

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **15 décembre 2023**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame TROTTMANN Marie-Madeleine**

Titre de la thèse : « *Exploration des mécanismes moléculaires de la reprogrammation directe d'astrocytes en neurones induits GABAergiques* »



Résumé

Le système nerveux central des mammifères ne possède pas la capacité de régénérer les neurones perdus suite à une lésion ou à une neurodégénération. Les dégâts cérébraux induisant la mort neuronale peuvent être de nature diverse, tels qu'un arrêt vasculaire cérébral, un traumatisme crânien, des maladies neurodégénératives ou encore certaines épilepsies. La réponse cérébrale aux dégâts induisant la mort neuronale implique de nombreux types cellulaires, notamment des cellules gliales (microglies, glies NG2 et astrocytes) qui vont être activées et proliférer afin de contraindre et protéger le site de la lésion en formant une cicatrice gliale. Au-delà de cette réponse, de nombreuses études se sont penchées sur la réponse neurogénique endogène pouvant avoir lieu suite à une perte de neurones. Chez les mammifères adultes, la neurogenèse persiste dans certaines zones précises du cerveau, mais ne permet pas le remplacement efficace des neurones perdus lors d'une lésion. Afin de pallier ce manque, une stratégie émergente de réparation cérébrale consiste à convertir des cellules gliales réactives résidentes du cerveau en neurones induits (iNs) fonctionnels, par reprogrammation cellulaire directe. Cette reprogrammation peut être réalisée en induisant l'expression dans les cellules gliales de facteurs de transcription au potentiel neurogénique connu. Parmi les populations cellulaires candidates pour être reprogrammées, les astrocytes apparaissent comme des cibles idéales : ils prolifèrent suite à un dommage cérébral, et leur proximité cellulaire avec les neurones, du fait de leur génération par les mêmes cellules progénitrices, pourrait faciliter leur reprogrammation en iNs. De plus, dans des conditions de réponse à un dommage, l'activation des astrocytes induit des modifications de leur profil cellulaire qui pourraient augmenter leurs capacités neurogéniques. Un avantage de la reprogrammation directe d'astrocyte en iNs est de pouvoir induire un phénotype neuronal précis, répondant au besoin, grâce à

une combinaison de facteurs de transcription adaptée. Les neurones GABAergiques génèrent la majeure partie des signaux inhibiteurs au sein du cerveau, ils sont essentiels pour l'équilibre entre excitation et inhibition des circuits neuronaux, et leur perte ou leur dysfonctionnement est impliqué dans l'apparition de nombreux troubles tels que la schizophrénie, le trouble du spectre autistique, et l'épilepsie. La régénération de neurones GABAergiques apparaît donc comme un objectif primordial, et la reprogrammation directe d'astrocytes comme un moyen de le remplir. Il a été montré que l'expression de certains facteurs de transcription spécifiquement impliqués dans la différenciation des neurones GABAergiques durant le développement du cerveau embryonnaire était suffisante pour induire la reprogrammation d'astrocytes en iNs GABAergiques fonctionnels. Cette reprogrammation représente une stratégie prometteuse pour le remplacement de neurones perdus, mais la compréhension de ses mécanismes reste très limitée. Pour cette raison, l'objectif de ma thèse est de disséquer les mécanismes moléculaires sous-tendant la reprogrammation d'astrocytes en iNs GABAergiques. Dans cette démarche, j'ai exploré plusieurs aspects essentiels des changements moléculaires ayant lieu au cours de la reprogrammation. Le programme transcriptionnel d'un astrocyte va subir de profonds et nombreux changements pour permettre l'acquisition d'une nouvelle identité neuronale précise. Ainsi, l'étude du transcriptome des cellules en cours de reprogrammation permet d'apporter des informations précieuses sur les mécanismes complexes qui permettent la reprogrammation complète d'astrocytes différenciés en iNs fonctionnels. La dynamique d'expression de gènes peut par ailleurs refléter des changements d'importance majeure, tels que les transitions épigénétiques et métaboliques nécessaires à la transformation des astrocytes.

Résultats

J'ai montré par immunomarquage que l'expression forcée du facteur de transcription Dlx2 ou de la combinaison d'Ascl1 et Dlx2 induit efficacement la reprogrammation d'astrocytes en iNs GABAergiques. J'ai ensuite montré par single cell RNA-Sequencing que les astrocytes exprimant les facteurs de transcription Ascl1 et Dlx2, ou Dlx2 seul, présentent deux trajectoires transcriptionnelles alternatives conduisant à leur reprogrammation en iNs GABAergiques. Ces trajectoires, établies par analyse pseudo-temporelle à partir de données transcriptomiques de cellules exprimant le/les facteurs de transcription depuis 7 jours, permettent l'identification d'états intermédiaires distincts au cours de la reprogrammation. La première trajectoire est composée d'une première étape durant laquelle les cellules de départ, présentant un profil transcriptionnel d'astrocytes matures, perdent progressivement l'expression de leurs marqueurs d'identité gliale et expriment de manière transitoire des gènes associés aux cellules souches des niches neurogéniques présentes dans le cerveau adulte. On retrouve notamment la surexpression des gènes Notch1 et Notch2 dans ce premier état intermédiaire. Toutefois, la comparaison de ces cellules avec des cellules souches endogènes de niche neurogénique du cerveau adulte n'a révélé qu'une similitude partielle principalement due à un profil métabolique semblable. En

effet, cette transition de l'état astrocytaire au premier état intermédiaire s'accompagne d'une activité liée à la transcription et traduction ainsi qu'à un métabolisme glycolytique et lipidique accru, mais aussi d'une forte expression de composants mitochondriaux. Dans la continuité de ces observations, le second état intermédiaire sur cette trajectoire se caractérise par l'expression de gènes impliqués dans la différenciation neuronale ainsi que dans le stress oxydatif. Ces observations, ainsi que celle d'une diminution d'expression des gènes liés à la glycolyse, précise la mise en place du changement métabolique profond nécessaire pour la transition d'un métabolisme glial glycolytique à l'acquisition d'un métabolisme neuronale reposant sur la phosphorylation oxydative. La seconde trajectoire détectée lors de mon analyse montre une transition de l'astrocyte d'origine à un état intermédiaire composé de cellules cyclantes. Ces cellules, ayant en grande partie perdue l'expression de leurs gènes gliaux, présentent l'expression de certains gènes neuronaux et liés au lignage GABAergique. L'état final vers lequel convergent enfin les deux trajectoires se caractérise par l'expression de composants synaptiques et de marqueurs spécifiques de neurones GABAergiques. La transition de l'astrocyte à l'iN GABAergique s'accompagne également d'une reprogrammation épigénétique extensive, observée à l'échelle transcriptomique par l'expression graduelle de gènes liés au remodelage chromatinien, ainsi qu'au changement de profil d'expression d'ARN non codants. Une analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cellules reprogrammées par *Ascl1* et *Dlx2* comparée à *Dlx2* seul a permis d'établir une expression importante de modulateurs épigénétiques dans la condition *Dlx2* seul comparée à la combinaison *Ascl1-Dlx2*. Par ailleurs, des gènes reflétant la maturité neuronale et les fonctions synaptiques se trouvent significativement plus exprimés dans les cellules exprimant *Ascl1-Dlx2*. De manière cohérente, les neurones induits par *Dlx2* seul présentaient également un profil d'expression de gènes enrichi en composants épigénétiques liés à la maintenance de cellules souches. Enfin, certains marqueurs de sous-types neuronaux GABAergiques sont également affectés par ces différentes combinaisons de facteurs de transcription. Ces analyses ont donc permis de confirmer les observations immunologiques précédemment faites suggérant une plus grande maturité des iNs reprogrammés par la combinaison d'*Ascl1* et *Dlx2* comparé à *Dlx2* seul.

Conclusion

En conclusion, mes travaux apportent une description précise des mécanismes moléculaires sous-tendant la reprogrammation directe d'astrocytes en neurones induits GABAergiques. L'utilisation de séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique m'a permis d'explorer en détail la dynamique d'expression de gènes au cours du processus de reprogrammation. L'identification des voies métaboliques et épigénétiques impliquées dans cette reprogrammation permet d'aiguiller de futures explorations fonctionnelles qui permettront de mieux comprendre et d'optimiser ce processus. Enfin, ce travail apporte des connaissances essentielles dans l'optique d'une translation potentielle de cette reprogrammation d'astrocytes en neurones induits comme stratégie thérapeutique chez l'homme.

