

Etudes sur la différenciation et la prolifération cellulaire

J.-F. Collard, M. Hinsenkamp

Belgian
BioElectroMagnetics Group



Laboratoire de Recherche en
Orthopédie-Traumatologie
Université Libre de Bruxelles
Hôpital Erasme



Questions

- Quels sont les récepteurs et les mécanismes sur lesquels agit la stimulation électrique?
- Quels sont les processus biologiques activés par ces récepteurs (prolifération, différenciation, physiologique ou pathologique)?
- Quelles sont les caractéristiques de la stimulation déclenchant une réaction cellulaire?

Revue de la littérature

Que dit la littérature à ce sujet?

- Manque de connaissance des mécanismes cellulaires activés après la stimulation ELF
- Importance de leurs identifications pour l'ensemble des études liées à l'exposition ELF
- Efficacité des techniques omiques pour la recherche des mécanismes cellulaires (bénéfice des larges screening)

Revue de la littérature

Que dit la littérature à ce sujet?

- Importance dans le choix du modèle expérimental pour l'extrapolation des résultats à l'homme
- Le seul effet pathologique qui reste controversé par certaines études épidémiologiques concerne la leucémie infantile

Développements actuels de l'étude

Objectifs

- Mettre en évidence les processus biologiques actifs dans la réponse cellulaire observée après la stimulation ELF
- Isoler une liste de gènes "marqueurs" spécifiquement impliqués dans ces mécanismes

Développements actuels de l'étude

Objectifs

- Tester l'hypothèse que la stimulation ELF accélère dans le temps l'apparition de phénomènes qui seraient apparus naturellement mais avec une latence plus longue
- Vérifier la cohérence des nouveaux résultats avec les résultats des études historiques

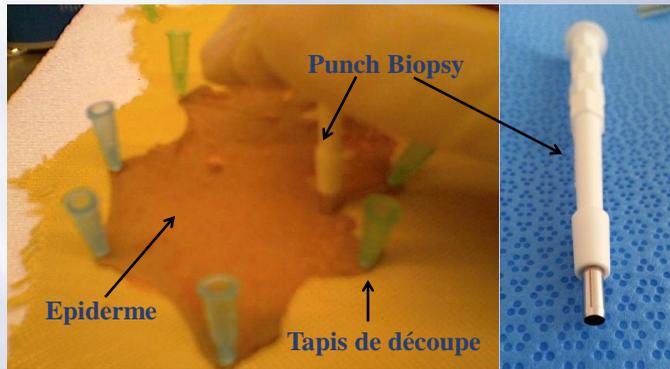
Modèle expérimental



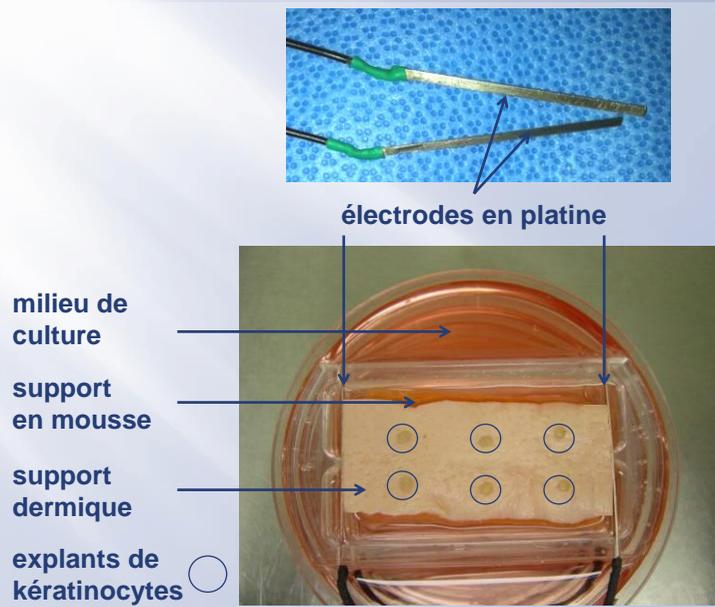
Modèle expérimental



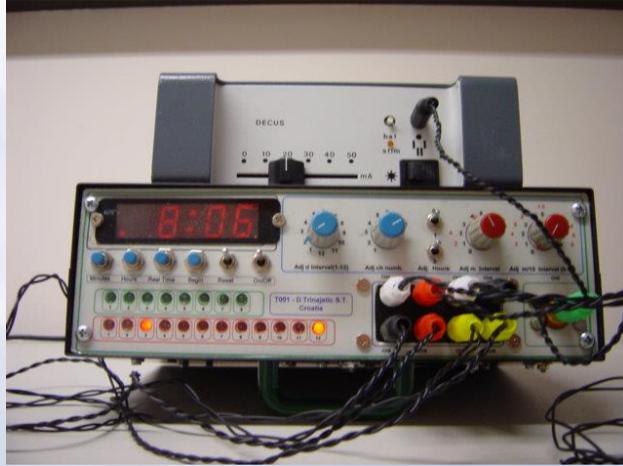
Modèle expérimental



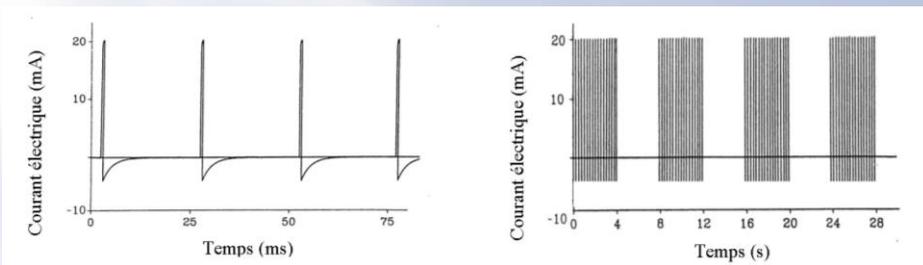
Modèle expérimental



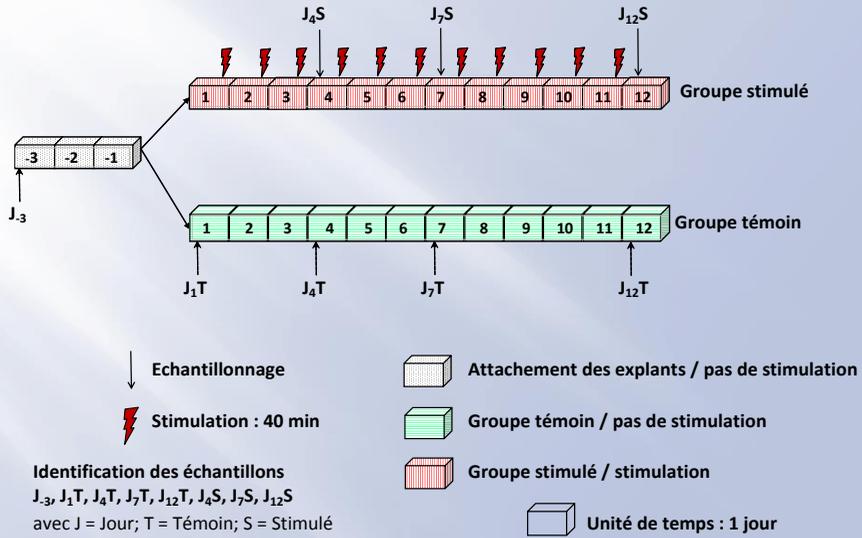
Modèle expérimental



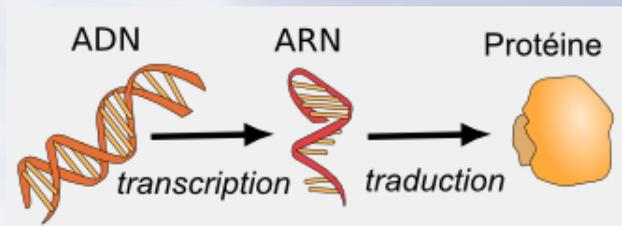
Modèle expérimental



Méthode expérimentale : échantillonnage



Méthode expérimentale : Microarray



Résultats : Analyse manuelle des résultats microarrays

Premières observations

- Modification de l'expression d'un certain nombre de gènes

J_x	J_x Témoin/ J_1		J_x Stimulé/ J_1	
	Sur-exprimé	Sous-exprimé	Sur-exprimé	Sous-exprimé
J_4	93	203	315	626
J_7	389	313	228	397
J_{12}	397	609	441	505

Stimulé/Témoin	J_4	J_7	J_{12}
Sur-exprimé	39	30	237
Sous-exprimé	265	190	259

Résultats : Analyse manuelle des résultats microarrays

L'analyse des résultats au cours du temps (J_x vs J_1)

- La stimulation augmente ou diminue la régulation de certains gènes par rapport à J_1 (témoin)

mais

dans la majorité des cas, la variation n'inverse pas le sens de la régulation naturelle

- Seuls 3 gènes (EPS8, ADAMTS1, NOS1) ne suivent pas cette règle : ils sont sur-exprimés à J_4 S et sous-exprimés à J_{12} T

Résultats : Analyse manuelle des résultats microarrays

Premières observations

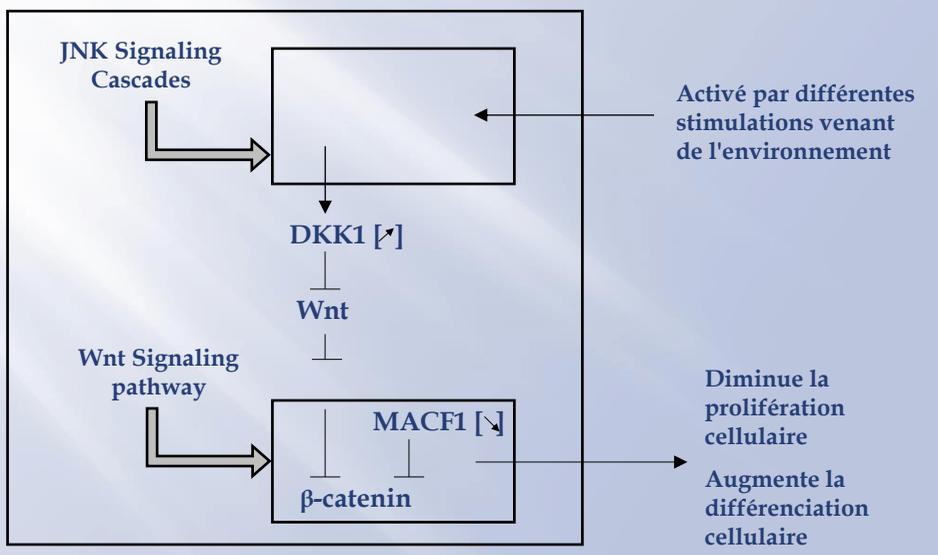
- Liste des gènes dont l'expression est modifiée pour l'ensemble des temps d'échantillonnage

Stimulé/Témoin	J ₄	J ₇	J ₁₂
Sur-exprimé	39	30	237
Sous-exprimé	265	190	259

- Activating transcription factor 3 (ATF3) :	FC	J ₄ 2.49	J ₇ 13.41	J ₁₂ 9.28
	p	0.03	0.05	0.03
- Membrane metallo-endopeptidase (MME) :	FC	3.02	5.53	20.28
	p	0.005	0.005	0.04
- Thioredoxin reductase 1 (TXNRD1) :	FC	2.02	3.22	2.34
	p	0.05	0.05	0.02

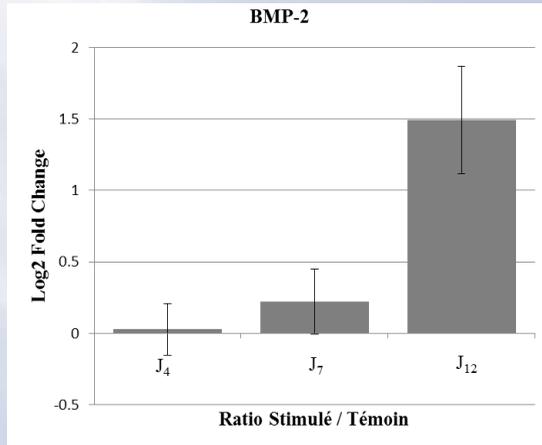
Résultats : Analyse manuelle des résultats microarrays

Premières observations : Expression de DKK1 et MACF1

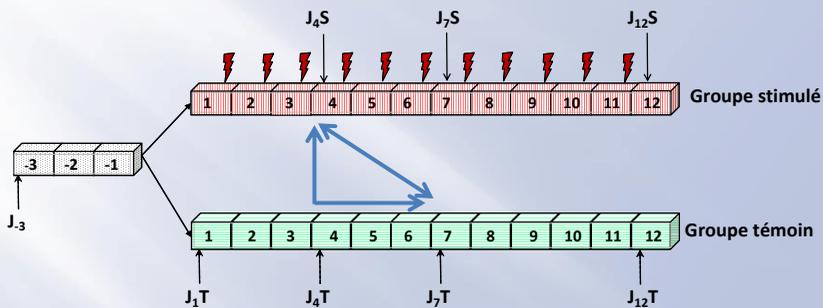


Résultats : Analyse manuelle des résultats microarrays

Premières observations : Expression de BMP-2

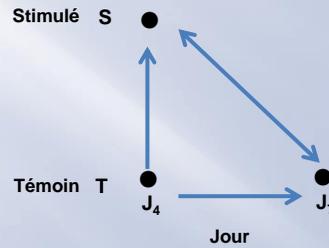


Résultats : analyse par triangulation



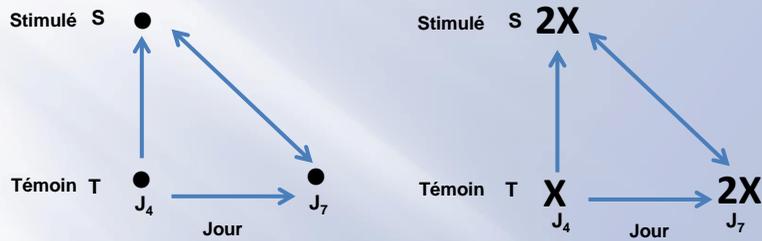
L'échantillonnage au cours du temps permet la comparaison des effets de la stimulation à un temps donné avec l'évolution naturelle du groupe témoin

Résultats : analyse par triangulation



La stimulation ELF a-t-elle le même effet sur la cellule que l'évolution naturelle de la culture dans le temps?

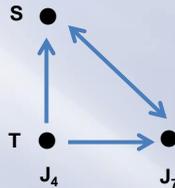
Résultats : analyse par triangulation



La stimulation ELF a-t-elle le même effet sur la cellule que l'évolution naturelle de la culture dans le temps?

Résultats : analyse par triangulation

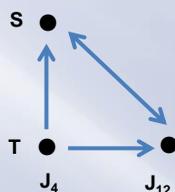
- Triangle $J_4S-J_4C-J_7C$



- 319 sondes rencontrent les 3 conditions de p-value du triangle $J_4S-J_4C-J_7C$
- Dans cette liste, 271 sondes sont sous-exprimées par la stimulation et 48 sont sur-exprimées
- La liste se réduit à 33 si nous appliquons un $FC = 2$ ($\log_2FC = 1$)

Résultats : analyse par triangulation

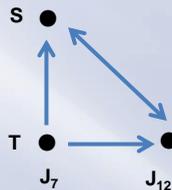
- Triangle $J_4S-J_4C-J_{12}C$



- 183 sondes rencontrent les 3 conditions de p-value du triangle $J_4S-J_4C-J_{12}C$
- Dans cette liste, 159 sondes sont sous-exprimées par la stimulation et 24 sont sur-exprimées
- La liste se réduit à 25 si nous appliquons un $FC = 2$ ($\log_2FC = 1$)

Résultats : analyse par triangulation

- Triangle $J_7S-J_7C-J_{12}C$



- 329 sondes rencontrent les 3 conditions de p-value du triangle $J_7S-J_7C-J_{12}C$
- Dans cette liste, 301 sondes sont sous-exprimées par la stimulation et 28 sont sur-exprimées
- La liste se réduit à 65 si nous appliquons un $FC = 2$ ($\log_2FC = 1$)

Résultats : analyse par triangulation

Premières observations

- CHEK1, DKK1, NDRG4, SPRR3
 - Connus pour jouer un rôle dans la prolifération et la différenciation
- UBE2D3
 - Actif dans la voie de signalisation de la BMP
- Différents autres gènes
 - Actifs dans la mitose, le développement cellulaire et la réplication de l'ADN

Résultats : analyse bio-informatique

GeneOntology module du site internet WebGestalt

- Graphe orienté acyclique
 - Mise en évidence des processus biologiques actifs de manière plus fréquente que ce qui est attendu par le hasard
 - Régulation positive (ou négative) des processus biologiques
 - Prolifération cellulaire
 - Régulation de la mort cellulaire
 - Régulation des processus métaboliques de l'ADN
 - Réponse au stress

Résultats : analyse bio-informatique

KEGG module du site internet WebGestalt

- Recherche les voies de signalisation qui utilisent un nombre significatif de gènes présents dans nos résultats microarrays
 - "Cycle cellulaire"
utilise 16 gènes des résultats
 - "Voie de signalisation de p53"
utilise 11 gènes des résultats

Résultats : analyse bio-informatique

Site internet KEGG

- Recherche des voies connexes aux processus "cycle cellulaire" et "voie de signalisation de p53" incluant des gènes présents dans nos résultats

Résultats : analyse bio-informatique

Site internet KEGG

KEGG Nom de la voie de signalisation	Nombre de gènes de la "Liste A" inclus dans la voie	KEGG Nom de la voie de signalisation	Nombre de gènes de la "Liste A" inclus dans la voie
Cell cycle	16	Tight junction	6
FoxO signaling pathway	13	Complement and coagulation cascades	5
MAPK signaling pathway	12	Adherens junction	4
Cytokine-cytokine receptor interaction	12	B Cell receptor signaling pathway	4
p53 signaling pathway	11	ErbB signaling pathway	4
PI3K/Akt signaling pathway	11	T-cell receptor signaling pathway	4
Regulation of Actin cytoskeleton	11	ECM-Receptor Interaction	3
Focal adhesion	9	mTOR signaling pathway	3
Wnt signaling pathway	9	NF-Kappa B signaling Pathway	3
Apoptosis	7	Phosphatidylinositol signaling system	3
Calcium signaling pathway	6	TGF- β signaling pathway	3
Jak-STAT signaling pathway	6		

Résultats : analyse bio-informatique

Site internet KEGG

Nom de la voie de signalisation	Symbole du gène	Nom de la voie de signalisation	Symbole du gène
Regulation of actin cytoskeleton	ARHGEF7	FoxO	PRMT1
	SSH1		PLK4
	ENAH	MAPK	DUSP4
	IQGAP3		MAP4K4
Wnt signaling pathway	DKK1	Adherens junction	SSX2IP
	TBL1XR1	Calcium signaling pathway	TMEM142B
	DAAM1	ECM-Receptor Interaction	HMMR
	SFRP1	ErbB signaling pathway	NRG1
Complement and coagulation cascades	F12	Focal adhesion	PARVA
	KNG1	Jak-STAT signaling pathway	SPRY4
	THBD	TGF-beta signaling pathway	FST
Cell Cycle	CDC6	Tight junction	EPB41L3
	TTK		

Résultats : analyse bio-informatique

Pathway Studio

- Recherche des processus cellulaires qui utilisent :
 - le plus grand nombre de gènes des résultats
 - les gènes dont l'expression a été la plus modifiée
 - les gènes interagissant entre eux
 - la fonction des gènes isolés par la méthode de la triangulation

Résultats : analyse bio-informatique

Pathway Studio

- Recherche la localisation dans la cellule des protéines liées aux gènes dont l'expression a été modifiée
- Recherche des protéines impliquées dans le plus grand nombre d'interactions

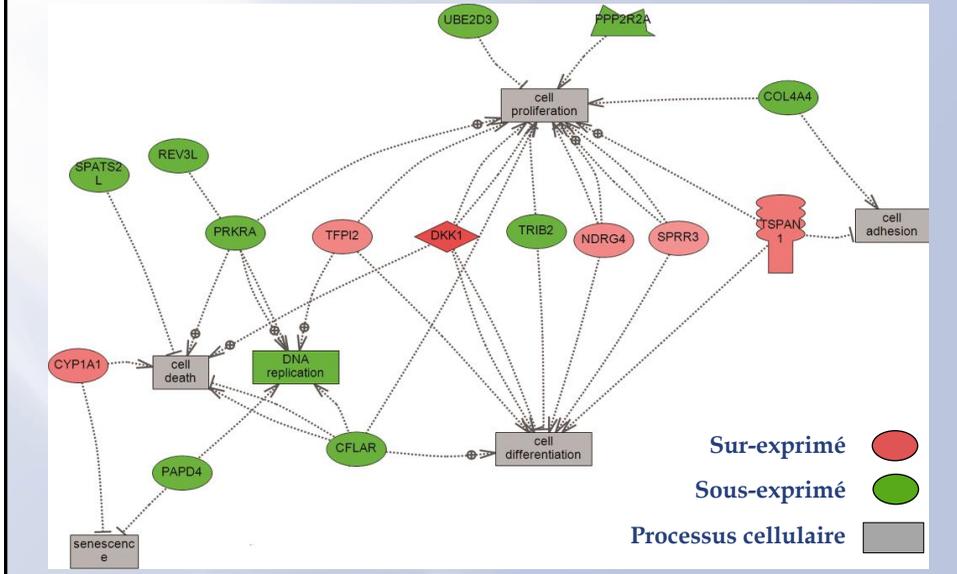
Résultats : analyse bio-informatique

Pathway Studio

- Confirme les processus cellulaires les plus significatifs obtenus avec le module GO sur le site WebGestalt.
- Résultats cohérents avec nos précédentes observations sur :
 - la diminution de la prolifération
 - l'activation de la différenciation
 - la croissance cellulaire
 - la cicatrisation des plaies
 - ...

Résultats : analyse bio-informatique

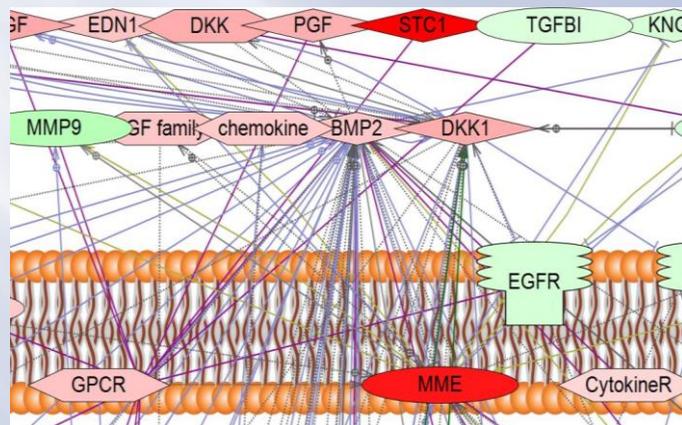
Pathway Studio : analyse par triangulation



Résultats : analyse bio-informatique

Pathway Studio

- Localisation et interaction des protéines



Discussion

Gènes mis en évidence par analyse manuelle

ADAMTS1
 ATF3
 BMP-2
 DKK1

 MACF1
 MME

 TXNRD1

Gènes mis en évidence par analyse bio-informatique

ADAMTS1
 ATF3
 BMP-2
 DKK1
 DUSP4
 MACF1
 MME
 PDGFRA
 SFRP1
 TXNRD1
 WNT
 ...

Discussion

Principaux mécanismes cellulaires mis en évidence

- Apoptosis
- Cell Cycle
- FoxO
- Jak/STAT
- MAPK
- mTOR
- p53
- PI3K/Akt
- Regulation of actin cytoskeleton
- SAPK/JNK
- TGF- β
- Wnt
- ...

Discussion

Principaux processus cellulaires mis en évidence

- adhésion cellulaire
- apoptose
- cycle cellulaire
- croissance cellulaire
- différenciation cellulaire
- migration cellulaire
- mort cellulaire
- prolifération cellulaire
- vascularisation
- ...

Conclusions

Par rapport aux objectifs annoncés, nous avons

- Montré la cohérence entre la modification de l'expression des gènes et les résultats des études historiques
- Isolé et proposé différents processus cellulaires pouvant être à l'origine des observations macroscopiques

Conclusions

Par rapport aux objectifs annoncés, nous avons

- Isolé différents gènes qui sont de bons "candidats marqueurs" des processus cellulaires activés par une exposition ELF
- Montré que la stimulation accélère la sur- ou la sous-régulation de certains gènes qui, dans des circonstances normales (groupe témoin non stimulé) auraient suivi la même tendance (sur- ou sous-régulation) mais de manière plus lente

Conclusions

Nouvelles perspectives de recherche

- Comparer et grouper les résultats de la littérature montrant des effets similaires, même si la stimulation ou le modèle de culture sont différents
- Développer les techniques de microdosimétrie électrique afin de connaître avec précision la stimulation reçue par la cellule
- Améliorer l'étude des signaux afin de découvrir la composante active qui déclenche la réaction de la cellule

Conclusions

Nouvelles perspectives de recherche

- Suite aux résultats obtenus au niveau de l'ARN, prouver l'activation des protéines impliquées dans les réactions