



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **17 Décembre 2019**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur Hugo DUCUING.**

Titre de la thèse : « **. Étude fonctionnelle de la signalisation PlexinA1-SlitC dans le guidage des axones commissuraux de la moelle épinière** ».



Chez les bilatériens, les commissures sont des circuits neuronaux interconnectant les deux moitiés du système nerveux central. Elles sont essentielles pour l'intégration et la coordination des modalités sensorielles, des commandes motrices et le traitement des fonctions cérébrales. Au cours du développement embryonnaire, les neurones commissuraux étendent un axone qui traverse la ligne médiane de l'organisme pour se connecter à sa cible finale. Cette navigation est hautement stéréotypée et contrôlée, à chacune de ses étapes, par une multitude de signalisations de guidage axonal.

Au sein de la moelle épinière, certains neurones commissuraux naissent d'un territoire dorsal. Leurs axones croissent ventralement et traversent la ligne médiane au sein d'un territoire particulier : la plaque du plancher (PP). Ils naviguent à travers les pieds des cellules gliales qui composent la PP et acquièrent au cours de leur progression la capacité de répondre aux signaux répulsifs présents dans la PP. Ce gain de sensibilité aux signaux répulsifs permet de : 1) expulser les axones de la PP, qui s'orientent alors rostralement et continuent leur navigation vers leurs cibles finales et, 2) empêcher les axones de retraverser la ligne médiane en jouant un rôle de barrière. Au cours des dernières décennies, différentes équipes ont identifié les principales signalisations répulsives de la PP : la Semaphorin3B (Sema3B) via le complexe de récepteurs PlexinA1 (PlxnA1) – Neuropilin-2 (Nrp2), SlitC via le récepteur PlxnA1 et SlitN via les récepteurs Roundabout1-2 (Robo1-2). Cependant, les contributions précises et les spécificités fonctionnelles de ces différentes signalisations restent incomprises.

Au cours de ma thèse j'ai participé dans un premier temps à une étude visant à comprendre si la génération de spécificités fonctionnelles des signalisations répulsives pouvait résulter de dynamiques spatiales et temporelles propres à chaque récepteur de guidage à la surface du cône de croissance (CC). J'ai en particulier mis au point un paradigme de FRAP (récupération de fluorescence après photoblanchiment) sur des moelles épinières embryonnaires natives, et réalisé des expériences sur des CC électroporés avec des récepteurs de guidage fusionnés à la pHluorin, une GFP sensible au pH permettant de suivre le pool membranaire de récepteurs. Ces

expériences ont permis d'étudier la dynamique de récepteurs pendant la traversée de la PP et de montrer que l'exocytose de PlxnA1 est significativement plus forte que celle de Robo1. J'ai également imagé en super-résolution les pools membranaire et total de différents récepteurs dans des CC naviguant la PP. L'analyse de ces images a permis de mettre en évidence une localisation membranaire spécifique pour PlxnA1 et Robo1 au sein du CC. Plus généralement, ces résultats ont révélé une séquence unique d'adressage des récepteurs à la surface des CC, qui pourrait leur permettre de discriminer fonctionnellement les différents signaux répulsifs.

Mes travaux de thèse ont ensuite porté sur la spécificité fonctionnelle d'une de ces signalisations : SlitC-PlxnA1. Suite à une précédente étude de notre équipe montrant que la mutation Y1815F de PlxnA1 permet d'abroger in vitro spécifiquement la signalisation de SlitC mais pas celle de Sema3B, nous avons généré un modèle de souris portant cette mutation. J'ai tout d'abord analysé les phénotypes de guidage des axones commissuraux dans ce modèle, et observé des défauts qui permettent de proposer que la signalisation SlitC-PlxnA1 empêche spécifiquement les axones d'effectuer des demi-tours lors de la traversée de la ligne médiane. En réintroduisant PlxnA1^{Y1815F} fusionné à la pHluorin dans la moelle épinière d'embryons PlxnA1^{-/-}, j'ai pu montrer que le récepteur muté est incapable de sauver ce phénotype de demi-tours. Je me suis ensuite intéressé aux impacts de la mutation Y1815F sur PlxnA1. Tout d'abord, j'ai montré que PlxnA1^{Y1815F} est bien exprimé par les neurones commissuraux et son patron temporel d'adressage à la membrane ressemble à celui du récepteur natif. Cependant, j'ai pu mettre en évidence que l'expression de surface de PlxnA1^{Y1815F} est altérée, aussi bien in vivo, lorsque le récepteur est ré-exprimé dans la moelle épinière embryonnaire, qu'in vitro, dans un modèle cellulaire N2a et des cultures de neurones commissuraux. Enfin, je me suis intéressé aux interacteurs de PlxnA1 en comparant les partenaires du récepteur natif et muté par une approche de spectrométrie de masse. Les analyses ont permis d'établir une première liste de candidats dont l'interaction au récepteur pourrait être perturbée par la mutation Y1815F. Des expériences complémentaires sont en cours pour valider ces altérations.

Au final, mes résultats ont permis de caractériser de nouveaux éléments mécanistiques des processus de navigation des axones commissuraux et fournissent la première dissection de la contribution fonctionnelle spécifique d'une signalisation d'un récepteur de guidage partagé par plusieurs ligands.