



Université Claude Bernard



# DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **8 juin 2018**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **LEBRUN Diane**

Titre de la thèse : « Caractérisation et généralisation de l'implication de la voie NOTCH cytoplasmique au cours des processus de transition épithélio-mésenchymateuse chez l'embryon de poulet ».



## Résumé

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus incontournable dans de nombreux contextes normaux et pathologiques, tels que gastrulation, organogenèse, fibroses et cancers. Cette transformation de cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse est indissociable de l'acquisition de propriétés migratoires et est généralement associée à un changement de destin cellulaire. Différentes voies moléculaires sont impliquées selon le contexte de l'EMT concernée. Récemment, notre laboratoire a mis en évidence que la voie Notch cytoplasmique contrôle l'EMT des cellules de la lèvre dorso-médiale du somite (DML). Les crêtes neurales exprimant DLL1 activent « en passant » le récepteur NOTCH, libérant ainsi le domaine intra-cytoplasmique de NOTCH (NICD). Dans le cytoplasme, NICD inhibe la kinase GSK3 $\beta$ , conduisant à la stabilisation de SNAIL, un gène maître de la transition épithélio-mésenchymateuse. Il en résulte une libération de la  $\beta$ -caténine des jonctions adhérentes qui, après translocation dans le noyau, active la transcription des gènes de la myogénèse (*Myf5*). Ainsi, l'activation de la voie Notch cytoplasmique permet une induction concomitante de l'EMT et de la myogénèse. La fonction cytoplasmique de Notch reste controversée et le mécanisme par lequel NICD inhibe GSK3 $\beta$  reste obscur.

Au cours de ma thèse j'ai cherché à élucider le mécanisme par lequel NICD inhibe l'activité kinase de GSK3 $\beta$ . J'ai confirmé l'interaction de GSK3 $\beta$  et de NICD en démontrant leur interaction *via* CoIP. Après avoir démontré l'implication de la sérine-thréonine kinase AKT dans la myogénèse des cellules de la DML, j'ai mis en évidence, *via* CoIP et électroporation, que l'inhibition GSK3 $\beta$  par NICD est très certainement médiée par AKT, connue pour être impliquée dans l'EMT et inhiber GSK3 $\beta$  par phosphorylation. En comparant le NICD1 de poulet et les 4 NICD de souris, j'ai montré que l'expression exogène de ces 5 molécules induit l'EMT et la différenciation myogénique de manière similaire. J'ai aussi montré que parmi des différents domaines de NICD, le domaine RAM, connu pour se lier à l'ADN (*via* RBPJ), est nécessaire et suffisant à l'inhibition de GSK3 $\beta$ .

Un second axe de ma thèse a été de tester l'implication de la voie Notch cytoplasmique dans d'autres contextes d'EMT. Pour ce faire, j'ai mis en évidence que cette voie est impliquée dans les autres lèvres du dermomyotome mais aussi dans les crêtes neurales qui délaminent du toit du tube neural. J'ai en particulier mis en évidence une co-activation des voies Wnt et Notch, une inhibition de la kinase GSK3 $\beta$  par NICD cytoplasmique ainsi qu'une inhibition de la différenciation en présence d'une  $\beta$ -caténine mutée, retenue à la membrane, ou en présence d'une molécule SNAIL2 dominant-négative.

Le dernier axe de ma thèse a consisté à élucider le mécanisme de régulation de l'induction de l'EMT et de la myogénèse *via* l'activation de NICD. Il a été mis en évidence que toutes les cellules de la DML peuvent être activées *via* DLL1 et que la surexpression massive de NICD dans la DML provoque une différenciation massive et une déplétion du groupe de cellules progénitrices. Afin de déterminer si la régulation de cette initiation se fait avant ou après induction de NICD, j'ai créé un plasmide permettant de répondre à cette question et afin de visualiser son expression *in vivo*, j'ai initié une

collaboration avec une équipe de l'ILM afin de créer un microscope vertical SPIM biphoton permettant l'observation d'embryon de poulets vivants. Ce projet est encore en cours.

Ainsi, mon travail de thèse a permis de i) préciser le mécanisme par lequel NOTCH et GSK3 $\beta$  interagissent physiquement au niveau cytoplasmique lors de l'induction de l'EMT et de la myogenèse des cellules de la DML et j'ai ajouté un nouvel acteur à ce complexe, AKT qui permettrait de médier l'inhibition de GSK3 $\beta$  par NICD *via* phosphorylation, de ii) démontrer que cette voie Notch cytoplasmique est présente dans au moins deux autres EMT embryonnaires, celles de la lèvre ventro-latérale du somite et celle des crêtes neurales, et iii) de mettre en place de nouveaux outils d'imagerie *in vivo* pour explorer les aspects dynamiques de ces mécanismes.