

# « Entre systèmes modèles et conservation phylogénique, le projet DrosoMan de protéomique comparative entre l'Homme et la Drosophile

ou

## l'association de moyens industriels et de la science artisanale pour établir les maillons faibles des ensembles protéiques »

par Jacques Camonis\* & Laurent Daviet\*\*

\*Inserm U528, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05. E-mail : jcamonis@curie.fr

\*\*Hybrigenics SA, 3-5, impasse Reilles, 75014 Paris. E-mail : ldaviet@hybrigenics.fr

Reçu le 7 avril 2004

### RÉSUMÉ

L'annotation fonctionnelle est un défi pour les biologistes confrontés aux quantités d'informations fournies par les projets de séquences des génomes des Vertébrés, des organismes modèles, des micro-organismes. Mais le savoir-faire de la recherche fondamentale « classique », qui se prête mal à des approches massives, est à la fois indispensable pour une compréhension approfondie, et insuffisant pour affronter l'énormité de la tâche. Inversement, quelques techniques sont industrialisables et permettent une description en termes de « protéomique fonctionnelle », en aval de la

génomique. L'Institut Curie et Hybrigenics ont pris conscience de leur complémentarité et ont établi une alliance dans le domaine du cancer et de la signalisation. Cette alliance s'est concrétisée autour d'un projet de protéomique fonctionnelle comparative entre l'Homme et la Drosophile. De nouveaux partenaires de protéines pourtant très étudiées ont été ainsi définis, de nouveaux réseaux sont apparus, et des « domaines biologiques » qui paraissaient indépendants sont connectés grâce à la profondeur des cribles et des analyses subséquentes.

**SUMMARY** "Using model organisms and phylogenetic conservation, the DrosoMan project combines high tech hand-made science and industrial know-how to target the Achilles heel of cancer cells. A comparative proteomic project that associates Academia and Biotech"

The post-genomic era offers a huge challenge for scientists used to hand-made tailored approaches that can deal with deep insight into a small number of objects. Reciprocally, industry is used to undergo massively parallel approaches, dealing with large numbers but rather shallow insight. The complementation is obviously tantalizing, and Institut Curie and Hybrigenics (HGX) have signed an alliance in

the field of cancer and signal transduction. A comparative proteomic approach was undertaken, where ortholog baits from Homo sapiens and flies were used to screen extremely complex two-hybrid cDNA libraries. New partners of "old" proteins have been identified, new networks have emerged, and unexpected connectors have been shown to link biological niches supposed to be independent.

### INTRODUCTION

Notre projet se situe dans l'ère post-génomique et représente un projet d'annotation fonctionnelle des protéomes en appliquant une technique qui se prête à la parallélisation massive, la technique du double-hybride en levure. Il se situe aussi dans une optique d'identification de nou-

veaux médicaments anti-cancéreux, à la fois par la vocation des partenaires impliqués et par le cadre de son financement. Ce projet associe l'Institut Curie et la société Hybrigenics (HGX), mais rencontre dans son déroulement quelques paradoxes : il est plus rapide de réaliser un crible « double hybride » qu'une publication, il est plus rapide de faire une publication qu'un médica-



ment... En résultent des problèmes de « tempo » (le temps académique est plus long que le temps industriel) et de pilotage de la recherche (le temps des agents ministériels est de façon désespérante différent du temps des acteurs de la recherche) quand on veut passer de la génomique aux nouveaux outils thérapeutiques.

**Le défi** consiste à mettre de l'ordre dans/mettre à profit les tombereaux d'informations fournies par la génomique pour comprendre la physiologie, la physiopathologie et inventer de nouveaux traitements. Comment travailler des milliers de gènes avec les approches artisanales de la recherche fondamentale ?

**La solution**, dans son principe, consistera à inventer et mettre en place des approches « massivement parallèles », robotisées, qui vont réduire la quantité d'information en l'organisant (réduction de la masse, augmentation de la complexité). Mais peu de techniques du monde artisanal qu'est la recherche académique s'offrent à l'automatisation, et ce défi a été relevé et réussi par Hybrigenics SA avec le double-hybride en levure.

D'où une alliance entre un Institut public de Recherche, l'Institut Curie, et la Société Hybrigenics. Associant

le savoir-faire de la « haute-couture » à la capacité de production de masse du « prêt-à-porter », le **champ d'application de l'alliance** s'attaque aux fonctions cellulaires fondamentales et aux mécanismes de cancérogenèse. L'objectif est double, pour les deux parties, exploratoire (protéomique fonctionnelle, création de cartes d'interaction protéine-protéine à très grande échelle voire à l'échelle des protéomes) et appliqué (identification et validation de cibles thérapeutiques dans le domaine du cancer, puis criblage et identification de nouvelles têtes de séries pharmacologiques).

Pour coordonner les flux d'informations et de matériels entre les parties, pour aider à l'analyse des données primaires et pour participer à l'analyse transversale, une structure légère, un laboratoire mutualisé Institut Curie-Hybrigenics a été mis en place, composé de deux assistantes-ingénieurs et animé par Jacques Camonis.

L'alliance entre l'Institut Curie et Hybrigenics SA a mis en jeu 353 appâts proposés par les laboratoires publics experts qui les ont clonés après un « design » optimisé (troncature des régions d'insertion membranaire, mutants dominants, ...). Les résultats ont été analysés par ces mêmes chercheurs. Une analyse transversale des

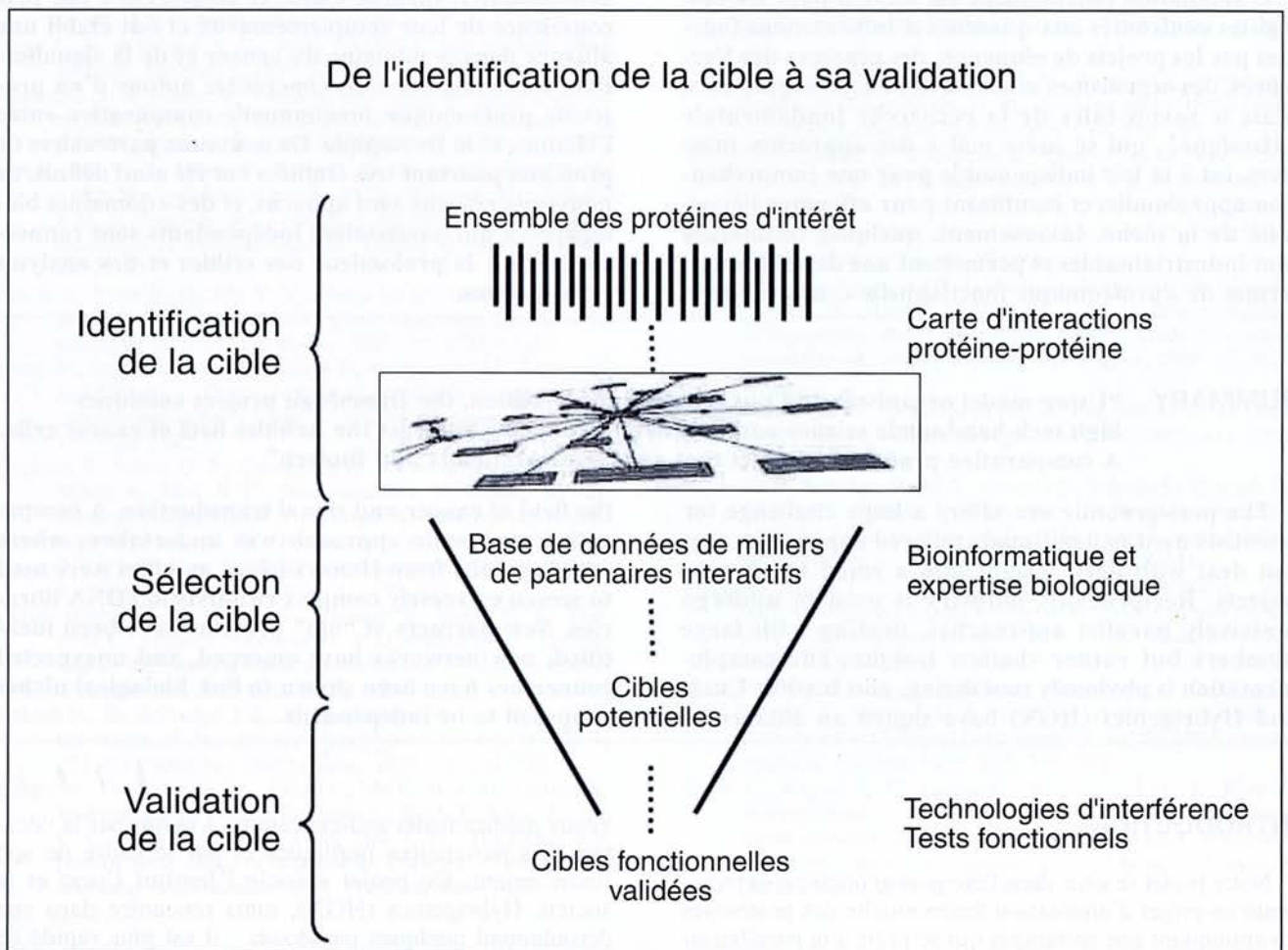


FIG. 1.

cribles a été effectuée par HGX et le laboratoire Institut Curie-Hybrigenics, grâce à la puissante informatique dont s'est doté Hybrigenics qui a développé une interface utilisateur pour naviguer dans les réseaux d'interactions.

Les validations biologiques sont effectuées par les chercheurs académiques et HGX.

Notre projet explore le cytoplasme en prospectant la signalisation par les voies Notch, Hedgehog, diverses GTPases, des protéines à domaines FERM, etc., le trafic (avec une attention particulière sur l'Exocyste, des SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors), des protéines des MVB (multi-vesicular bodies), Rab6 et ses partenaires, ...), le centrosome comme grand coordonnateur de la cellule, mais aussi le noyau (INI1, Rad27, des protéines de la réparation, Collier, etc.).

## LES RÉSEAUX ET DES HOMMES. FAUT-IL COMPRENDRE POUR AGIR ?

La démarche de notre projet consiste à partir d'une protéine impliquée soit, activement, dans un processus onco-

génique, soit nécessaire au bon déroulement de ce processus, d'identifier ses partenaires, de les valider comme interacteurs *in vivo* et de s'interroger quant à la pertinence de ces partenaires comme cibles pharmacologiques.

La figure 1 montre le processus qui va de l'identification à la validation. Un tel processus s'inscrit dans une démarche « intelligente » (« Comprendre pour agir ») sachant que ceci s'oppose à ce qui a été longtemps la démarche de l'industrie pharmaceutique : le criblage « aveugle » à base phénotypique « grossière » sur des lignées de référence ou le criblage (bio)chimique visant des acteurs de la division telles les topo-isomérases.

## LE PROJET DROSOMAN OU COMMENT SE SERVIR D'UN TAMIS ÉVOLUTIF

L'idée qui a mené à ce développement du projet initial est que des interactions protéines-protéines qui impliqueraient des proies et des appâts orthologues entre deux espèces phylogénétiquement éloignées seraient certainement significatives. Nous avons choisi la *Drosophile* comme espèce de référence évolutive, un eucaryote mul-

## Appâts orthologues, proies orthologues

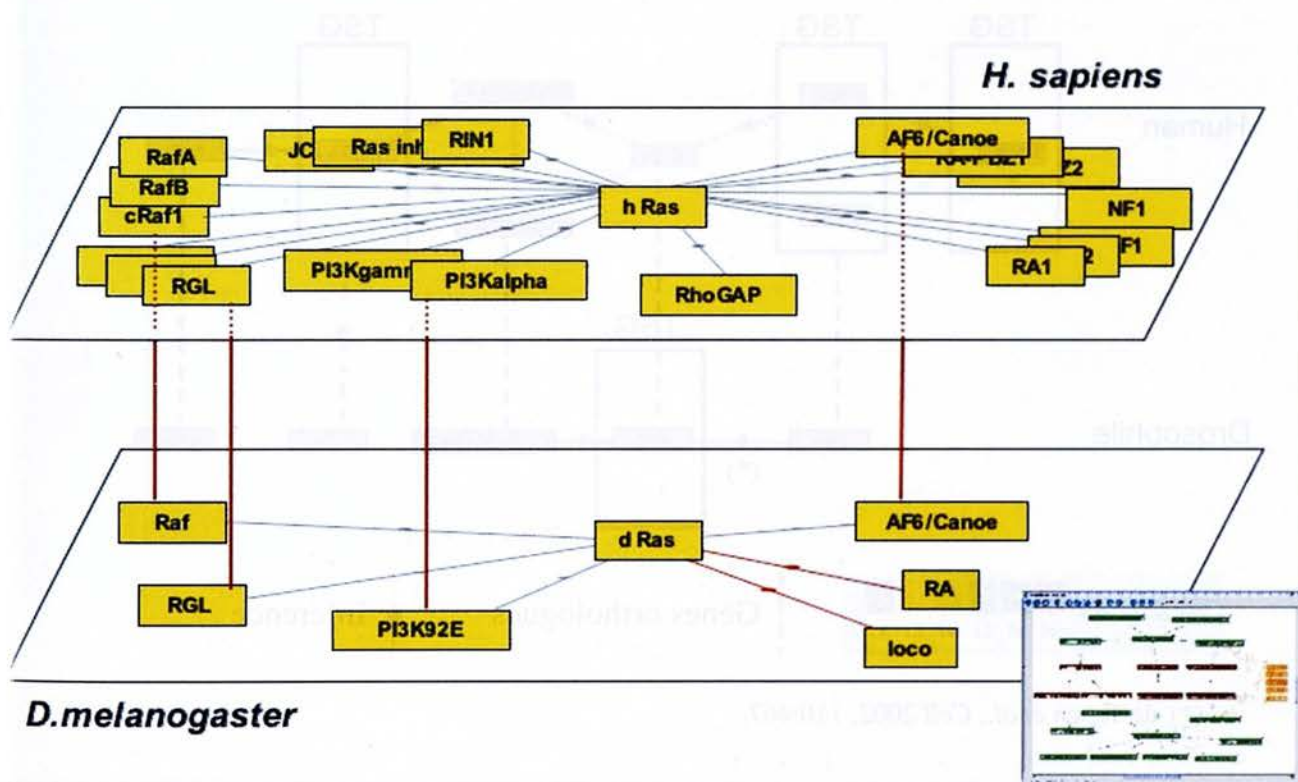


FIG. 2.

ticellulaire à génome réduit. Et le projet Drosoman a consisté à cribler toutes les protéines mentionnées ci-dessus d'origine humaine et de la Drosophile. Cette approche nous a permis de mieux trier les interactions, jouant de notre «tamis évolutif» qui permet d'augmenter le score de confiance des interactions trouvées dans les deux espèces, mais aussi d'inférer des chaînons manquants dans une espèce, car trouvés dans l'autre espèce. La figure 2 illustre un exemple de «cartes orthologiques» centrées sur Ras.

Actuellement la carte d'interactions de la Drosophile que nous avons réalisée est disponible sur le Web (<https://pim.hybrigenics.com/pimrider/nologin/index-droso.html>.) et est accessible aussi *via* Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) pour chaque protéine trouvée dans la carte.

**LE CAS DU SUPPRESSEUR DE TUMEUR RasSF1**

L'exemple de la figure 3 est une autre illustration de la puissance des approches trans-spécifiques. RASSF1 est un

gène suppresseur de tumeur (TSG) : le locus RasSF1 (3p21.3) est inactivé épigénétiquement dans des tumeurs du poumon (80-100 % SCLC, 30-40 % NSCLC), du sein (49-62 %), du rein (91 %), etc. Deux mécanismes ont été proposés : une inhibition de la progression G1/S par régulation post-transcriptionnelle de l'accumulation de la cycline D1 ou RasSF1 comme effecteur pro-apoptotique de Ras.

Le projet Drosoman a criblé plusieurs membres de la famille RasSF et nous avons trouvé une interaction avec les kinases pro-apoptotiques MST1 et MST2. Ces deux kinases appartiennent à la « famille Ste20 » et sont activées par une protéolyse dépendant de la voie de la caspase-3 qui coupe la région inhibitrice C-terminale de MST1/2. La surexpression des MST1 (mais pas des mutants du domaine kinase) induit une mort par apoptose et MST1 semble activé en aval de la voie MEKK1-JNK. Le complexe MST/RasSF1 a été proposé comme un nouvel effecteur de Ras qui médie son effet pro-apoptotique.

Le projet Drosoman a aussi criblé MST1 et MST2 comme appâts et identifié WW45 comme partenaire. Le criblage orthologue montre que l'orthologue drosophile de MST pour partenaire Salvador, l'orthologue de

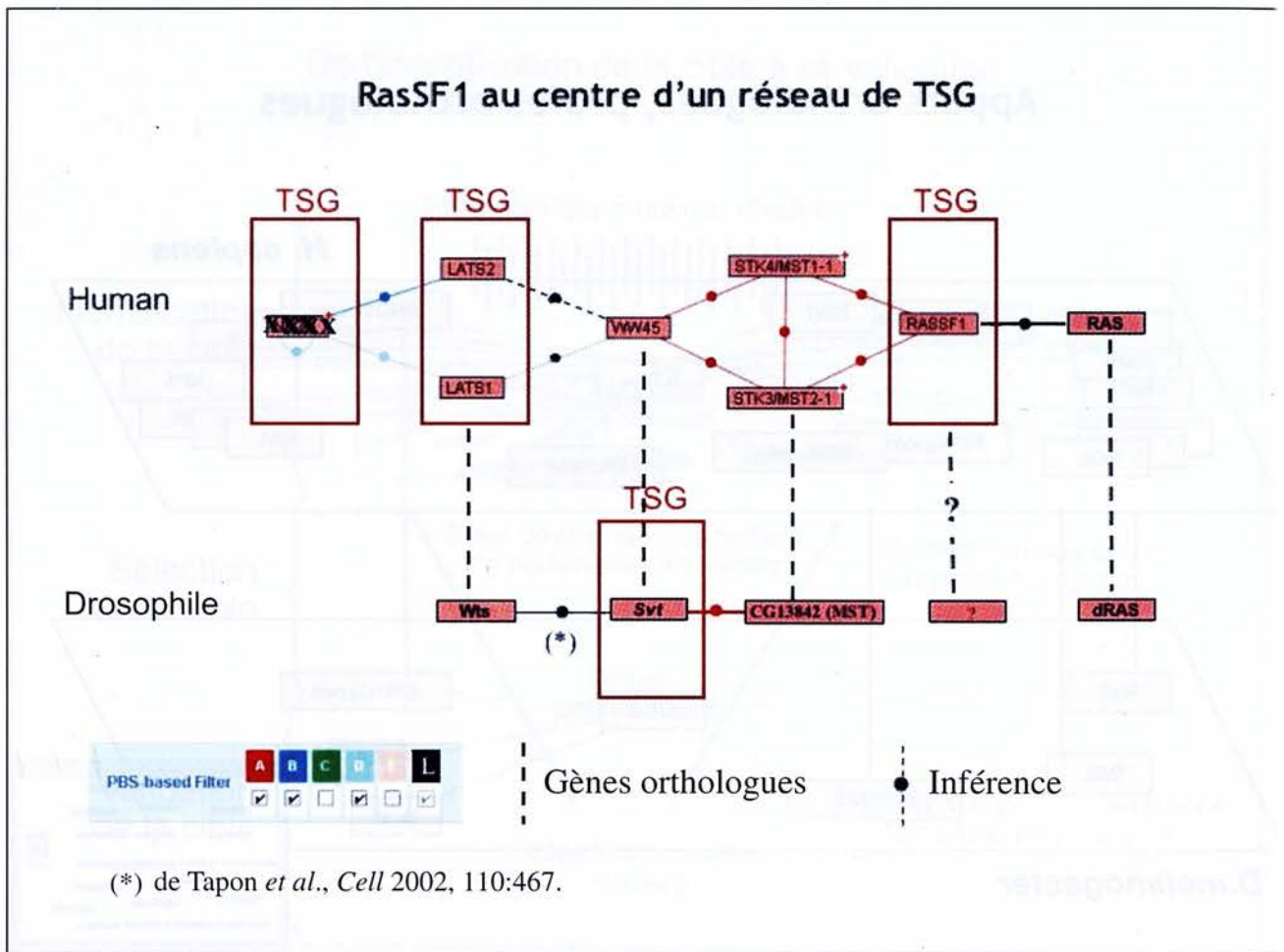


FIG. 3.

WW45. Cette conservation de l'interaction est médiée par une conservation des motifs d'interactions (domaine WW et motif PPXY). *Salvador (Sav)* est bientôt publié comme un TSG de drosophile qui régule la sortie du cycle et l'apoptose, et WW45 est retrouvé muté dans des lignées cancéreuses humaines. Enfin LATS/*Warts* qui sont des kinases et des TSG chez la Souris interagissent physiquement avec WW45/*Sav*. Les mutants de *Warts* et de *Sav* ont des phénotypes similaires. Or, le projet DrosoMan, criblant un autre TSG (Fig. 3) a identifié LATS comme partenaire, étendant le réseau de TSG. Nous criblons actuellement plusieurs tumorothèques afin d'estimer l'implication des divers gènes codant cette chaîne de protéines. En particulier, nous testons si des mutants de XXXX et des pertes d'expression de RasSF1 seraient des événements exclusifs.

**OÙ EN SOMMES NOUS ?**

Les cartes des réseaux orthologues s'étendent, et elles permettent tantôt de trier, tantôt de compléter.

La connectivité va bon train où nous intégrons de plus en plus de « niches » biologiques dont les interconnexions étaient inconnues. Les laboratoires ont de quoi travailler quelques années...

Mais où sont les médicaments ? Patience... et relisez l'introduction où il est question du temps, même si tous les acteurs, tant publics que privés, ont une conscience claire de l'urgence. L'aventure d'une association entre deux mondes qui s'ignorent le plus souvent, la recherche publique et la recherche privée, a déjà permis des découvertes étonnantes, et porte en elle l'espoir d'applications prochaines.