

| | |
|---|---|
| UE11 – Biologie Cellulaire – Signalisation Cellulaire - n°1 13/02/2019 Pr Sandra Guilmeau sandra.guilmeau@inserm.fr | RT : Sam Majeri Kasmaei RL : Pierre Aubert |
|---|---|

Introduction à la signalisation cellulaire

Plan :

I. Physiologie et signification

A. Définition

B. Notion de transduction du signal

C. Modes de transmission ; exemple des systèmes endocrines, nerveux et immunitaires

II. Acteurs de la signalisation cellulaire

A. Premiers messagers

B. Récepteurs nucléaires et membranaires

C. Médiateurs de la signalisation intracellulaire

D. Bases de la signalisation : spécificité, amplification, intermittence, intégration

Présentation de l'UE :

L'UE est divisée en 13 cours d'1h30, donnés par des chercheurs, 5 séminaires de 3h où l'on analyse des articles récents, et dans lesquels tous les étudiants seront interrogés, et un TD interactif au dernier cours. Le programme des cours est sur le moodle.

Un tiers de la note est donnée par le séminaire. Les listes de qui vont à quel séminaire quand sont sur le moodle de l'UE11 Signalisation cellulaire. Pendant ces séminaires il va falloir analyser un article récent, qui sera mis sur le moodle 15 jours avant le séminaire. Article à lire et à comprendre, mais pas besoin de préparer de présentation dessus, premier séminaire le 6 mars, allez voir la liste sur le moodle pour savoir vous êtes avec quel groupe et à quelle date vous passez. Les deux autres tiers de la note sont donnés par les partiels, avec 1/3 de la note sur des QCM sur les cours, et le dernier tiers rédactionnel sur analyse d'article. 1^{ère} session d'examens mi-juin, aux amphi Frézal et Portier. 2^{ème} session en août (rattrapages)

I. Physiologie et signification

A. Définition

La **signalisation cellulaire** est indispensable dans la **totalité des fonctions biologiques** normales (synaptique, immunitaire, musculaire, hormonale, croissance embryonnaire...) et des anomalies de la signalisation cellulaire peuvent causer des **pathologies** comme des **tumeurs**, des **inflammations** des **maladies auto-immunes** et toutes sortes de maladies.

Tous les organismes doivent réagir aux **changements de leur environnement** et ils le font par la **signalisation cellulaire**, lorsque les cellules traduisent un **signal externe** par un **changement interne**. Les organismes ont évolué de telle sorte que les voies de signalisation cellulaires soient **conservées entre les espèces** et soient **utilisées dans toutes les formes de vie multicellulaire**. La signalisation peut être une **communication intracellulaire** ou **entre deux cellules**, une communication **électrique** ou une communication **chimique**.

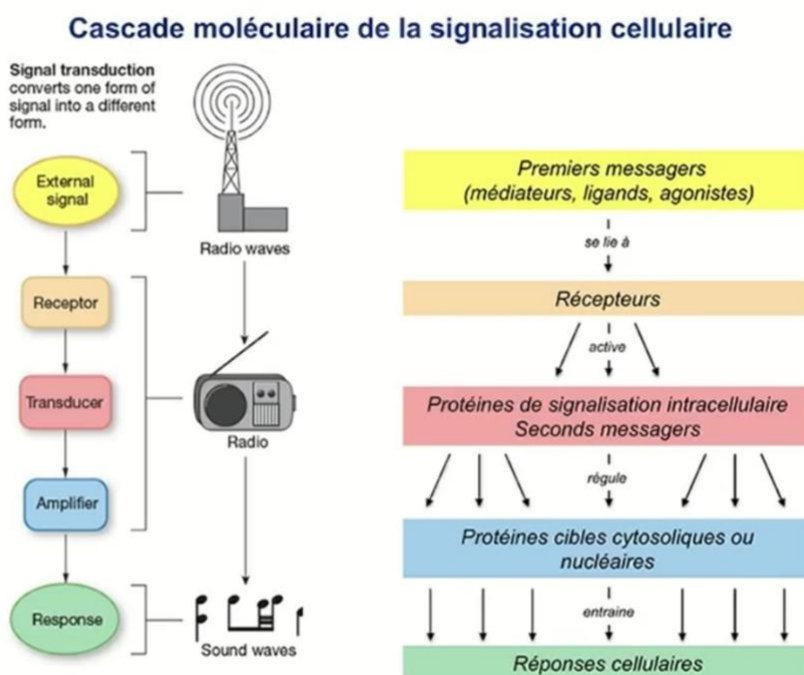
Il y a une forte **interactivité** entre la cellule et l'organisme. L'organisme va apporter à la cellule des **premiers messagers** (hormones, cytokines, neurotransmetteurs, potentiel d'action), la cellule va avoir une **réponse** qui peut être une modification nucléaire ou transcriptionnelle, une sécrétion, un potentiel d'action, une division, une apoptose, une contraction musculaire, et de la cellule va émaner **d'autres messagers** qui vont aller communiquer avec d'autres cellules de l'organisme.

La signalisation cellulaire nécessite la **réception** par la cellule du message extérieur et **l'intégration** de son message pour adapter **l'homéostasie**. Le premier messager est donc un **signal** qui doit être reconnu par un **récepteur membranaire ou intracellulaire** (généralement nucléaire quand intracellulaire) spécifique à la cellule cible.

B. Notion de transduction du signal

Ces **récepteurs** vont donc interpréter **spécifiquement** leur **ligand**, et déclencher une voie de signalisation qu'on appellera **transduction du signal** ou signal intracellulaire. La transduction est donc la **transformation d'un message extracellulaire en message intracellulaire**. Ce processus est très important chez les métazoaires dont l'homme : **20% des gènes** sont consacrés à la réalisation de la transduction du signal.

Ce terme de transduction du signal est apparu dans le titre de 3 articles publiés en 1979, et a été emprunté aux physiciens qui désignent par transduction le passage d'une forme à une autre. Exemple : un microphone transduit des ondes sonores en courant électrique. Schématiquement, la transduction cellulaire est comparable à la transduction physique.



Les bases de la signalisation sont la **spécificité** du ligand pour son récepteur, **l'amplification** du signal, **l'intermittence** (il faut que le signal soit transitoire, pas constant, cette intermittence est assurée par des rétrocontrôles) et **l'intégration** du message cellulaire.

On a deux grands types de premiers messagers, les **molécules lipophiles** qui sont transportées par des

protéines spécialisées dans le sang et qui **traversent la membrane plasmique**, et les **molécules hydrophiles** qui se transportent sous forme libres dans le sang et qui nécessitent soit un transporteur membranaire pour les laisser passer à travers la membrane soit un récepteur membranaire. Dans la cellule on a **plusieurs systèmes effecteurs** entre le récepteur et la cible intercellulaire. Il y a deux grands types d'actions, soit **l'activation/inhibition d'enzymes/transporteurs/canaux**, soit l'activation ou inhibition de la **transcription**

C. Modes de transmission ; exemple des systèmes endocrines, nerveux et immunitaires

La **sélectivité** de l'action du premier message est à la fois due à sa **concentration**, son **gradient**, **l'orientation** de ce gradient, et la **présence** de son récepteur sur ou dans la cellule cible. Certaines cellules peuvent **entièrement ignorer** la présence d'une forte concentration d'un message si l'expression du récepteur de ce message leur fait défaut.

Deux types de communication par des premiers messagers secrétés ou membranaires : **communication locale ou à distance**

Pour la communication locale, on a 3 types de communication, la juxtacrine, qui se fait entre deux cellules collées. Soit par des **jonctions communicantes** (gap junction) qui laissent passer le premier messager soit par des **molécules d'adhérence** (signal contact dépendant) qui permettent les interactions entre les molécules des membranes des cellules.

La communication **autocrine**, où le messager agit sur **la même cellule qui l'a secrété**, et la communication **paracrine**, où le messager est secrété et diffuse à une **cellule adjacente**.

Les modes de communication à distance sont les communications **endocrine** (via des hormones secrétées dans le sang par des glandes qui agiront sur les cellules possédant le récepteur spécifique) et **neurocrine** (via des neurotransmetteurs entre le neurone pré synaptique et la cellule post synaptique, ou via des neurohormones secrétées dans le sang par des neurones qui agiront sur les cellules possédant le récepteur spécifique)

Dans le système immunitaire, la communication est **complexe** : à la fois autocrine, paracrine, et endocrine. Les premiers messagers sont les **cytokines**

II. Acteurs de la signalisation cellulaire

A. Premiers messagers

Il faut faire la différence entre la notion de **ligand ENDOGENE** (molécule lipophile ou hydrophile se fixant sur récepteurs spécifiques) et de molécules agonistes ou antagonistes qui sont des molécules **EXOGENE** qui vont inhiber ou activer des récepteurs.

B. Récepteurs nucléaires et membranaires

Les récepteurs nucléaires vont interagir avec des messagers lipophiles et les récepteurs membranaires avec des messagers hydrophiles. Il y a 4 classes de récepteurs :

- **Les récepteurs catalytiques**, qui ont une activité enzymatique intrinsèque, les lier avec leur ligand va activer ou inhiber directement leur activité. Généralement monocaténaires, meilleur exemple : les récepteurs tyrosine kinase
- **Les récepteurs couplés aux protéines G** : le récepteur monomérique constitué de 7 domaine transmembranaire va activer la protéine G (**transducteur**) quand liée à son ligand. La protéine G va ensuite réguler l'activité **d'effecteurs** (canaux ioniques, adénylate cyclase, phospholipase C...)
- **Les récepteurs canaux ioniques**, lier leur ligand va ouvrir ou fermer le canal. Constitués de plusieurs sous unités
- **Les récepteurs intégrines**, la liaison avec le ligand aura généralement des conséquences sur le cytosquelette

L'activation d'un récepteur par son ligand ou son agoniste peut se faire par

- **Un changement de conformation** (récepteurs des canaux ioniques tels que les récepteurs nicotiniques)
- **La formation de dimères** (récepteurs à activité enzymatique intrinsèque, récepteurs nucléaires, récepteurs canaux complexes multimériques)
- **Protéolyse** (récepteurs couplés aux protéines G, récepteurs protease activated receptor et récepteurs Notch)

L'activation du récepteur conduit à des changements d'affinité du récepteur pour les molécules avec lesquelles il interagit

La signalisation cellulaire n'est pas aussi simple que « Le message arrive à la cellule, et la cellule intègre le message et y répond ». En effet, certains récepteurs peuvent avoir des effets totalement différents selon la force d'interaction récepteur-ligand. Par exemple, dans le contexte tumoral, pour les récepteurs tyrosine kinase, cette force d'interaction peut être responsable d'anti-apoptose, de prolifération, de différenciation, ou de chimiotaxie.

C. Médiateurs de la signalisation intracellulaire

Similaire à un relais, où un premier signal va être pris en charge par un deuxième qui sera pris en charge lui-même et ainsi de suite jusqu'à la conversion du **substrat** en **produit**.

On distingue deux types de médiateurs intracellulaires : les **médiateurs protéiques** et les **seconds messagers** de nature nucléotidique (AMPC), lipidique (DAG), ou ionique (Calcium).

Souvent, la **cascade de réaction** est une série de modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations en cascade (rapide) ou d'association avec des seconds messagers ou encore grâce à la formation de complexes fonctionnels.

On peut trouver des **protéines adaptatrices** qui permettent de passer le signal entre le récepteur et les médiateurs, des **protéines d'ancrage** ancrées à la membrane et au récepteur et qui vont aussi faire passer le signal, et des **protéines d'échafaudage**, très efficaces, qui vont recruter à elles seules plusieurs médiateurs ce qui va faciliter la transmission du signal très rapidement.

D. Bases de la signalisation : spécificité, amplification, intermittence, intégration

Un petit signal à la base **d'un seul complexe ligand-récepteur** va souvent donner une réponse cellulaire puissante avec plusieurs molécules intracellulaires : c'est **l'amplification**. Chaque effecteur va agir sur plusieurs effecteurs et ainsi rendre le signal plus puissant, **mais pas déformé**, on garde fidèlement l'information transmise. Pour le récepteur à l'épinéphrine par exemple, le signal est multiplié par **10⁸**

Toutes les voies de signalisation ont leur **rétrocontrôle**, qui est essentiel pour que la cellule reste sensible aux signaux de son environnement. Ce rétrocontrôle permet **l'intermittence** de la signalisation.

Ce **rétrocontrôle** se situe à différents niveaux :

- Les récepteurs peuvent être modifiés et rendus réfractaires ; ils peuvent être enlevés de la membrane (par endocytose ou coupure).
- Les complexes de signalisation peuvent être désactivés par déphosphorylation ou par hydrolyse du second messager

Un manque de rétrocontrôle rend la cellule **incapable de répondre conformément** aux besoins de l'organisme. **Le cancer** est un exemple très étudié d'une pathologie qui survient à la suite d'un défaut dans le rétrocontrôle des voies de signalisation.

Il est possible pour un récepteur d'intégrer le même signal en plusieurs voies de signalisation intracellulaire, que deux différents récepteurs activent la même voie, ou encore qu'un récepteur active une voie qui active une autre voie qui peut être activée individuellement par un autre récepteur. Cette façon d'intégrer des signaux variés est important pour l'études des cellules tumorales, qui auront tendance à être constituées de plusieurs types cellulaires et donc d'avoir des **réponses très complexes** aux signaux de leur environnement

Conclusion

Signalisation cellulaire = réactions hétérogènes et transitoires.

L'activation de voies de signalisation intracellulaire associe :

- Des interactions protéiques multiples (complexes multiprotéiques)
- Dépendantes ou non de modifications post-traductionnelles (phosphorylations)
- Entraînant des changements de compartiments cellulaires

La communication entre protéines ou leur activation impliquent des petites molécules non protéiques appelées seconds messagers

De nombreuses modifications post-traductionnelles régulent ces voies de signalisation à court ou long terme

FICHE RECAPITULATIVE :

Introduction à la signalisation cellulaire

La **signalisation cellulaire** permet aux organismes de réagir aux changements de l'environnement. Elle est donc indispensable et très conservée entre les espèces. Ses anomalies peuvent causer toutes sortes de maladies.

La **transduction du signal** (ou signal intracellulaire) correspond à la voie de signalisation déclenchée par la fixation ligand – récepteur. **20% des gènes** humains y sont consacrés.

Bases de la signalisation = **1. Spécificité 2. Amplification 3. Intermittence 4. Intégration**

Amplification = petit signal → plusieurs molécules intracellulaire → réponse puissante

Intermittence = extinction du signal par rétrocontrôle (le cancer est due à un défaut de rétrocontrôle)

Il existe **2 grands modes de transmission** : locale ou à distance.

- **Communication locale** = Juxtacrine (gap junction ou molécules d'adhérence) + Autocrine / Paracrine
- **Communication à distance** = Endocrine + Neurocrine

Dans le système immunitaire la communication est plus complexe et utilise les cytokines comme premiers messagers.

1) Premiers messagers

- **ligand endogènes**
 - lipophiles (traversent la membrane plasmique)
 - hydrophiles (transporteur ou récepteur membranaire)
- **ligand exogènes** = inhibition ou activation des récepteurs

2) Récepteurs nucléaires et membranaires

→ 4 types de récepteurs

- **Catalytiques** (ex. R tyrosine kinase)
- **RCPG** (R à 7 domaines transmembranaire + protéine G)
- **Canaux ioniques**
- **Intégrines** (conséquence sur cytosquelette)

→ 3 types d'activation du récepteur

- **changement de conformation**
- **formation de dimères**
- **protéolyse**

3) Médiateurs de la transduction

Souvent caractérisés par une série de modifications post-traductionnelles

- **Protéines** (adaptatrices, d'ancrage, d'échafaudage...)
- **Seconds messagers** (nucléotidique, lipidique ou ionique)

UE11 –Biologie Cellulaire–
Signalisation Cellulaire - n°2
13/02/2019
Aurélien De Reyniès

RT : Sam Majeri Kasmaei
RL : Pierre Aubert

Apport des omiques à l'étude de la signalisation cellulaire

Plan :

- I. **Le cancer comme modèle d'étude**
- II. **Cancer : Questions liées à la signalisation**
- III. **Types de molécules et technologies omiques**
- IV. **Molécules non/peu/rarement mesurées**
- V. **Ressources web structurées sur la signalisation**
- VI. **Méthodes bio-informatiques pour l'analyse des voies de signalisation**
- VII. **Exemples d'apport en cancérologie**
- VIII. **Technologies omiques et méthodes bio-informatiques : prochaines étapes**
- IX. **Conclusions**

Mot du RT : On n'a pas l'adresse email du prof donc cours non relu.

I. Le cancer comme modèle d'étude

La tumeur peut être vue comme un **organe** qui **communique** avec le système hôte dans son ensemble. Elle est composée de cellules **diverses et communicantes** entre elles et avec l'organisme, des cellules tumorales, génétiquement hétérogènes, **phénotypiquement plastiques**, et de cellules du microenvironnement : immunitaires, fibroblastes, stromales, endothéliales. La tumeur est liée à de **multiples dérèglements** de la signalisation cellulaire normales.

II. Cancer : Questions liées à la signalisation

Il y a plusieurs marques distinctives du cancer : **prolifération** cellulaire, résistance à la mort cellulaire, **instabilité du génome** (accumulation de mutations **génétiques et épigénétiques**), induction d'angiogenèse, activation de l'invasion et de la métastase, utilisation de l'inflammation de manière pro-tumorale, échapper à l'inhibition de contact, et pleins d'autres.

Pour chaque type de cancer, ces distinctions seront exprimées différemment. L'étude du cancer c'est donc étudier **pleins de cancers différents**, quand on étudie un cancer on peut se demander quelles **voies de signalisation** pro ou anti tumorales qui sont dérégulées, quelles **voies du métabolisme** sont activées, quels sont les **interactions** entre les cellules tumorales et son stroma, quelles sont les dérivations épigénétiques, quel est l'impact fonctionnel des mutations, y'a-t-il des **facteurs de transcription dérégulés**? Ces questions sont toutes importantes pour trouver **le plan thérapeutique**.

La régulation liée à l'épigénétique est **très importante**, un exemple frappant est celui des abeilles femelles : les ouvrières et les reines ont le **même génome**, mais leur nourriture n'est pas la même, et cela va induire des modifications épigénétiques, qui vont causer des différences considérables sur les fonctions et la longévité des reines et des ouvrières soient différentes.

III. Types de molécules et technologies omiques

Quand on fait de la bio-informatique, on travaille sur **des très grosses données** qu'on appelle les **données omiques**.

Pour étudier le **génom**e, on utilise soit un **séquençage** de l'ADN complet (Whole Genom Sequencing) ou de l'ADN exonique (whole exon sequencing)

Pour étudier l'**épigénom**e, on étudiera surtout l'**état de la chromatine**, avec une immunoprécipitation de la chromatine (**ChIP-seq**) et l'**état de la méthylation** de l'ADN avec le **séquençage bisulfite**

Pour étudier le **transcriptom**e (les transcrits) on **séquence l'ARN**.

Pour étudier le protéome (les protéines) ou le métabolome (les métabolites, comme les lipides, sucres, métabolites, ou acides aminés) on sépare d'abord les éléments avec une chromatographie ou une électrophorèse puis on identifie ou quantifie les éléments par résonance magnétique nucléaire ou spectrométrie de masse.

Les données sur le génome, épigénom, ou transcriptome sont produites à **très haut débit**, l'analyse de ces données **nécessite** donc l'implication de la bio-informatique, tandis que les données sur le protéome et le métabolome sont produite à moyen débit, et **le bio-informaticien y est donc peu confronté**.

La base de la plupart de ces technologies est l'**hybridation** entre brins complémentaires : dans les bonnes conditions, deux brins complémentaires vont naturellement s'unir.

Le séquençage de l'ADN est basé sur la **fragmentation** de l'ADN simple brin en petits fragments, pour les **amplifier** puis les **séquencer** avant d'aligner les **lectures** (reads) sur le génome. Enfin, à partir des données obtenues, on peut chercher des anomalies.

Etant donné que la fragmentation est **aléatoire**, les données obtenues auront forcément des « trous ». Il faut donc passer **plusieurs fois** pour avoir des données vraiment interprétables. Il faut avoir une **couverture moyenne de 30 fois** au moins pour avoir une **lecture acceptable** d'un génome normal, et de 60 fois pour analyser de l'ADN tumoral mélangé à de l'ADN non tumoral.

Pour faire un **ChIP-seq**, on va extraire l'ADN, fixer une protéine spécifique sur l'ADN, puis par un processus **d'immunoprécipitation** on va prendre **uniquement** l'ADN lié à ces protéines spécifiques et le séquencer. Cela permet de connaître par exemple les cibles des facteurs de transmission, avec quels gènes ils interagissent. Le ChIP-seq des histones permet de connaître **l'état de la chromatine**, savoir si le site chromatinien est un site de transcription actif ou un site sans aucune transcription.

Le séquençage bisulfite permet de connaître l'état de la méthylation de l'ADN. Il est basé sur un principe simple : **le bisulfite convertit les C de l'ADN en T**, mais **pas les C méthylés**, on peut donc séquencer l'ADN après sa conversion bisulfite, et à partir du nombre de C estimer la méthylation de l'ADN, donné sous forme de β -value, définie entre 0 et 1 avec 0 complètement déméthylé et 1 complètement méthylé.

Pour la quantification des ARN, on **convertit les ARN en ADN** complémentaire qu'on séquence

IV. Molécules non/peu/rarement mesurées

Il est **facile** d'analyser toutes les données du **génom**e ou du **transcriptome** avec les technologies actuelles. Mais on ne peut analyser **que beaucoup moins de 1% du métabolome ou du protéome**, on ne sait même pas combien de protéines ou de métabolites il y a chez l'homme, mais c'est probablement une **très grande quantité** (plusieurs centaines de milliers). De plus, il y a **énormément de données publiques** sur le génome et le transcriptome (sur internet par exemple, beaucoup de banques de données) mais sur le protéome et le métabolome il y a **peu de données publiques**. Cela a un impact sur l'analyse de la signalisation cellulaire : tandis que les **récepteurs sont bien analysés et connus**, une **faible proportion des médiateurs** des voies de signalisation seulement est mesurée.

V. Ressources web structurées sur la signalisation

Le **KEGG** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) est une des plus anciennes banques de données sur le sujet de la signalisation. On peut y trouver des schémas très précis et exhaustifs sur les cascades de réaction de la signalisation cellulaire <http://genome.jp/kegg/pathway.html>

Une autre source est **WikiPathways**, plus récent, encyclopédie ouverte sur la signalisation cellulaire. <https://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways>

La **Gene ontology** associe à chaque gène tous les produits associés, ou tous les gènes/protéines associées à chaque fonction. <http://www.geneontology.org>

Biocarta présente les mêmes informations que la KEGG, mais d'une façon beaucoup plus **jolie, lisible, ludique, et facile à comprendre et mémoriser**. https://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways

VI. Méthodes bio-informatiques pour l'analyse des voies de signalisation

Quand un bio informaticien cherche à analyser de manière automatique les voies de signalisation impliquées dans un phénomène quelconque, il doit passer de l'échelle des molécules à l'échelle des voies de signalisation. L'intérêt de cette approche est qu'elle permet de **faire un tri** parmi un très grand nombre d'hypothèses, **sans à priori, très vite, à faible coût**, mais ces limites sont que les molécules utilisées par ces méthodes (surtout des transcrits) ne sont **que des substituts** des molécules fonctionnelles (protéines), les informations structurées disponibles sur les voies de signalisation peuvent être **incomplètes ou fausses**, et les méthodes **n'utilisent que très partiellement** les informations structurées disponibles sur les voies de signalisation

En général, ces méthodes **ne permettent pas d'avoir des certitudes**, mais elles permettent **d'accélérer énormément** les recherches en diminuant considérablement les hypothèses possibles, il ne reste plus qu'à **valider expérimentalement** les hypothèses les plus probables.

VII. Exemples d'apport en cancérologie

L'analyse des voies par méthode bio-informatique a permis de montrer par exemple que la voie jak-stat est hyper activée chez les lymphomes NK/T, ou que dans les tumeurs de la glande surrénale (phéochromocytome) la glycolyse est hyperactivée dans les tumeurs mutée VHL.

VIII. Technologies omiques et méthodes bio-informatiques : prochaines étapes

Aujourd'hui, on analyse les cellules individuellement, dans le futur, on pourra **spatialiser les signaux** : analyser individuellement chaque cellule puis les replacer dans le tissu, et ainsi connaître d'où vient chaque signal dans le tissu. Mieux comprendre les interactions cellulaires permet notamment de traiter beaucoup mieux les cancers.

IX. Conclusions

Les **technologies omiques** ne mesurent que **certains composants** de la signalisation cellulaire, surtout les récepteurs, et donnent une vision statistique au temps t des molécules mesurées.

Les méthodes **bio-informatiques** qui utilisent les omiques ont de nombreuses limites intrinsèques et liées à la nature des inputs

Néanmoins, ces approches rendent de grands services pour faire un **tri rapide et peu coûteux** parmi d'innombrables hypothèses.

Les développements technologiques en cours (spatialisation des signaux) vont encore accroître l'apport de ces outils à l'étude de la signalisation cellulaire.

Les outils de biologie moléculaire et cellulaire sont nécessaires pour valider les hypothèses prioritaires identifiées ici.

FICHE RECAPITULATIVE

Apport des omiques à l'étude de la signalisation cellulaire

TUMEUR = organe qui **communique avec le système hôte** lié à de **multiples dérèglements** de la signalisation cellulaire.

Cependant les cancers n'agissent pas tous de la même manière. Il est donc nécessaire d'étudier les modifications du métabolisme, du génome, des facteurs de transcriptions, des voies de signalisation ainsi que des interactions entre la tumeur et le stroma.

Données omiques = Grande quantité de données bio-informatiques permettant d'étudier :

- le **génom**e (séquençage ADN complet ou exonique)
 - l'**épigénom**e (ChIP-seq + séquençage bisulfite)
 - le **transcriptom**e (séquençage ARN)
 - le **protéom**e / **métabolom**e (électrophorèse + Spectrométrie)
- } produite à haut débit

***ChIP-seq** : immunoprécipitation de la chromatine (permet de connaître l'état de la chromatine et donc l'état du site de transcription)

***Séquençage bisulfite** : le bisulfite convertit les C de l'ADN en T sauf les méthylés (permet de connaître l'état de méthylation)

ATTENTION le séquençage de l'ADN est **basé sur la fragmentation** or une couverture moyenne (lecture du génome de référence) ne donne des informations que sur une version incomplète du génome. On doit donc **multiplier par 30** le nombre de couverture pour un génome normal et **par 60 pour un génome tumoral**.

Contrairement au génome / transcriptome, les données publiques sur le protéome / métabolome sont **très peu nombreuses** et plus difficilement analysables.

- ☞ Implique qu'une très faible proportion des médiateurs de la signalisation est mesurée.
- ☞ Les études de signalisation cellulaire par les bio-informaticiens ne permettent donc pas d'avoir de certitudes (car utilisation des transcrits et non des protéines) mais permettent d'accélérer les recherches.

Ressources web = **KEGG, WikiPathways, Gene ontology, Biocarta, etc.**

UE11 – Biologie Cellulaire –
Signalisation Cellulaire - n°3
13/02/2019
Camilla Pilati
camilla.pilati@inserm.fr

RT : Sam Majeri
RL : Pierre Aubert

Méthodologies d'étude pour la signalisation cellulaire : la voie de l'angiogénine

Plan :

Introduction

I. Interaction protéine-protéine

A- Criblage global

- 1) Double hybride chez la levure
- 2) Chromatographie d'affinité + Spectrophotométrie de masse

B- Criblage par candidat

- 1) Co-immunoprecipitation (co-IP)
- 2) Pull-Down Assay
- 3) Fluorescent Resonant Energy Transfer (FRET)
- 4) Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)
- 5) Ligature de proximité

II. Conclusion

Mot du RT : Ce cours tourne autour de l'analyse d'une publication sur l'angiogénine, mais son but c'est de comprendre les méthodes et les techniques utilisées pour l'étude de la signalisation cellulaire. La prof est allée vraiment vite et a survolé beaucoup de notions. Elle n'a pas eu le temps de finir le cours, la partie du cours sur les méthodes des interaction protéine-ADN n'a pas été mentionnée en cours, mais elle est sur le powerpoint, disponible sur le moodle. Comme elle n'a pas été mentionnée en cours, je ne l'ai pas retranscrit. Le powerpoint est franchement pas mal

Introduction

L'angiogénine (ANG) ou RNase 5 est une protéine identifiée en 1985, de 14kDa secrétée, on lui retrouve des mutations loss of function dans la sclérose latérale amyotrophique/maladie de Charcot et dans la maladie de Parkinson et est surexprimée dans les cancers. Elle est un facteur angiogénique, et c'est une ribonucléase. Elle possède 3 domaines fonctionnels : un site catalytique d'activité RNase, une séquence de localisation nucléaire, qui lui permet de rentrer dans le noyau, et un domaine de liaison au récepteur.

Elle possède 3 fonctions principales :

- Ligand
- Facteur de transcription
- RNase

En fonction de l'état des cellules et des conditions environnementales, elle est internalisée et déplacée vers le noyau ou les granules de stress.

Dans sa fonction de Ligand, elle active les voies AKT-mTOR et ERK par phosphorylation, et dans les cellules en croissance active et prolifération elle est transloquée dans le noyau où elle est un facteur de transcription de l'ARN ribosomique, ce qui permet de répondre à la forte demande métabolique.

Dans les cellules sous stress, elle est transloquée vers les granules de stress et clive les tRNA en tiRNA, ce qui diminue la traduction et permet la survie cellulaire. Cela explique son rôle putumorale.

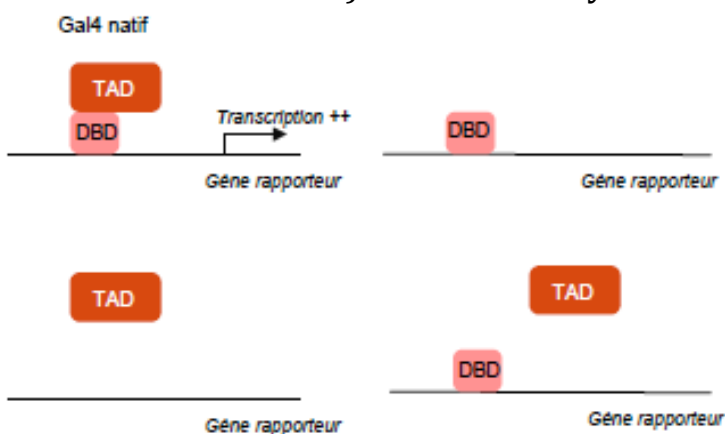
C'est une cible prometteuse pour les thérapies liées à l'ANG, notamment au niveau de son récepteur de surface cellulaire qui est essentiel pour les fonctions de l'ANG. Mais jusqu'à très récemment, ce récepteur était inconnu.

Pour identifier ce récepteur, on recherche ces interactions, on recherche donc des interactions protéine-protéine.

II. Interaction protéine-protéine

A- Criblage global

1) Double hybride chez la levure

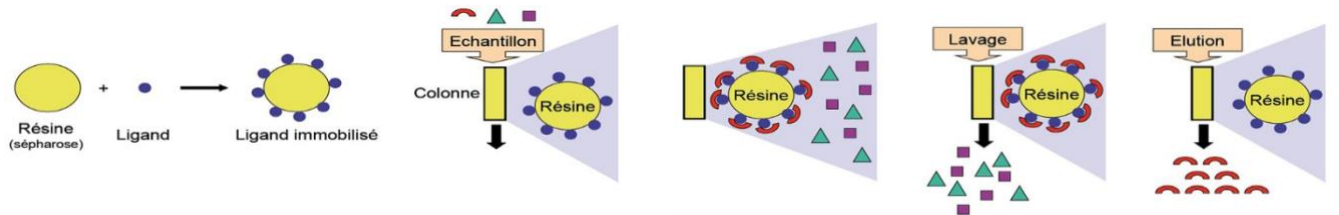


Cette technique est basée sur Gal4, un facteur de transcription avec 2 domaines : le domaine DBD : DNA binding domain, et le domaine TAD : transactivating domain. Lorsque les 2 domaines de Gal4 sont physiquement proches (moins de 50 nm), le DBD pourra se fixer à l'ADN et le TAD activera le DBD ce qui va activer la transcription du gène rapporteur. Pas de transcription possible si la chaîne peptidique est coupée entre les deux domaines.

On prend donc 2 plasmides, un dit appât qui code pour notre protéine connue (comme l'angiogénine) fusionnée avec le DBD et l'autre proie qui code pour des protéines inconnues (banque d'ADN qui codent beaucoup de protéines) fusionnées à TAD. Lorsque la protéine appât et proie interagissent, on a le gène rapporteur qui est donc transcrit.

2) Chromatographie d'affinité + Spectrophotométrie de masse

On fixe de manière covalente le ligand à une résine, puis on passe notre échantillon sur une colonne, on réalise ensuite un lavage et une élution pour isoler les protéines de l'échantillon qui a interagi avec le ligand.



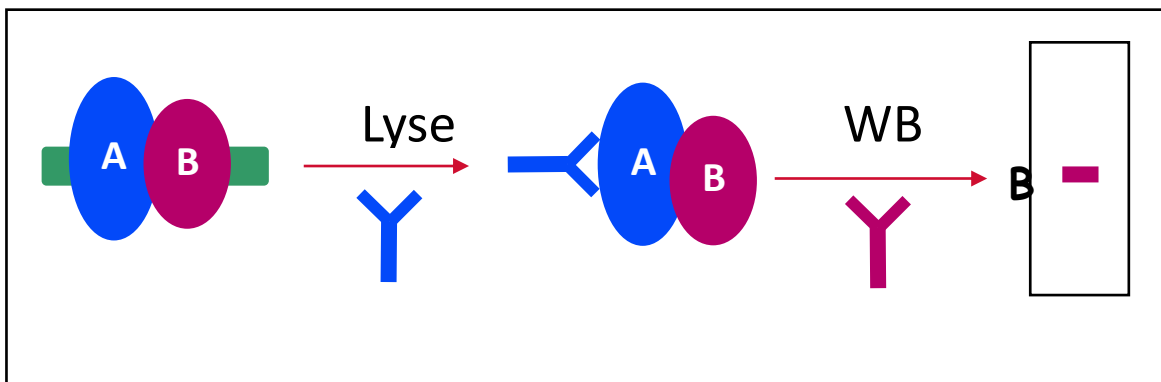
On analyse ensuite par spectrométrie de masse qui va permettre de connaître la séquence de peptide par leur masse et leur charge, on peut ensuite identifier les protéines par les banques de données et les quantifier.

B- Criblage par candidat

1) Co-immunoprécipitation (co-IP)

Technique très importante « à apprendre par cœur ».

On commence avec un extrait protéique de cellule qui contient la protéine que l'on étudie et toutes les autres de la cellule, dans des conditions non dénaturantes, c'est presque comme un



test in vivo. On mélange cet extrait avec des anticorps spécifiques couplés à des billes, on centrifuge tout ça, puis on fait un western blot, en conditions le plus souvent dénaturantes (SDS PAGE) pour plus de lisibilité mais possiblement non dénaturantes (PAGE natif). La co-IP a des grands avantages : elle étudie les interactions avec des protéines modifiées post-traductionnellement, et en conformation naturelle, des conditions de « vraie vie ». Mais elle ne permet pas de détecter les interactions protéine-protéine à faible affinité ou instables, parfois on identifie des complexes protéiques au lieu d'identifier la vraie molécule qui interagit (exemple : si on identifie B avec A, mais que B est en fait liée à C qui est liée à A, A et B n'interagissent pas ensemble) et c'est une approche ciblée à priori

2) Pull-Down Assay

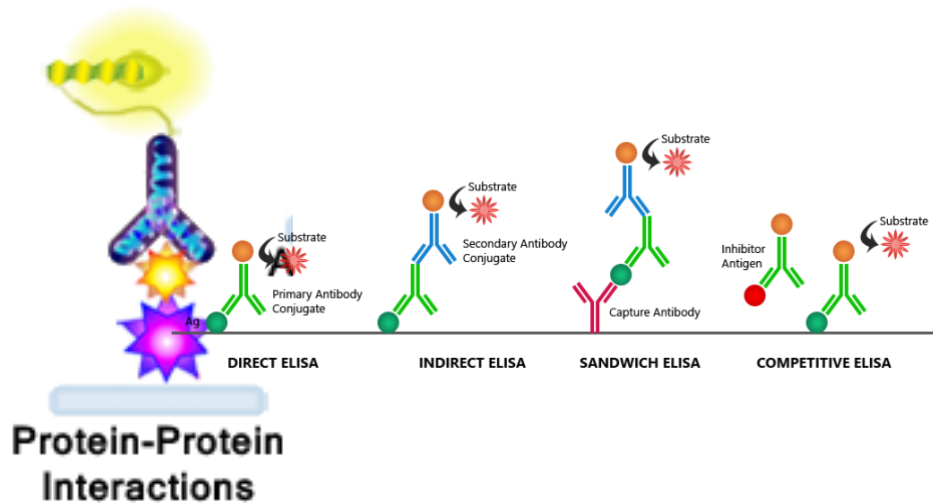
Le Pull-down assay est similaire à la chromatographie d'affinité + spectrophotométrie de masse, mais à la place de faire une spectrophotométrie de masse on fait un Western Blot, pour une approche plus ciblée.

3) Fluorescent Resonant Energy Transfer (FRET)

Le FRET sont des technologies basées sur le transfert d'énergie entre un fluorophore excité et un fluorophore dans son état fondamental. Quand les 2 fluorophores sont très proches, il y a le transfert d'énergie que l'on peut détecter au microscope optique (autofluorescence). On accroche donc les deux protéines à étudier à un fluorophore excité et non excité. Le problème étant que les fluorophores sont des assez grosses protéines et qu'ils peuvent changer la conformation des protéines. C'est un test avec une grande sensibilité mais une basse spécificité, et il y a une deuxième technique similaire, le BRET, plus spécifique mais moins sensible, qui utilise deux fluorophores à l'état fondamental.

4) Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

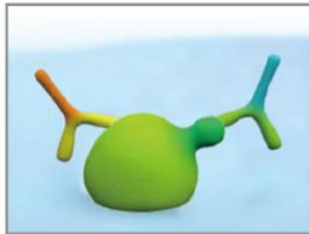
On fixe une protéine attachée à un anticorps primaire sur un support, on met un lysat protéique dessus, on lave, et l'on peut utiliser un anticorps pour vérifier si la protéine non fixée interagit



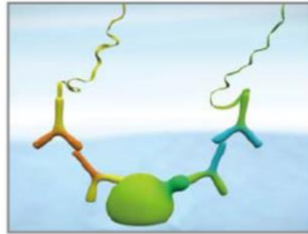
avec la protéine fixée.

5) Ligature de proximité (PLA)

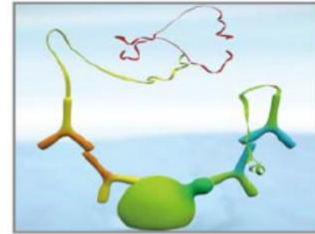
Test récent, on utilise deux anticorps primaires qui vont reconnaître les protéines, on ajoute des anticorps secondaires qui vont reconnaître les anticorps primaires. Sur les anticorps secondaires il y a des sondes ADN qui vont former une structure circulaire si elles sont physiquement proches, qu'on peut amplifier par PCR et on peut utiliser des sondes fluorescentes pour former un signal.



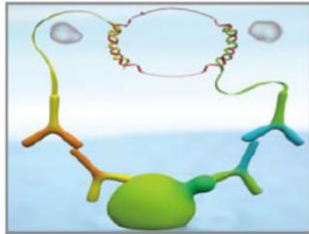
1. Incubate with target primary antibodies from two different species



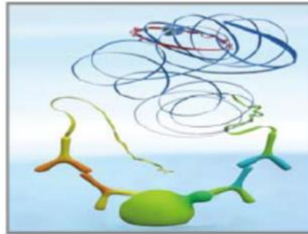
2. Add PLA probes PLUS and MINUS



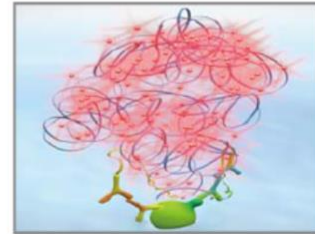
3. Hybridize connector oligos



4. Ligation to form a complete DNA circle



5. Rolling circle amplification



6. Add fluorescent probes to reveal phosphorylation

Conclusion

Il y a moins de 2 ans, une étude publiée dans le journal Cell a montré que le récepteur de l'angiogénine interagissant avec le récepteur plexin-B2, grâce à des études globales suivies de tests ELISA et de co-IP pour confirmer. Une question qui s'est posée ensuite c'est si le récepteur plexin-B2 était exprimé dans le cancer de la prostate. Les chercheurs ont donc confirmé la présence de plexin-B2 par immunohistochimie, en proportion plus grande dans les cancers que dans les cellules de prostate normale, en localisation membranaire.

Ils ont ensuite voulu étudier les effets du silencing de Plexin-B2, donc ils ont utilisé des siRNA anti-Plexin B2 pour réduire considérablement son expression, diminution de l'expression qu'ils confirment par western blot et immunohistochimie.

Ils constatent également que Erk et AKT sont beaucoup moins phosphorylé dans les cellules avec de l'ANG mais pas de plexin B2, confirmant que la plexin B2 est essentielle aux fonctions de l'ANG.

En réduisant la plexin B2, la prolifération cellulaire est beaucoup plus faible, on pourrait donc potentiellement penser à utiliser cette voie comme traitement du cancer.

FICHE RECAPITULATIVE

Méthodologies d'étude pour la signalisation cellulaire : la voie de l'angiogénine

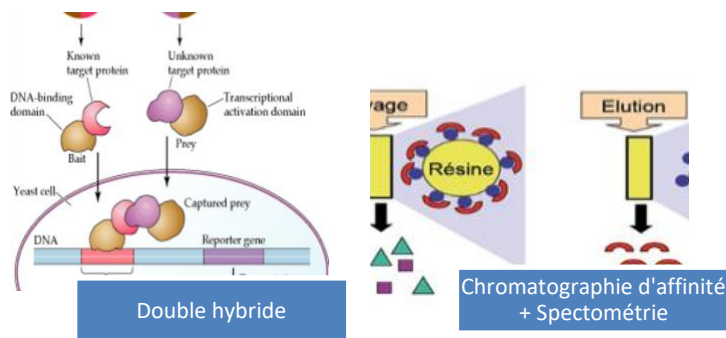
Angiogénine = (ou RNase 5) protéine sécrétée **surexprimée dans les cancers**.

3 fonctions principales : Ligand, Facteur de transcription et RNase.

Fonction globale de protection de la cellule et d'induction de la prolifération = PRO-tumorale

On va chercher à cibler le récepteur à l'ANG en cherchant les **interactions protéine - protéine**

Soit par **Criblage global** :



Soit par **Criblage par candidat** :

