

TD1 de biologie cellulaire

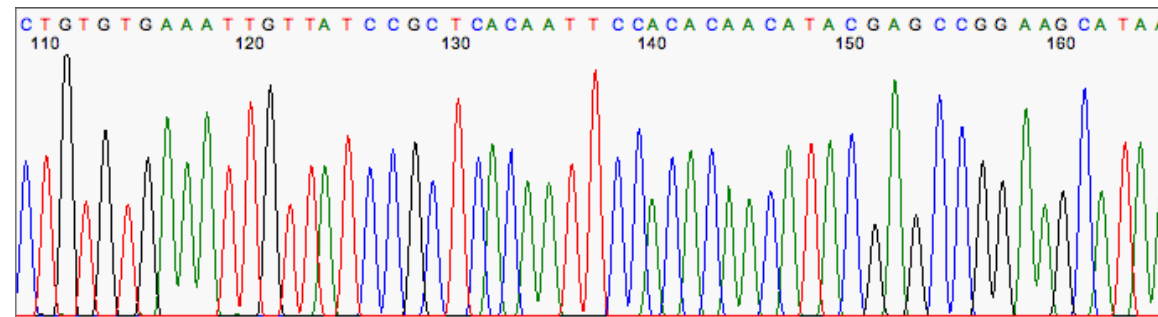
comment déterminer les conséquences
d'une mutation génétique...

Maladie familiale / maladie du développement

-> consultation médicale (enquête environnementale, génétique,...)

-> séquençage ADN

Chromatogramme (Sanger)



Comment une mutation dans l'ADN peut altérer le comportement des cellules ?

De l'ADN à la protéine

ADN



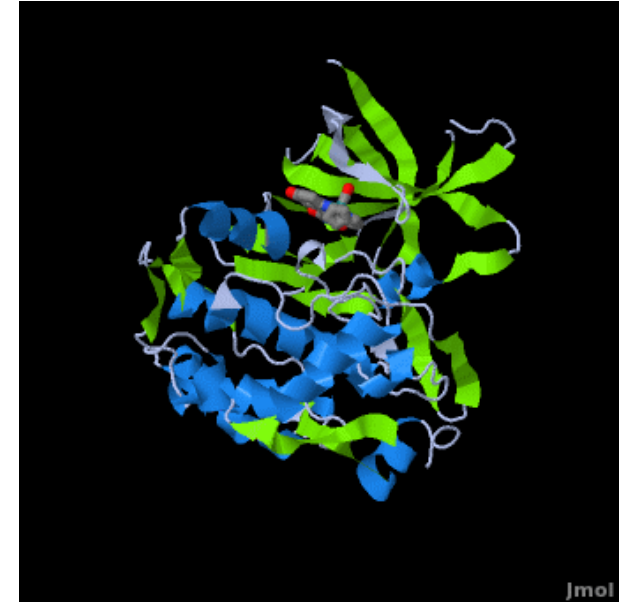
stockage de l'information à
long terme

ARN



ordre de créer une protéine:
information à court terme

Protéine



assure une fonction dans la cellule,
outil / machine / échaffaudage

De l'ADN à la protéine

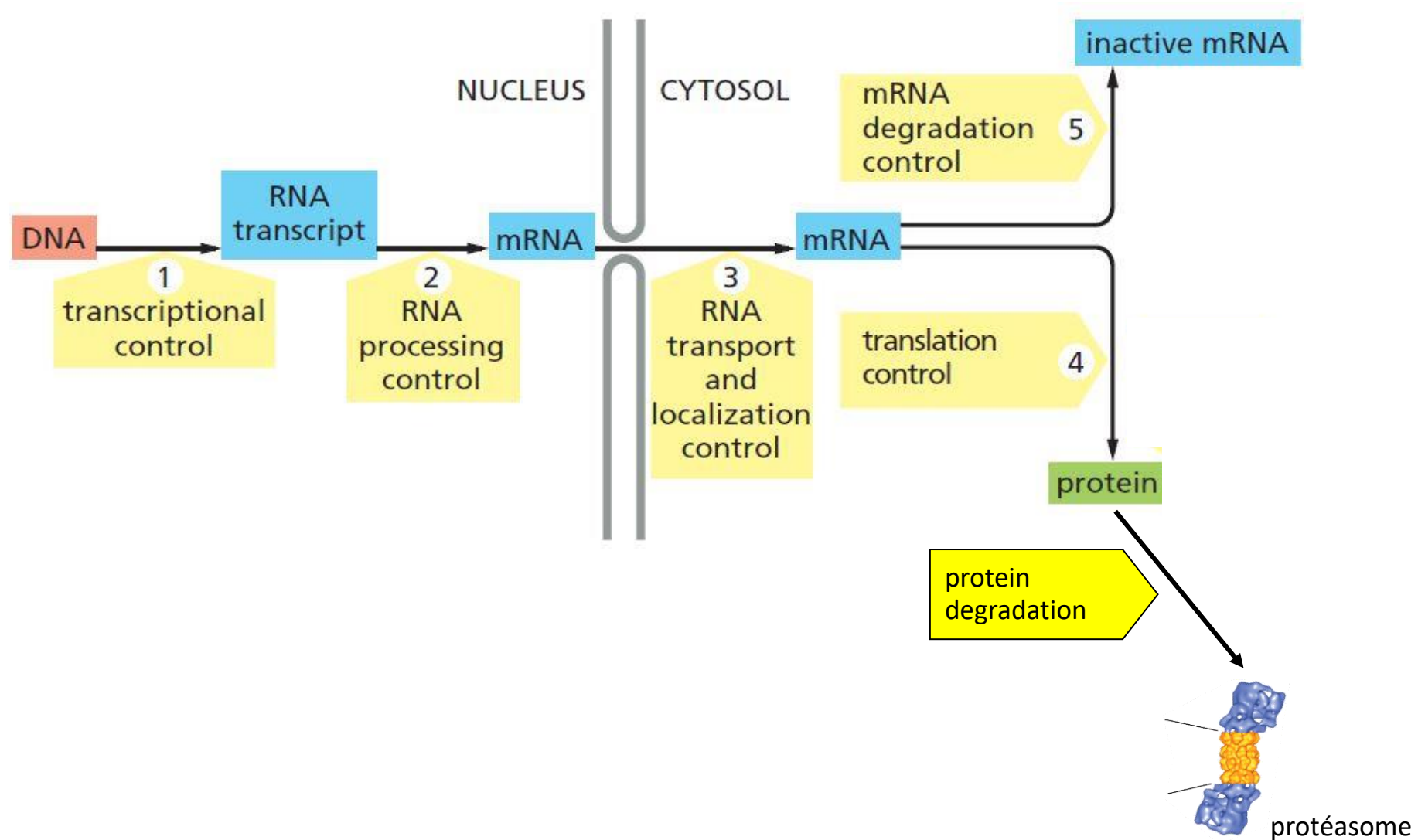
Quels niveaux du processus de synthèse des protéines peuvent être altérés ?

altération quantitative: contrôle de l'expression d'un gène:

- **ARN**
- **protéine**

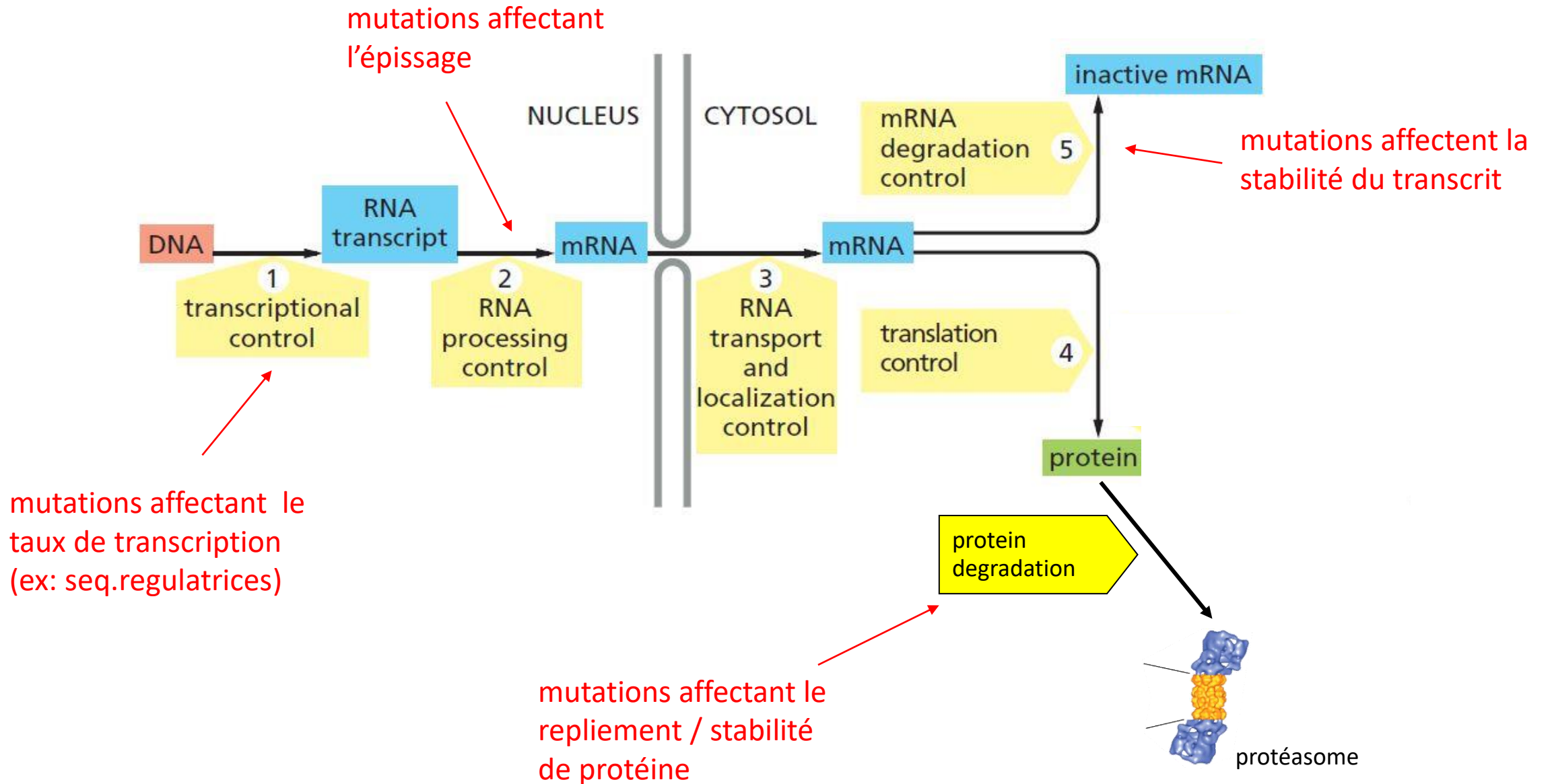
altération quantitative: contrôle de l'expression d'un gène:

- ARN
- protéine

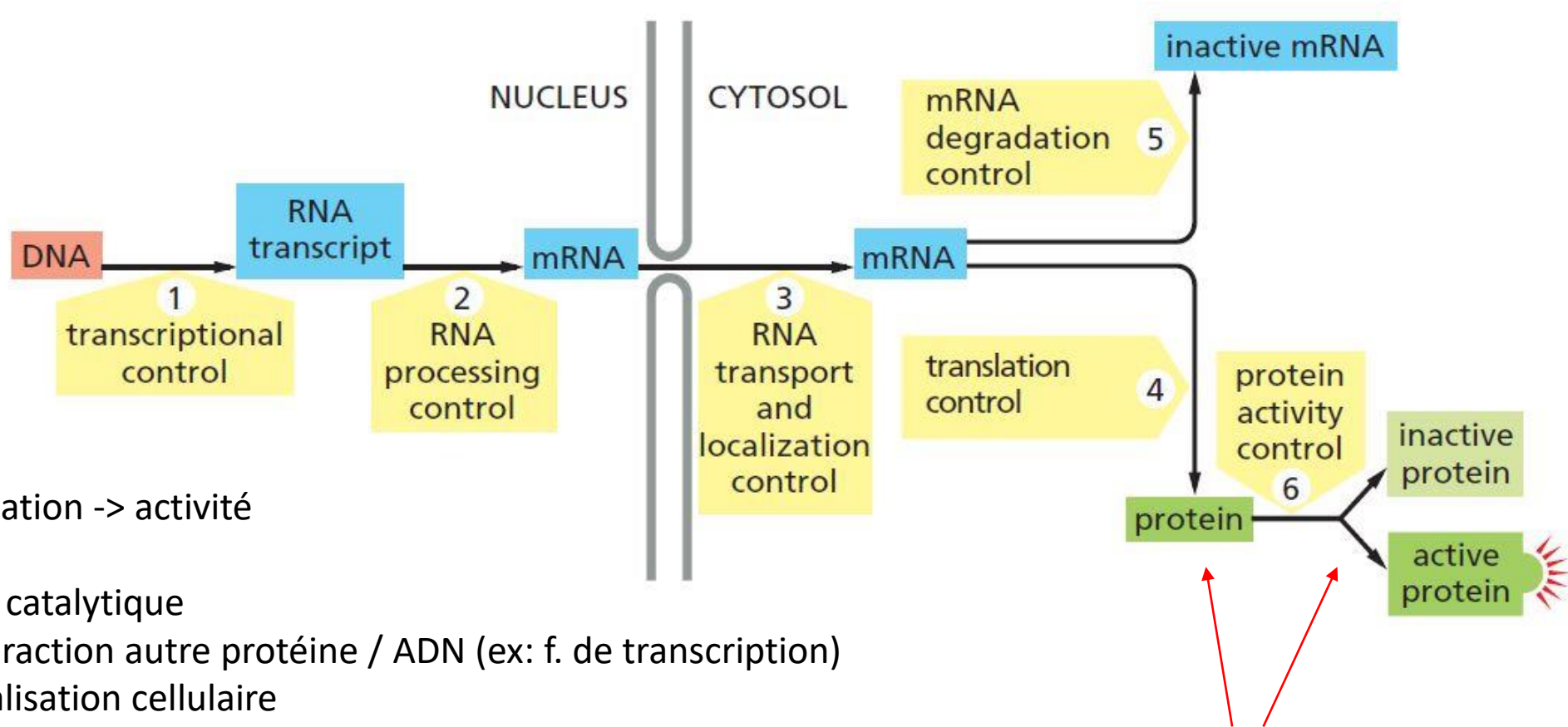


altération quantitative: contrôle de l'expression d'un gène:

- ARN
- protéine



altération fonctionnelle: contrôle de l'activité d'une protéine:



- Conformation -> activité

ex:

- site catalytique
- interaction autre protéine / ADN (ex: f. de transcription)
- localisation cellulaire

- Changement de conformation -> activation/désactivation

ex:

- site de modification post-traductionnelle (ex: aa phosphorylé)
- site d'interaction protéine partenaire

mutation affectant la conformation
ou l'aptitude au changement de
conformation

Maladie familiale / maladie du développement

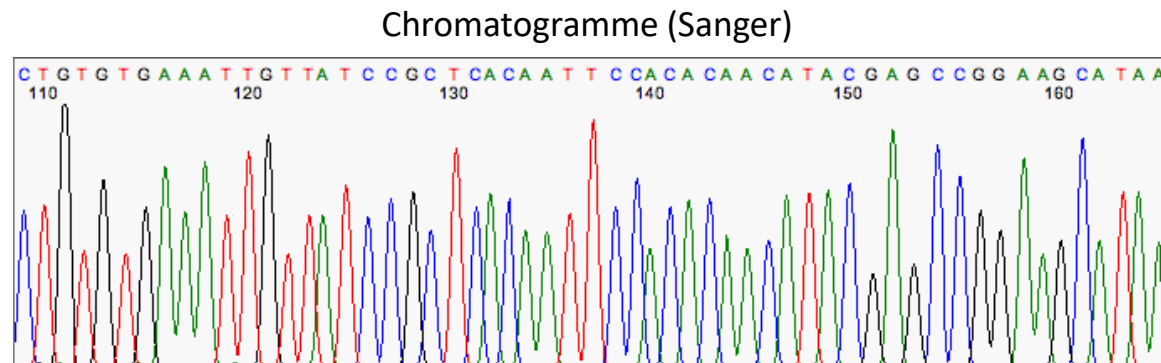
-> enquête génétique

-> séquençage ADN

A partir de quelles cellules du patient extraire l'ADN?

-> N'importe quel tissu : toutes les cellules ont le même génome

-> des cellules facilement accessibles : cellules sanguines



Comment identifier une Mutation ?

= Différences avec le « génome de référence » humain (Variant)
séquencé en 2001 à partir de 13 individus sains (américains)

Avons-nous tous la même séquence d'ADN ?

NON: nous sommes tous différents d'apparence car chaque génome est un peu différent entre chaque individu

Comment sélectionner les variants potentiellement pathogènes ?

Ces variations entre individus **sains** sont héritées (on ressemble à nos ascendants), et donc présentes aussi chez d'autres descendants de nos ascendants ; ces variations sont donc **fréquentes** dans la population générale

→ variants fréquents sans signification pathologique = **polymorphismes**,

→ Sélection des variants rares

Parmi les variants rares, comment sélectionner le Variant pathogénique (causal) ?

1) Variant **déjà connu** pour donner provoquer la maladie ?
(ex: DF508 du gène CFTR dans la mucoviscidose)

2) sinon:

Toutes les régions du génome sont elles autant susceptibles
d'altérer le fonctionnement d'une protéine ?

Non! :

- gènes (régions transcrites + régions régulatrices) : 25% du génome
- introns ne codent pas les protéines

-> Sélection des variants dans les portions de génome impliquées dans le production des protéines

- code génétique redondant (plusieurs codons pour 1 ac. aminé, 3^e nt du triplet souvent neutre)

Parmi les variants rares, comment sélectionner le Variant pathogénique (causal) ?

Sélection des variants :

- Affectant une séquence de fonction connue :
 - Codante (seq. de la protéine)
 - Consensus :
 - Régulatrice (promoteur,...)
 - Epissage, ...
- Et affectant un gène connu pour être :
 - impliqué dans la fonction affectée par la maladie
 - exprimé dans tissu atteint par la maladie

→ variant(s) *potentiellement* causal(aux)

→ études expérimentales, au-delà de la simple étude de l'ADN, pour **démontrer** sa pathogénicité

Etudes expérimentales démontrant la pathogénicité de la mutation

Déterminer si une mutation dans un gène, affecte:

- la quantité de l'ARNm ? → dosage
- la quantité de la protéine codée ? → dosage
- sa fonction ? → analyse fonctionnelle
 - localisation ?
 - activité: activité enzymatique, liaison-activation d'un promoteur,...

- mesures à partir de quel type cellulaire du patient?

→ cellules accessibles: sang, peau

- comment déterminer qu'une mesure est normale ou pas ?

→ nécessité de comparer (quantité, localisation, activité) avec des cellules issues d'individus normaux

- le gène affecté par la mutation est-il nécessairement exprimé par ces cellules accessibles

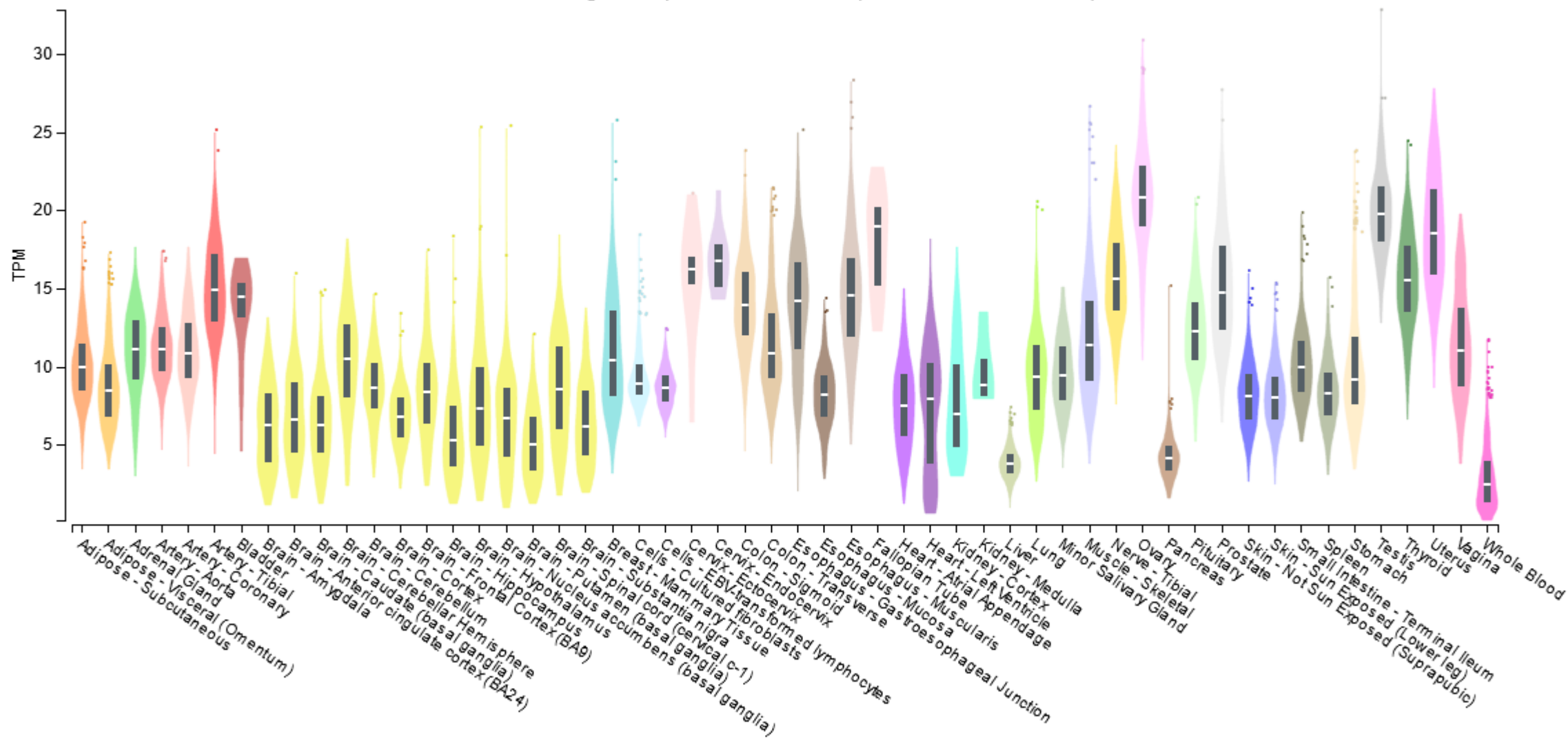
tous les gènes ne s'expriment pas dans tous les types C
or la plupart des type C sont inaccessibles (coeur cerveau,..)

Exemple d'expression d'un gène

www.gtexportal.org

Expression ubiquitaire

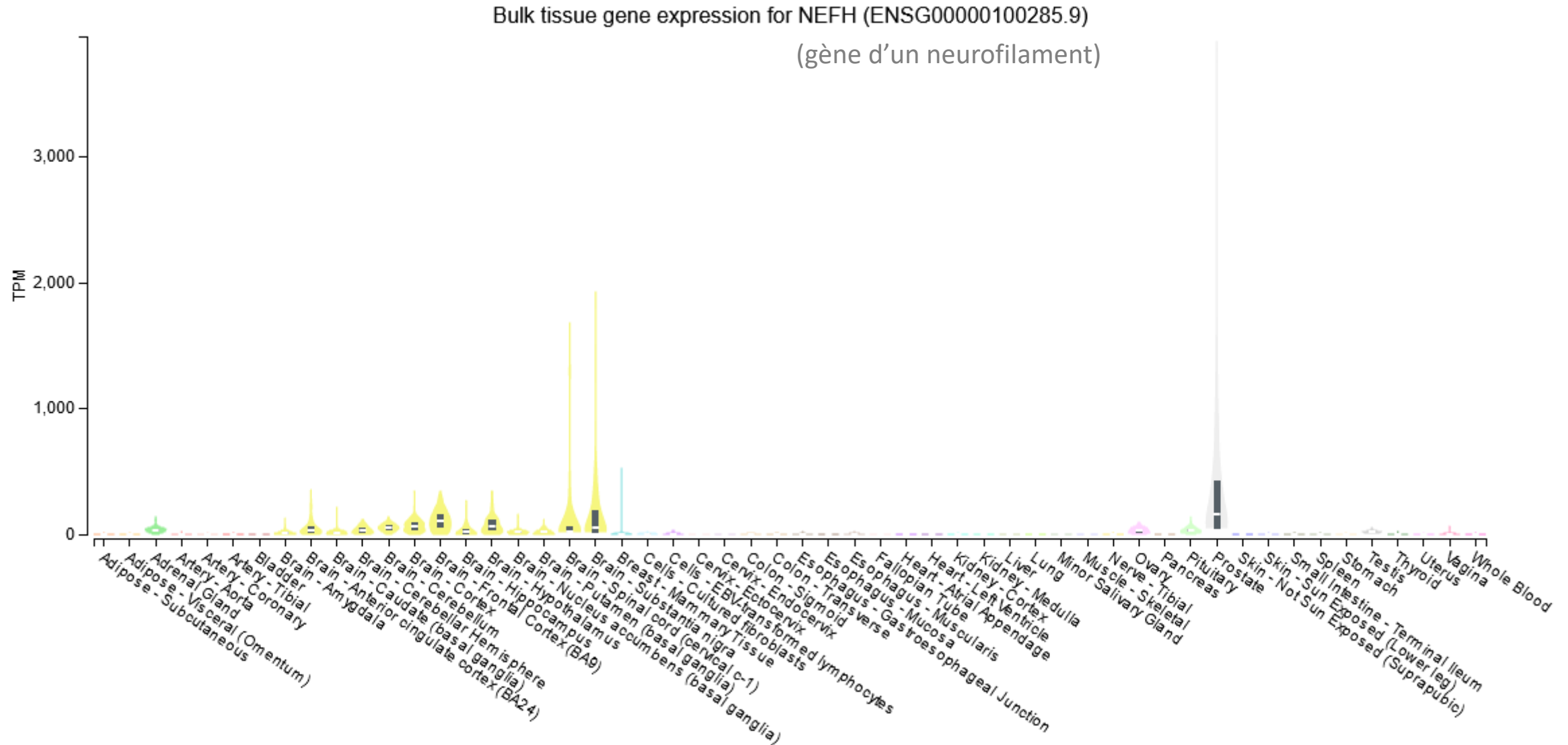
Bulk tissue gene expression for COQ7 (ENSG00000167186.10)



Exemple d'expression d'un gène

www.gtexportal.org

Expression spécifique à quelques tissus



étude expérimentale démontrant la pathogénicité de la mutation

Quel matériel biologique utiliser si le type cellulaire affecté par la mutation est inaccessible ?

→ modèle cellulaire “artificiel” :

- soit expression forcée du gène muté dans une lignée cellulaire standard
= **transgénèse**
- soit différenciation *in vitro* dans le type cellulaire adéquat:
mais: pb : n'exprime pas la protéine mutée → transgénèse
- soit différenciation des cellules accessibles du patient dans le type C que l'on souhaite = **cellules pluripotentes induites**
= dédifférenciation – redifférenciation

Lignée cellulaire: culture de cellules établie de manière permanente, càd dont les cellules se divisent indéfiniment; souvent issue de cellules cancéreuses; souvent de phénotype peu différencié

Cellules primaires: cellules extraites d'un organisme, se divisant un faible nbre de fois en culture, mais pouvant se différencier plus complètement

étude expérimentale démontrant la pathogénicité de la mutation

Quel matériel biologique utiliser si le type cellulaire affecté par la mutation est inaccessible ?

→ modèle cellulaire “artificiel” :

- soit expression forcée du gène muté dans une lignée cellulaire standard
= **transgénèse**
- soit différenciation *in vitro* dans le type cellulaire adéquat:
mais: pb : n'exprime pas la protéine mutée → transgénèse

=> Recherche de différences entre conditions avec et sans transgène

- soit différenciation des cellules accessibles du patient dans le type C que l'on souhaite = **cellules pluripotentes induites**
= dédifférenciation – redifférenciation

=> Recherche de différences avec des cellules issues d'individus sains

étude expérimentale démontrant la pathogénicité de la mutation

Quel matériel biologique utiliser si le type cellulaire affecté par la mutation est inaccessible ?

→ modèle cellulaire “artificiel” :

- soit expression forcée du gène muté dans une lignée cellulaire standard
= **transgénèse**
- soit différenciation *in vitro* dans le type cellulaire adéquat:
mais: pb : n'exprime pas la protéine mutée → transgénèse
- soit différenciation des cellules accessibles du patient dans le type C que l'on souhaite = **cellules pluripotentes induites**
= dédifférenciation – redifférenciation

+ simple
- proche de réalité



+ compliqué
+ physiologique

étude expérimentale démontrant la pathogénicité de la mutation

Quel matériel biologique utiliser si le type cellulaire affecté par la mutation est inaccessible ?

→ modèle cellulaire “artificiel” :

Que faire si on ne trouve pas de phénotype cellulaire observable
(eg: un déficit intellectuel ne se voit pas au microscope)

→ modèle “artificiel” en organisme entier
= édition de génome -> OGM
organismes modèles pour l'étude des pathologies humaines: souris, rat

+ simple
- proche de réalité



+ compliqué
+/- physiologique
limitations éthiques

étude expérimentale démontrant la pathogénicité de la mutation

Quel matériel biologique utiliser si le type cellulaire affecté par la mutation est inaccessible ?

→ modèle cellulaire “artificiel” :

Que faire si on ne trouve pas de phénotype cellulaire observable
(eg: un déficit intellectuel ne se voit pas au microscope)

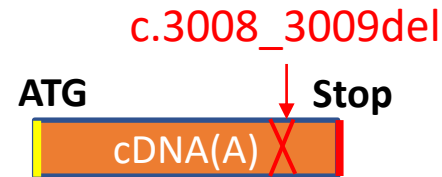
→ modèle “artificiel” en organisme entier
= édition de génome -> OGM
organismes modèles pour l'étude des pathologies humaines

→ Permettent également
de tester des traitements

Transgénèse

- Transgène : gène modifié que l'on souhaite faire exprimer dans des cellules.
Il est souvent constitué de séquences codantes uniquement
= ADN complémentaire (ADNc): exons sans introns, rétro-transcription de l'ARNm

Ex: modifications de l'ADNc (mutations) -> modification du comportement de la protéine?



- + vecteur : insertion du transgène dans 1 ADN support capable de se maintenir dans la cellule (plasmide bactérien, virus) et d'exprimer le transgène (promoteur ubiquitaire)
- + méthode d'absorption: pour faire entrer le vecteur dans la cellule (**transfection** chimique,...)

Techniques d'observation : microscopie

1. différents types de microscopes avec différentes résolutions
 - microscopie optique (photonique)
 - microscopie électronique
2. visualisations de protéines spécifiques : immunofluorescence

Microscopie optique

Puissance = « **grossissement** » : rapport entre la dimension de l'observation et la taille réelle de l'objet

$$\text{PUISSANCE} = \text{GRANDISSEMENT DE L'OBJECTIF} \times \text{PUISSANCE DE L'OCULAIRE}$$

X1000

X10

OCULAIRE

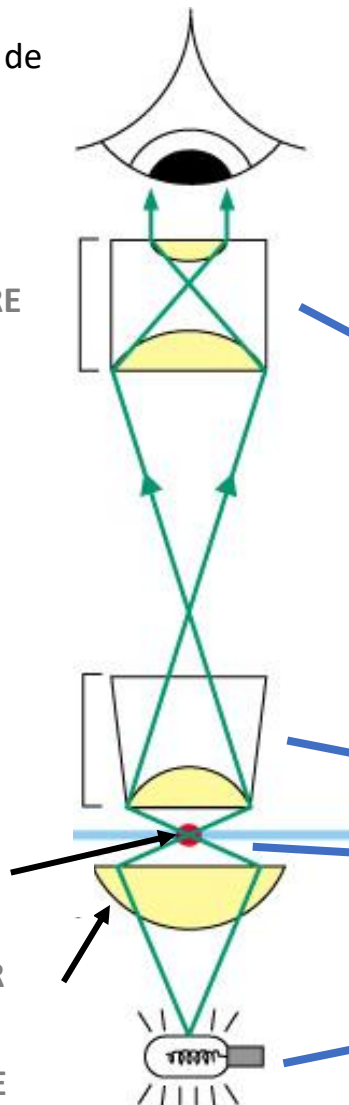
X100

OBJECTIF

SPECIMEN

CONDENSATEUR

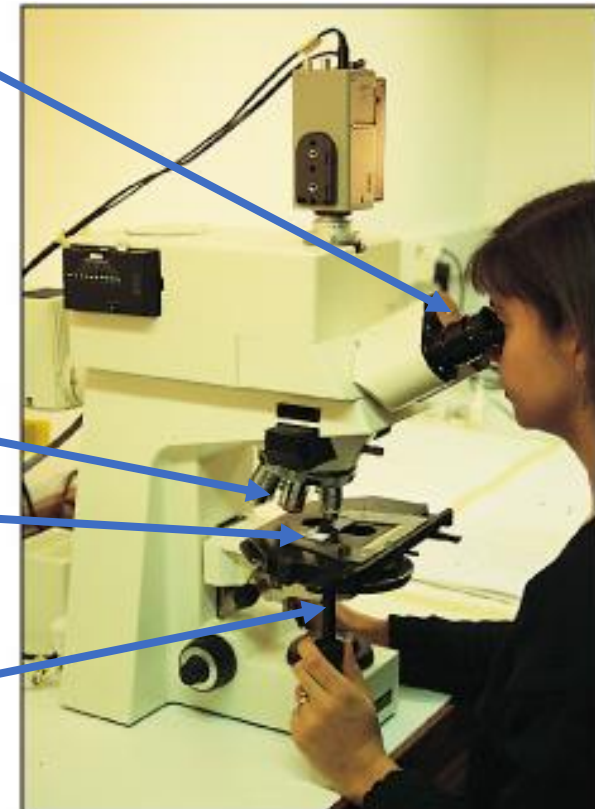
SOURCE DE LUMIERE



Combinaison de lentilles convergentes:

Le **condensateur** focalise un cône de lumière sur chaque point du spécimen

L'**objectif** collecte un cône de lumière pour créer une image



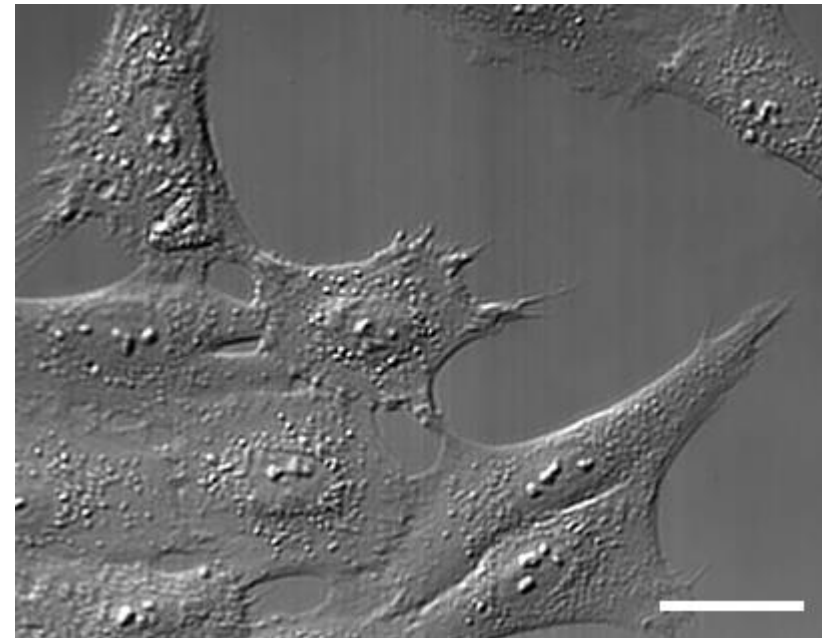
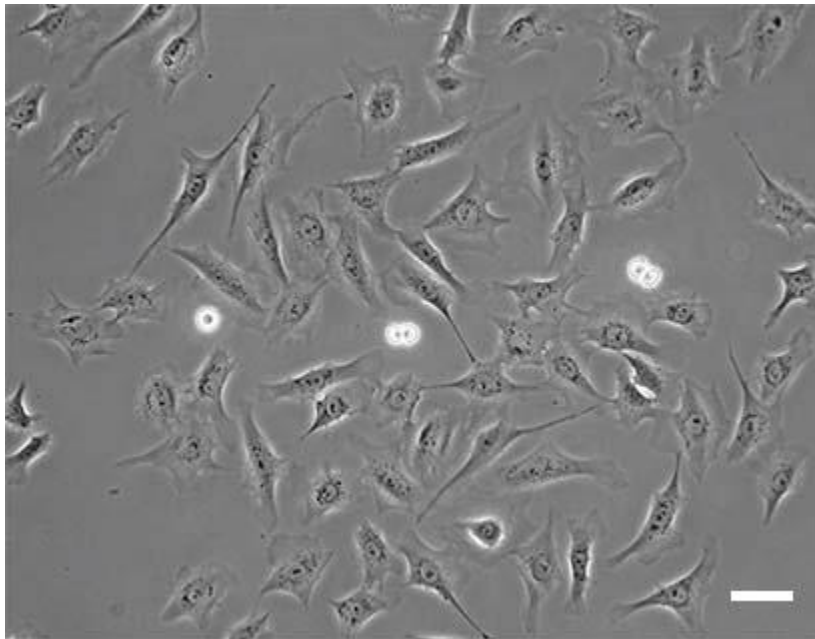
Microscopie optique

en transmission : matériel biologique ~transparent (peu de contraste)

-> techniques optiques pour **augmenter le contraste**:

contraste de phase

contraste d'interférence différentielle (Nomarski)



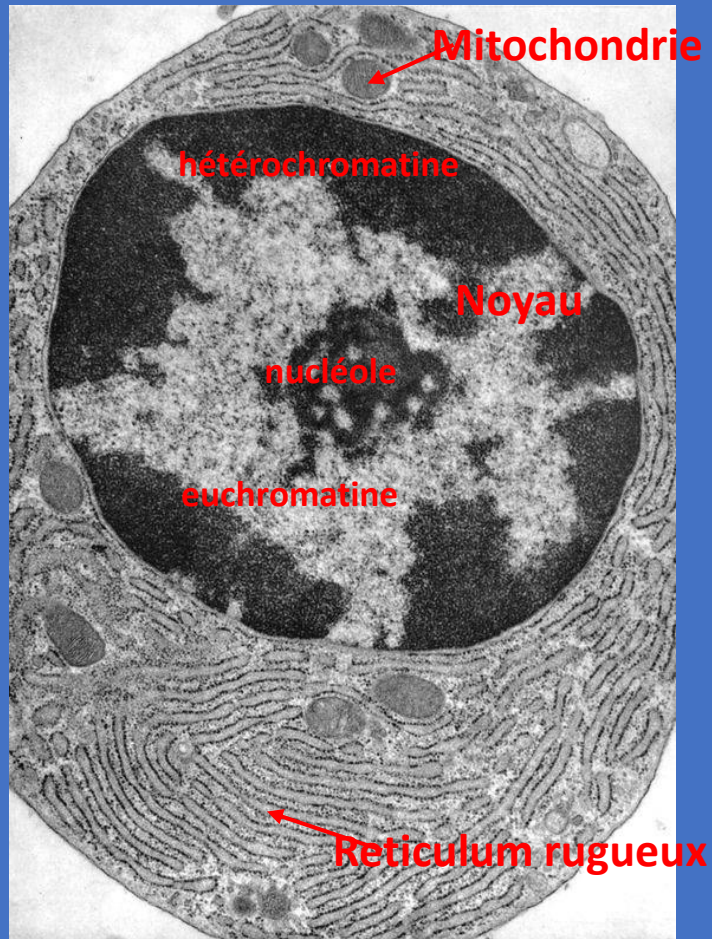
Microscopie optique / électronique

	μ optique	μ électronique
Élément détecté	Photon	Electron
Longueur d'onde	400-700 nm	0,001-1 nm
Limite de résolution	200 nm	0,2 nm
Cibles	Cellules , localisation organites et macromolécules dans la cellule	organites et macromolécules individualisées

Microscopie électronique

Différentes applications possibles, en fonction des techniques de préparation :

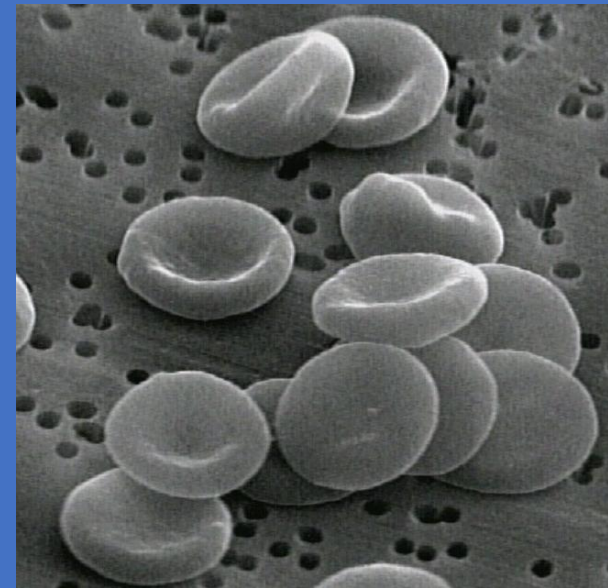
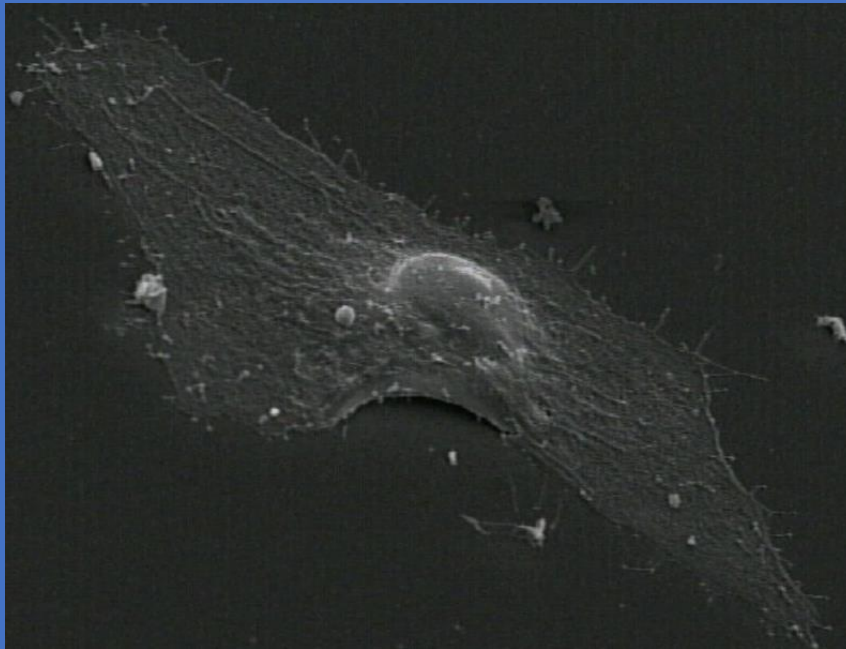
- **ME Transmission : conventionnelle**: voir les **structures subcellulaires** en coupe



Microscopie électronique

Différentes applications possibles, en fonction des techniques de préparation :

- **ME Balayage** : Voir la **structure 3D** (moindre résolution: 10nm)

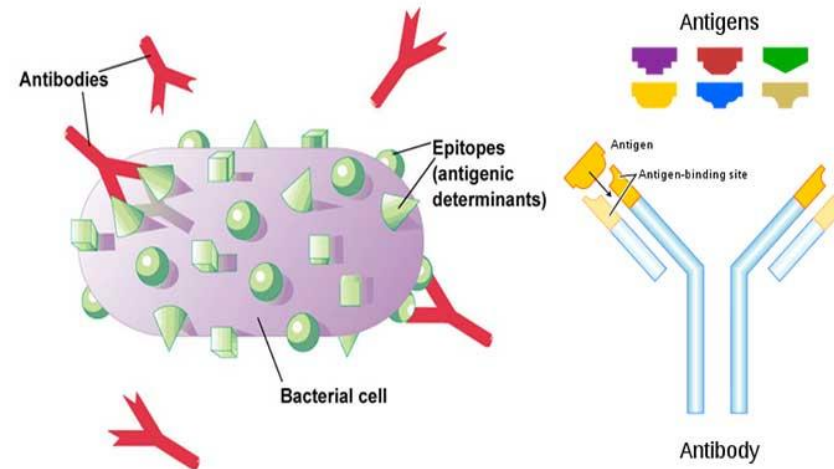


<http://scm.univ-lorraine.fr/files/2014/09/02.jpg>

Visualisation de macromolécules: ImmunoFluorescence (IF)

Marquage à l'aide d'anticorps

- **Les anticorps** (Ac), protéines de reconnaissance des pathogènes sécrétées par les cellules de l'immunité acquise (lymphocytes B), reconnaissent/s'hybrident avec une surface complémentaire, souvent un domaine d'une protéine.
- La molécule reconnue est appelée **antigène**; le domaine reconnu **épitope**
- épitope: domaine dans sa conformation finale (3D, complexes prot...) exposé à la surface de la molécule
- Les Ac, générés artificiellement chez l'animal, ou en pathologie chez l'homme, sont ainsi devenus des outils de détection/marquage des protéines.

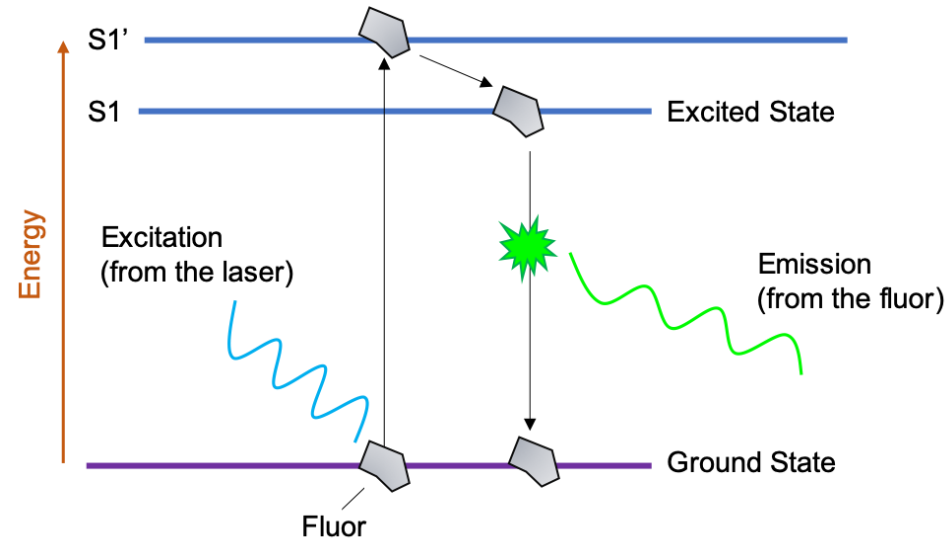


Visualisation de macromolécules: ImmunoFluorescence (IF)

Détection par couplage des Ac à des Fluorochromes :

= molécule fluorescente:

- molécule excitée par les photons d'une certaine longueur d'onde et émettant un photon dans une longueur d'onde supérieure
- La molécule peut avoir une affinité particulière pour : une **organelle** (mitochondrie : fluo. chargé +), **l'ADN** (intercallant: DAPI), etc...

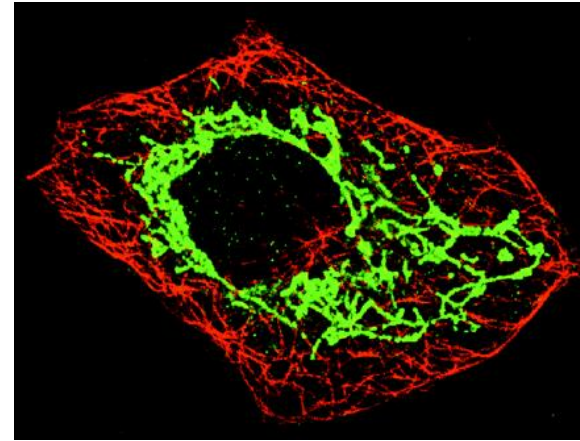


- Possibilité de combiner plusieurs fluorochromes (si λ_{ex} / λ_{em} différentes)

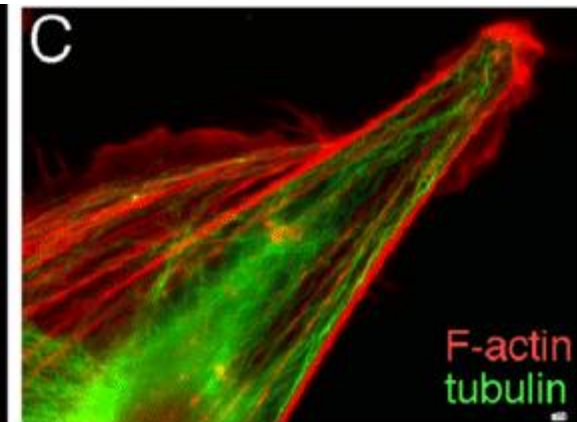
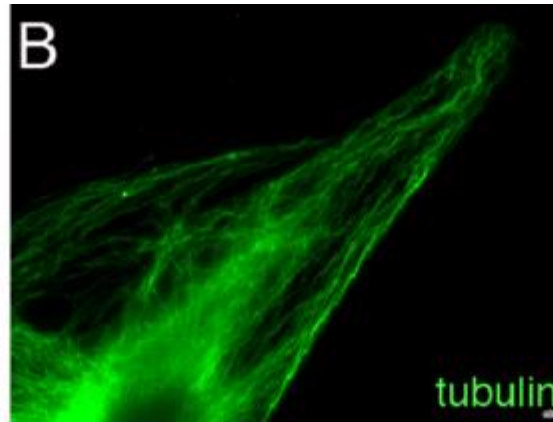
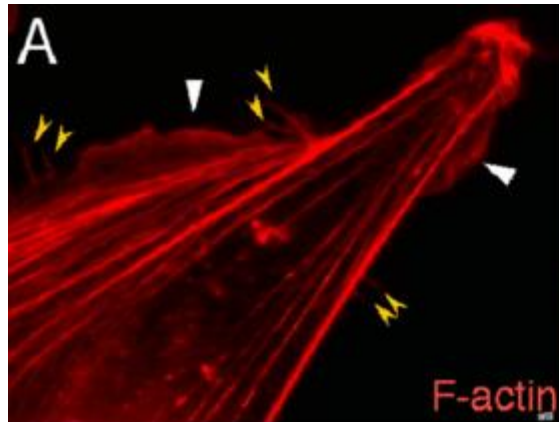
ImmunoFluorescence (IF)

Fluorochromes peuvent émettre à des longueurs d'onde différentes
→ détection simultanée de plusieurs cibles
= **co-localisation**

Vert: mitochondries
Rouge: μ tubules



Science. 1999 Mar 5;283(5407):1493-7.

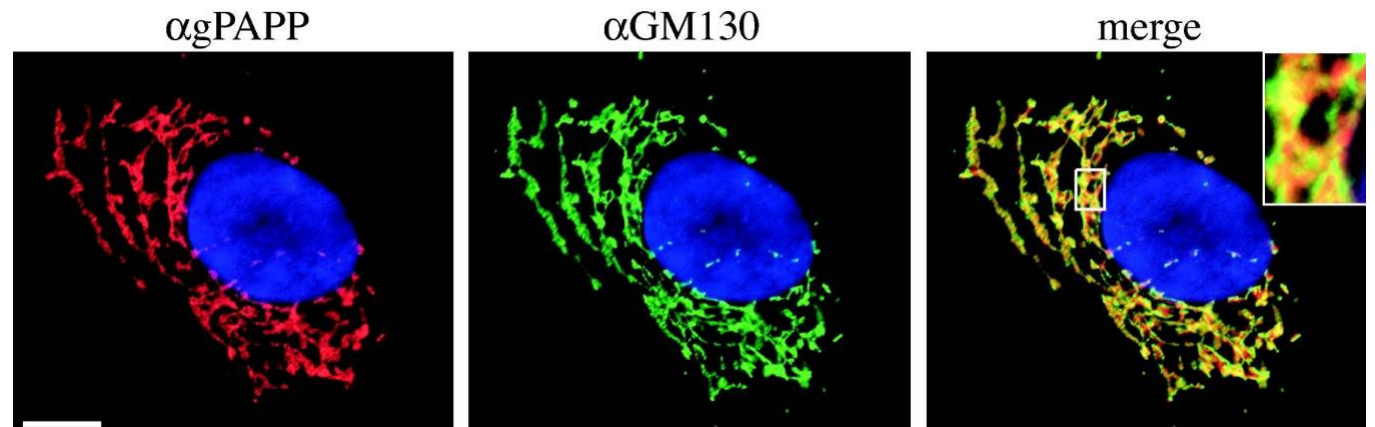


Cell Struct Funct. 2003 Aug;28(4):229-41.

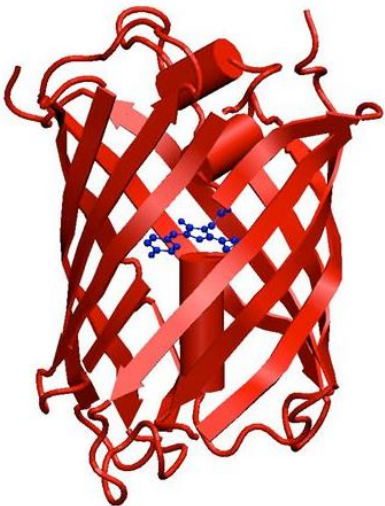
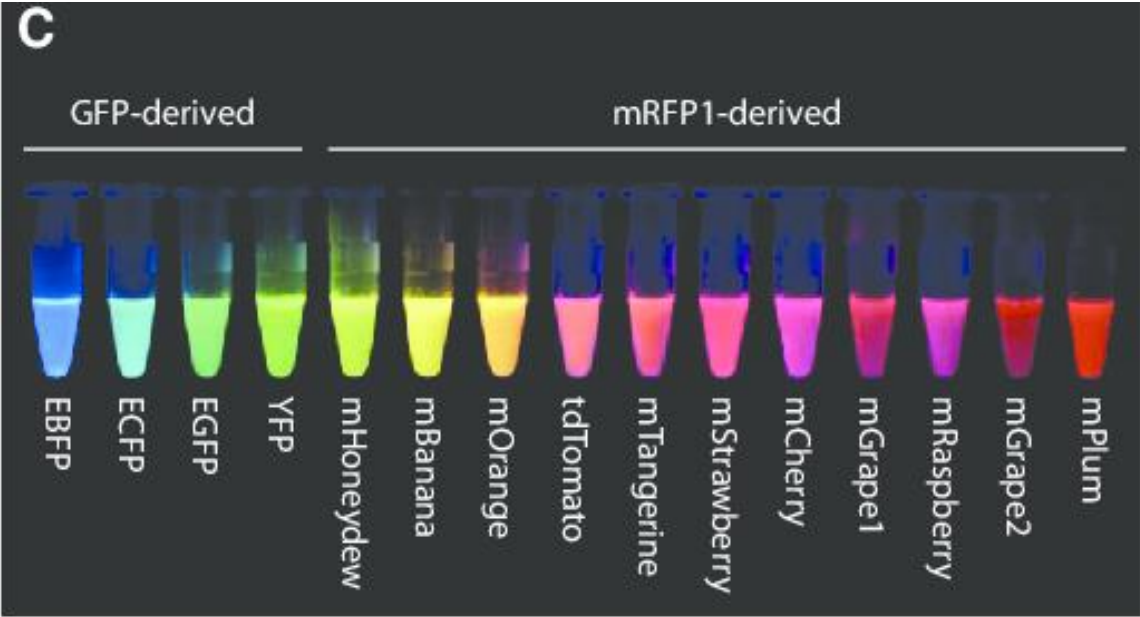
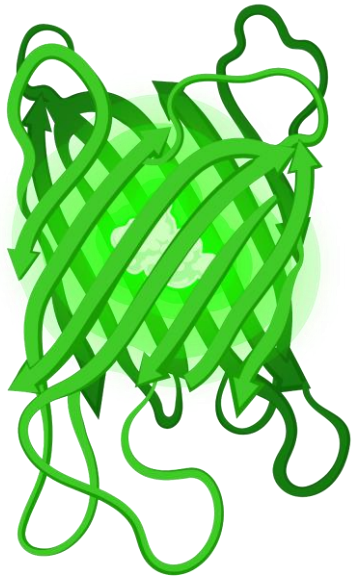
Qu'apporte l'information d'une co-localisation?

- Savoir dans quel compartiment est localisé une protéine : avec des marqueurs de compartiments (ex: anticorps contre une protéine résidente de tel compartiment)
- Savoir si 2 protéines sont susceptibles d'interagir (pas une preuve d'interaction!!)

gPAPP : Golgi-resident PAP 3'-phosphatase



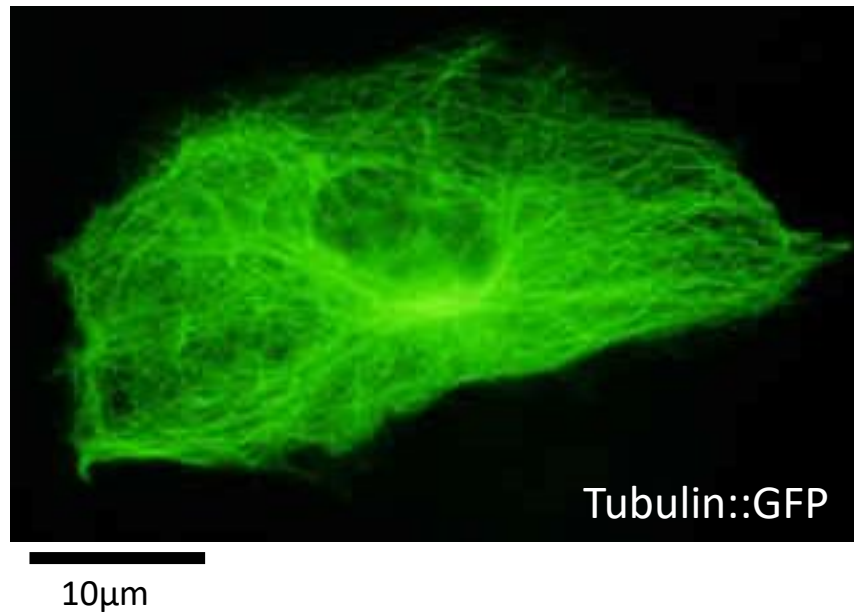
Détection de proteines fusionnées à une protéine fluorescente



Détection de protéines fusionnées à une protéine fluorescente

Transgénèse

cDNA de la protéine A fusionné au cDNA d'une protéine fluorescence (GFP)
-> visualisation *in vivo*:



Détection de protéines fusionnées à une protéine fluorescente

Transgénèse

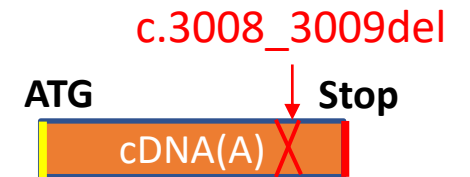
cDNA de la protéine étudiée « collé » au cDNA d'une protéine fluorescence (GFP)

-> protéine traduite avec protéine fluorescente -> « fusionnées »

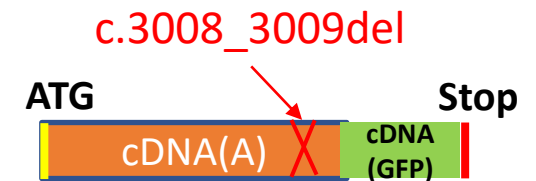
-> visualisation *in vivo* (vidéo-microscopie)



modifications du cDNA (mutations) -> modification du comportement de la protéine?



Combinaison des 2:



Exemple d'étude

Jacquier et al. *Acta Neuropathologica Communications* (2017) 5:55
DOI 10.1186/s40478-017-0457-1

Acta Neuropathologica
Communications

RESEARCH

Open Access



Cryptic amyloidogenic elements in mutant NEFH causing Charcot-Marie-Tooth 2 trigger aggresome formation and neuronal death

Arnaud Jacquier^{1,2†}, Cécile Delorme^{3†}, Edwige Belotti¹, Raoul Juntas-Morales⁴, Guilhem Solé⁵, Odile Dubourg⁶, Marianne Giroux⁷, Claude-Alain Maurage⁸, Valérie Castellani¹, Adriana Rebelo⁹, Alexander Abrams⁹, Stephan Züchner⁹, Tanya Stojkovic^{10*†}, Laurent Schaeffer^{1,11*†}  and Philippe Latour^{2†}

Maladie de Charcot-Marie-Tooth : dégénérescence des nerfs périphériques

Étude de 2 familles atteintes

Transmission : dominante

Mutations :

Gène : *NEFH* (neurofilament)

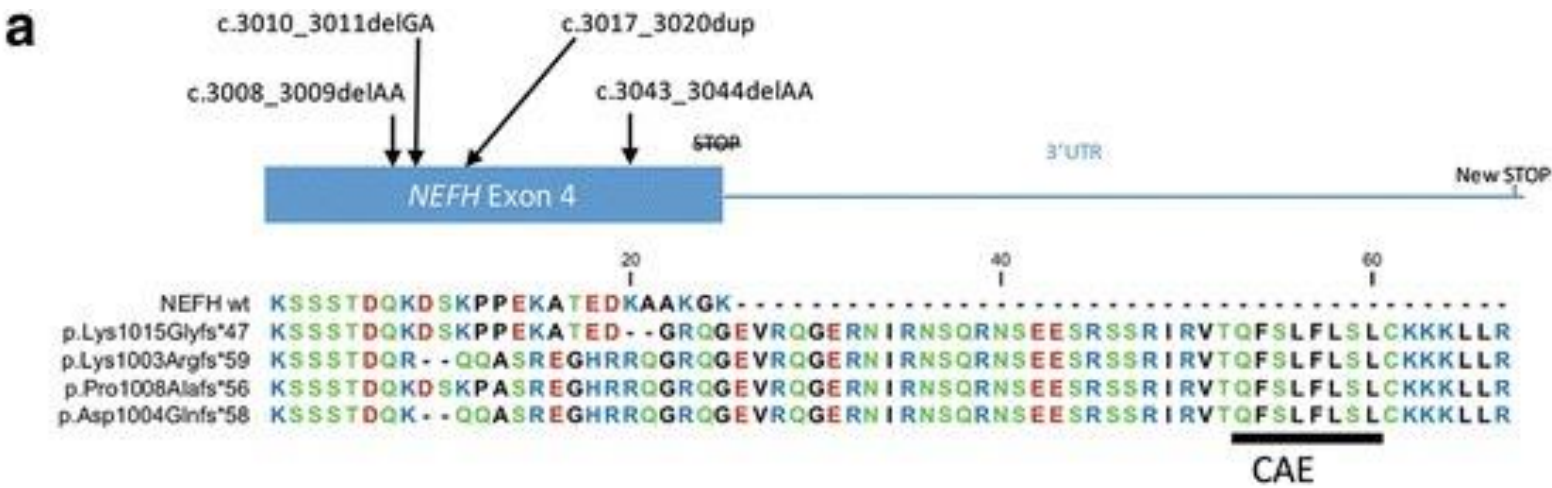
famille 1 : c.3008_3009del (p.Lys1003Argfs*59) ; famille 2 : c.3043_3044del (p.Lys1015Glyfs*47).

Conséquence ????

Mutation NEFH:

ARNm

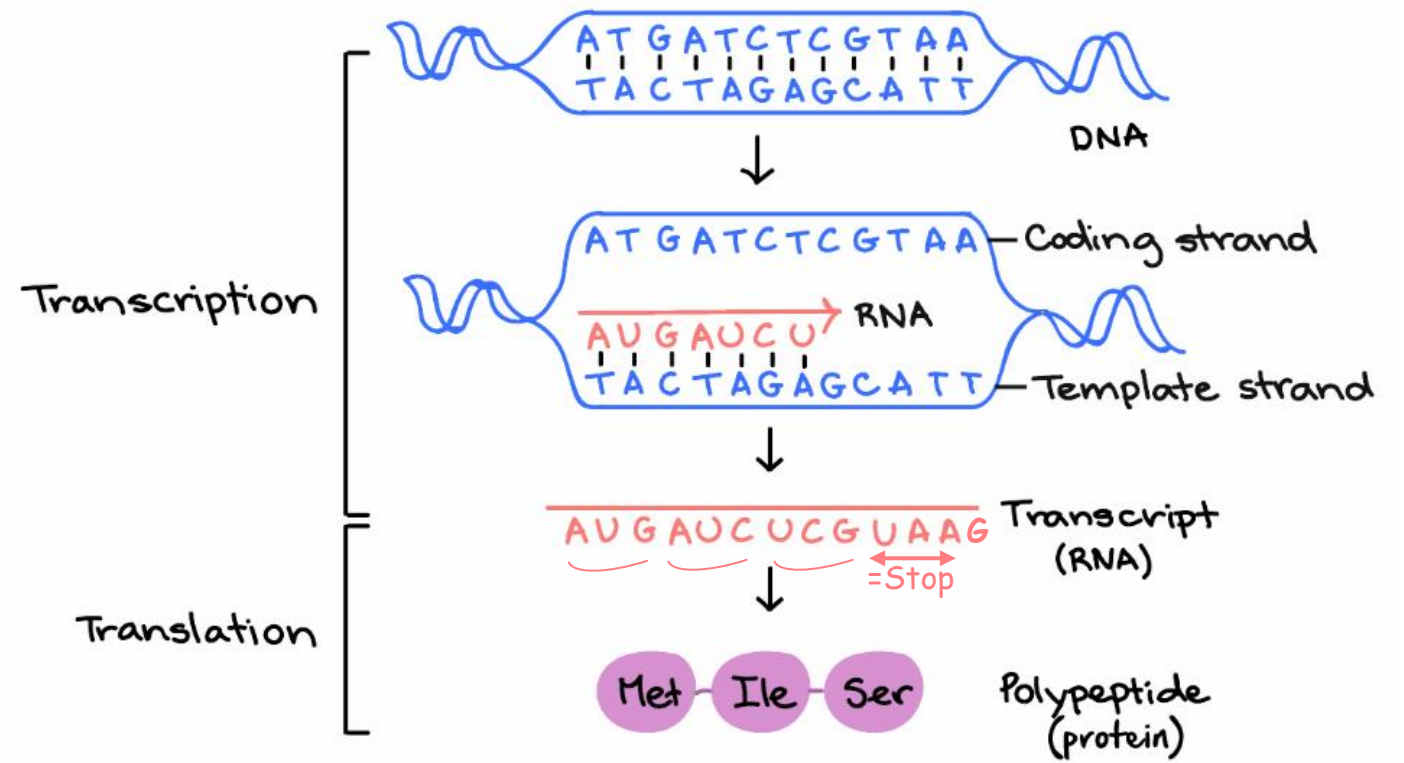
Protéine



- Perte d'1 nucléotide
- > decalage du **cadre de lecture** (frameshift (fs))
- > perte du Stop de traduction
- > ajout séquence peptidique

Codon == triplet de nucléotides
 -> 3 **cadres de lecture** possible par brin

		Second Letter					
		U	C	A	G		
First Letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U	C
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U	C
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U	C
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U	C
		G	A	C	G	Third Letter	

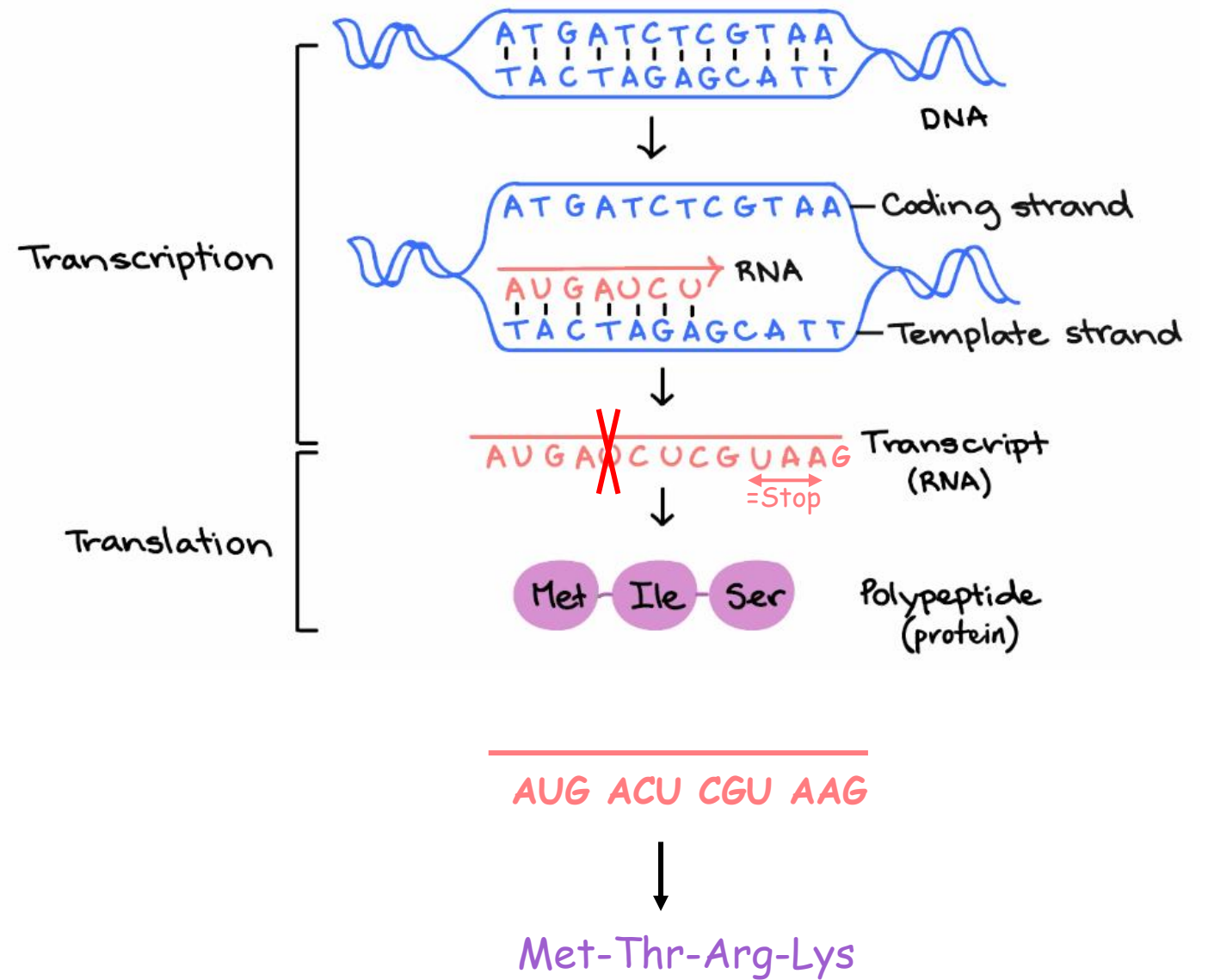


Importance de la position de départ du ribosome

Codon == triplet de nucléotides
 -> 3 **cadres de lecture** possible par brin

-> Délétions ou insertions d'un multiple autre que 2 changent le cadre de lecture, donc l'ensemble des ac.aminés codés après la mutation !

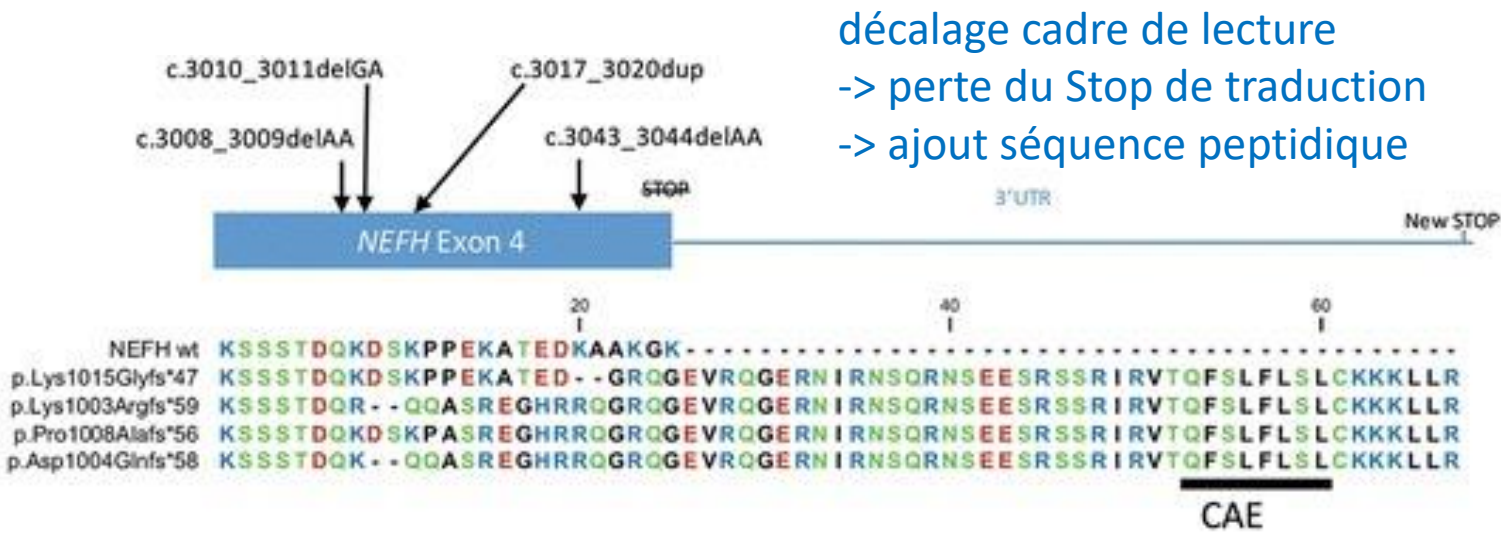
		Second Letter					
		U	C	A	G		
First Letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U	C
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U	C
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U	C
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U	C
		G	A	G	G	Third Letter	



Mutation NEFH:

ARNm

Protéine

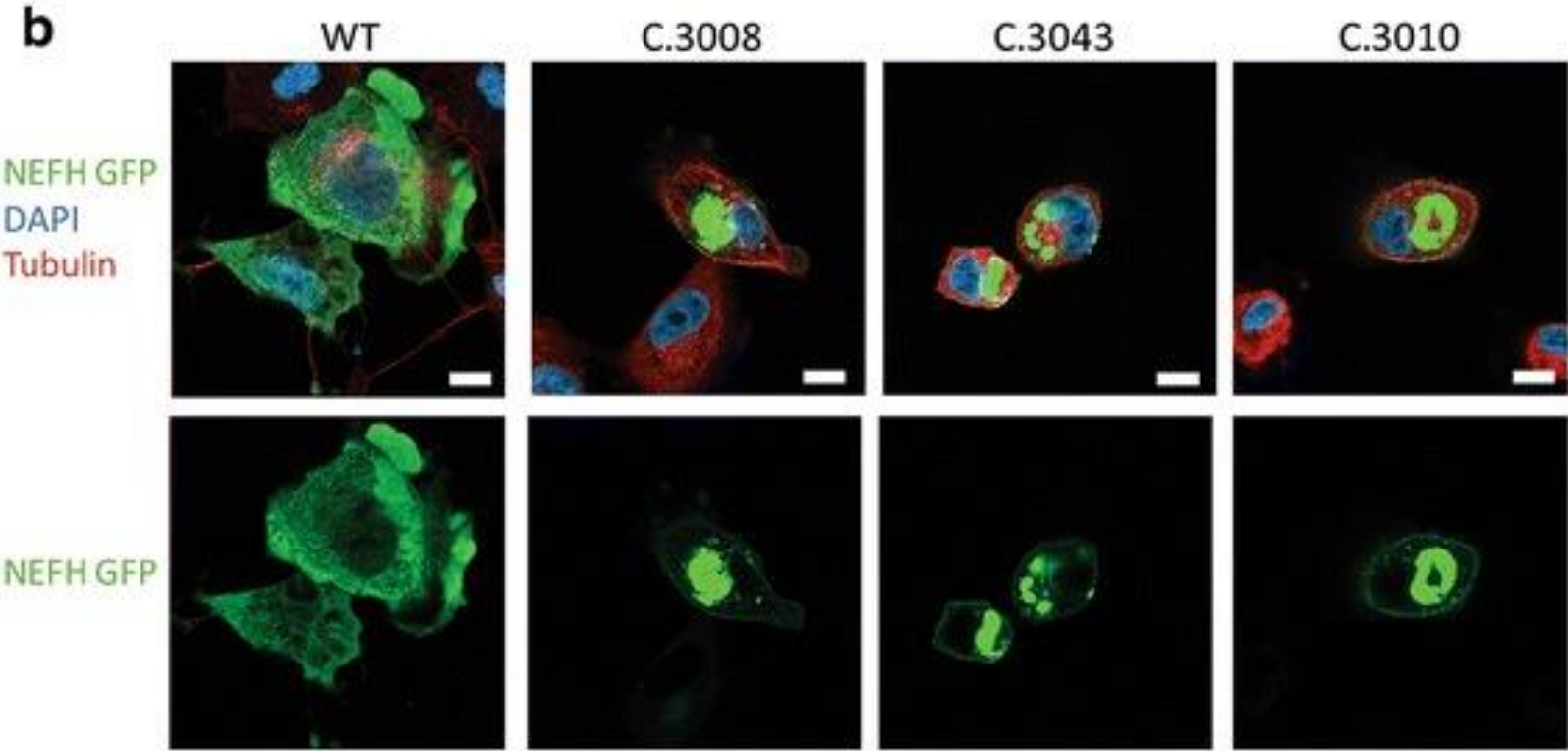


décalage cadre de lecture
-> perte du Stop de traduction
-> ajout séquence peptidique

Transgène de NEFH fusionné à la GFP, portant ou non la mutation, (sur-)exprimé dans des cellules HeLa en culture

→ Microscopie à fluorescence

→ Interpréter ces images :



Cellules HeLa: issues (depuis 1951!) de cellules de cancer du col de l'utérus

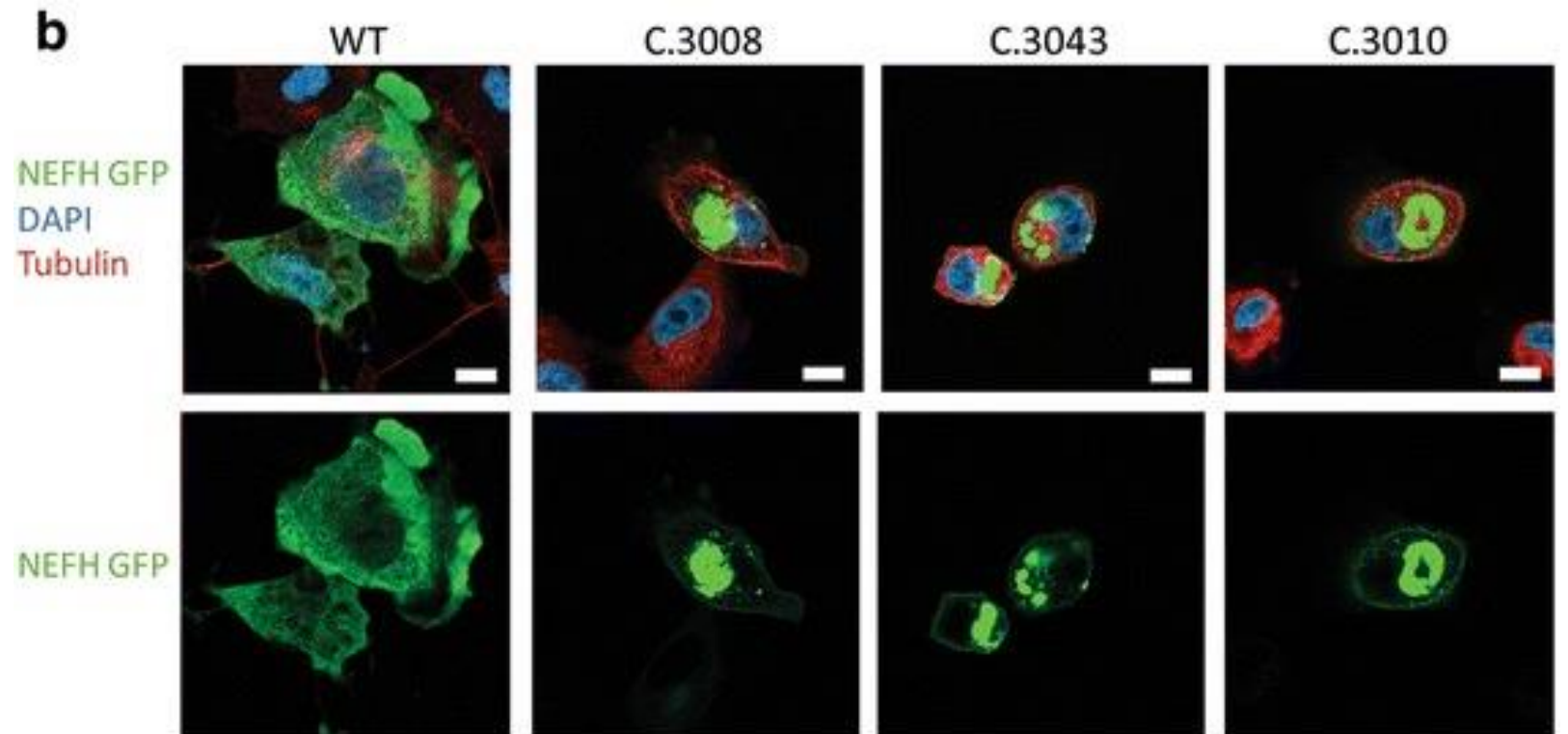
localisation de NEFH-GFP normale ?

Concordant avec vos connaissances ?

localisation de NEFH-GFP mutées ?

Hypothèse du mécanisme cellulaire?

Certitude sur la pathogénicité ?



Exemple 2

Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C.
ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import.
EMBO J. 2010

Maladie: sclérose latérale amyotrophique (dégénérescence neurones moteurs)

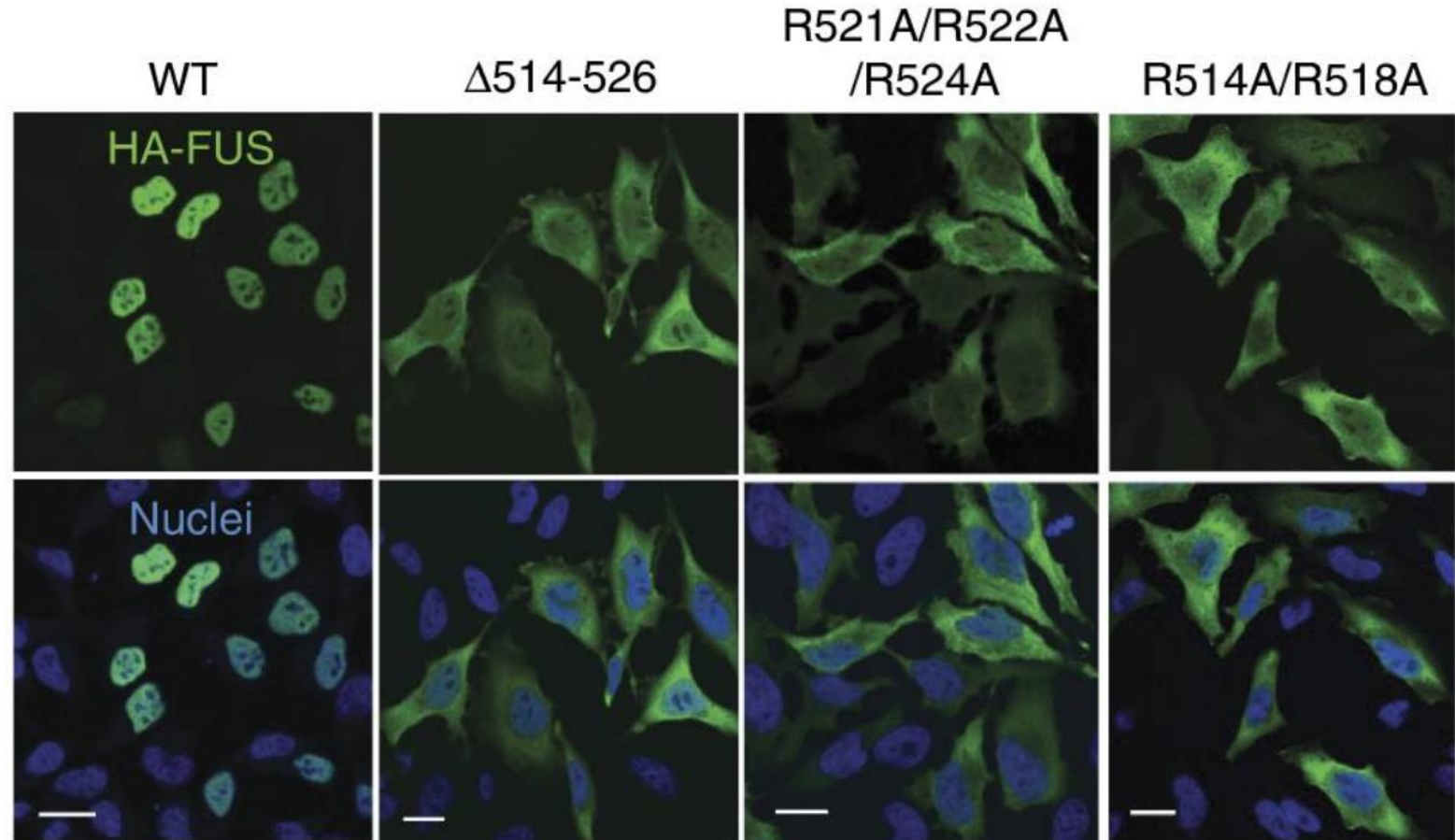
Forme familiale -> mutations dans plusieurs gènes, dont le gène *FUS*

Mutations toutes concentrées dans la région des ac.aminés 514 à 526 de la protéine

Transgène FUS, portant ou non les mutations, ou une délétion de la région 514-526, fusionné au peptide HA, (sur-)exprimé dans cellules HeLa en culture

→ Microscopie à fluorescence

→ Interpréter ces images :



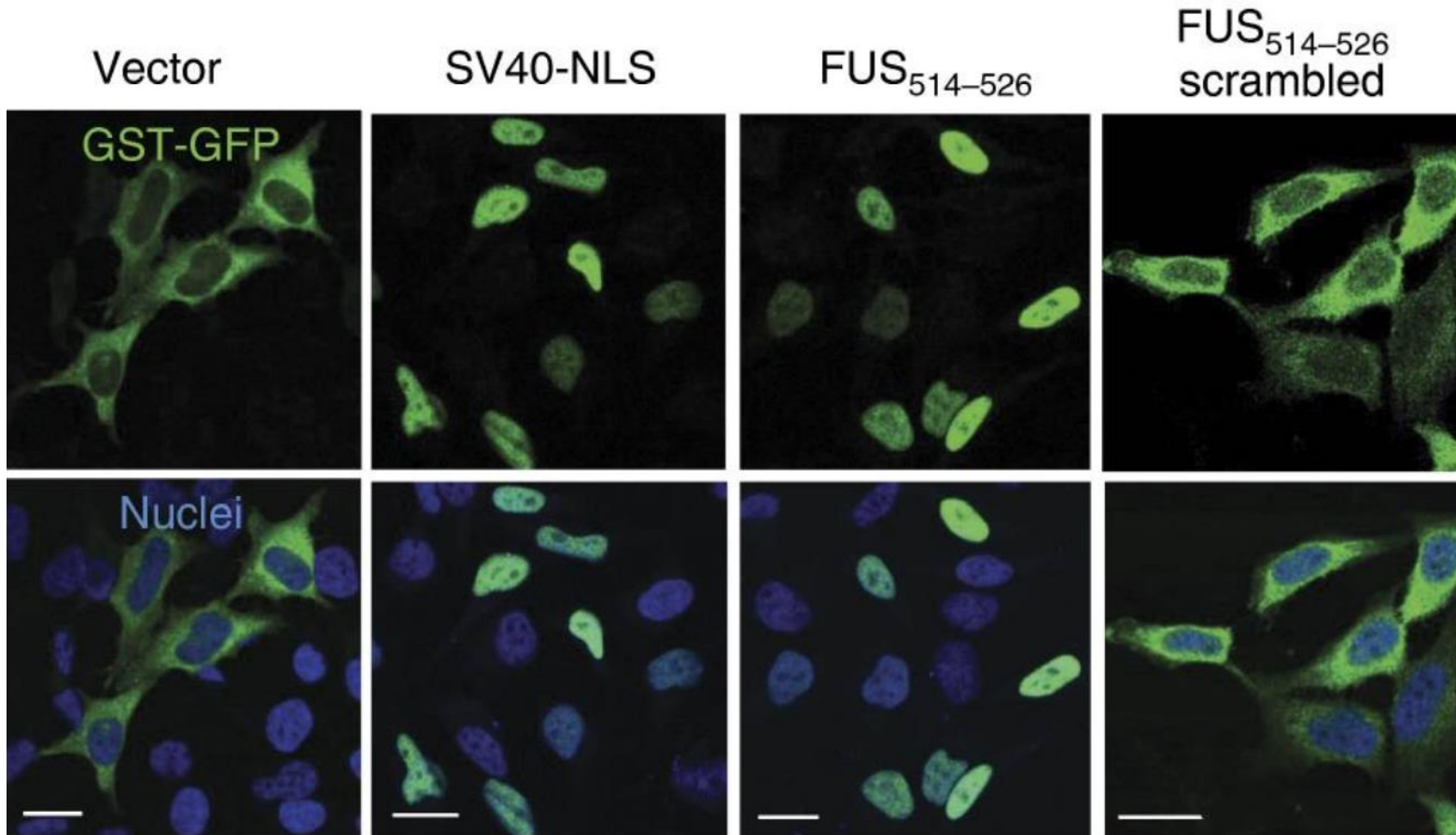
Exemple 2

Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C.
ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import.
EMBO J. 2010

Transgène GFP, fusionné à 1 NLS connu (SV40),
ou à la partie 514-526 de FUS, ou à cette même
région mais dont l'ordre des ac. aminés a été
mélangé,
(sur-)exprimé dans cellules HeLa en culture

→ Microscopie à fluorescence

→ Interpréter ces images :

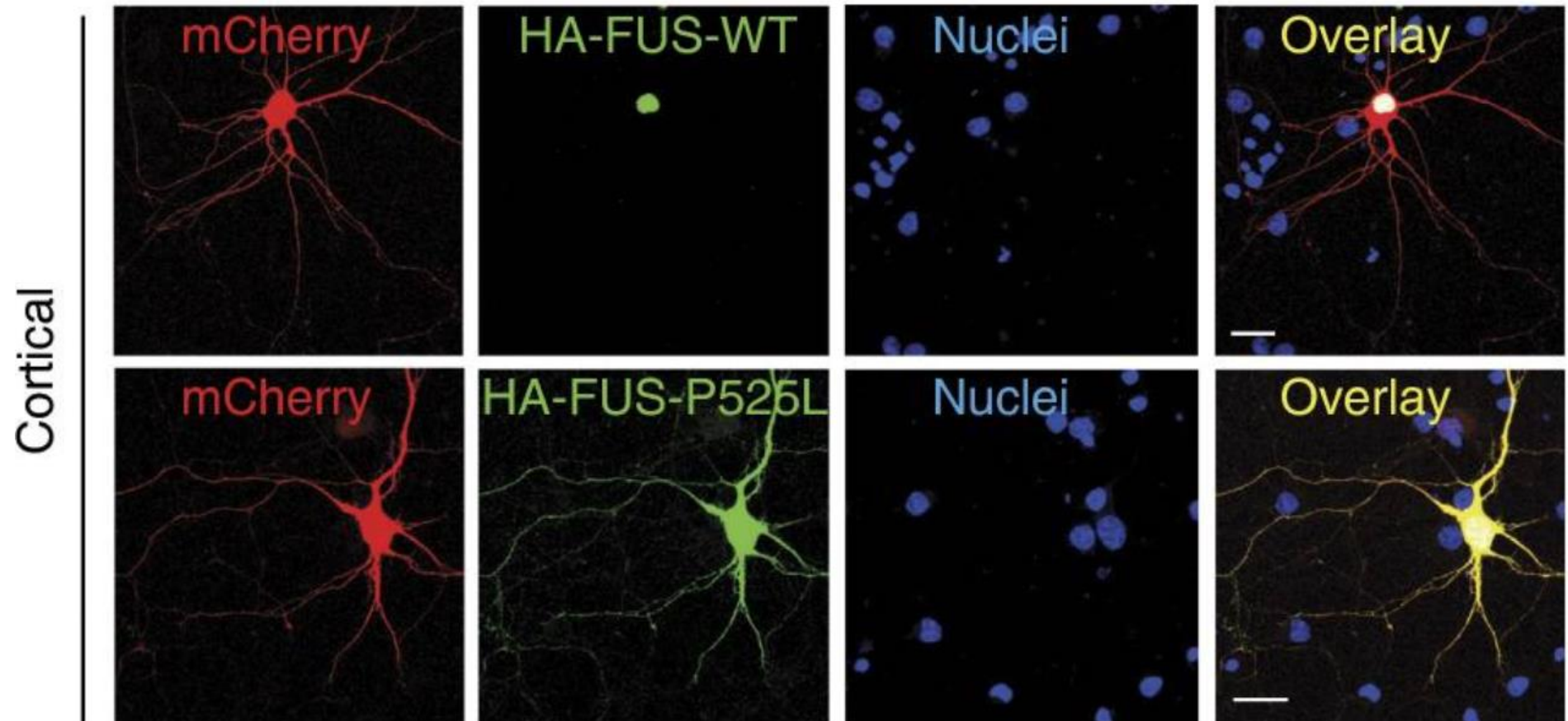


Exemple 2

Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C.
ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import.
EMBO J. 2010

Expression du transgène dans des neurones corticaux de rats en culture

Co-transfecté avec transgène mCherry (autre protéine fluorescence, émettant dans le rouge)



Si ARN et protéine en quantité normale et Localisation ~normale

- Est-ce que mutation affecte le phénotype cellulaire ?

Ex: neurones :

morphologiquement: prolongements (axones/dendrites)

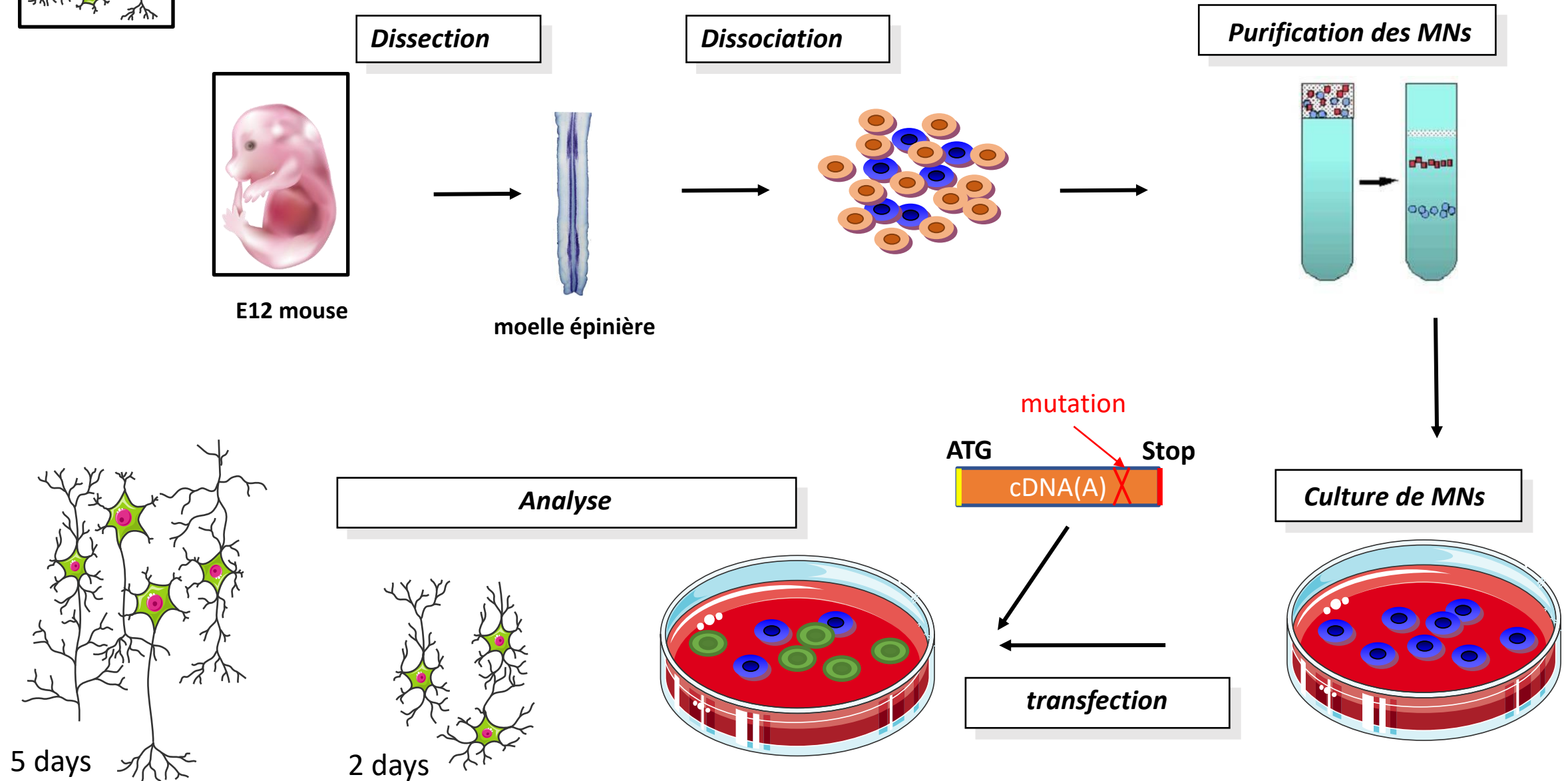
fonctionnellement: conduction nerveuse

- Est-ce que la mutation affecte le phénotype de l'organisme ?

Ex: souris :

locomotion, comportement, épilepsie, ...

Culture de motoneurone (MN) primaire et transfection (pas de lignée cellulaire disponible)



→ Morphologie des cellules

transgène normal



transgène mutant

