

Réponse à l'appel à projets Crédits Incitatifs PHASE 2016

UNITE Projet N° :

TITRE : TRADUCTOPHENO, prédire le phénotype cellulaire à la lumière du traductome

CT	Chercheurs impliqués (% du temps)	Unité	Classement DU
Unité Porteur	Romain Yvinec (25 %), Pascale Crépieux (20%), Valérie Labas (10 %), Anne Poupon (10%), Eric Reiter (5 %) Master 2 biostatistiques à recruter (100 %)	PRC	
Unité 1			
Unité 2			

1) Contexte et objectifs

La cellule est un système adaptatif très complexe, et la prédiction du phénotype qu'elle exprime est un véritable défi scientifique. Pour prédire ce phénotype, il est nécessaire de combiner plusieurs approches systémiques, notamment pour confronter le transcriptome à l'efficacité de traduction des ARNm et finalement au niveau de protéines réellement produites. Toutefois, les approches expérimentales à haut-débit (RNA-Seq, nanoLC-HRMS/MS, etc) se heurtent à des questions d'analyse statistique inédites, si l'on veut déterminer des différentiels dans une condition stimulée par rapport à une condition contrôle. Bien que des méthodes d'analyse différentielle de transcriptome à partir de données RNA-Seq existent déjà, elles sont encore perfectibles, et aucune méthode à ce jour ne fait complètement consensus au sein de la communauté. La difficulté réside dans le faible nombre de répétitions, le très grand nombre de tests statistiques effectués en parallèle (un par gène), la possible interdépendance entre les gènes et les différentes normalisations due aux cycles d'amplifications et d'échantillonnage. Ce problème méthodologique est encore plus criant pour l'analyse des données de traductome car il a encore été peu abordé. Enfin, la mise en regard de plusieurs jeux de données de nature différente pose également des questions statistiques et méthodologiques encore non résolues.

Le traductome (quantification individuelle des ARNm recrutés aux ribosomes) induit par l'hormone folliculo-stimulante (FSH) dans son tissu-cible, la cellule de Sertoli de rat mâle, est en cours d'analyse dans notre équipe. Le transcriptome correspondant a été publié par d'autres, et le protéome n'est pas connu. Notre objectif est donc de confronter les résultats de traductome au protéome réel de la cellule de Sertoli sous l'influence de la FSH.

2) Protocole

- Des cellules de Sertoli de rat en culture primaire seront stimulées *in vitro* par 3,3 nM FSH pendant 1,5 h (conditions du traductome déjà obtenu) et 4 h (accumulation des protéines néosynthétisées).
- Les lysats cellulaires correspondants seront séparés sur gel SDS-PAGE, 20-30 bandes par échantillons seront découpées. Puis la plate-forme PAIB de la PRC prendra en charge les analyses protéomiques qualitatives et quantitatives : la digestion tryptique in-gel des protéines, les analyses nanoLC-HRMS/MS (nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution en tandem), l'identification des protéines grâce au logiciel Mascot, la validation et la quantification des protéines (comparaison : condition contrôle vs 1,5h ou 4h de stimulation) par le logiciel Scaffold Q+.
- Des coefficients de corrélation entre le traductome et le protéome, par gène, et un indice de corrélation globale au niveau de la cellule, seront calculés. De manière plus précise, nous identifierons des groupes de protéines qui partagent un même comportement (corrélation positive, anti-corrélation, etc...)
- Les deux jeux de données traductome et protéome seront également comparés par reconstruction de réseau à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis. A nouveau, des indices de similitude des réseaux seront calculés pour quantifier cette corrélation.
- Enfin, les jeux de données seront unifiés pour identifier de manière robuste le réseau induit dans les cellules de Sertoli suite à la stimulation par FSH.

Tous les dispositifs expérimentaux et informatiques utiles au projet sont opérationnels à la PRC.

3) Caractère innovant du projet (5 lignes maximum)

La comparaison du transcriptome et du protéome met en évidence des distorsions entre gènes transcrits et protéines produites. Le traductome, quant à lui, devrait refléter beaucoup plus fidèlement le protéome réel, mais la dynamique présidant à ces deux niveaux de régulation reste à être explorée (mécanismes de pause au niveau des ribosomes, stabilité variable des protéines, etc). Cette mise en regard nécessite le développement de méthodes statistiques adaptées. L'identification de différents groupes de gènes, selon leur niveau de corrélation (ou anti-corrélation) permettra de proposer différents mécanismes de régulation (transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel) induit par la stimulation par FSH.

Si le traductome reflète fidèlement le protéome, les réseaux obtenus à partir de ces deux jeux de données devraient être similaires et permettra une validation croisée du réseau activé suite à la stimulation par FSH.

4) Adéquation au schéma stratégique du département (2-3 lignes maximum)

Ce projet s'inscrit dans l'axe thématique *Adaptation des animaux*, dans le domaine de la biologie prédictive. Il concerne la caractérisation des mécanismes adaptatifs fonctionnels mis en œuvre dans le contexte de l'effet d'une hormone importante pour le contrôle de la reproduction animale.

5) Caractère stratégique du projet pour préparer une soumission à l'ANR, à l'Europe ou un méta-programme INRA ou pour débiter une collaboration internationale ou nationale (3-5 lignes maximum)

L'action physiologique d'hormones telles que FSH et LH pourrait permettre de comprendre comment est décodé un signal qui varie en fréquence et/ ou en amplitude, au niveau d'un système cellulaire, dans chacune des trois composantes (protéome, le transcriptome et le traductome). Nous soumettrons une demande à l'ANR proposant de déterminer ces trois composantes du phénotype cellulaire dans une même expérience, en cellule de Sertoli de rat primaire, ce qui n'a jamais été réalisé jusqu'alors. Ce projet ANR nécessitera d'une part la mise en œuvre de nouvelles approches de microfluidique et d'imagerie cellulaire, et d'autre part le développement méthodologique d'analyses statistiques multivariées (plusieurs stimulation et plusieurs variables dépendantes mesurées) adaptées aux données haut-débit. Il débouchera sur la reconstruction d'un réseau le plus complet possible induit par la stimulation de l'hormone ainsi que sa dynamique.

6) Calendrier (détailler pour 2016 si projet pluriannuel)

- M1 : Stimulation des cellules de Sertoli, contrôles-qualité, migration sur gel SDS-PAGE
- M2 : Digestion tryptique et analyses nanoLC-HRMS/MS, identification et validation des protéines, quantification utilisant 2 méthodes quantitatives indépendantes (Spectral counting et XIC : eXtraction Ion Chromatogram) et analyse statistique (T-test).
- M3 -M6:Analyse statistique d'expression différentielle du protéome.
- M6- M12 : Corrélation traductome/ protéome et analyses bioinformatiques (analyse de corrélation, reconstruction de réseaux, etc)

7) Pour les projets sur 2 ans déjà engagés: Résumé des résultats déjà obtenus et justification de la demande pour la 2^{ème} année

BUDGET	Unité du porteur	Unité 2	Unité 3	Total projet	Aide demandée PHASE
Frais expérimentaux (culture cellulaire, validations expérimentales, méthodes de séparation, etc)	5 k€			5 k€	2 k€
Frais d'analyses (préciser)	10 k€ (spectrométrie de masse PAIB)			10 k€	10 k€
Déplacements					
Autres (à détailler)	3k€ (6 mois stage M2)			3k€	0 k€
Total	18 k€			18 k€	12 k€

En cas de projets d'une durée de 2 ans, indiquez le coût total du projet :
 et l'aide obtenue en 2015.....et l'aide demandée pour 2016.....
 ou l'aide demandée pour 2016 et celle qui serait demandée en 2017:.....

ANNEXE

Si le porteur de projet a bénéficié de crédits incitatifs du département PHASE au cours de l'une des 4 années précédentes

Titre du projet précédent :

Année :