



HAL
open science

Etude du rôle des modifications post- traductionnelles de la stomatine dans sa fonction biologique dans la cellule épithéliale mammaire

Christelle Cebo, Rémy Valet

► To cite this version:

Christelle Cebo, Rémy Valet. Etude du rôle des modifications post- traductionnelles de la stomatine dans sa fonction biologique dans la cellule épithéliale mammaire. *Biologie moléculaire*. 2016. hal-02954886

HAL Id: hal-02954886

<https://hal.inrae.fr/hal-02954886>

Submitted on 1 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UE Projet Scientifique

Plateforme GBMC Génomique, biologie moléculaire et cellulaire

2015/2016

Rémy VALET

Etude du rôle des modifications post-traductionnelles de la stomatine dans sa fonction biologique dans la cellule épithéliale mammaire

Mots-clés : cellule épithéliale mammaire – stomatine – gouttelettes lipidiques



Encadrant : Christelle CEBO

INRA de Jouy-en-Josas

Unité : Génétique Animale et Biologie Intégrative

Equipe : Génomique Fonctionnelle et Physiologie de la Glande Mammaire

Adresse : INRA , site de Vilvert , Bât 440 , Bureau 635



<u>TABLE DES MATIERES</u>	page 1
<u>LISTE D'ABREVIATION</u>	page 2
I – <u>Introduction Du Contexte Général</u>	page 3
A) <u>La Glande Mammaire</u>	
B) <u>Les Cellules Epithéliale Mammaire (CEM)</u>	
C) <u>Composition du Lait : les protéines et les lipides</u>	
D) <u>Sécrétion et Production du Lait dans la CEM</u>	
E) <u>La Stomatine : Description</u>	
II – <u>Question(s) Scientifique(s) Posée(s) et Objectif(s) du Projet</u>	page 7
A) <u>Rôle de la Stomatine dans la biosynthèse des gouttelettes lipidiques : surexpression de la stomatine dans un modèle cellulaire.</u>	
B) <u>Rôle de la Ser244 dans la fonction biologique de la protéine : mutation de Ser244 en Ala244</u>	
III – <u>Approches Méthodologiques et expérimentales employées</u>	page 8
A) <u>Vecteur pEGFP</u>	
B) <u>Principe de la Mutagenèse Dirigée</u>	
C) <u>Transformation des bactéries, culture sur milieu sélectif et ciblage des colonies positives par PCR</u>	
D) <u>Transfection de cellules COS-7 avec le vecteur sauvage ou mutant (GFP-STOM Ser244Ala) et effet sur les gouttelettes lipidiques en présence d'un inducteur (acide oléique)</u>	
<u>REFERENCES</u>	page 13

LISTE D'ABBREVIATIONS

CEM : Cellules Epithéliales Mammaire

COS-7 : Cellules rénales de chimpanzé

GL : Gouttelettes Lipidiques

MP : Membrane Plasmique

pEGFP : plasmid Expressing Green Fluorescent Protein (plasmide Exprimant une Protéine Fluorescente Verte)

RE : Réticulum Endoplasmique

SMC : Site Multiple de Clonage

I – Introduction Du Contexte Général.

A) La Glande Mammaire.

La glande mammaire est une glande exocrine vascularisée et innervée impliquée dans la production du lait chez les mammifères femelles (Figure 1A).

Les cellules responsables de la production du lait sont les Cellules Epithéliales Mammaires (CEM) regroupées en acinus autour d'un canal collecteur intralobulaire formant un lobule. Les lobules sont regroupés autour d'un canal interlobulaire formant les lobes eux-mêmes drainés par un canal galactophore amenant à un espace de stockage appelé citerne chez les bovins et ovins (Figure 1B).

Le lait est distribué au veau par un sinus galactophore situé dans le trayon.

B) Les Cellules Epithéliales Mammaires (CEM)

Les CEM sont des cellules formant un tissu épithélial synthétisant les composants du lait. Elles sont regroupées en acinus autour d'un canal collecteur. Ces cellules sont polarisées et possèdent une orientation baso-apical : la zone basale est fixée à la matrice et la zone apicale donne sur le canal collecteur intralobulaire.

Les CEM sont les cellules productrices du lait, et notamment des protéines (caséines et des protéines du lactosérum) et des lipides (globules gras). Les caséines sont produites par la voie classique de synthèse des protéines (c'est-à-dire le réticulum endoplasmique puis l'appareil de Golgi) alors que les lipides sont produits à partir d'un bourgeonnement de gouttelettes dans le réticulum endoplasmique.(Figure 1C)

C) Composition du Lait : les protéines et les lipides

Le lait est composé de différentes fractions : lipides, protéines, glucides et composants secondaires (minéraux et vitamines) :

-les lipides sont sous la forme de mono, di ou triglycérides entourés d'une membrane : ce sont les globules gras.

-Les protéines sont multiples : les caséines organisées en micelles, sont les plus importantes (environ 4/5 des protéines totales chez le bovin) mais on trouve aussi des protéines solubles (lactoprotéines) et des protéines appartenant au globule gras

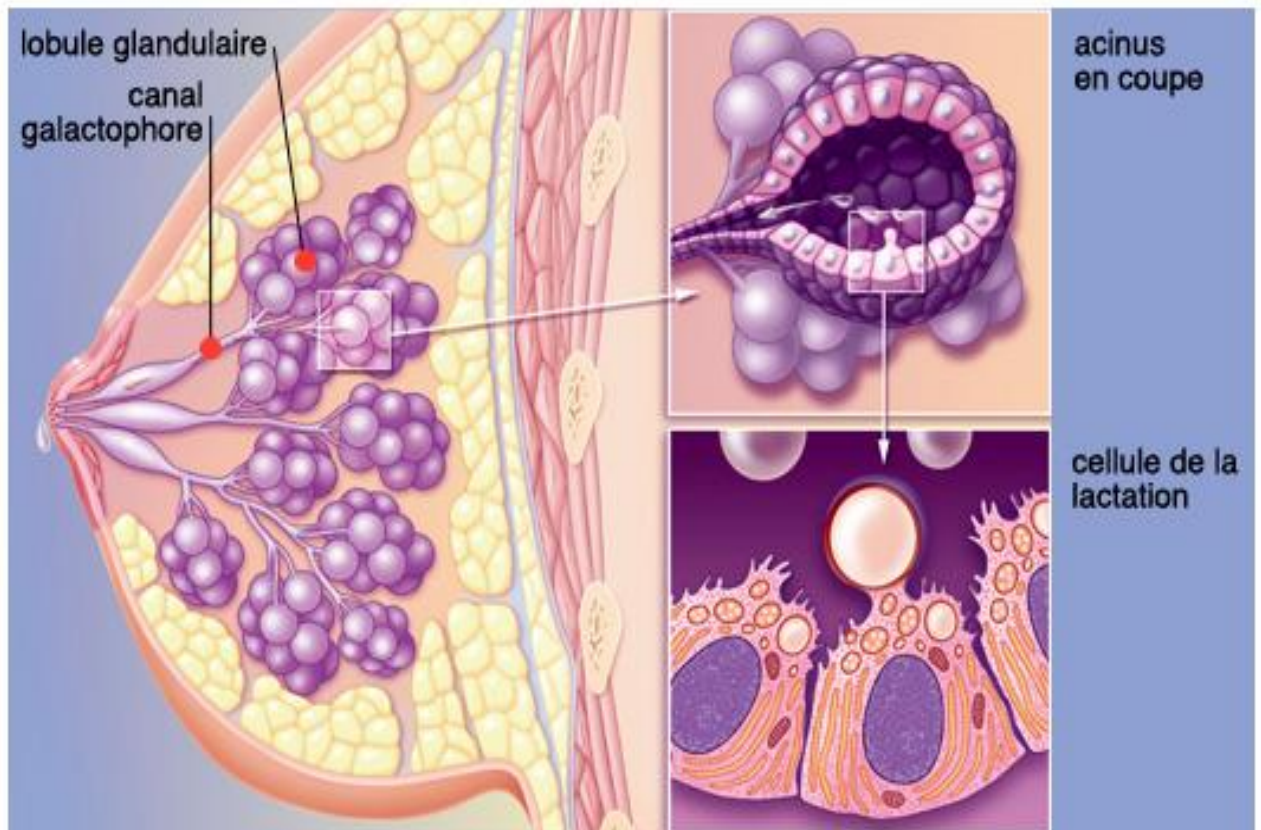


Figure 1 : Schéma d'une glande mammaire , d'un acinus et d'une cellule de la lactation chez un humanoïde femelle

source : http://www.arcagy.orginfocancerimg423_popup_sein-principe-de-la-lactation-1186705.jpg

A: Glande Mammaire composé de lobules glandulaires organisés autour d'un canal galactophore.

B: lobule glandulaire composé de cellules épithéliales mammaires organisés autour d'un canal galactophore

C: Cellule Epithéliale Mammaire en lactation (formation d'un globule gras dans le canal galactophore)

- Les glucides sous forme de lactose.

D) Sécrétion et Production du Lait par la CEM

La synthèse des globules gras est initiée dans le réticulum endoplasmique sous forme de gouttelettes de lipides constitués de triglycérides, diglycérides ou monoglycérides entourées d'une première couche de phospholipides issus du RE (réticulum endoplasmique). Ces gouttelettes lipidiques vont migrer dans le cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique où elles vont être entourées d'une bicouche lipidique issue de la membrane plasmique et sécrétées en globules gras. Cette bicouche lipidique est constituée de lipides comprenant une partie hydrophile et une partie hydrophobe permettant au globule gras d'être totalement soluble dans le lait.

De nombreuses protéines sont présentes à la surface des globules gras, protéines que l'on peut retrouver à la surface de la membrane plasmique des CEM.

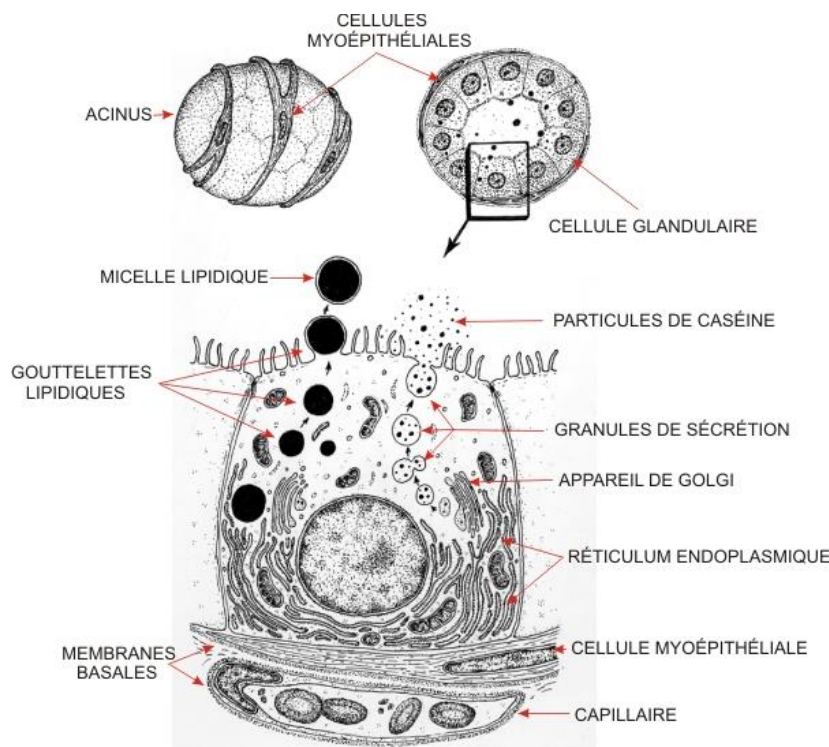
(Figure 2)

E) La Stomatine : Description

De nombreuses protéines issues du RE et de la membrane plasmique sont présentes à la surface des globules gras dont la stomatine. Des études protéomiques ont montré une corrélation entre la concentration en stomatine et la taille des globules gras : à la surexpression de la stomatine est corrélée une diminution de la taille des globules gras chez les chèvres qui suggèrent que la stomatine a un rôle dans la formation et la libération des globules gras.

(Cebo C, et al , 2012, Journal of Dairy Science, 95(11), 6215-6229).

Chez la chèvre, la stomatine présente quatre sites de phosphorylation (Ser2, Thr10, Thr177, Ser244) deux sites sont très conservés entre espèces (Thr177, Ser244), ce qui suggère un rôle biologique pour ces acides aminés. (Figure 3).



Les gouttelettes lipidiques sont produites dans le réticulum endoplasmique des cellules épithéliales mammaires

Ces gouttelettes migrent jusqu'à la partie apicale de ces cellules où elles sont excrétés hors de la cellule où elles deviennent des micelles lipidiques (=globules gras)

Figure 2 : Schéma de la production des gouttelettes lipidiques dans une cellule mammaire épithéliale
source : http://audilab.bmed.mcgill.ca/HAhtmlfrs_47_F.html

tr A8E4P3 A8E4P3_BOVIN	MSDKRPAVDITQARRLPDSFKDSPSTGLGVCGWILVAVSFLFTVITFPVSIWMCIKIKEY	60
sp P54116 STOM_MOUSE	MSDKRQSSHVQSQRIPESFRENKTELGCWILVAASFFVITFPISIWICIKIVKEY	60
sp P27105 STOM_HUMAN	MAEKRHTRDSEAQRLPDSFKDSPKGLGPCGWILVAFSFLFTVITFPISIWMCIKIKEY	60
	:. : . :.:*:*:*:*:. . * ***** *:.*:****:*:*:*:*:	
tr A8E4P3 A8E4P3_BOVIN	ERAIIFRLGRILQGGAKGPGFLFFILPCTDSFIKVD MRTISFDIPPQEILT KDSVTISVDG	120
sp P54116 STOM_MOUSE	ERVIIFRLGRILQGGAKGPGFLFFILPCTDSL IKVD MRTISFDIPPQEVLT KDSVTISVDG	120
sp P27105 STOM_HUMAN	ERAIIFRLGRILQGGAKGPGFLFFILPCTDSFIKVD MRTISFDIPPQEILT KDSVTISVDG	120
	** . *****:*****:*****:*****	
tr A8E4P3 A8E4P3_BOVIN	VVYRVQ NATLAVANITNADSATRLLAQTTLRNVLGTKNLSQILSDREEIAHNMQSTLDD	180
sp P54116 STOM_MOUSE	VVYRVQ NATLAVANITNADSATRLLAQTTLRNALGTKNLSQILSDREEIAHMQSTLDD	180
sp P27105 STOM_HUMAN	VVYRVQ NATLAVANITNADSATRLLAQTTLRNVLGTKNLSQILSDREEIAHNMQSTLDD	180
	*****.*****.*.*****	
tr A8E4P3 A8E4P3_BOVIN	ATDDWGIKVERVEIKDVKLPVQLQRAMAAEAEASREARAKVIAAEGEMNASRALKEASMV	240
sp P54116 STOM_MOUSE	ATDDWGIKVERVEIKDVKLPVQLQRAMAAEAEAREARAKVIAAEGEMNASRALKEASMV	240
sp P27105 STOM_HUMAN	ATDAWGIKVERVEIKDVKLPVQLQRAMAAEAEASREARAKVIAAEGEMNASRALKEASMV	240
	*** *****.*****:*****:*****	
tr A8E4P3 A8E4P3_BOVIN	ITE SPAALQLRYLQTLTTIAAEKNSTIIFPLPIDMLQAIMGPKQ----	284
sp P54116 STOM_MOUSE	ITE SPAALQLRYLQTLTTIAAEKNSTIVFPLPVDMLQGIMGSNH----	284
sp P27105 STOM_HUMAN	ITE SPAALQLRYLQTLTTIAAEKNSTIVFPLPIDMLQGIIGAKHSHLG	288
	*****:***:***.*:* : :	

Figure 3 : séquence en acide aminé de la stomatine bovine alignée avec celle de la stomatine murine et humaine
source : INRA

tr|A8E4P3|A8E4P3_BOVIN : séquence en acide aminé de la stomatine bovine

sp|P54116|STOM_MOUSE : séquence en acide aminé de la stomatine murine

sp|P54116|STOM_HUMAN : séquence en acide aminé de la stomatine humaine

Positions surlignées : sites de phosphorylation –Vert : acide aminé phosphorylé similaires entre les espèces

II – Question(s) Scientifique(s) Posée(s) et Objectif(s) du Projet

A) Rôle de la Stomatine dans la biosynthèse des gouttelettes lipidiques : surexpression de la stomatine dans un modèle cellulaire.

Il est intéressant d'induire une surexpression de la stomatine dans les cellules de mammifères pour voir les conséquences sur la taille et le nombre des gouttelettes lipidiques.

Pour induire cette surexpression il est nécessaire de préparer des plasmides codant pour la protéine par transformation de bactéries, puis de transfecter des cellules de mammifères avec ce plasmide recombinant. Nous observerons ensuite les gouttelettes lipidiques par observation microscopique des cellules.

B) Rôle de la Ser244 dans la fonction biologique de la protéine : mutation de Ser244 en Ala244

La stomatine possède quatre sites de phosphorylations dont deux qui sont très conservés entre espèces. Nous allons donc changer l'un de ces deux acides aminés par un acide aminé qui ne peut pas être phosphorylé (alanine).

Pour cela, nous allons dans un premier temps effectuer une mutagenèse dirigée par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADNc de la stomatine dans le but de changer un nucléotide pour changer un codon qui sera transcrit et traduit en un autre acide aminé, ici en alanine.

Cet ADNc sera ensuite cloné et inséré dans un plasmide pour transformer des bactéries permettant de produire le plasmide en grande quantité. Le plasmide recombinant qui contient également une cassette GFP sera ensuite transfecté dans les cellules COS-7 où le plasmide recombinant sera exprimé par la machinerie cellulaire pour produire la stomatine mutée Ser244Ala.

La microscopie à fluorescence sera utilisée pour observer la stomatine Ser244Ala dans les cellules COS-7 et voir si cette stomatine mutée est active ou non et si cela a une incidence sur les gouttelettes lipidiques.

III – Approches Méthodologiques et expérimentales employées

A) Vecteur pEGFP-C1

Le plasmide EGFP-C1 est un vecteur d'expression de mammifère permettant l'expression de la stomatine couplée avec une protéine fluorescente afin de la visualiser in vitro.

Le vecteur EGFP possède de nombreux éléments indispensables au clonage de la stomatine. (Figure 4)

NeoR / KanR code des protéines conférant à la bactérie transformée une résistance à la néomycine et à la kanamycine qui sont des antibiotiques : ce procédé permet de sélectionner les bactéries qui ont incorporés le plasmide EGFP.

La EGFP (Green Fluorescent Protein) code pour une protéine fluorescente qui sera couplée à la stomatine et permettra de visualiser la stomatine en condition in vitro et notamment la stomatine présente dans les CEM.

Le MCS (Multi Clonage Site ou site de clonage multiple) est une portion de plasmide permettant l'insertion du gène de la stomatine. Ce site est reconnu par de nombreuses enzymes de restrictions qui vont reconnaître des sites spécifiques, couper l'ADN permettant l'insertion du gène de la stomatine. Les enzymes de restrictions utilisées sont Xho I et Eco RI permettant une insertion directionnelle du gène de la stomatine.

B) Principe de la Mutagenèse Dirigée

Le principe est d'induire une mutation d'un ou de plusieurs nucléotides de l'ADNc dans le but de produire in fine une protéine différente afin d'étudier son activité lorsque celle-ci est mutée (Figure 5).

Nous allons utiliser ce procédé afin de modifier un acide aminé de la stomatine par une autre afin d'observer les conséquences d'une stomatine non fonctionnelle sur la formation des gouttelettes lipidiques. Cette mutagenèse nécessite 4 amorces : 2 amorces mutées et 2 amorces non mutées permettant l'amplification de l'ADN de la stomatine.

Les deux amorces mutées possèdent la région mutée et une région complémentaire avec l'ADN à amplifier permettant la production de l'ADN muté. Les 2 autres

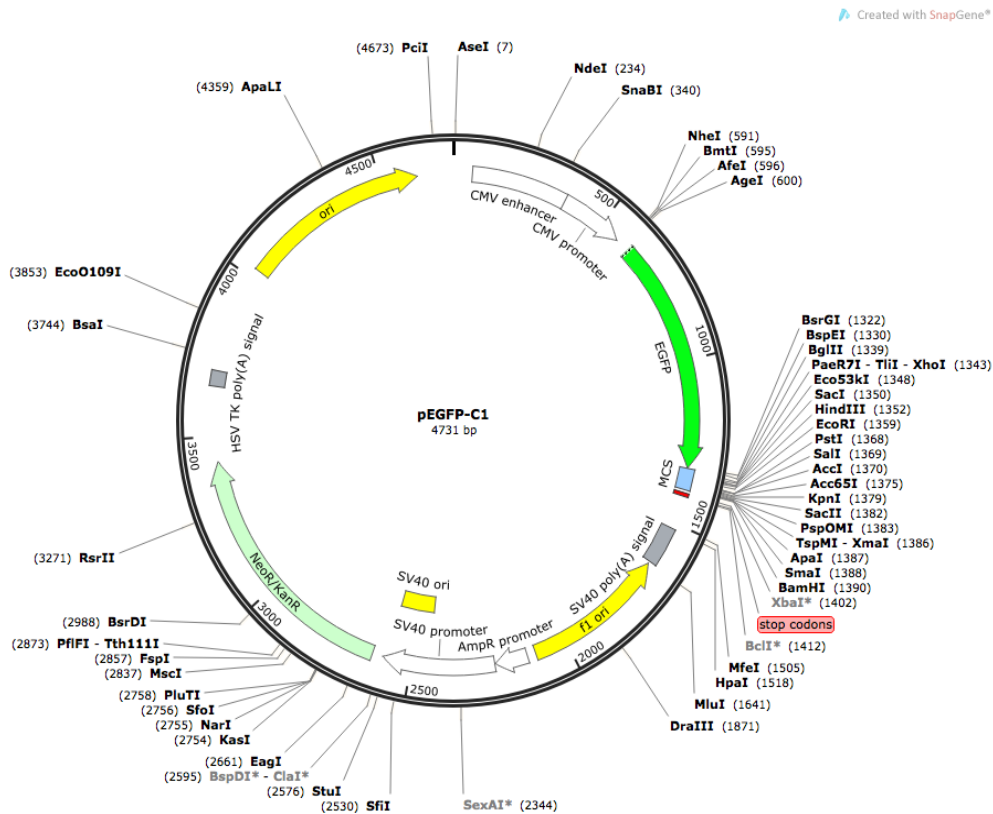


Figure 4 : Carte Génétique du plasmide PEGFP-C1

source : http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/fluorescent_protein_genes_and_plasmids/pEGFP-N2/

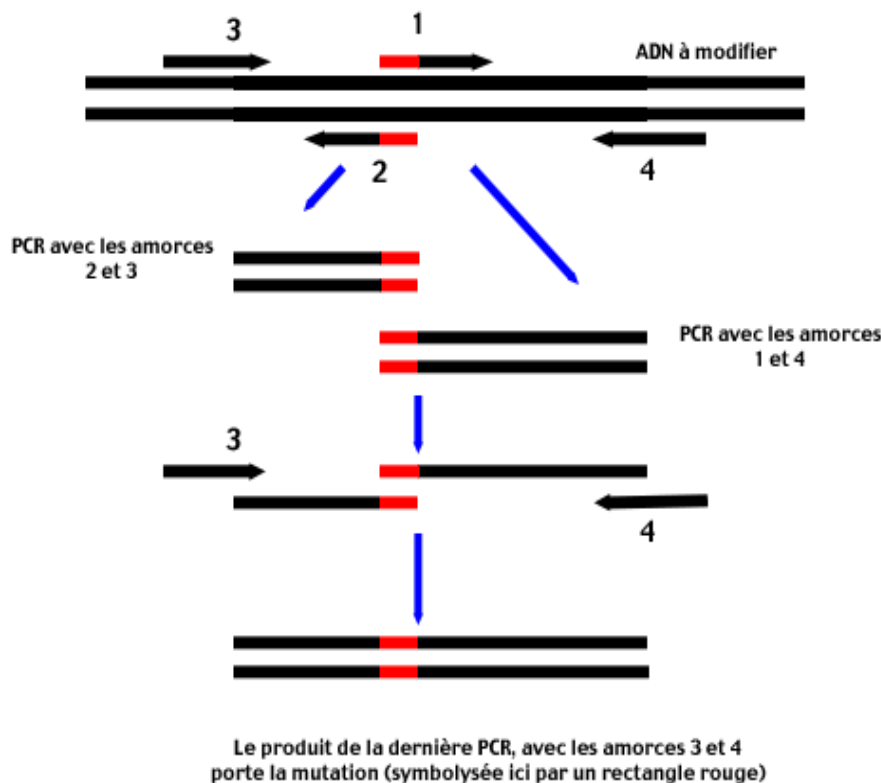
http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/fluorescent_protein_genes_and_plasmids/pEGFP-N2/

EGFP : protéine fluorescente verte.

MCS : Site multiple de clonage pour insertion du gène de la stomatine.

Xho I et Eco RI : sites d'actions des enzymes de restrictions pour coupure du plasmide permettant l'insertion du gène de la stomatine.

NeoR / KanR : code une résistance à un antibiotique permettant de cribler les bactéries ayant incorporé le plasmide.



Rouge : site de mutation dirigé.

1 : PCR avec amorces 2 et 3 permettant d'obtenir la partie 5' / 3' gauche de l'ADN.

2: PCR avec amorces 1 et 4 permettant d'obtenir la partie 3' / 5' droite de l'ADN.

3 : compatibilité de la « mutation » permettant complémentarité entraînant la PCR de la partie manquante.

4: Obtention de l'ADN muté

Le produit de la dernière PCR, avec les amorces 3 et 4 porte la mutation (symbolisée ici par un rectangle rouge)

Figure 5 : Schéma de la Mutagenèse Dirigée

source : [http://www.ens-](http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/muta_pcr/mutapcr.htm)

[lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/muta_pcr/mutapcr.htm](http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/muta_pcr/mutapcr.htm)

amorces vont permettant la synthèse de la séquence manquante permettant d'obtenir un ADN muté complet.

Nous vérifierons que la séquence obtenue est bien celle désirée par un séquençage dont le résultat sera comparé avec la séquence de la stomatine non muté : une substitution de T en G est attendue.

C) Transformation des bactéries, culture sur milieu sélectif et ciblage des colonies positives par PCR

Il est nécessaire de préparer l'insertion du gène de la stomatine dans le vecteur plasmidique de la pEGFP avec des enzymes de restrictions avant de pouvoir procéder à la transformation des bactéries.

Le gène de la stomatine sera inséré dans le MCS (Site multiple de clonage), le plasmide et l'insert seront digérés avec des enzymes de restrictions qui reconnaissent des séquences nucléotidiques spécifiques, Une fois le plasmide recombinant obtenu par ligation, ce plasmide sera introduit dans des bactéries : c'est la transformation. Cette technique permet l'obtention du plasmide recombinant en grande quantité (temps court de la division cellulaire)

Ces bactéries ont ensuite mis en culture sur un milieu LB en présence d'un antibiotique (Kanamicine) pour cibler les bactéries ayant incorporé le plasmide recombinant car ce dernier contient un gène codant une protéine conférant à la bactérie une résistance à cet antibiotique. Les colonies obtenues auront toutes incorporé le plasmide mais il est possible qu'il possède ou non le cDNA de la stomatine (plasmide recombinant ou vide) : il est donc nécessaire de choisir les colonies ayant incorporé le plasmide recombinant. On va donc tester quelques colonies pour savoir si elles ont bien incorporé le plasmide recombinant par PCR (amorces spécifiques de la stomatine) et séquençage des produits de PCR.

Les colonies positives sont sélectionnées pour amplification du plasmide qui sera utilisé pour transférer dans les cellules COS-7.

D) Transfection de cellules COS-7 et le vecteur sauvage et mutant (GFP-STOM Ser244Ala) et effet sur les gouttelettes lipidiques en présence d'un inducteur (acide oléique)

Le plasmide recombinant sera transfecté dans les cellules COS-7. Les cellules COS-7 vont ensuite transcrire et traduire le gène pour exprimer la stomatine mutée Ser244Ala.

La formation des gouttelettes lipidiques sera activée par ajout d'acide oléique qui est similaire aux lipides pour forcer les cellules à produire des gouttelettes lipidiques. La stomatine sauvage ou mutée est couplée à une protéine GFP qui est fluorescente permettant ainsi de visualiser la stomatine dans les cellules et/ou autour des gouttelettes lipidiques par microscopie de fluorescence. (Figure 6).

Conclusions :

Nous espérons, à la fin de ce stage, de pouvoir observer les cellules COS-7 au microscope à fluorescence : on ignore cependant si on observera la présence de gouttelettes lipidiques : si oui, seront-elles plus grandes ou plus petites, seront-elles plus ou moins nombreuses qu'en présence de stomatine normale ? Observerons-nous une fluorescence indiquant la présence de stomatine Ser244Ala autour de ces gouttelettes ou une absence totale de stomatine ?

Le stage permettra de répondre à toutes ces questions.

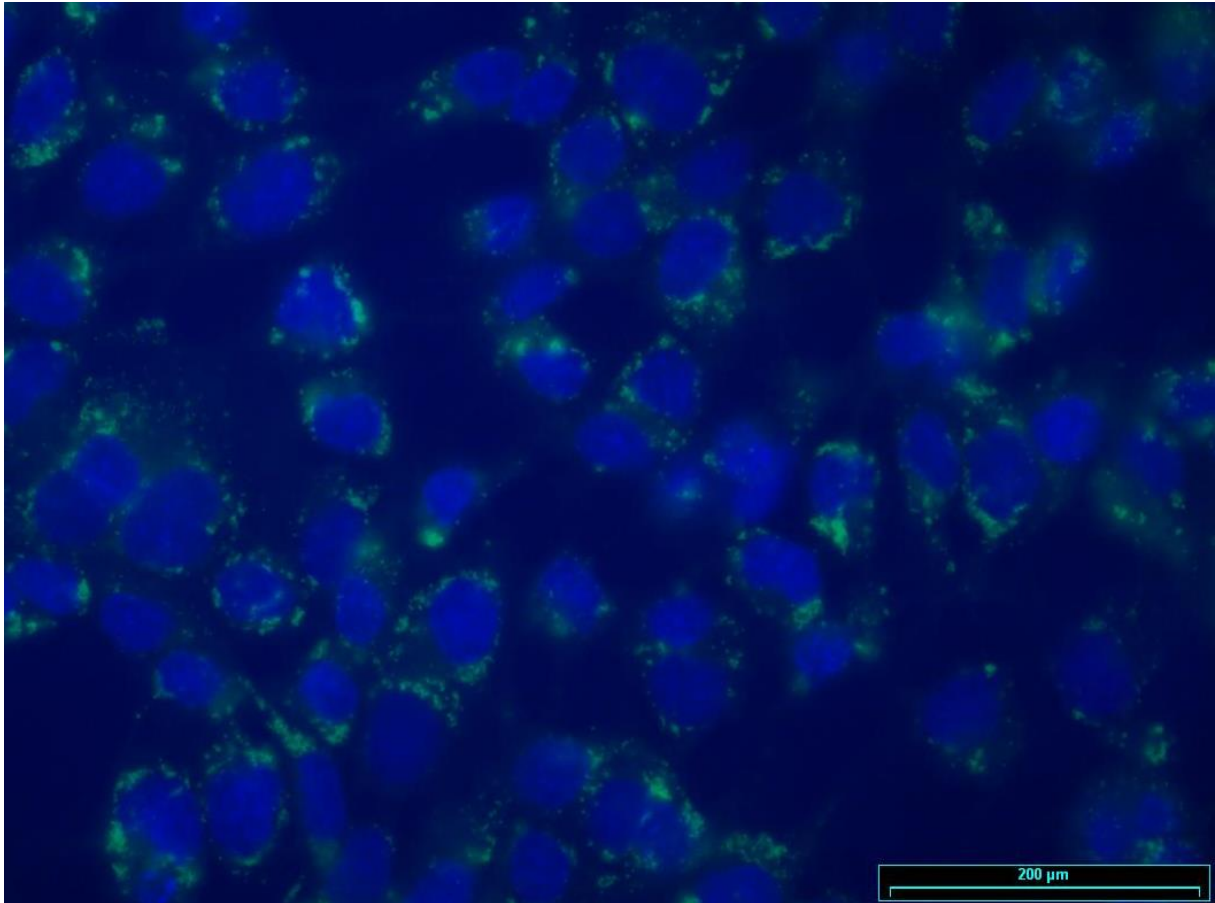


Figure 6 : Observation des stomatines en fluorescence autour des gouttelettes lipidiques

Cellules COS-7 stimulés à l'acide Oléique
Culture sur milieu DMEM + 10%
Vert : EGFP-stomatine autour des gouttelettes lipidiques

Comparative Proteomics Of Milk Fat Globule Membrane In Different Species Reveals Variations In Lactation And Nutrition

Jing Lu , Xinyu Wang , Weiqing Zhang , Lu Liu , Xiaoang Pang , Shuwen Zhang , Jiaping Lv
Food Chemistry 196 (2016) 665 – 672

Association Of Stomatin With Lipid Bodies

Ellen Umlauf , Edina Csaszar , Manuel Moertelmaier , Gerhard J.Shuetz , Robert G.Parton and Rainer Prohaska
DOI 10.074/jbc.M310546200 (2004)

Milk Fat Globule Membrane Proteomics : A Snapshot of Mammary Epithelial Cell Biology

Christelle Cebo
Food Technology Biotechnology 50 (3) 306-314 (2012)

(Résumé)

Les cellules épithéliales mammaires organisées en acinus produisent les différentes fractions du lait, notamment les lipides. Ces lipides sont des glycérides entourés d'une membrane issue du réticulum endoplasmique pour former les gouttelettes lipidiques. Ces gouttelettes lipidiques vont migrer dans la cellule jusqu'à la membrane plasmique où elles vont être entourées d'une bicouche lipidique avant d'être sécrétées dans la lumière des acini : ce sont les globules gras.

De nombreuses protéines entourent la gouttelette lipidique, et notamment la stomatine. Des études antérieures ont démontrés l'importance de la stomatine dans la synthèse des globules gras. Le but de ce stage est d'observer les conséquences de la stomatine mutée sur les gouttelettes lipidiques et donc dans la synthèse des globules gras.

