

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 426 :  
GÈNES GÉNOMES CELLULES

Laboratoire : CNRS, UMR 9197, Institut des Neurosciences Paris-Saclay

**THÈSE DE DOCTORAT**

**SYNTHESE EN FRANCAIS**

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

**Alessandro BROMBIN**

Functional study of the role played by nucleolar proteins in  
the control of neural progenitor homeostasis using zebrafish  
as a model

**Date de soutenance : 29/09/2015**

**Composition du jury :**

Directeur de thèse :	Jean-Stéphane JOLY	DR2 (INRA)
Rapporteurs :	Francesco ARGENTON Pierre-Emmanuel GLEIZES	Professeur (Università degli Studi di Padova) Professeur (Université de Toulouse - Paul Sabatier)
Examineurs :	Pierre CAPY Frédéric CATEZ Morgane LOCKER	Professeur (Université de Paris Sud) CR1 (CNRS) MCF (Université de Paris Sud)
Membres invités :	Françoise JAMEN	MCF (Université de Paris Sud)

## RESUME

L'identité des cellules souches et des progéniteurs neurax, comme celle de tout type cellulaire, est caractérisée par des signatures moléculaires spécifiques qui dépendent de l'environnement dans lesquelles les cellules se trouvent. Ainsi, il est primordial d'étudier ces cellules dans un contexte *in vivo*.

Le toit optique du poisson zèbre est un modèle idéal pour ce type d'étude. En effet, c'est une large partie du cerveau moyen localisée en position dorsale et qui présente la particularité de croître de manière orientée tout au long de la vie de l'animal grâce aux cellules neuroépithéliales présentes à sa périphérie (dans la « peripheral midbrain layer », PML). De plus, les progéniteurs neuroépithéliaux, les progéniteurs à cycle court et les cellules post-mitotiques sont localisées dans des domaines adjacents du toit optique, conséquence de sa croissance orientée. Chaque population cellulaire est marquée par des profils d'expression particuliers. Ainsi, une recherche dans la base de données ZFIN (base de donnée qui répertorie des nombreux profils d'expression) nous a permis d'identifier environ 50 gènes ayant une forte expression dans les cellules de la PML (progéniteurs neuroépithéliaux). De façon intéressante, une vingtaine de ces gènes codent pour des facteurs de la biogenèse des ribosomes.

L'accumulation de ce type de transcrits dans les progéniteurs lents était surprenante. Ainsi, au cours de mon doctorat, j'ai étudié le rôle spécifique des facteurs de la biogenèse des ribosomes dans le maintien des cellules neuroépithéliales de la PML. En effet, bien qu'il soit généralement admis que la biogenèse des ribosomes est un processus essentiel dans toutes les cellules, il a été récemment démontré que plusieurs facteurs nécessaires à la synthèse des ribosomes ont un rôle tissu-spécifique. Par exemple, Notchless est requis pour la survie de la masse cellulaire interne de l'embryon préimplantatoire de souris. Récemment, des expériences de knock-out conditionnel chez la souris ont montré que Notchless était nécessaire au maintien des cellules souches hématopoïétiques et intestinales, mais pas à celui des cellules différenciées. En effet, en absence de Notchless dans les cellules souches, la grosse sous-unité ribosomique (60S) ne peut pas être exportée hors du noyau et s'accumule. Au contraire, dans les cellules différenciées, où Notchless n'est pas indispensable, cette accumulation n'est pas observée. J'ai commencé une étude fonctionnelle basée sur la surexpression conditionnelle d'une forme dominante-négative du gène notchless homolog 1 (nle1, homologue poisson zèbre du gène Notchless mammifère). Selon mon hypothèse, les progéniteurs lents de la PML (Slow amplifying progenitors, SAPs) pourraient avoir besoin de Notchless pour la maturation de la sous-unité 60S, contrairement aux cellules différenciées qui pourraient survivre après la délétion de ce gène. Des expériences sont encore en cours, mais nous avons déjà pu démontrer par des expériences d'expression transitoire dans l'embryon que nle1 jouait un rôle crucial dans la survie des progéniteurs neuroépithéliaux de la PML.

En parallèle, j'ai étudié des lignées de poisson-zèbre mutantes pour des gènes codants pour des composants du complexe de snoRNP (box C/D small nucleolar ribonucleoprotein : Fibrillarine, Nop56, Nop58). Les trois mutants présentent des phénotypes similaires, en

particulier une apoptose massive et une dérégulation du cycle cellulaire dans l'ensemble du toit optique à 48 heures de développement. Étonnamment, ces résultats sont en faveur d'un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M. Ainsi, cette étude pourrait permettre de mettre en évidence de nouveaux mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire intervenant lors du dysfonctionnement de la biogenèse des ribosomes.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence l'importance de la biogenèse des ribosomes dans la régulation fine de l'homéostasie cellulaire, et dans la détermination de l'identité des progéniteurs neuroépithéliaux.

## INTRODUCTION

### **Le toit du poisson zèbre comme modèle d'étude**

Chez les anamniotes, la capacité de fabriquer de nouveaux neurones et de nouvelles cellules gliales est maintenue tout au long de leur vie. Par exemple, dans le cerveau du poisson zèbre il y a 16 zones distinctes de neurogenèse et toutes ces niches de cellules souches contribuent à la croissance continue et à la régénération des différentes parties du système nerveux central (SNC).

Une des régions les plus étudiées du SNC des vertébrés est le système visuel. Il est composé de la rétine et de ses tissus cibles dans le cerveau: le toit optique (TO) chez les non-mammifères ou le colliculus supérieur, le corps genouillé latéral et le cortex visuel chez les mammifères. La niche des cellules souches de la rétine et celle du toit optique a été particulièrement bien caractérisée. Une croissance sans l'addition de nouveaux neurones conduirait à la perte de l'acuité visuelle. Une neurogenèse soutenue dans le système visuel représente donc un avantage sélectif pour ces animaux qui croissent pendant toute leur vie. Cependant, cet avantage est seulement partiel car ces animaux sont confrontés à plusieurs problématiques telles que le risque d'une prolifération aberrante. Nous sommes loin de connaître les détails des réseaux génétiques, des voies métaboliques et des interactions cellulaires qui contrôlent le comportement des cellules souches afin qu'elles produisent un nombre de neurones correct. Il doit exister un équilibre parfait entre la croissance continue et le contrôle de la prolifération. La compréhension de la logique des cellules et des facteurs moléculaires intervenants dans le contrôle de la prolifération dans le TO apportera une meilleure compréhension du développement et, en parallèle, vers une compréhension des mécanismes liés à la tumorigenèse.

La neurogenèse dans le système visuel du poisson zèbre est restreinte aux zones périphériques de la rétine et du TO. La rétine croît, donc, par addition d'anneaux concentriques de la même manière que le TO croît par addition des colonnes des cellules aux marges médiales et caudales de chaque lobe.

Le TO est constitué par des populations cellulaires différentes organisées selon un continuum (des cellules souches aux cellules différenciées). Chaque population de cellules est marquée par des patrons d'expression de gènes différents. Récemment, plusieurs études ont montré que les mêmes gènes exprimés par une des populations cellulaires du TO sont aussi exprimés dans la population analogue de la rétine. L'équipe a contribué à démontrer la

synexpression de gènes qui sont exprimés à la fois dans les cellules souches du TO, dans la région appelée couche périphérique du mésencéphale (Peripheral Midbrain Layer, PML), et dans les cellules souches de la rétine (Cervený et al., 2012; Recher et al., 2013). Le transcriptome des cellules de la PML est enrichi en transcrits de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la synthèse des nucléotides ou dans la biogenèse des ribosomes. Deux hypothèses ont été formulées afin d'expliquer cette accumulation. La première est que les cellules de la PML pourraient jouer le rôle de «chambres de stockage» et accumuler des transcrits et des protéines pour permettre les divisions très rapides des progéniteurs du TO sans nouvelle synthèse. Les cellules de la PML sont des cellules au cycle cellulaire très long comparé aux progéniteurs adjacents. La deuxième hypothèse est que ces facteurs seraient spécifiques des cellules souches neuroépithéliales et donc des cellules souches en général. En effet, des similitudes ont été retrouvées en comparant le réseau génétique des gènes exprimés spécifiquement dans la PML et ceux identifiés pour l'homéostasie des neuroblastes (cellules souches neurales) de drosophile, ou bien encore d'autres réseaux liés aux cellules souches pluripotentes humaines ou associés à différents types de cancers. Des nombreux articles montrent que les ribosomes et la biogenèse des ribosomes jouent des rôles spécifiques dans l'homéostasie des différents types cellulaires (Xue and Barna, 2012 ; Brombin et al., 2015). De plus, des mutants pour 18 gènes de la PML présentent tous le même phénotype caractérisé par des défauts du neuroectoderme et des défauts oculaires. Ils ont une tête et des yeux plus petits par rapport aux animaux sauvages.

### **Résumé du projet**

Ma thèse a porté sur l'étude de la relation qui existe entre la biogenèse des ribosomes et l'homéostasie des progéniteurs neuroépithéliaux. En particulier, j'ai cherché à répondre aux questions suivantes : les facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes jouent-ils des rôles spécifiques dans le maintien de la pluripotence ? Des altérations de la biogenèse des ribosomes peuvent-elles affecter le développement du TO ?

Ma thèse a porté sur l'étude fonctionnelle de gènes codants pour des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes et qui sont spécifiquement exprimés dans les progéniteurs du toit optique, localisés dans la PML. Je me suis intéressé à la manière dont des altérations de niveaux d'expression de ces gènes peuvent entraîner des changements dans la prolifération et le cycle cellulaire en général. Dans une première partie de ma thèse, j'ai caractérisé plusieurs lignées de poissons zèbre qui portent des mutations invalidantes de gènes codants pour des petites protéines nucléolaires, les snoRNPs (Fibrillarin, Nop56, Nop58). Ces protéines participent à la biogenèse des ribosomes et sont connues pour leurs implications dans la tumorigenèse.

La partie principale de ma thèse concerne l'étude fonctionnelle du gène *notchless* homolog 1 (*nle1*) nécessaire à la maturation de la grande sous-unité ribosomale (60S). Il a été montré que le gène *Notchless* (homologue murin) est nécessaire pour la survie de la masse cellulaire interne de l'embryon avant implantation (Cormier et al., 2005). Plus récemment, des expériences de knock-out conditionnel chez la souris ont montré que *Notchless* est nécessaire au maintien des cellules souches hématopoïétiques, mais pas pour les progéniteurs engagés dans une voie de différenciation ni pour les cellules différenciées (Le Boutellier et al., 2013). *Notchless* joue-t-il un rôle similaire dans les cellules souches

neuroépithéliales? Est-il différemment requis dans les progéniteurs et dans les cellules différenciées? Mon hypothèse est que les progéniteurs lents la PML ont besoin de Notchless pour la maturation de la sous-unité 60S alors que les cellules différenciées peuvent survivre à la délétion de ce gène. Ceci confirmerait l'importance de la biogenèse des ribosomes en tant que régulateur du cycle cellulaire et de l'homéostasie des progéniteurs

Il n'existe pas de mutant disponible pour *nle1*. Deux stratégies ont été choisies pour réaliser la perte de fonction de *Nle1*. D'une part, pour étudier le rôle de *Nle1* dans le développement précoce du poisson-zèbre, l'expression du gène *nle1* a été inhibée par injection d'oligonucléotides morpholinos. D'autre part, pour déterminer la validité de notre hypothèse (rôle différentiel de *Nle1* selon le type cellulaire), l'inactivation fonctionnelle de *Nle1* a été réalisée en exprimant spécifiquement une forme dominante-négative de *nle1* dans différents types cellulaires.

## RESULTATS

### ***nle1* est spécifiquement exprimé dans les cellules de la PML**

Les cellules de la PML ont été d'abord définies sur la base de leurs caractéristiques cytologiques et de leur comportement prolifératif. Elles sont des cellules de type neuroépithéliale au cycle cellulaire lent. Ces caractéristiques sont conservées des stades embryonnaires (Recher et al., 2013) jusqu'à l'âge adulte (Ito et al., 2010). Les cellules de la PML, en se divisant, donnent naissance à des progéniteurs à prolifération rapide qui, ensuite, sortent du cycle cellulaire et se différencient.

Il y a un gradient de différenciation similaire dans la CMZ où les RSC sont juste apposées à des progéniteurs en prolifération qui sont à l'origine de toutes les cellules de la rétine.

Dans les deux structures, chaque population de cellules exprime des gènes différents. Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont démontré qu'il y a une forte corrélation entre les patrons d'expression qu'on retrouve dans les deux structures (Fig. 2A) (Cervený et al., 2012 ; Recher et al., 2013). En particulier les cellules souches des deux structures expriment les mêmes gènes. Elles expriment des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et qui sont exprimés aussi par les progéniteurs rapides et indifférenciés se trouvant juste apposés. De plus, elles expriment aussi des gènes spécifiques dont la fonction dans le maintien de l'état quiescent est, jusqu'à présent, inconnue. La synexpression de ces mêmes gènes dans les deux structures implique l'existence d'une logique transcriptionnelle commune (Ramalison et al., 2012). Des mutants sont disponibles pour au moins 18 des gènes spécifiques de la PML. Ces mutants ont tous le même phénotype caractérisé par des défauts du neuroectoderme et des yeux. Trois mutants sont disponibles au laboratoire et leur caractérisation est en cours.

Le gène *nle1* tout comme les gènes *fbl*, *nop56* et *nop58* sont spécifiques de la PML. Il est exprimé dans tous les tissus en prolifération après la somitogenèse et son patron se restreint aux tissus d'origine neuroépithéliale et à l'intestin à la fin de l'embryogenèse. Plus tard, *nle1* est exprimé dans les cellules de la PML et dans les RSC. C'est intéressant de noter que *nle1* est exprimé aussi dans l'intestin. En effet, il a été démontré que *Nle1* est nécessaire au

maintien de cellules souches des cryptes intestinales chez la souris (Stedman et al., 2015).

### **Etude fonctionnelle du gène *nle1***

A présent, j'ai travaillé à la génération d'une forme Dominante-Négative (DN) de *nle1*. Cette approche a l'avantage de permettre l'expression ciblée dans des cellules différentes à des stades différents de développement. Il a été démontré que l'acide aminé glutamate en position 114 de la protéine Rsa4 de la levure (orthologue de Nle1) est nécessaire pour son correct fonctionnement (Bassler et al., 2010). De plus, le remplacement de cet acide aminé avec un résidu d'aspartate génère un phénotype DN en provoquant le blocage de l'exportation de la grande sous-unité ribosomale (60S). Le résidu glutamate est super conservé au cours de l'évolution et il correspond au glutamate en position 76 de la protéine Nle1 du poisson zèbre. J'ai muté la séquence codante du gène *nle1* afin d'obtenir une protéine avec un aspartate en position 76.

L'injection de l'ARNm DN dans les embryons de poisson zèbre entraîne la formation de plusieurs phénotypes. Presque 50% des embryons injectés sont morts pendant les 48 premières heures du développement et les survivants montraient des défauts graves de développement. 10% des embryons injectés étaient acéphaliques. Au contraire, la surexpression de la forme sauvage de *nle1* ne semble pas affecter le développement embryonnaire. Afin de démontrer la spécificité des phénotypes trouvés, j'ai réalisé des expériences de sauvetage. La co-injection de l'ARNm pour la forme DN et d'une double dose d'ARNm pour la forme sauvage permet le sauvetage des phénotypes DN. 48 heures après l'injection, la mortalité embryonnaire est autour du 20% (pourcentage normal observé après injection) et tous les survivants ont un phénotype normal.

### **Rôle de *nle1* dans la biologie des cellules souches neuroépithéliales**

Afin de confirmer si la mutation DN est vraiment efficace chez le poisson zèbre, des expériences de transfection ont été réalisées dans des fibroblastes de poisson zèbre (collaboration avec l'équipe de Pierre Boudinot, INRA) et dans des cellules ES murines (collaboration avec l'équipe de Michel Cohen-Tannoudji, Institut Pasteur). La mortalité cellulaire comme aussi la qualité de la biogenèse des ribosomes ont été aussi analysés. Cependant, il n'a pas été possible de montrer des défauts de biogenèse des ribosomes in vitro. Pour cette raison, j'ai une analyse précoce d'embryons injectés avec de l'ARNm. Au moment de l'écriture de mon manuscrit de thèse les expériences sont encore en cours.

L'objectif principal de mon projet de thèse était de démontrer que *nle1* joue un rôle spécifique selon le type cellulaire. Des résultats sur ce gène, obtenus chez la souris par l'équipe de Michel Cohen-Tannoudji indiquent un rôle important de ce gène d'une part dans les cellules souches des cryptes intestinales et d'autre part dans les cellules souches hématopoïétiques (Le Bouteiller et al., 2013; Stedman et al., 2015). Cette étude met en évidence pour la première fois des différences dans les mécanismes de biogenèse des ribosomes entre différents types de cellules chez un mammifère. Nous voulions déterminer si de telles différences existent également dans les tissus d'origine neuroépithéliale. Notre hypothèse était que les cellules de la PML et éventuellement les progéniteurs à cycle cellulaire rapide de deux systèmes ont besoin de Nle1 pour la maturation de la sous-unité 60S. En revanche, dans les cellules différenciées, il existe une autre voie de biogenèse des

ribosomes, une voie indépendante de Nle1. Par conséquent, l'inactivation de Nle1 dans des cellules différenciées ne devrait pas affecter la biologie de ces cellules. Ainsi, j'ai testé différentes séquences cis-régulatrices spécifiques pour activer la surexpression des deux formes de nle1 dans des différents types cellulaires du cerveau. Les cellules qui surexpriment une des deux formes de nle1 pouvaient aisément être identifiées grâce à la co-expression de la GFP.

Les injections des constructions de transgénèse est actuellement en cours et les premières observations des embryons de la F0 sont encourageantes. Les embryons injectés avec des constructions qui permettent l'expression des transgènes dans des cellules différenciées (Enhancer 55) ne montrent aucun phénotype après l'activation du transgène. La surexpression de la forme WT ou DN dans les cellules de la PML (Enhancer 101) ne semble pas être toxique non plus, mais l'expression de la forme DN dans les mêmes cellules porte à la morte précoce des embryons injectés. Dans les deux cas, les embryons F0 ont été imagés pendant plusieurs jours. La surexpression de la forme DN dans les cellules de la PML entraîne la mort de ces cellules.

Bien que d'autres expériences soient nécessaires pour confirmer ces résultats, cela nous indique nle1 semble être nécessaire pour la survie des progéniteurs neuroépithéliaux et non pas des cellules différenciées.

### **Caractérisation de poissons zèbres mutants pour les gènes codants les snoRNP.**

Pour une autre partie de ma thèse, j'ai travaillé (en collaboration avec Emilie Mugniery, post-doc ARC) à la caractérisation d'un panel de poissons zèbre qui portent des mutations invalidantes de gènes codant pour des petites protéines nucléolaires, les snoRNPs (Fibrillarin, Nop56, Nop58). Ces protéines participent à la biogenèse des ribosomes et sont connues pour leurs implications dans la tumorigenèse.

Tous les mutants pour les snoRNPs ont des yeux et des TO de taille réduite par rapport aux embryons sauvages. Ces mutants présentent des fortes altérations de la prolifération et du cycle cellulaire. Suite à des pulses d'analogues de la thymidine, seules les régions prolifératives du TO et de l'œil sont marquées chez les embryons sauvages. Contrairement aux embryons sauvages, les mutants montrent un marquage diffus dans la totalité du cerveau. Cela pourrait être lié au fait que l'haploinsuffisance des facteurs de la biogenèse des ribosomes stimule la prolifération des cellules adjacentes de façon non cellule autonome, en accord avec ce que a été observé chez *C. elegans* (Voutev et al., 2006). La dérégulation de la prolifération pourrait être liée à une apoptose médiée par p53. La taille des noyaux et des nucléoles des cellules mutantes est plus importante par rapport à la taille des noyaux des cellules sauvages.

Ces résultats sont en faveur d'un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M. Ainsi, cette étude pourrait permettre de mettre en évidence de nouveaux mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire lors de défauts de biogenèse des ribosomes.

L'analyse phénotypique sera complétée grâce à l'utilisation de différentes techniques (analyse histologique, TUNEL, expériences d'incorporation d'analogues de la thymidine, immunomarquages, imagerie en microscopie bi-photonique). Nous réaliserons, aussi, des expériences de biochimie pour voir si la biogenèse des ribosomes est affectée. Nous

envisageons de réaliser des expériences de fractionnement cellulaire sur gradients de sucrose afin de séparer les particules pré-40S, pré-60S et 80S et déterminer ainsi le profil de polysomes.

Chez plusieurs mutants, la taille plus petite du système nerveux (et notamment du toit optique et des yeux) est liée à une augmentation du nombre de cellules en apoptose. Nous regarderons, par injection de morpholino spécifique de p53, si la délétion ou l'haploinsuffisance de p53 atténue ou supprime certains des phénotypes développementaux observés.

Afin de déterminer si la réduction en taille provient d'une diminution de la prolifération cellulaire, nous suivrons les divisions cellulaires in vivo (après inhibition de l'apoptose par injection de morpholino p53). Les différentes cellules pourront également être isolées par FACS pour déterminer les proportions de cellules dans les différentes phases du cycle.

L'ensemble de ces résultats montrent comment les facteurs de la biogenèse des ribosomes (tout comme le processus) contribue à la régulation fine de l'homéostasie cellulaire, et donc à la détermination de l'identité des progéniteurs neuraux.