

Avis de Soutenance

Madame Agathe DE NEUFVILLE

Biologie des cellules souches

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Nétrine-1 comme régulateur de la pluripotence naïve : une analyse multi-omique dans les cellules souches embryonnaires

dirigés par Monsieur Pierre SAVATIER et Madame Irene AKSOY

Soutenance prévue le **vendredi 12 décembre 2025** à 14h00
Lieu : Salle de conférence 18 avenue du Doyen Lépine 69500 Bron

Composition du jury proposé

M. Pierre SAVATIER	INSERM Lyon	Directeur de thèse
M. John DE VOS	Université de Montpellier	Rapporteur
Mme Claire CHAZAUD	INSERM Clermont-Ferrand	Rapporteuse
Mme Alice JOUNEAU	INRAE Jouy-en-Josas	Examinatrice
M. Jérôme LAMARTINE	Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Mme Irène AKSOY	INSERM Lyon	Invitée

Mots-clés : Nétrine-1, cellules souches, pluripotence,,

Résumé :

La pluripotence se définit par la capacité d'une cellule à se différencier en l'ensemble des types cellulaires d'un organisme adulte. Elle s'inscrit dans un continuum comprenant deux états principaux : la pluripotence naïve, qui reflète l'épiblaste pré-implantatoire, et la pluripotence amorcée, proche de l'épiblaste post-implantatoire. Dans la masse cellulaire interne et l'épiblaste, Nétrine-1 (NTN1) et ses récepteurs NEOGENIN-1 (récepteur de la famille NEO1/DCC), UNC5B et UNC5D (récepteurs de la famille UNC5H) présentent un motif d'expression en « poivre et sel », suggérant un rôle de cette signalisation dans la régulation de la pluripotence naïve. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons étudié le rôle du gène NTN1 et de ses récepteurs NEO1, UNC5B et UNC5D dans les cellules souches embryonnaires (ESC). Les cellules ont été cultivées dans l'état naïf de pluripotence grâce au milieu de culture PXGL. Nous avons construit une lignée cellulaire surexprimant un transgène NTN1 (exoNTN1WT, par transfection d'un vecteur PiggyBAC) ainsi que plusieurs lignées cellulaires NTN1-/- (par CRISPR-Cas9) dans le but d'étudier les conséquences d'un gain ou d'une perte de fonction. Ces différentes lignées ont été analysées par séquençage des ARN (population globale ou unicellulaire). Nous avons également analysé les marques épigénétiques signatures des états naïf et amorcé dans les cellules exoNTN1WT et NTN1-/- . Ces expériences ont montré que l'absence de NTN1 déstabilise la pluripotence naïve alors que sa surexpression la renforce. Nous avons ensuite cherché à caractériser le mécanisme d'action de exoNTN1WT en particulier le rôle joué par les récepteurs NEO1 et UNC5B dans la transmission du signal. Dans ce but, nous avons construit plusieurs lignées de PSC exprimant des variants de exoNTN1WT dotés d'une affinité réduite respectivement pour

NEO1 (exoNTN1ΔNEO), UNC5B/UNC5D (exoNTN1ΔUNC5H), ou les trois récepteurs (exoNTN1ΔNEOΔUNC5H). La caractérisation des cellules par séquençage unicellulaire des ARN a révélé que ces trois variants possèdent la même capacité que exoNTN1WT à renforcer la pluripotence naïve lorsqu'ils sont surexprimés. Nous avons conclu que les récepteurs canoniques NEO1/DCC et UNC5H ne sont vraisemblablement pas essentiels pour le soutien de la pluripotence naïve dans les cellules ESC. Nous avons tenté d'identifier d'autres récepteurs et voies de signalisation capables de répondre à la surexpression des exoNTN1 dans les cellules ESC. Dans ce but, nous avons construit des lignées cellulaires exprimant exoNTN1WT ou exoNTN1ΔNEOΔUNC5H de manière inducible par la docyclyline. Après induction pendant 4h, 12h, et 24h, le protéome et le phospho-protéome des cellules ont été analysés et comparé à celui des cellules non-induites. Nous avons ainsi mis en évidence la déphosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation et la régulation de l'épigénome, en particulier l'Heterochromatin Protein 1alpha (HP1alpha) impliquée dans la régulation des marques d'histone H3K9me3 et l'inhibition de la formation de l'hétérochromatine. Cette voie de régulation est compatible avec l'action « pro-naïve » de exoNTN1. Nous avons également étudié l'expression de DRAXIN dans les cellules ESC. DRAXIN est connue comme une molécule antagoniste de l'action de Nértrine-1 dans le système nerveux central. Les données d'analyse du transcriptome suggèrent que DRAXIN antagonise l'action de Netrin-1 dans la régulation de la pluripotence naïve. Enfin, nous avons étudié l'action de exoNTN1 sur la reprogrammation des cellules ESC en cellules de type 8-cellules (8CLC). Les analyses par séquençage unicellulaire des ARN ont montré que la surexpression de exoNTN1ΔUNC5H facilite la transition des cellules ESC en cellules 8CLC. De l'ensemble de ces travaux, nous pouvons conclure que exoNTN1 est un activateur puissant de la pluripotence naïve.