

Ecole doctorale Environnements-Santé
Dossier de projet de thèse « Contrat doctoral Etablissements »
ANNEE 2024

TITRE DU PROJET :

**Caractérisation par cellule unique des défauts cellulaires et transcriptionnels des
Organoïdes Cérébraux Humains ayant des Variations Génétiques Pathogènes dans des
Familles de Protéines SR, CELF et hnRNP**

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :
Nom : VITOBELLO
Prénom : Antonio

Co-directeur de thèse éventuel :
Nom : JEGO
Prénom : Laurence

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu)
INSERM UMR1231 CTM, équipe GAD

- localisation
Bâtiment B3, 15 bd du maréchal De Lattre de Tassigny 21000 Dijon

- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu
Vitobello Antonio, Jego Laurence

- adresse courriel du contact scientifique
Antonio.vitobello@u-bourgogne.fr

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)
MultiOmixCARE project (Programme d'investissements d'avenir (PIA): Rare Diseases:
Resolving diagnostic deadlock) 100 778 euros, projet d'envergure
MIND 25 000 euros, projet Amorçage

- connaissances et compétences requises
Culture cellulaire, Western blot, immunofluorescence, extraction ARN, ADN, Crispr/Cas9
Des connaissances dans les mécanismes génétiques, ainsi que dans les technologies
associées comme l'analyse des profils transcriptomiques seraient un atout.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

Résumé en français

Les protéines SR, CELF et hnRNP sont des facteurs d'épissage clés impliqués dans de nombreux aspects du métabolisme de l'ARN. Des publications récentes et des travaux en cours dans notre laboratoire indiquent que des variations pathogènes de protéines appartenant à ces familles sont impliquées dans des troubles neurodéveloppementaux

syndromiques et non syndromiques. Les organoïdes du cerveau humain, dérivés de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC), représentent un modèle physiologiquement pertinent pour comprendre les mécanismes pathologiques impliqués dans les maladies neurologiques.

Ce projet doctoral vise à caractériser la différenciation des progéniteurs cérébraux et les anomalies de transcription/épissage induites par des variations pathogènes dans les familles de protéines SR et hnRNP, en utilisant des organoïdes du cerveau humain et la technologie CRISPR/Cas9 pour l'introduction de variations. Les organoïdes cérébraux seront différenciés des cellules souches pluripotentes induites, imitant le développement précoce du cerveau humain. Des marqueurs spécifiques pour différentes étapes de la différenciation des progéniteurs cérébraux seront évalués par immunofluorescence et microscopie confocale. Le profil transcriptomique des organoïdes cérébraux, y compris l'expression des gènes et les différences d'épissage alternatif, sera déterminé au niveau unicellulaire à l'aide de la technologie de séquençage d'ARN unicellulaire 10x Genomics. Les résultats attendus fourniront des informations essentielles sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à la différenciation des progéniteurs cérébraux et sur les anomalies de transcription/épissage associées aux variations pathogènes des familles de protéines SR, CELF et hnRNP. Ces données pourraient aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et à éclairer les stratégies de traitement des maladies neurodéveloppementales associées à ces variations.

Résumé en anglais

SR, CELF and hnRNP proteins are key splicing factors involved in many aspects of RNA metabolism. Recent publications, and ongoing work in our laboratory, indicate that pathogenic variants in proteins belonging to these families are involved in syndromic and non-syndromic neurodevelopmental disorders. Human brain organoids, derived from induced pluripotent stem cells (hiPSCs), represent a physiologically relevant model to understand pathological mechanisms involved in neurological diseases.

This doctoral project aims to characterize the differentiation of brain progenitors and the transcriptional/splicing anomalies induced by pathogenic variants in the SR and hnRNP protein families, utilizing human brain organoids and CRISPR/Cas9 technology for variant introduction. Brain organoids will be differentiated from induced pluripotent stem cells, mimicking early human brain development. Specific markers for different stages of brain progenitor differentiation will be assessed via immunofluorescence and confocal microscopy. The transcriptomic profile of brain organoids, including gene expression and alternative splicing differences, will be determined at the single-cell level using 10x Genomics single-cell RNA sequencing technology. Expected outcomes will provide critical insights into the molecular mechanisms underlying brain progenitor differentiation and the transcriptional/splicing anomalies associated with pathogenic variants in the SR, CELF and hnRNP protein families. These data could help identify novel therapeutic targets and inform treatment strategies for neurodevelopmental diseases associated with these variants.

Description du Projet

Introduction :

Les organoïdes cérébraux humains ont émergé comme un modèle prometteur pour étudier le développement du cerveau humain et les mécanismes moléculaires associés aux maladies neurologiques. Les protéines SR (Serine/Arginine-rich), CELF (CUGBP Elav-like) et hnRNP (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein) sont des acteurs clés impliqués dans de nombreux aspects du métabolisme de l'ARN et en particulier de l'épissage alternatif, un processus crucial pour la diversité fonctionnelle des protéines dans le cerveau. Des variations pathogènes dans ces familles de protéines ont été récemment associées à un

large éventail de maladies neurologiques, y compris les troubles neurodéveloppementaux syndromiques ou non syndromiques (PMID: 37071997; 34107259).

Objectif :

Ce projet de doctorat vise à caractériser les défauts de différenciation des progéniteurs cérébraux et les anomalies transcriptionnelles et d'épissage induites par des variations pathogènes dans les familles de protéines SR, CELF et hnRNP, en utilisant des organoïdes cérébraux humains et la technologie CRISPR/Cas9 pour introduire ces variations. Le profil transcriptomique par cellule unique sera obtenu grâce à la technologie de séquençage d'ARN "single-cell" de 10x Genomics qui permettra ainsi de caractériser la composition cellulaire des organoïdes à plusieurs stades de différenciation.

Méthodologie :

- Culture et différenciation des organoïdes cérébraux humains :

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) seront différenciées en organoïdes cérébraux tridimensionnels, mimant le développement précoce du cerveau humain.

- Introduction de variations pathogènes par CRISPR/Cas9 :

Des variations pathogènes dans les gènes des protéines SR et hnRNP seront introduits dans les iPSC à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 pour générer des lignées cellulaires porteuses de ces variations.

- Caractérisation de la différenciation des progéniteurs cérébraux :

L'expression de marqueurs spécifiques des différents stades de différenciation des progéniteurs cérébraux sera évaluée par immunofluorescence et microscopie confocale.

- Analyse de l'épissage alternatif :

Les différences dans les motifs d'épissage alternatif entre les lignées cellulaires porteuses de variations pathogènes et les lignées de type sauvage seront analysées par séquençage haut débit.

- Séquençage d'ARN à cellule unique :

Le profil transcriptomique des organoïdes cérébraux, y compris les différences d'expression génique, sera déterminé à l'échelle de la cellule unique en utilisant la technologie de séquençage d'ARN à cellule unique de 10x Genomics.

Résultats attendus :

Des informations essentielles sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à la différenciation des progéniteurs cérébraux et aux anomalies transcriptionnelles et d'épissage associées à des variations pathogènes dans les familles de protéines SR et hnRNP sont attendus. Ces données pourraient aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et à développer des stratégies de traitement pour les maladies neurologiques associées à ces variations.

Conclusion :

En combinant l'utilisation d'organoïdes cérébraux humains, de la technologie CRISPR/Cas9 et du séquençage d'ARN à cellule unique, ce projet de doctorat offre une approche novatrice pour étudier les mécanismes moléculaires des maladies neurologiques. Les résultats obtenus pourraient avoir un impact significatif sur notre compréhension des bases moléculaires de ces maladies et ouvrir de nouvelles perspectives pour leur traitement.

Compétences requises pour le candidat idéal afin de mener à bien ce projet :

Le candidat devra être titulaire d'un master 2 avec des connaissances théoriques en génétique et biologie cellulaire, si possible dans le domaine des neurosciences, avec une motivation pour contribuer à l'avancement des connaissances dans le domaine des maladies du développement. Le candidat devrait être capable de travailler de manière autonome tout en collaborant efficacement avec les membres de l'équipe mixte de recherche, comprenant des biologistes, des cliniciens et des bioinformaticiens. Il communiquera ses résultats de recherche en français et en anglais.

Compétences techniques :

Une expérience en culture cellulaire est requise.

Des compétences en biologie moléculaire comme la PCR quantitative en temps réel (qPCR), en western blotting, et en immunofluorescence sont demandées.

Une connaissance des principes et méthodes d'analyse bioinformatique de données de séquençage haut débit d'AND et d'ARN est souhaitable mais pas obligatoire.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

Biologie

Santé, médecine humaine, vétérinaire

Mots clés : Organoïdes cérébraux humains, facteurs d'épissage, troubles du neurodéveloppement, CRISPR/Cas9, scRNA-seq