

Avis de Soutenance

Madame Elise MARECHAL

Biologie-Santé - Spécialité Biologie du Développement

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

identification de mécanismes pathophysiologiques dans des syndromes cardio-neuro-cutanés congénitaux

dirigés par Madame Heather ETCHEVERS

Soutenance prévue le **lundi 24 juin 2024** à 14h00

Lieu : CERIMED – Centre Européen de Recherche en Imagerie Médicale Faculté de Santé, Bâtiment
10A 27, boulevard Jean Moulin 13005 Marseille, France

Salle : Amphithéâtre du CERIMED

Composition du jury proposé

Mme Heather ETCHEVERS	MMG - AMU - INSERM	Directrice de thèse
Mme Nadège BONDURAND	Institut Imagine - INSERM	Rapporteuse
M. Antoine ZALC	Institut Cochin - INSERM	Rapporteur
Mme Sophie CHAUVET	IBDM - AMU	Examinatrice
M. Piotr TOPILKO	IBENS - INSERM	Examinateur
Mme Anne BARLIER	MMG - AMU - INSERM	Président

Mots-clés : RASopathies, Voie de signalisation MAPK, Cellules de la crête neurale, Cellules de Schwann, Système nerveux périphérique, Système cardiovasculaire

Résumé :

Les RASopathies congénitales désignent un ensemble de syndromes développementaux résultant de mutations activatrices germinales ou somatiques dans la voie de signalisation des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), comme les syndromes de Noonan ou Cardio-Facio-Cutané (CFC) pour ce qui est des mutations constitutionnelles, et le Naevus Géant Congénital (NGC) comme exemple de mutation somatique. Ces syndromes respectifs peuvent partager des traits cliniques communs tels que des dysmorphies crânio-faciales, des retards de croissance, des lésions cutanées telles des nævi mélanocytaires, des atteintes neurologiques, des malformations cardiaques ou des anomalies nerveuses périphériques et une prédisposition à développer des cancers. La population embryonnaire des cellules de la crête neurale (CCN) est particulièrement impliquée dans la différenciation de tous ces organes atteints, puisque responsables de la formation du système nerveux périphérique (SNP), de la voie efférente cardiaque et de la pigmentation cutanée entre autres. Nous proposons que les cellules multipotentes sont particulièrement sensibles à l'altération des voies intracellulaires des MAPK ou de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) au cours de leur différenciation, contrairement aux tissus matures. L'activation de ces voies de signalisation et leurs effets transcriptionnels en aval détournent à la fois les taux de prolifération et de différenciation, menant à diverses malformations congénitales qui diffèrent en fonction du contexte de l'induction de

la mutation. Au cours de ma thèse, j'ai exploré divers modèles murins exprimant en mosaïque des formes constitutivement actives des kinases codées par les gènes *Braf* ou *Pik3ca*, soit dans divers progéniteurs cardiaques, soit dans des CCN post-migratoires avant leur différenciation en cellules de Schwann du SNP. Les embryons mutants exprimant ces mutations dans les cellules cardiaques ont présenté une gamme de phénotypes malformatifs hétérogènes, parfois associés à des anomalies pigmentaires ou vasculaires. En revanche, les souris exprimant la mutation *Braf(V600E/+)* dans les cellules de Schwann développent une neuropathie périphérique démyélinisante précoce, associée à d'autres symptômes du spectre des RASopathies. Grâce à l'analyse des voies moléculaires dérégulées, j'ai montré que les cellules de Schwann *Braf*-mutantes acquièrent un phénotype de réparation en l'absence de lésion nerveuse, ce qui empêche une myélinisation périphérique efficace. En complément, j'ai démontré que la présence de la mutation *BRAF Q275R* dans des cellules souches pluripotentes induites humaines dérivées de patients porteurs du syndrome CFC entrave la différenciation terminale en cardiomyocytes atriales ou en cellules de Schwann matures. J'ai par ailleurs identifié l'existence d'un profil de méthylation de l'ADN spécifique de la peau humaine atteinte par le NGC, reflétant un effet précoce et stable de l'activation de la voie MAPK dans les dérivés de la CCN en amont. Ces résultats suggèrent que de nouveaux phénotypes de maladies neurodégénératives et/ou cardiaques humaines pourraient également résulter d'un mosaïcisme somatique.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

Les RASopathies congénitales désignent un ensemble de syndromes développementaux résultant de mutations activatrices germinales ou somatiques dans la voie de signalisation des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), comme les syndromes de Noonan ou Cardio-Facio-Cutané (CFC) pour ce qui est des mutations constitutionnelles, et le Naevus Géant Congénital (NGC) comme exemple de mutation somatique. Ces syndromes respectifs peuvent partager des traits cliniques communs tels que des dysmorphies crânio-faciales, des retards de croissance, des lésions cutanées telles des nævi mélanocytaires, des atteintes neurologiques, des malformations cardiaques ou des anomalies nerveuses périphériques et une prédisposition à développer des cancers. La population embryonnaire des cellules de la crête neurale (CCN) est particulièrement impliquée dans la différenciation de tous ces organes atteints, puisque responsables de la formation du système nerveux périphérique (SNP), de la voie efférente cardiaque et de la pigmentation cutanée entre autres. Nous proposons que les cellules multipotentes sont particulièrement sensibles à l'altération des voies intracellulaires des MAPK ou de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) au cours de leur différenciation, contrairement aux tissus matures. L'activation de ces voies de signalisation et leurs effets transcriptionnels en aval détournent à la fois les taux de prolifération et de différenciation, menant à diverses malformations congénitales qui diffèrent en fonction du contexte de l'induction de la mutation.

Au cours de ma thèse, j'ai exploré divers modèles murins exprimant en mosaïque des formes constitutivement actives des kinases codées par les gènes *Braf* ou *Pik3ca*, soit dans divers progéniteurs cardiaques, soit dans des CCN post-migratoires avant leur différenciation en cellules de Schwann du SNP. Les embryons mutants exprimant ces mutations dans les cellules cardiaques ont présenté une gamme de phénotypes malformatifs hétérogènes, parfois associés à des anomalies pigmentaires ou vasculaires. En revanche, les souris exprimant la mutation *Braf*^{V600E/+} dans les cellules de Schwann développent une neuropathie périphérique démyélinisante précoce, associée à d'autres symptômes du spectre des RASopathies. Grâce à l'analyse des voies moléculaires dérégulées, j'ai montré que les cellules de Schwann *Braf*-mutantes acquièrent un phénotype de réparation en l'absence de lésion nerveuse, ce qui empêche une myélinisation périphérique efficace. En complément, j'ai démontré que la présence de la mutation *BRAF* Q275R dans des cellules souches pluripotentes induites humaines dérivées de patients porteurs du syndrome CFC entrave la différenciation terminale en cardiomyocytes atriales ou en cellules de Schwann matures. J'ai par ailleurs identifié l'existence d'un profil de méthylation de l'ADN spécifique de la peau humaine atteinte par le NGC, reflétant un effet précoce et stable de l'activation de la voie MAPK dans les dérivés de la CCN en amont. Ces résultats suggèrent que de nouveaux phénotypes de maladies neurodégénératives et/ou cardiaques humaines pourraient également résulter d'un mosaïcisme somatique.

Mots clés : RASopathies, voie de signalisation MAPK, cellules de la crête neurale, cellules de Schwann, système nerveux périphérique, système cardiovasculaire

Abstract

Congenital RASopathies refer to a group of developmental syndromes resulting from germline or somatic activating mutations in the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathway, such as Noonan or Cardio-Facio-Cutaneous (CFC) syndromes in the case of constitutional mutations, or giant Congenital Melanocytic Nevus (CMN) syndrome as an example of somatic mutation. These disorders share overlapping clinical features including craniofacial dysmorphism, growth delays, skin lesions such as melanocytic nevi, neurological impairments, cardiac malformations, peripheral nerve anomalies, and a predisposition to cancer development. The embryonic population of neural crest cells (NCC) is particularly involved in the differentiation of all affected sites, as they are responsible for the formation of the peripheral nervous system (PNS), cardiac outflow tract, and skin pigmentation, among others. I propose that multipotent cells are particularly sensitive to alterations in the intracellular pathways of MAPK or phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) during their differentiation, unlike mature tissues. The activation of these signaling pathways and their downstream transcriptional effects divert both proliferation and differentiation, leading to various congenital malformations that differ depending on the context of mutational induction.

During my thesis, I explored various mouse models expressing in a mosaic manner constitutively active forms of kinases encoded by the *Braf* or *Pik3ca* genes. These were targeted either to diverse cardiac progenitors or post-migratory NCC before their differentiation into Schwann cells of the PNS. Embryos expressing these mutations in cardiac cells displayed a range of heterogeneous malformative phenotypes, sometimes associated with pigmentary or vascular anomalies. In contrast, mice expressing the *Braf*^{V600E/+} mutation in Schwann cells developed early demyelinating peripheral neuropathy, associated with other symptoms in the RASopathy spectrum. Through analysis of deregulated molecular pathways, I demonstrated that *Braf*-mutant Schwann cells acquired a repair phenotype in the absence of nerve injury, hindering the maintenance of effective peripheral myelination. In addition, I showed that the presence of the *BRAF* Q275R mutation in induced pluripotent stem cells derived from patients with CFC syndrome impaired terminal differentiation into atrial cardiomyocytes or mature Schwann cells. Furthermore, I identified a specific DNA methylation profile in human CMN skin, reflecting an early and stable effect of MAPK pathway activation in upstream NCC-derived progenitors. These findings suggest that new phenotypes of human neurodegenerative and/or cardiac diseases could also result from similar somatic mosaicism.

Keywords: RASopathies, MAPK signaling pathway, neural crest cells, Schwann cells, peripheral nervous system, cardiovascular system