



AVIS DE SOUTENANCE

Mme LOREEN HABOUB TAHA présente ses travaux en soutenance le :

17 mars 2023 à 14h00

à l'adresse suivante :

**Salle de réunion
CRCM**

27 boulevard Leï Roure
13273 MARSEILLE Cedex 09

en vue de l'obtention du diplôme :

Doctorat en Biologie-Santé – Spécialité Oncologie

La soutenance est publique.

Titre des travaux : LA MUTATION DU GENE ZBTB16 ENTRAINE UNE MYELOFIBROSE EN ABSENCE DU LOCUS CDKN2A CHEZ SOURIS

Ecole doctorale : Sciences de la vie et de la santé (62)

Unité de recherche : Centre de Recherche en cancérologie de Marseille

Directeur : Mme ESTELLE DUPREZ, DIRECTEUR DE RECHERCHE

Membres du jury

| Nom | Qualité | Etablissement | Rôle |
|-------------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------|
| M. MICHEL AURRAND-LIONS | DIRECTEUR DE RECHERCHE | UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE | Président du jury |
| Mme HANNA RASLOVA | DIRECTEUR DE RECHERCHE | UNIVERSITE PARIS SACLAY | Rapporteuse du jury |
| M. EIRINI TROMPOUKI | DIRECTEUR DE RECHERCHE | UNIVERSITE COTE D'AZUR - Nice | Rapporteur du jury |
| Mme ESTELLE DUPREZ | DIRECTEUR DE RECHERCHE | UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE | Directeur |

Le Doyen

Georges LEONETTI

Résumé

ZBTB16, le gène codant pour le facteur de transcription PLZF, est un régulateur important de l'hématopoïèse. PLZF interagit avec les protéines Polycomb (PcG) pour médier son action transcriptionnelle en se liant à des séquences promotrices spécifiques. Comme les protéines PcG régulent le locus *CDKN2A*, nous avons émis l'hypothèse que PLZF pourrait être impliqué dans cette régulation. Nous avons donc cherché à comprendre l'interaction *Plzf-Cdkn2a* en explorant un modèle de souris double mutant *Cdkn2a*^{-/-} *Zbtb16*^{lu/lu}. Les souris *Cdkn2a*^{-/-} *Zbtb16*^{lu/lu} ont développé une cytopénie, une splénomégalie, une fibrose de la moelle et une mégacaryopoïèse. Nous avons montré une expansion des cellules souches et des progéniteurs à potentiel myéloïde dans la moelle et la rate du double mutant, qui conduit à une hématopoïèse extra-médullaire. Nous démontrons ainsi qu'une double mutation de *Cdkn2a* et de *Zbtb16* déclenche un phénotype semblable à la myélofibrose (MF) humaine. Nous avons recherché les gènes et les voies dérégulés qui expliquent la pathogenèse de la MF dans notre modèle. En utilisant l'approche du RNA-seq sur cellule unique (scRNA-seq), nous avons analysé les compartiments immatures et leurs transcriptomes associés. Nous avons identifié les clusters LT-HSC, MPP2 et GMP-N comme étant les clusters initiateurs de la MF. L'analyse fonctionnelle a révélé des mécanismes de coopération entre les deux mutations. La mutation de *Plzf* a induit une différenciation myéloïde tandis que la mutation de *Cdkn2a* a induit une réponse inflammatoire. Parmi les gènes dérégulés intéressants, les gènes associés au lignage myéloïde (*Elane*, *Mpo*) et les gènes associés à l'IFN étaient régulés positivement dans notre modèle. En outre, les régulateurs du cycle cellulaire de la phase G1-S étaient dérégulés dans la moelle de *Cdkn2a*^{-/-} *Zbtb16*^{lu/lu}. Cette signature, qui indique une entrée dans le cycle favorisée de ces cellules, explique la prolifération myéloïde et constitue une cible thérapeutique intéressante. Nos résultats valident un nouveau modèle de souris pour étudier de nouveaux mécanismes moléculaires de la MF, où des mécanismes cellulaires et moléculaires coopératifs impliquant une dérégulation du cycle cellulaire et une accumulation myéloïde dans un contexte inflammatoire, favorisent de concert la pathologie.

Mots clés : Hématopoïèse, Myélofibrose, Vieillesse, PLZF, CDKN2A

Abstract

ZBTB16, the coding gene for PLZF transcription factor, is a master regulator of hematopoiesis. PLZF interacts with Polycomb proteins (PcG) to mediate its transcriptional action by binding to specific promoter sequences. As PcG proteins regulate *CDKN2A* locus, we hypothesized that PLZF may be involved in this regulation. We therefore sought to understand the *Plzf-Cdkn2a* interplay by exploring a double mutant mouse model *Cdkn2a*^{-/-} *Zbtb16*^{lu/lu}. The *Cdkn2a*^{-/-} *Zbtb16*^{lu/lu} mice developed cytopenia, splenomegaly, BM fibrosis and megakaryocytosis. We showed expansion of HSCs and progenitors with a myeloid potential in the double mutant BM and spleen, which led to extramedullary hematopoiesis. Overall, we demonstrate that a double mutation of *Cdkn2a* and *Zbtb16* triggers myelofibrosis (MF)-like phenotype resembling human MF. We looked for the deregulated genes and pathways that explain the MF pathogenesis in our model. Using single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) approach, we analyzed immature compartments and their associated transcriptomes. We identified the LT-HSC, MPP2 and GMP-N clusters as MF-initiating clusters. Functional analysis revealed cooperative mechanisms between both mutations. *Plzf* mutation induced myeloid differentiation while *Cdkn2a* mutation induced inflammatory response. Among the interesting deregulated genes, the myeloid-associated genes (*Elane*, *Mpo*) and IFN-associated genes were upregulated in our model. Furthermore, cell cycle regulators at G1-S phase transition were deregulated in *Cdkn2a*^{-/-} *Zbtb16*^{lu/lu} BM. This signature, which indicates a favored cycle entry of these cells, explains the myeloid proliferation and constitutes interesting therapeutic targets. Together, we represent a novel mouse model for studying new molecular mechanisms driving MF, where cooperative cellular and molecular mechanisms involving cell cycle dysregulation and myeloid accumulation under inflammatory landscape, promote together the MF pathology.

Keywords: Hematopoiesis, Myelofibrosis, Aging, PLZF, CDKN2A