, which were detected using Gabor filters. Graph-specific attributes were employed to classify the variants, proving that the graph representation embeds relevant information from the confocal images. Furthermore, we identified various techniques capable to differentiate the graphs, allowing us to compare the FN variants quantitatively and qualitatively. Performance analysis using toy graphs showed that the methods, which are based on graph matching and optimal transport, can meaningfully compare graphs. Using the graph-matching framework, we proposed different methodologies for defining the prototype graph, representative of a certain FN class. Additionally, the graph matching served as a tool to compute parameter deformation maps between the variants. These deformation maps were

analyzed in a statistical framework showing whether or not the variation of the parameters can be explained by the variance within the same class.

Keywords: image processing, machine learning, graph-matching, statistical parametric maps, extracellular matrix, fibronectin, cancer.

# Nino KUKHALEISHVILI

INPHYNI – Institut de Physique de Nice

Jeudi 17 Décembre 2020 à 14h00

En visioconférence depuis la Salle Claud Brot, Institut de Physique de Nice

## Biophysique de la croissance filamenteuse fongique et mécanique de perforation dans des élastomères (Biophysics of fungal filamentous growth and mechanics of perforation in elastomers)

### devant le jury composé de :

Pr. Arezki BOUDAUD

Dr. Catherine VILLARD

Pr. Jacques DUMAIS

Dr. Martine BASSILANA

Dr. Xavier NOBLIN

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Co-directrice de thèse

Directeur de Thèse

### Résumé

---

Les levures sont des champignons unicellulaires, qui peuvent être utiles (pain, bière) ou délétères pour l'homme. *Candida albicans* est une levure pathogène opportuniste de l'Homme, pouvant provoquer des infections superficielles mais aussi systémiques, pour lesquelles le pronostic vital est souvent engagé. Un des facteurs de virulence de cet organisme est sa capacité à transiter entre une forme ovoïde et une forme filamenteuse (hyphe), capable de pénétrer les tissus cellulaires. J'ai étudié pendant ma thèse la croissance d'hyphe de *C. albicans* (diamètre 2 microns environ) dans des élastomères de PDMS plus ou moins rigides. J'ai pu observer que ces hyphe sont capables de pénétrer de tels milieux aux rigidités comparables aux tissus humains. Mon travail s'est développé en deux parties.

Dans une première partie, j'ai étudié la pénétration dans du PDMS réticulé d'une tige macroscopique millimétrique pour mieux comprendre les mécanismes et forces en jeu, par analogie avec la perforation des hyphe de taille microscopique. J'ai mesuré les relations forces-déformation jusqu'au point où la tige ressort de l'échantillon de PDMS, ce qui constitue un aspect complètement original par rapport à l'état de l'art. J'ai pu montrer comment variait la

force critique de rupture, mais aussi les forces résistantes à la pénétration jusqu'à la sortie de la tige, et quantifier les effets de la rigidité du PMDS, mais aussi de la vitesse.

Dans une deuxième partie, j'ai manipulé des souches de *C. albicans* sauvage et mutées. J'ai observé et mesuré leur croissance dans des dispositifs en PMDS microfabriqués à puits par imagerie en temps réel. J'ai d'abord réalisé un travail important de conception de ces dispositifs, sachant que la plupart des observations nécessitaient une distance de travail faible, ajoutant une contrainte forte sur la fabrication de ces dispositifs. La pénétration de milieux de rigidité et contrainte de rupture contrôlables imposent aux filaments des forces résistantes à leur croissance, au plus proche de la situation réelle, qui fait de l'approche proposée une démarche originale. Grâce aux résultats de la première partie, nous avons pu déterminer la pression de turgescence générée dans les hyphes en utilisant un modèle récent de croissance.

Mots clés : Forces de perforation, Indentation, PDMS, *Candida albicans*, croissance invasive, pression de turgescence

## Abstract

---

Yeasts are unicellular fungi, which can be useful (bread, beer) or harmful to humans. *Candida albicans* is an opportunistic human pathogen, which can cause superficial as well as systemic infections, often life-threatening. One of the virulence factors of this organism is its ability to transit between an ovoid form and a filamentous form (hypha), capable of penetrating cellular tissues. During my thesis I studied the growth of *C. albicans* hyphae (diameter approximately 2 microns) in PDMS elastomers of various rigidity. I have observed that these hyphae are able to penetrate such environments with rigidities comparable to human tissues. My work was held into two parts.

On one hand, I examined the penetration in cross-linked PDMS of a macroscopic one-millimeter diameter probe to better understand the mechanisms and forces involved, by analogy with the perforation of hyphae of microscopic size. I measured the force-strain relationships up to the point where the probe protrudes from the PDMS sample, which is a completely original aspect compared to the state of the art. I was able to show how the critical breaking force varied, but also the forces resistant to penetration up to the exit of the probe and to quantify the effects of the rigidity of the PMDS, but also of the speed.

On the other hand, I worked with wild and mutated *C. albicans* strains. I developed and measured their growth in microfabricated PMDS membrane with chambers using real-time imaging. I first did a lot of work designing these membranes, most of the observations required a short working distance, which added a strong challenge on the manufacture of these membranes. The penetration of rigid media imposes on the filaments resistive stresses to their growth, as close as possible to the real situation. This makes the proposed approach an original

one. Thanks to the results of the first part, we were able to determine the turgor pressure displayed in the hyphae using a recent growth model.

Key words: Perforation forces, Indentation, PDMS, *Candida albicans*, Invasive growth, Turgor pressure



**Maria MENSCH**

UMR 7275 CNRS/UCA – IPMC – Sophia Antipolis

**Vendredi 13 Mars 2020 à 14h00**

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

## **Étude du rôle pathophysiologique des peptides A $\eta$ récemment découverts dans le cerveau**

**(Unraveling the physiopathological actions of the newly discovered A $\eta$  peptides in the brain)**

**devant le jury composé de :**

Dr Stéphane MARTIN

Président du Jury

Dr Thierry AMÉDÉE

Rapporteur

Dr Yoon CHO

Rapporteur

Dr Corinne BEURRIER

Examinatrice

Dr Laurent GIVALOIS

Examineur

Dr Hélène MARIE

Directrice de Thèse

### **Résumé**

---

L'implication de la protéine précurseur de l'Amyloïde (APP) est bien établie dans la pathologie Alzheimer, une des maladies neurodégénératives la plus étendue à travers le monde. Ces 30 dernières années de nombreuses études focalisent sur cette pathologie mais le progrès dans la compréhension de son étiologie et les cures possibles restent cependant limitées. Toutes les études concernant la forme familiale et les cibles potentielles, soulignent l'importance d'APP et des fragments issus de son clivage. Déchiffrer le rôle des différents fragments d'APP dans la fonction synaptique et leurs effets comportementaux est crucial dans la compréhension de l'étiologie de cette pathologie. En 2015, Willem et al, ont décrit une nouvelle voie de clivage produisant le peptide Amyloid- $\eta$  (A $\eta$ ). Ils ont pu démontrer que le peptide A $\eta$ - $\alpha$ , dans sa forme la plus longue, produit par le clivage de l' $\eta$ -secretase et  $\alpha$ -secretase, alimente des propriétés bioactives. Appliqué dans l'hippocampe ex vivo, il diminue la potentialisation à long terme (PLT) et in vivo il réduit les ondes calciques. Au-delà de ces observations initiales, ma thèse intitulée « Étude du rôle pathophysiologique des peptides A $\eta$  récemment découverts dans le cerveau » focalise sur le rôle d'A $\eta$  dans différents paramètres de la plasticité synaptique excitatrice et les

comportements associés. Nous avons testé les effets d'une augmentation aigue et chronique d'A $\eta$ - $\alpha$ , en administrant de l'A $\eta$ - $\alpha$  synthétique (M108) de manière aigue sur des tranches d'hippocampe ex vivo et via l'analyse de nouvelles lignées de souris transgéniques MISEPA2 et MISEPA4 sur-exprimant l'A $\eta$ - $\alpha$ . Nos résultats montrent l'impact d'A $\eta$ - $\alpha$  sur la plasticité synaptique à des concentrations nano-molaires en induisant une dépression à long terme (DLT), tandis que la plasticité présynaptique à court terme et la transmission synaptique basale sont inchangées. Puis, afin d'élucider les effets aigus et chroniques d'un taux élevé d'A $\eta$ - $\alpha$  sur la cognition, nous avons mené une série de tests mnésiques. L'analyse des lignées transgéniques révèle aucun déficit majeur de mémoire, bien que des altérations subtiles soient notables lors d'analyses individuelles. De plus des injections intracérébrales aigues de M108 chez des souris in vivo ne montrent pas de déficit de mémoire. Nous concluons que, bien que la plasticité synaptique excitatrice hippocampique soit clairement impactée par des taux élevés d'A $\eta$ - $\alpha$ , aucun phénotype comportemental majeur ne semble apparent. En parallèle, nous avons étudié la plasticité synaptique et le comportement dans un nouveau modèle de souris Knock-out APP $\Delta$ eta, dans lequel le clivage d'APP par la  $\eta$ -secretase est absent. Dans cette lignée la DLT ne peut pas être induite, mais l'application aigue de M108 rétablit la DLT. Ces données révèlent donc un rôle crucial de l'A $\eta$ - $\alpha$  dans ce mécanisme de plasticité synaptique. De plus, les souris APP $\Delta$ eta montrent un déficit en mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris et une baisse de l'anxiété dans le test d'openfield et les boites claires obscures, indiquant que le clivage d'APP par  $\eta$ -secretase est nécessaire dans les fonctions cognitives. En conclusion, nos résultats contribuent à la compréhension du rôle d'A $\eta$ - $\alpha$  dans la physiopathologie, mettant en avant son rôle essentiel dans la plasticité synaptique et la cognition.

Mots Clefs : APP, amyloid- $\eta$ , plasticité synaptique, cognition, hippocampe

## Abstract

---

The amyloid precursor protein (APP) is well known by its association with Alzheimer's disease (AD), the most common neurodegenerative disease worldwide. Despite intense research focusing on AD over the last 30 years, the progress in understanding its etiology and finding a cure has been limited. Thus far, all data gathered regarding the genetic causes of familiar AD, the progression of the disease, and potential therapeutic targets for AD, highlight the importance of APP and its cleavage products. Deciphering the role of the different APP fragments in synaptic function and behavior is crucial to understand AD etiology fully. In 2015, Willem et al., described a new APP processing pathway producing amyloid- $\eta$  (A $\eta$ ) peptides. They could demonstrate that the A $\eta$ - $\alpha$  peptide, the longest form of A $\eta$  produced by  $\eta$ -secretase and  $\alpha$ -secretase cleavage, harbors bioactive properties. Applied on the hippocampus ex vivo it lowers long-term potentiation (LTP) and in vivo it lowers calcium wave activity. Going beyond

these initial observations, my thesis, "Unraveling the physiopathological role of the newly discovered A $\eta$  peptides in the brain" focused on further identifying A $\eta$ - $\alpha$  actions on different parameters of excitatory synaptic plasticity and associated behavioral outputs. We tested the effects of acute and chronic elevations of A $\eta$ - $\alpha$ , employing acute application of synthetic A $\eta$ - $\alpha$  (M108) on hippocampal slices ex vivo or via the analysis of new transgenic mouse lines MISEPA2 and MISEPA4 overexpressing A $\eta$ - $\alpha$ , respectively. Our results show that A $\eta$ - $\alpha$  impacts synaptic plasticity at low nanomolar concentrations and shifts plasticity towards long-term depression (LTD), while it does not perturb pre-synaptic short-term plasticity or basal synaptic transmission. Next, to unravel the effects of both acute and chronic elevated A $\eta$ - $\alpha$  levels on cognition, we performed a series of memory-dependent behavioral tests. Analysis of the transgenic mouse lines indicated no major memory impairments, although subtle alterations were noticeable upon individual testing and analysis paradigms. Also, an acute injection of M108 in the brain in vivo did not correlate with significant memory loss. We conclude that, while hippocampal excitatory synaptic plasticity is clearly impacted by elevated A $\eta$ - $\alpha$  levels, this cellular phenotype failed to robustly translate into alterations of behavioral output thus far. In parallel, we went on to investigate the effects on synaptic plasticity and behavior caused by the absence of APP processed by  $\eta$ -secretase in a novel knock-out APP $\Delta$ Eta mice line. In this mouse line LTD could not be induced, but acute M108 application rescued this phenotype. These data reveal a crucial role of A $\eta$ - $\alpha$  in this synaptic plasticity mechanism. Additionally, APP $\Delta$ Eta mice exhibited impaired spatial memory in MWM task and reduced anxiety in the Open field and Light-Dark box tests, indicating that this APP cleavage is necessary for cognitive functions. In conclusion, our results advanced the understanding of the physio-pathological role of A $\eta$  in the brain, highlighting an essential function in excitatory synaptic plasticity and cognition.

Keywords: APP, amyloid- $\eta$ , synaptic plasticity, cognition, hippocampus

# Giorgia MILORO

Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR 7277 - INSERM U1091  
Faculté des Sciences – NICE

Vendredi 11 Décembre 2020 à 9h00  
iBV - Centre de Biochimie – NICE (visio-conférence)

## Déterminer le rôle du récepteur de mort Fas/CD95 dans la co-stimulation des cellules T

### (Deciphering the role of the death receptor Fas/CD95 in T cell co-stimulation)

#### devant le jury composé de :

Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT  
Dr Hai-Tao HE  
Dr Aurélie ROSSIN  
Dr Anne-Odile HUEBER

Président du Jury  
Rapporteur  
Examinatrice  
Directrice de Thèse

#### Résumé

---

Fas (CD95 / TNFRSF6), un récepteur transmembranaire de type I de la superfamille des récepteurs au TNF (TNFR), est un activateur de mort cellulaire bien connu. Cependant, il a également été impliqué dans des fonctions de non-mort cellulaires, telles que la survie, la différenciation et la migration. Alors que la cascade moléculaire qui initie l'apoptose lors de l'engagement de Fas avec son ligand FasL est particulièrement bien décrite, les informations concernant les mécanismes moléculaires sous-tendants les voies non apoptotiques médiées par Fas sont rares. Comme indiqué par les manifestations d'auto-immunité et de lymphoprolifération chez les patients ALPS porteurs de mutations dans le récepteur ou dans son ligand, le système Fas / FasL joue un rôle majeur dans l'homéostasie des lymphocytes T et dans le contrôle de l'auto-immunité et du cancer. D'un côté, la mort médiée par Fas a été décrite comme critique pour (i) la suppression des lymphocytes autoréactifs, et donc dans le maintien de la tolérance périphérique; (ii) le contrôle du nombre de lymphocytes activés par des antigènes faibles lors d'infections par des pathogènes.

De l'autre côté, certaines fonctions de non mort de Fas ont été décrites dans les cellules T, parmi lesquelles le rôle de Fas comme récepteur co-régulateur de l'activation du TCR. Malgré l'importance potentielle de ce rôle dans les stratégies immuno-thérapeutiques, seules quelques études controversées liées à cette implication ont été réalisées. En effet, alors que plusieurs études ont décrit Fas comme un récepteur costimulateur du TCR, d'autres ont défini une inhibition de l'activation des lymphocytes T lors d'une stimulation concomitante de Fas et du TCR. Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse consistait à disséquer moléculairement la co-signalisation Fas-TCR.

En utilisant à la fois des cellules T primaires et des lignées cellulaires portant un TCR transgénique spécifique, nous avons pu définir Fas comme un récepteur co-stimulateur. En exploitant les approches biochimiques ainsi que la cytométrie en flux et la microscopie, nous avons déchiffré la co-stimulation Fas-TCR à la fois au niveau fonctionnel et moléculaire. Premièrement, nous avons montré que la co-stimulation Fas-TCR se produit à la fois dans les cellules T naïves et les cellules T mémoire ainsi que dans les souspopulations CD4 + et CD8 +.

Moléculairement, nous avons décrit que Fas renforce la signalisation TCR dès les étapes précoces, puisque la phosphorylation des premières protéines impliquées dans l'activation du TCR est augmentée. En outre, les formes membranaires et solubles de FasL sont capables d'initier le signal co-stimulateur de Fas. Enfin, nous avons pu exclure l'implication de FADD et Caspase-8, premiers acteurs de la signalisation Fas, dans la co-activation, et, de manière importante, l'implication du domaine de mort de Fas, suggérant le rôle d'un autre domaine de Fas. Décrire les mécanismes moléculaires et le contexte dans lequel la co-stimulation Fas-TCR se produit pourrait être d'une importance cruciale dans la compréhension de la physiopathologie de Fas dans les cellules T, mais également pour l'établissement de futures stratégies immuno-thérapeutiques.

Mots clés : Récepteur de mort Fas, activation des lymphocytes T, point de contrôle immunitaire du TCR, immuno-thérapie, co-stimulation du TCR, système immunitaire.

## Abstract

---

Fas (CD95/TNFRSF6), a type-I transmembrane receptor of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily, is a well-known cell death activator. However, it has been also implicated in non-cell death processes including cell survival, differentiation, migration. Whereas the molecular cascade that initiates apoptosis upon Fas engagement with its ligand FasL is particularly well described, the informations concerning the molecular mechanisms underlying the Fas mediated non-apoptotic pathways are sparse.

As indicated by the induction of autoimmunity and lymphoproliferation in ALPS patients harboring mutations in either the receptor or its ligand, the Fas/FasL system plays a major role in T cell immune homeostasis and thus, in the control of autoimmunity and cancer. On one

side, the Fas mediated death has been described critical for (i) the deletion of autoreactive lymphocytes, and thus in the maintenance of peripheral tolerance; (ii) the control of the number of lymphocytes activated by weak antigens during pathogen infections.

On the other side, and beyond cell death induction, some Fas non-death pathways have been described in T cells, among which the role of Fas as co-regulatory receptor for the TCR during its activation. Despite the potential importance of this role in immunotherapeutic strategies, only few and controversial studies related to this involvement were done. Indeed, whereas several studies have described Fas as a TCR co-stimulatory receptor, others defined an inhibition of T cell activation by Fas-TCR concomitant stimulation. In this context, the aim of my PhD project consisted into molecularly dissect the Fas-TCR co-signaling.

By using both primary T cells and cell lines bearing a specific transgenic TCR, we could define Fas as a costimulatory receptor. By exploiting biochemical approaches as well as flow cytometry and microscopy we could decipher the Fas-TCR crosstalk both at functional and molecular level. First, we show that Fas-TCR costimulation occurs in both naïve and in memory T cells as well as in both CD4+ and CD8+ T cell subpopulations. Molecularly, we could describe that Fas enhances the TCR signaling at membrane proximal level, since the phosphorylation of the first proteins involved in TCR activation is increased. Furthermore, both membrane bound and soluble FasL are capable to initiate Fas co-stimulatory signal. Lastly, we could exclude the involvement of FADD and Caspase-8, first actors of Fas signaling, in the co-activation, and even more importantly, the involvement of the death domain of Fas cytoplasmic tail, unveiling the implication of another Fas receptor domain.

To describe the molecular mechanisms and the context where Fas-TCR co-stimulation occurs might be of an outstanding importance in the comprehension of Fas physiopathology in T cells and for future studies that might involve its potential for immunotherapeutic strategies.

Keywords: Death receptor Fas, T cell activation, TCR immune checkpoint, immunotherapy, TCR costimulation, immune system.

# Gaurav PANDHARIKAR

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

Lundi 15 Juin 2020 à 9h00

Institut Sophia Agrobiotech, en visioconférence

## Symbiose fixatrice d'azote versus nutrition minérale azotée : conséquence sur l'interaction entre *Medicago truncatula* et le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*

devant le jury composé de :

Dr Marc LEPETIT

Rapporteur

Dr David GIRON

Rapporteur

Dr. Jean-Christophe SIMON

Examineur

Pr. Pierre FREUDO

Directeur de Thèse

Pr. Marylène POIRIÉ

Directrice de Thèse

### Résumé

---

Les symbiotes jouent un rôle crucial dans le phénotype de leur hôte et dans son adaptation à l'environnement. Cependant, jusqu'à récemment, les interactions plantes-insectes étaient étudiées sans tenir compte de la présence de bactéries symbiotiques chez les partenaires impliqués. De nouvelles découvertes ont démontré que les communautés racinaires et aériennes des plantes sont liées. Dans ce contexte, mon doctorat s'interroge sur la façon dont les interactions entre les espèces végétales et les insectes sont modulées par leurs symbiotes respectifs. Dans un premier temps, j'ai analysé le rôle de la symbiose fixatrice d'azote (NFS) chez la légumineuse *Medicago truncatula* (A17) dans l'interaction avec des lignées de pucerons du pois *Acyrtosiphon pisum* portant différents endosymbionts facultatifs (FS). Pour ce faire, j'ai comparé la croissance de plantes de *M. truncatula* inoculées avec la bactérie nodulante *Sinorhizobium meliloti* (NFS) ou arrosées avec une solution de nitrate (non inoculées ; NI) infestées par des lignées de pucerons du pois provenant d'un même clone génétique (YR2) soit sans FS ou avec *Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica* ou *Regiella insecticola*. La croissance des plantes NSF et NI est réduite par l'attaque des pucerons, tandis que la croissance des pucerons (mais pas leur survie) a été fortement réduite sur les plants NFS. En présence de

pucerons la capacité de fixation d'azote des plantes NFS est réduite suite à l'induction d'une sénescence précoce des nodules. Enfin, chez les plantes NFS, toutes les lignées de pucerons ont déclenché l'expression du gène Pathogenesis-Related-1 (PR1), un marqueur de la voie salicylique (SA), et du gène Proteinase inhibitor (PI), un marqueur de la voie jasmonique (JA), tandis que chez les plantes NI, seule l'expression de PR1 a été déclenchée. Ainsi, le statut symbiotique de la plante influence clairement les interactions plante-puceron et la réponse de la plante à l'infestation, alors que le statut symbiotique du puceron ne fait que moduler l'amplitude de cette réponse. Il a été démontré que le génotype de la plante et du puceron sont tous deux importants dans le résultat de leur interaction, j'ai donc étudié plus en détail comment la NFS affecte l'interaction entre différents génotypes de plantes et de pucerons. Pour cela, j'ai utilisé trois génotypes différents d'*A. pisum* dépourvus de FS (LL01, YR2, T3-8V1) et deux génotypes de *M. truncatula* (A17 et R108) en présence ou en absence *S. meliloti*. La performance de chaque génotype de puceron sur les deux génotypes de plantes et l'effet des différents génotypes de pucerons sur la croissance des plantes et la capacité de fixation de l'azote des plantes de SNF ont été mesurés. Nous avons également estimé la réponse de défense médiée par le génotype de *M. truncatula* déclenchée par les différents génotypes de pucerons en utilisant différents gènes marqueurs des voies de défense JA et SA. J'ai constaté que les génotypes plantes-insectes ainsi que la présence de *S. meliloti* affectent de manière significative les interactions plantes-aphides. Ainsi, les interactions génétiques interspécifiques entre la plante hôte et les pucerons ainsi que leur statut symbiotique peuvent influencer la dynamique de la population et la structure de la communauté. Ces résultats montrent que l'interaction plante-insecte est fortement influencée par la génétique des espèces et par leur statut symbiotique, ajoutant un nouveau niveau de complexité qui reste à explorer.

Mots clefs : Puceron du pois (*Acyrtosiphon pisum*), *Medicago truncatula*, symbiose facultative, symbiose, rhizobium, fixation de l'azote, défense des plantes.

## Abstract

---

Symbionts play a crucial role in shaping their host phenotype and driving its adaptation to the environment. However, until recently plant-insect interactions were studied disregarding the symbiotic bacterial presence in the involved partners. New findings have now demonstrated that above- and belowground plant communities are linked through biotic interactions. In this context, my PhD questions how the interaction between plant-insect species are modulated by their respective symbionts. In the first part of my work I have analysed the effect of the nitrogen fixing symbiosis (NFS) in the leguminous *Medicago truncatula* (A17) in interaction with pea aphid *Acyrtosiphon pisum* lines bearing different facultative endosymbionts (FS). For this, first I have compared the growth of *M. truncatula* plants either inoculated with the nodules inducing bacteria *Sinorhizobium meliloti* (NFS) or supplemented with nitrate (non-inoculated; NI), infested with pea aphid lines derived from the same genetic clone (YR2) and bearing either no FS or *Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica* or *Regiella insecticola*. As expected, growth of both NFS and NI plants was reduced by the aphid attack, while aphid growth (but not survival) was strongly reduced on NFS compared to NI plants. Interestingly, most aphid lines decreased



the plant nitrogen fixation capacity of NFS plants by inducing an early nodule senescence. Finally, in NFS plants all aphid lines triggered the expression of Pathogenesis Related Protein 1 (PR1), a marker of the salicylic (SA) pathway, and of Proteinase Inhibitor (PI), a marker of the jasmonic (JA) pathway, while in NI plants only PR1 expression was triggered. Thus, the plant symbiotic status influences clearly the plant–aphid interactions and the plant response while the aphid symbiotic status only modulates the response amplitude. Since both plant and aphid genotypes are important in the outcome of their interaction, I further studied how plant symbiosis affect the plant-insect genotype x genotype interaction. For this, I used three different pea aphid genotypes devoid of FS (LL01, YR2, and T3-8V1) and two *M. truncatula* genotype (A17 and R108) combinations in the presence or absence of rhizobacteria. The performance of each aphid genotype on both plant genotypes and the effect of different aphid genotypes on the plant growth and nitrogen fixation capacity of NFS plants were measured. We also estimated *M. truncatula* genotype-mediated defence response triggered by the different aphid genotypes using multiple gene markers of the JA and SA defence-pathways. I found that the plant-insect genotypes as well as the rhizobacteria presence significantly affect plant-aphid interactions. These results show that the outcome of the plant-insect interaction is strongly impacted by the genotype of the species and by their symbiotic status, rising a new level of complexity that remains to be explored.

Key words: Pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*), *Medicago truncatula*, Facultative symbiont, symbiosis, rhizobium, nitrogen fixation, plant defence

# Paula PERESSINI LOPEZ

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

Lundi 29 Juin 2020 à 14h00  
en visioconférence

## Activité du rétrotransposon L1 dans les cellules musculaires

### devant le jury composé de :

Dr Eric RÖTTINGER	Président du Jury
Dr. Chantal VAURY-ZWILLER	Rapporteuse
Dr. Pierre-Antoine DEFOSSEZ	Rapporteur
Dr. Deborah BOURC'HIS	Examinatrice
Dr. Gaël CRISTOFARI	Directeur de Thèse
Dr. Chloé FÉRAL	Directrice de Thèse

### Résumé

---

Près de la moitié du génome humain provient d'éléments transposables (TE). Parmi eux, l'élément LINE-1 ou L1 (Long INterspersed Element-1) forme la seule famille d'éléments transposables actuellement active et autonome chez l'Homme. Bien que des centaines de milliers de copies soient dispersées dans le génome humain, seules 80 à 100 d'entre elles sont encore compétentes pour la rétrotransposition, c'est-à-dire capables de se reproduire par un mécanisme de "copier-coller" via un ARN intermédiaire et une étape de transcription inverse. L'activité des L1s peut avoir des conséquences délétères, en particulier par mutagenèse insertionnelle. Elle est néanmoins étroitement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Inversement, des facteurs d'hôtes spécifiques sont nécessaires pour accomplir le cycle répliatif des L1s. Lorsqu'elles se produisent dans la lignée germinale ou dans l'embryon précoce, les insertions de L1 peuvent être transmises à la génération suivante. La rétrotransposition des L1s a également été décrite dans certains tissus somatiques, comme dans les tumeurs épithéliales et dans le cerveau, à la fois dans les cellules progénitrices neurales et dans les neurones différenciés. Néanmoins, les niveaux d'expression des L1 compétents pour la rétrotransposition, et leur mobilisation, dans d'autres tissus somatiques restent incertains.

Ici, nous avons étudié l'activité des rétrotransposons L1 dans les cellules musculaires squelettiques humaines et murines. Nous montrons que la protéine du L1 la plus abondante, ORF1p, qui est essentielle à la rétrotransposition, est indétectable dans nos conditions expérimentales, dans des échantillons murins ou humains de muscle squelettique, alors qu'elle est facilement détectable dans les cellules cancéreuses ou dans les testicules. De même, elle n'est pas détectée dans les myoblastes immortalisés d'origine murine ou humaine. En revanche, nous avons découvert que le L1 est capable de rétrotransposition dans les myoblastes humains et murins lorsqu'elle est exprimée à partir d'un plasmide ou d'une copie intégrée avec un promoteur constitutif ou inductible, respectivement. En conclusion, si l'expression du L1 est inférieure à la limite de détection dans le muscle, les myoblastes sont bien permissifs à la rétrotransposition, ce qui indique que ces cellules expriment tous les facteurs cellulaires nécessaires pour réaliser ce processus, et n'expriment pas de facteurs de restriction significatifs qui bloqueraient la rétrotransposition.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'activité somatique des L1s pourrait ne pas être restreinte au cerveau ou aux cellules cancéreuses, mais pourrait également avoir lieu dans les muscles dans des conditions environnementales ou pathologiques qui déclencheraient leur expression.

Mots Clefs : rétrotransposon, muscle squelettique, vieillissement, insertion

## Abstract

---

Almost half of the human genome derives from transposable elements (TE). Among them, the Long INterspersed Element-1 (LINE-1 or L1) forms the only currently active and autonomous transposable element family in humans. Although hundreds of thousands L1 copies are dispersed in the human genome, only 80-100 of them are still retrotransposition competent, i.e. able to replicate by a "copy-and-paste" mechanism via an RNA intermediate and a reverse transcription step. On the one hand, L1 activity can have deleterious consequences, such as insertional mutagenesis, and is tightly regulated at the transcriptional or post-transcriptional levels. However, specific host factors are necessary for completion of L1 replication cycle. When occurring in the germline or in the early embryo, L1 insertions can be transmitted to the next generation. Somatic retrotransposition has been also described in epithelial tumors and in the brain, both in neural progenitor cells and differentiated neurons. Nevertheless, the extent of L1 expression and mobilization in other somatic tissues remains unclear.

Here, we investigated the activity of L1 retrotransposons in human and mouse skeletal muscle cells. We show that the most abundant L1 protein, ORF1p, which is essential to retrotransposition, is undetectable under our experimental conditions, in mouse or human muscle samples, while it is readily detected in cancer cells or in testis. Similarly, it was undetected in immortalized mouse or human myoblasts. However, we found that L1 is capable of retrotransposition in human and mouse myoblasts when expressed from a plasmid or from an integrated copy with a constitutive or inducible promoter, respectively. In conclusion, while

L1 expression is under the limit of detection in muscle, myoblasts are permissive to retrotransposition, indicating that these cells express all the cellular factors necessary to achieve this process, and do not express significant restriction factors that would prevent retrotransposition.

Altogether, our findings suggest that somatic L1 activity could not be confined to the brain or cancer cells, but could also occur in muscles under environmental or pathological conditions that would unleash L1 expression.

Keywords: retrotransposon, skeletal muscle, aging, insertion

# Marta PRIETO GARCIA

UMR 7275 CNRS/UCA – IPMC – Sophia Antipolis

Mardi 02 Juin 2020 à 9h00

En visioconférence

## Conséquences physiopathologiques d'une mutation faux sens X-fragile

### devant le jury composé de :

Dr Barbara BARDONI	Présidente du Jury
Pr Jonathan HANLEY	Rapporteur
Dr Julie PERROY	Rapporteuse
Dr Frédéric LAUMONNIER	Examineur
Dr Stéphane MARTIN	Directeur de Thèse

### Résumé

---

Mon projet de thèse vise à élucider les conséquences physiopathologiques d'une mutation faux sens sur le gène FMR1 identifiée chez des patients atteints du syndrome du X fragile (SXF). Le SXF est la forme la plus fréquente de déficience intellectuelle (DI) héréditaire et l'une des principales causes monogéniques connues d'autisme pour laquelle il n'existe pas de traitement efficace. Cette maladie est généralement causée par une expansion anormale du triplet CGG dans le 5' UTR du gène FMR1, entraînant son extinction transcriptionnelle et en conséquence, la perte d'expression de la protéine FMRP. FMRP est une protéine liant les ARNm et les transportant dans des granules le long des dendrites jusqu'à la base des synapses actives pour permettre la régulation de la traduction locale. Une des caractéristiques principales du SXF est la surabondance de protrusions dendritiques immatures qui conduisent à des déficits de transmission et de plasticité synaptiques. Plusieurs mutations faux sens du gène FMR1 ont été récemment identifiées chez les patients atteints de SXF. Trois patients sans lien de parenté, dont une femme, présentaient la mutation R138Q dans FMRP. Il est intéressant de noter que cette mutation se localise près d'un des sites actifs de la SUMOylation de FMRP, le résidu de lysine 130 (K130). Nous avons démontré que la SUMOylation de FMRP en réponse à l'activation des récepteurs mGlu5R est responsable de sa dissociation des granules d'ARNm, permettant ainsi la libération et la traduction locale de ses cibles d'ARNm. En retour, les épines dendritiques surnuméraires sont éliminées et/ou maturées. Nous avons donc émis l'hypothèse que la

mutation R138Q pourrait modifier la régulation de la SUMOylation de FMRP et par conséquent, sa fonction synaptique, participant ainsi à l'étiologie du SXF chez ces patients. À cette fin, nous avons généré un modèle de souris knock-in (R138Q-KI) portant la mutation humaine FMRP-R138Q. Lors de ma thèse, j'ai caractérisé ce nouveau modèle de souris sur le plan moléculaire, cellulaire, électrophysiologique et comportemental.

Mots Clefs : SXF, FMRP, R138Q, synapse, sumoylation

## Abstract

---

My PhD project aims to unravel the pathophysiological consequences of an FMR1 missense mutation identified in Fragile X Syndrome (FXS) patients. FXS is the most frequent form of inherited Intellectual Disability (ID) and a leading monogenic cause of autism for which there are no effective therapies available. This disorder is typically caused by an abnormal expansion of CGG repeats within the 5' UTR of the FMR1 gene, resulting in its transcriptional silencing and consequently, the loss-of-expression of the FMRP protein. FMRP is an RNA-binding protein that transports mRNAs in granules along dendrites to the base of active synapses for local translation in an activity-dependent manner. A hallmark of FXS is the overabundance of immature dendritic protrusions, leading to synaptic transmission and plasticity deficits. Several FMR1 missense mutations were recently identified in FXS patients. Among them, three unrelated patients presented the same R138Q mutation, including one female. Interestingly, this mutation localizes close to one of the active SUMO sites of FMRP, the lysine 130 (K130) residue. We showed that the mGlu5R-dependent sumoylation of FMRP triggers its dissociation from mRNA granules, allowing the release and local translation of its mRNA targets which in turn, regulate spine maturation and elimination. We thus hypothesized that the R138Q mutation may alter the mGlu5R-dependent FMRP sumoylation and consequently, its synaptic function, thereby participating in the aetiology of FXS in these patients. To this purpose, we generated an *Fmr1* R138Q knock-in (R138Q-KI) mouse model. Here, I present the results obtained during my PhD on the characterization of this novel mouse model at the molecular, cellular, electrophysiological and behavioural levels.

Keywords: FXS, FMRP, R138Q, synapse, sumoylation

**Serena SILVANO**

Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR 7277 - INSERM U1091  
Faculté des Sciences – NICE

**Vendredi 11 Décembre 2020 à 14h00**  
Soutenance de Thèse confidentielle à Huis Clos

## **Novel strategies to induce pancreatic beta-cell neogenesis and regeneration**

**devant le jury composé de :**

Dr Gérard GRADWOHL

Dr Jean-Sébastien ANNICOTTE

Dr Elvire GOUZE

Dr Patrick COLLOMBAT

Président du Jury et Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de Thèse

---

Thèse confidentielle à Huis Clos

# Meng-Chen TSAI

UMR 7275 CNRS / UCA – IPMC & UMR 2001 CNRS / Institut Pasteur - Paris

Jeudi 17 Décembre 2020 à 14h30

IPMC - Sophia Antipolis

## Les phospholipides polyinsaturés dans les larges déformations membranaires induites par les toxines bactériennes

### devant le jury composé de :

Dr Ludger JOHANNES

Président du Jury

Dr Gervaise LOIRAND

Rapporteuse

Dr Jean-Bastisite MANNEVILLE

Rapporteur

Dr Thierry FERREIRA

Examineur

Dr Hélène BARELLI

Directrice de Thèse

Dr Emmanuel LEMICHEZ

Directeur de Thèse

### Résumé

---

La plupart des membranes cellulaires contiennent des phospholipides (PL) avec des chaînes acyles saturées et mono-insaturées. Cependant, les PL polyinsaturés (PUPL) sont des composants membranaires abondants dans certaines cellules spécialisées, notamment les neurones et les cellules endothéliales. Précédemment, nous avons montré que l'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras polyinsaturé qui appartient à la famille des omega 3, réduisait le coût énergétique de la tubulation membranaire, facilitant ainsi la formation de vésicules dans les processus d'endocytose. Ici, nous étudions les effets du DHA dans les PL sur deux processus distincts d'invasion bactérienne ciblant les cellules endothéliales qui reposent soit sur l'inactivation de la RhoA GTPase, soit l'activation des Rho GTPases. Le premier processus est la formation de macroapertures transendothéliales (TEMs) ou tunnels, induits par une toxine bactérienne. Les TEMs représentent une nouvelle voie d'extravasation bactérienne dans les tissus à travers l'endothélium. Le second processus est l'invasion des cellules endothéliales par *Escherichia* pathogène extra-intestinal (ExPEC).

Nous avons modifié le profil lipidique des PL en terme de chaînes acylées dans les cellules endothéliales humaine de la veine ombilicale (HUVEC) par des régimes alimentaires à base d'acides gras définis. Dans des conditions de régime DHA où le pourcentage de DHA-PL à la membrane plasmique augmente, nous avons observé une augmentation de la fréquence d'ouverture des TEMs induits par l'exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum* qui inactive la GTPase RhoA. L'effet facilitant la nucléation des TEMs est attribué à une diminution de



l'épaisseur des cellules résultant de l'enrichissement en DHA-PL. Les TEMs dans un environnement enrichi en DHA-PL sont aussi plus petits et transitoires, montrant une densité plus élevée. Le produit de la taille maximale des TEMs par leur nombre reste pourtant constant, ce qui indique que la surface totale occupée par les TEM dans une cellule reste similaire. Notre étude montre donc une régulation homéostatique dans la cellule afin d'équilibrer la tension membranaire pour empêcher l'éclatement de la cellule induit par des toxines bactériennes.

Comme preuve plus large de l'importance des niveaux de PULP dans les membranes, nous avons découvert que l'augmentation du pourcentage de DHA-PL à la membrane plasmique réduit l'invasion des cellules endothéliales par une souche d'*E. coli* uropathogène, médiée par une toxine bactérienne activatrice des GTPases Rho. Dans l'ensemble, nos résultats mettent en lumière le rôle inhibiteur des PULP contenant du DHA sur les larges déformations de la membrane plasmique provoquées par l'actine et induites par deux familles de toxines bactériennes, qui affectent la signalisation de la Rho GTPase pour permettre l'invasion des cellules ou des tissus par des bactéries pathogènes.

Mots Clefs : membrane, phospholipides polyinsaturés, invasion bactérienne, macro-ouverture transendothéliales, acide docosahexaénoïque, *E. coli* uropathogène

## Abstract

---

Most cellular membranes contain phospholipids (PL) with saturated and mono-unsaturated acyl chains. However, polyunsaturated PL (PUPL) are abundant membrane components in some specialized cells, notably neurons and endothelial cells. Previously, we showed that docosahexaenoic acid (DHA), a polyunsaturated fatty acid that belongs to the omega 3 family, reduced the energy cost for membrane tubulation, thereby facilitating vesicle formation in endocytosis processes. Here, we investigate the effects of DHA in PL on two distinct bacterial invasion processes in endothelial cells, which rely on either RhoA GTPase inactivation or the activation of Rho GTPases. The first process is bacterial-toxin induced formation of transendothelial cell macroapertures (TEMs) or tunnels, which represents a novel path for bacterial extravasation in tissues through the endothelium. The second process is extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) invasion of endothelial cells.

We modified the lipidic profile of PL in terms of acyl chains in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) by defined fatty acid diets. Under DHA-diet conditions where the level of DHA-PL in the plasma membrane increased, we observed that the frequency of TEM openings increased in cells treated with the RhoA inactivating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum*. The facilitating effect on TEM nucleation was attributed to the thinner cell thickness resulting from DHA-PL enrichment. DHA-PL-enriched environment also triggered an increase of the density of TEMs that display smaller apertures and shorter lifetimes. The product of TEMs maximal size by their number remained constant, indicating the total area occupied by TEMs in a cell remains similar. We therefore show a homeostatic regulation in the host cell in order to balance the membrane tension to prevent cell rupture induced by bacterial toxins.

As a broader evidence of the importance of PUPL-levels in membranes, we found that increase of DHA-PL at the plasma membrane reduced bacterial toxin-induced invasion of endothelial cells by uropathogenic *E. coli*. Altogether, our results shed light on the role of DHA-containing PUPL on actin-driven large-scale plasma membrane deformations triggered by two families of bacterial toxins, which jeopardize Rho GTPase signaling to allow cell or tissue invasion by pathogenic bacteria.

Keywords : membrane, polyunsaturated phospholipids, bacteria invasion, transendothelial cell macroaperture, docosahexaenoic acid

# Marwa ZERHOUNI

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

Mardi 07 Juillet 2020 à 15h00

En visioconférence et Amphithéâtre Rampal - C3M – NICE

## Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome cutané métastatique et les syndromes myélodysplasiques : Caractérisation et validation préclinique de composés innovants

### devant le jury composé de :

Dr Rachid BENHIDA

Pr Issam BEN-SAHRA

Dr Lionel LARUE

Dr Patrice DUBREUIL

Dr Patrick AUBERGER

Dr Stéphane ROCCHI

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de Thèse

Directeur de Thèse

### Résumé

---

Le mélanome cutané métastatique et les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont deux cancers incurables développant des résistances à leurs traitements antitumoraux de référence. Les cellules résistantes à ces thérapies sont caractérisées par une reprogrammation métabolique qui influence et facilite la progression tumorale. Par conséquent, l'inhibition des voies métaboliques semble être une stratégie thérapeutique prometteuse dans ces deux pathologies.

Les deux équipes impliquées dans ce projet de thèse collaborent de longue date dans le domaine du cancer. Dans ce contexte et en partenariat avec l'Institut de Chimie de Nice, nos deux équipes ont mis au point des composés innovants ciblant les balances énergétiques intra cellulaires et la voie de l'AMPK. Parmi ces composés nous nous sommes intéressés plus précisément à l'AICAR (Acadésine). Un criblage d'efficacité et des études de structure-activité,

nous ont permis d'optimiser la structure de nos composés. Sur la base de leur solubilité, de leur stabilité et sur leur capacité à induire la mort cellulaire de cellules tumorales, nous avons identifié le HA 344 comme composé « lead ».

Cette étude propose de caractériser et de valider un nouvel inhibiteur covalent, le HA 344, dérivé de l'Acadésine, efficace sur des lignées de mélanomes et SMD sensibles et résistants à leur traitement de référence mais également sur cellules de patients. En combinant des techniques de click chimie, protéomique et métabolomique, nous avons identifié cette molécule comme un inhibiteur covalent de deux hubs métaboliques différents au sein des cellules tumorales. HA 344 inhibe l'étape finale et limitante de la glycolyse par sa liaison covalente à l'enzyme pyruvate kinase M2 (PKM2), et bloque simultanément l'activité de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), l'enzyme limitante de la synthèse de novo de guanylate. HA 344 bloque la croissance tumorale in vitro et in vivo de cellules de mélanome sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF. Ainsi, ce mécanisme d'action spécifique du HA 344 offre une nouvelle voie thérapeutique potentielle pour les patients atteints de mélanome cutané métastatique et d'autres cancers.

Mots Clefs : Thérapie ciblée, mélanome, leucémie, résistance acquise, inhibiteur covalent, glycolyse, PKM2, synthèse des purines, IMPDH

## Abstract

---

Cutaneous metastatic melanoma (CMM) and myelodysplastic syndromes (MDS) are two incurable cancers developing resistance to their reference antitumor treatments. Cells resistant to these therapies are characterized by a metabolic reprogramming, which profoundly influences and promotes tumor progression. Therefore, inhibition of metabolic pathways seems to be a promising therapeutic strategy to overcome resistance in these two pathologies.

The two teams involved in this thesis project have a long-lasting collaboration in the field of cancer. In this context and in partnership with the Nice Institute of Chemistry, our two teams have developed innovative compounds targeting intra-cellular energy balances and the AMPK pathway. Among these compounds, we were more specifically interested in AICAR (Acadesine). Screening efficiency and structure-activity studies enabled us to optimize the structure of our compounds. Based on their solubility, their stability, and their ability to induce tumor cells death, we have identified HA 344 as a lead compound.

This study describes the characterization and validation of a new covalent inhibitor, HA 344, derived from Acadesine, effective on CMM and MDS cell lines either sensitive or resistant to their reference treatment but also on CMM and MDS patient cells. By combining click chemistry, proteomics, and metabolomics approaches, we have identified this molecule as a

covalent inhibitor of two different metabolic hubs within cancer cells. HA 344 inhibits the final and rate-limiting step of glycolysis through its covalent binding to the pyruvate kinase M2 (PKM2) enzyme, and concurrently blocks the activity of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), the rate-limiting enzyme of de novo guanylate synthesis. HA 344 efficiently eliminates tumor growth of BRAF inhibitor sensitive- and resistant-CMM cells both in vitro and in vivo. Thus, this specific mechanism of action of HA 344 provides potential therapeutic avenues not only for patients with CMM but also a broad range of cancers.

Keywords: Targeted therapy, melanoma, leukemia, acquired resistance, covalent inhibitor, glycolysis, PKM2, purine synthesis, IMPDH