

Ecole doctorale Environnements-Santé
Dossier de projet de thèse « Contrat doctoral Etablissements »
ANNEE 2025

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : VITOBELLO

Prénom : Antonio

Section CNU : 4704

Grade : PU-PH

HDR : Date de soutenance 07/04/2023 Discipline : Génétique Médicale

l'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du présent projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) :

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

Antonio.vitobello@u-bourgogne.fr

03.80.39.66.59

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : INSERM UMR1231 CTM, équipe GAD, directeur François Ghiringhelli

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : DUPLOMB-JEGO

Prénom : Laurence

Section CNU :

Grade : Chercheure CHU

HDR : non ; oui Date de soutenance 19/12/2017. Discipline : Biologie cellulaire

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) :

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

Laurence.duplomb@chu-dijon.fr

03.80.39.32.38

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : INSERM UMR1231 CTM, équipe GAD, directeur François Ghiringhelli

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, Laurence Duplomb-Jego

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

- adresse courriel du contact scientifique

Antonio.vitobello@u-bourgogne.fr

- titre du projet

Caractérisation par cellule unique des défauts cellulaires et transcriptionnels des Organoïdes Cérébraux Humains ayant des Variations Génétiques Pathogènes dans un gène de la famille hnRNP

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)

Projet PERSONALISE (FEDER) – 100 000 EUR

- 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)

Les protéines 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 dans la protéine 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 un gène de la famille hnRNP récemment identifié par notre laboratoire, 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 éventuelles anomalies de transcription/épissage associées. Ces données pourraient aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et à éclairer les stratégies de traitement des maladies neurodéveloppementales associées à ces variations.

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 a gene of the hnRNP family recently identified by our laboratory 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 this hnRNP gene, 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. These data could help identify novel therapeutic targets and inform treatment strategies for neurodevelopmental diseases associated with these variants.

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.

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