



# Modélisation de pathologies humaines en modèle levure

Marc BLONDEL

Inserm UMR1078 «Génétique, Génomique fonctionnelle & Biotechnologies»

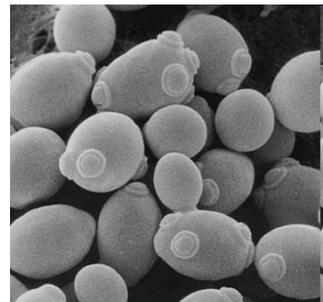
Université de Brest

Magritte «La clairvoyance» 1936  
(auto-portrait)

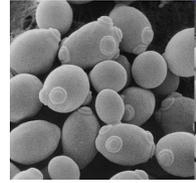


## Chémobiologie à l'happy hour :

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme pertinent pour modéliser des pathologies humaines...



# La levure : un organisme pertinent pour modéliser des pathologies humaines



la **levure** est un **eucaryote** aussi facile à manipuler qu'une bactérie

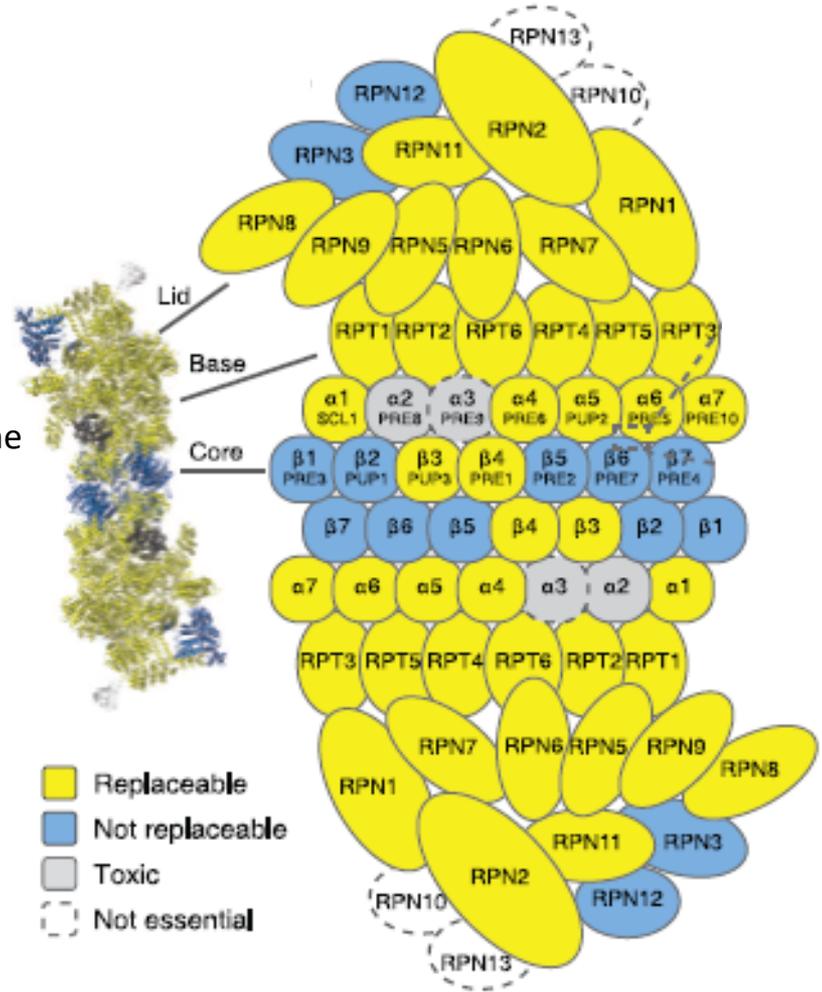
**les mécanismes cellulaires & de nombreux acteurs clés** impliqués dans ces **mécanismes** et dans des **maladies humaines** sont **conservés fonctionnellement** de la levure à l'Homme

# les mécanismes cellulaires & les acteurs clés de nombre de maladies humaines sont conservé de la levure à l'Homme

## liste non exhaustive de levuristes lauréats du prix Nobel de Médecine & Physiologie ou de Chimie :

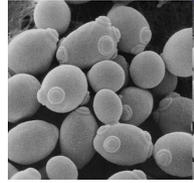
- Arthur Kornberg (1959) : ADN polymérase de levure
- Sir Paul Nurse & Lee Hartwell (2001) : les complexes CDK/cycline de levure yeast (*S. pombe* & *S. cerevisiae*)
- Roger Kornberg (2006) : ARN polymérase de levure
- Randy Shekman (2013) : le transport vésiculaire de la levure
- Yoshinori Ohsumi (2016) : l'autophagie chez la levure

Yeast 26S Proteasome



Kachroo et al Science 2015

# La levure : un organisme pertinent pour modéliser des pathologies humaines



la levure est un eucaryote aussi facile à manipuler qu'une bactérie

les mécanismes cellulaires & de nombreux acteurs clés impliqués dans ces mécanismes et dans des maladies humaines sont conservés fonctionnellement de la levure à l'Homme

→ il est donc possible de développer des modèles levures pour des pathologies humaines...

**POINT DE DEPART** : créer un **modèle levure** présentant un **phénotype pertinent pour la maladie** d'intérêt (e.g.: OE Htt103Q ⇨ aggrégation & toxicité en la levure comme dans les neurons des patient Huntington)

❖ recherche de **modificateurs + or –** par **criblage phénotypique** :

- petites molécules (identification de candidats-médicaments)
- gènes/cDNA (identification de mécanismes physiopathologiques)

❖ **validation** des hits/gènes en **systèmes mammifères/humain** (*ex vivo/in vivo*)

❖ les molécules peuvent être utilisées pour du **criblage inverse** pour identifier leurs cibles (identification de mécanismes physiopathologiques) car criblages phénotypiques

# trois situations possibles au regard du gène humain/viral gene impliqué...

**Un homologue fonctionnel du gène existe chez la levure**

**Modèles levure pour des maladies mitochondriales**  
(syndrome NARP /ATP6)

**Modèle levure pour la déficience intell. liée à T21 (Down/CBS)**

**Des gènes levure peuvent être utilisés comme prototype**

**Modèle levure pour les maladies à prion**

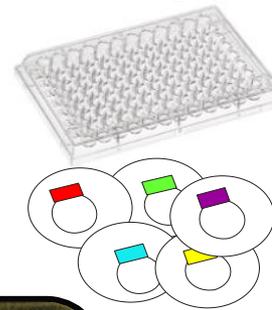
**Le gène humain ou viral n'a pas d'homologue mais est exprimé chez la levure**

**Modèle levure pour la maladie de Huntington (OE of Htt105Q)**

**Modèle levure pour l'échapp. au système immunit. de l'oncovirus d'Epstein-Barr (EBV)**

**[Phénotype pertinent]**

Recherche de modificateurs  
(criblage de drogues, gènes...)



**Suppression du phénotype :**

candidats-médicaments  
& mécanismes  
physiopathologiques



**Exacerbation du phénotype :**

mécanismes  
physiopathologiques

# preuves-de-principe (1)...

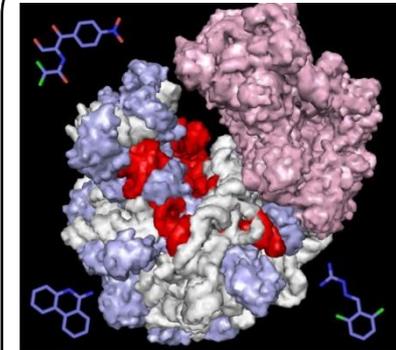
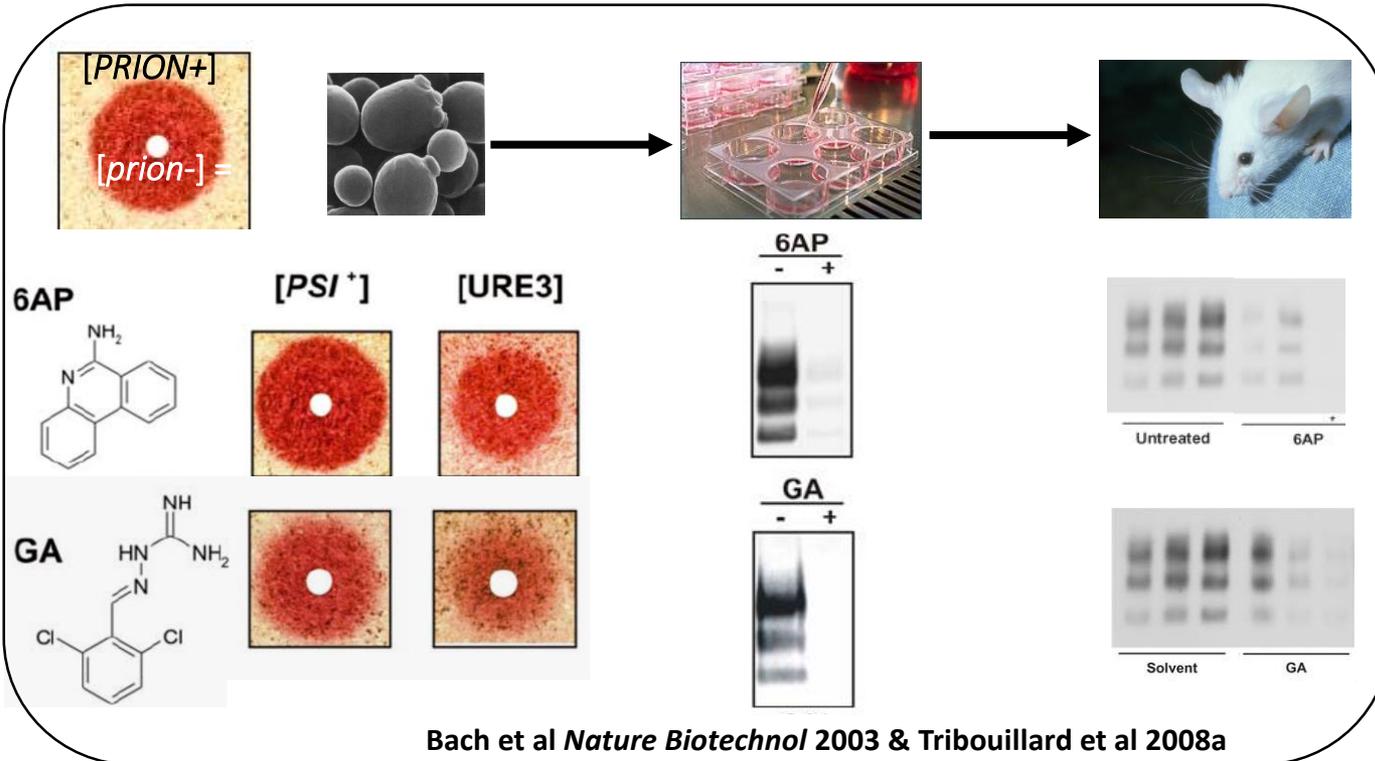
***Pour du criblage de molécules basé sur un modèle levure :***

Un modèle levure pour les maladies à prion (2003) :

isolement de molécules actives contre les prions de levure & de mammifères (*ex vivo* & *in vivo*)

**et**

détermination de leurs cibles par criblage inverse : PFAR (protein folding activity of the ribosome)



L'activité PFAR (*Prot. Folding Activity of the Ribosome*) est une cible sélective de la 6AP & GA

Tribouillard et al 2008b

# preuves-de-principe (2)...

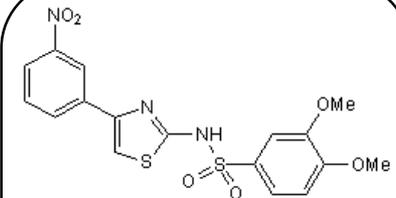
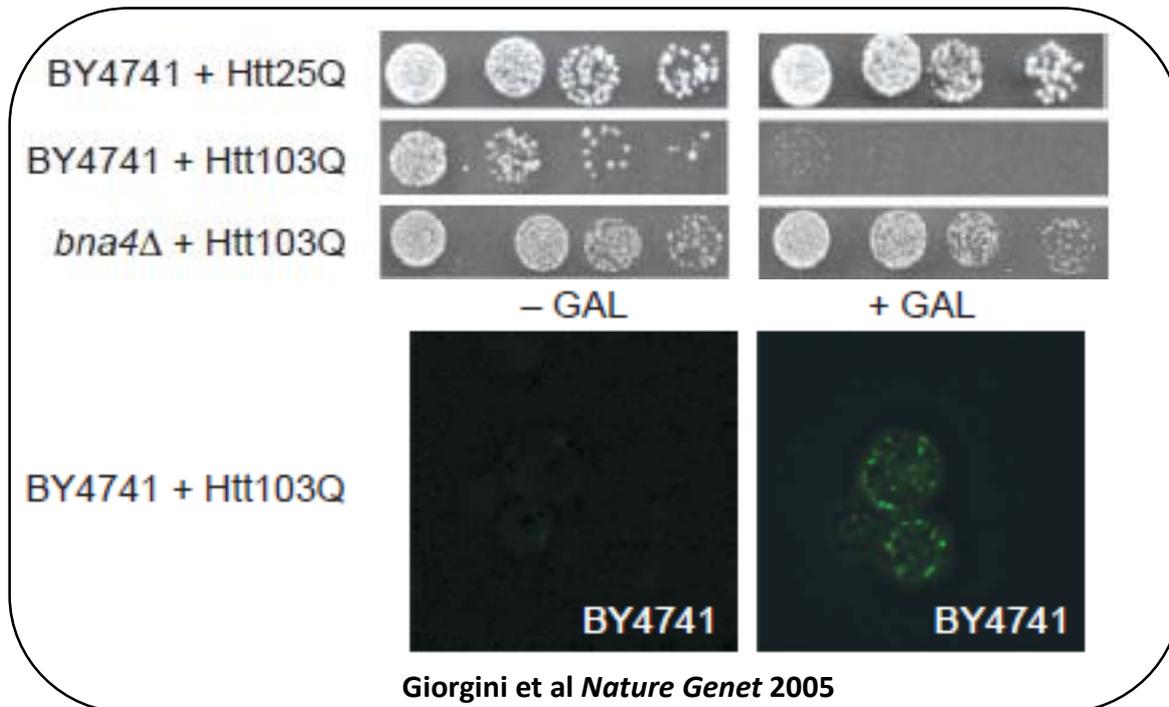
***Pour des criblages génétiques basés sur un modèle levure :***

Un modèle levure pour la maladie de Huntington (2005) :

identification de *BNA4/KMO* (kynurenine 3-monooxygenase) comme gène conservé impliqué dans la toxicité de Htt103Q chez la levure

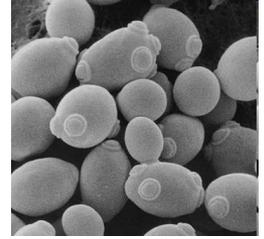
**et**

validation *in vivo* de KMO comme cible thérapeutique pour la maladie de Huntington



**Ro 61-8048 est un  
Inhibiteur puissant  
et sélectif de KMO  
&  
est actif dans des  
modèles anim. HD :  
KMO est une cible  
thérapeut. nouvelle**

# Des modèles levure pour des pathologies humaines :



## Deux remarques :

La création d'un modèle levure pour une maladie donnée n'est pas une fin en soi : **pertinent quand elle permet de répondre à des besoins particuliers** (pas de traitements, mécanismes physiopathologiques inconnus, maladies rares/orphelines...)

**Ces projets sont *de facto* très collaboratifs/interdisciplinaires** : avec des spécialistes des maladies considérées/des mécanismes physiopathol. & avec des chimistes médicaux

**Un modèle levure pour le mécanisme permettant l'évasion immunitaire de l'oncovirus d'Epstein-Barr (EBV)**

# Un modèle levure pour le mécanisme permettant l'évasion immunitaire de l'oncovirus d'Epstein-Barr (EBV) :

**de l'isolement de molécules interférant avec le mécanisme viral d'échappement au système immunitaire à l'identification de facteurs cellulaires impliqués**

## Un projet collaboratif/interdisciplinaire entre 3 équipes :

### **Modèles levures pour des pathologies humaines**

M Blondel, G Angrand, A Quillévéré, N Loaëc, R Le Sénéchal, C Voisset & MJ Lista  
Inserm UMR1078, Brest

### **Cancers liés à EBV**

R Fähræus, RP Martins, C Daskalogianni, & L Malbert-Colas  
Inserm UMR1162, Paris

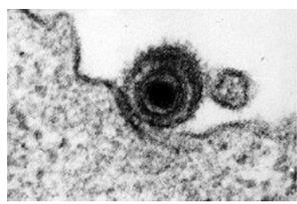
### **Chimie médicinales et ligands de G4**

MP Teulade-Fichou, C Beauvineau, O Reznichenko & A Granzhan  
CNRS UMR9187 - Inserm U1196, Curie Institute, Orsay

- Voisset et al *Disease Models & Mechanisms* 2014
- Daskalogianni et al *Journal of Pathology* 2015
- Lista et al *Biotechnology Journal* 2015
- Lista et al *Patent Application* 2017
- Lista et al *Nature Communications* 2017
- Lista et al *Microbial Cell* 2017
- Granzhan et al *Patent Application* 2018
- Wilson et al *Cancers* 2018
- Martins et al *Molecules* 2018
- Martins et al *Nucleic Acids Research* 2019
- Reznichenko et al *Eur J Med Chem* 2019
- Angrand et al *Genes* 2019

## **Supports financiers :**





# Le virus d'Epstein-Barr (EBV) & le cancer

- EBV est un gammaherpesvirus (= HHV-4) **oncogénique** qui serait responsable de **>1 % des cancers dans le monde qui incluent :**
  - le lymphome de Burkitt
  - le lymphome de Hodgkin
  - 10% des cancers gastriques
  - le carcinome nasopharyngé
- comme tous les gammaherpesvirus, EBV est un virus latent qui échappe au système immunitaire
- **but du projet : interférer avec l'échappement immunitaire d'EBV > immunothérapie pour les cancers liés à EBV (en promouvant la synthèse de néo-antigènes) :**
  - étant donné que **la plupart des cellules tumorales des cancers liés à EBV sont infectées par le virus...**
  - **contrairement** à la vaste majorité des **cellules non-tumorales**

**EBV est un virus latent qui échappe au système immunitaire...**

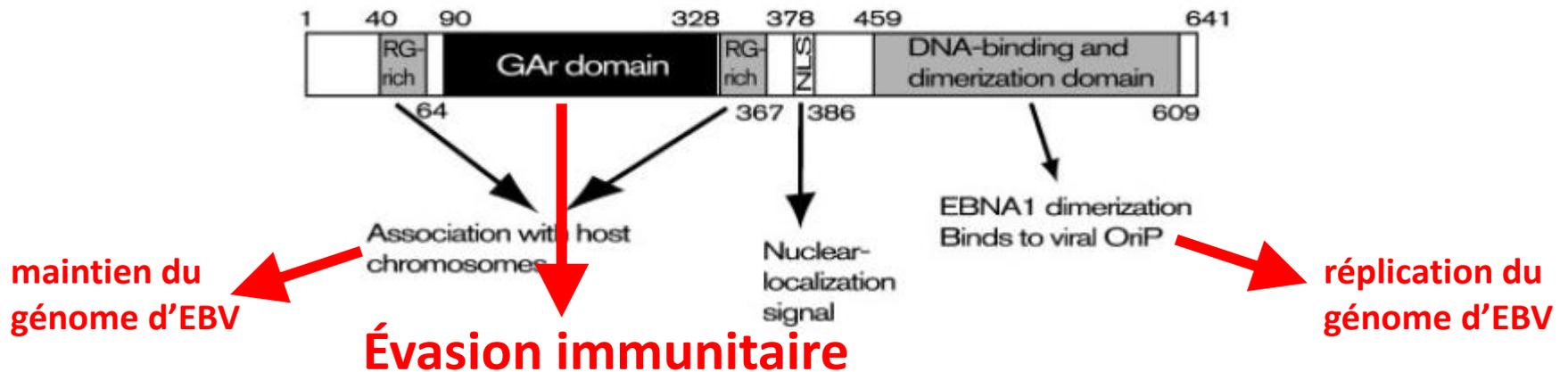
**EBV échappe au système immunitaire mais a un talon d'Achille : sa *genome maintenance protein* (GMP) **EBNA1****

**EBNA1 est : absolument essentielle pour la réplication & le maintien du génome d'EBV mais... très antigénique & des cellules T CD8<sup>+</sup> dirigées contre EBNA1 sont présentes chez toutes les personnes infectées**

**De ce fait un mécanisme qui limite le niveau d'EBNA1 a été sélectionné :**

**⇒ EBNA1 limite la traduction de son propre ARNm**

La capacité d'EBNA1 d'échapper au système immunitaire est due à son domaine GAR (*glycine-alanine repeats*) qui auto-limite sa production...



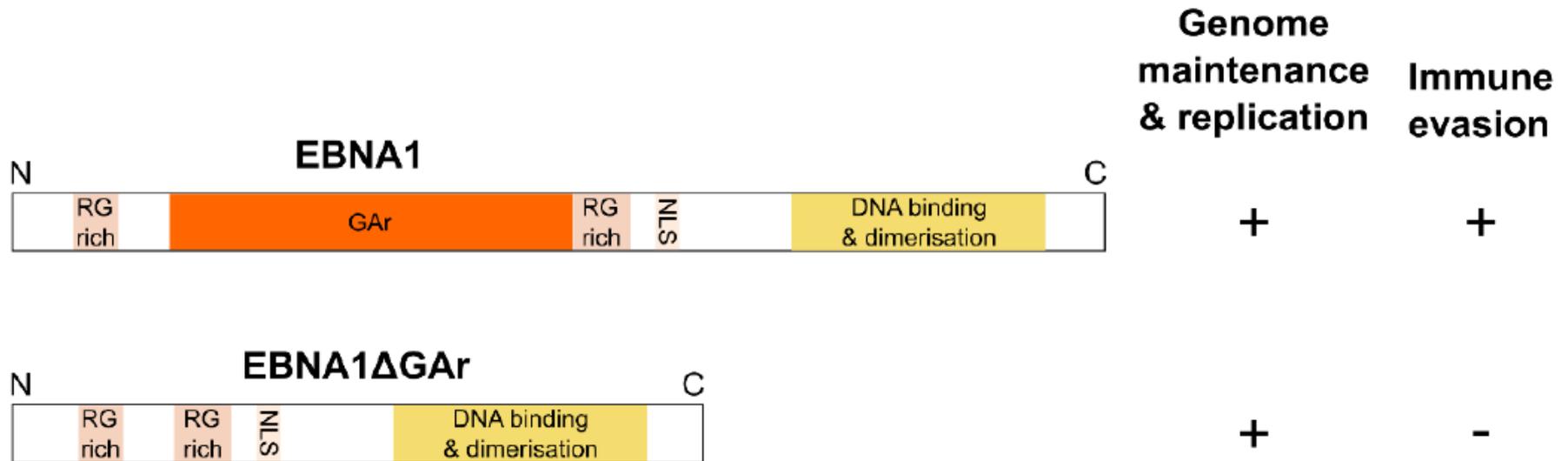
le domaine GAR d'EBNA1 inhibe la traduction de son propre ARNm en *cis*...

& ainsi la production peptides antigéniques dérivés d'EBNA1

un polymorphisme existe pour la longueur de GAR

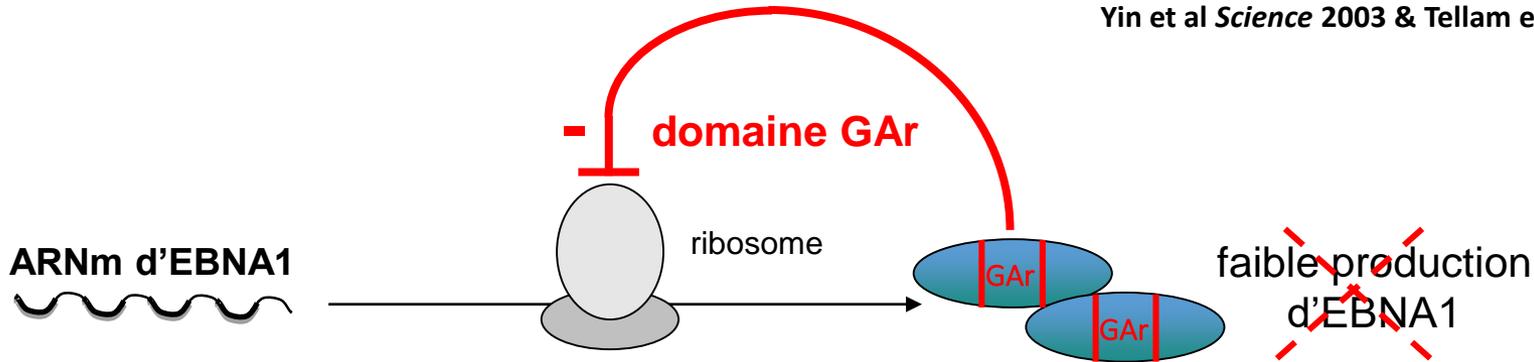
les effets sur la traduction & la présentation antigénique sont proportionnels à la longueur de GAR : plus GAR est long, plus l'inhibition est forte

la capacité d'EBNA1 à échapper au système immunitaire est due à son domaine GAr (glycine & alanine repeats) qui auto-limite sa production...



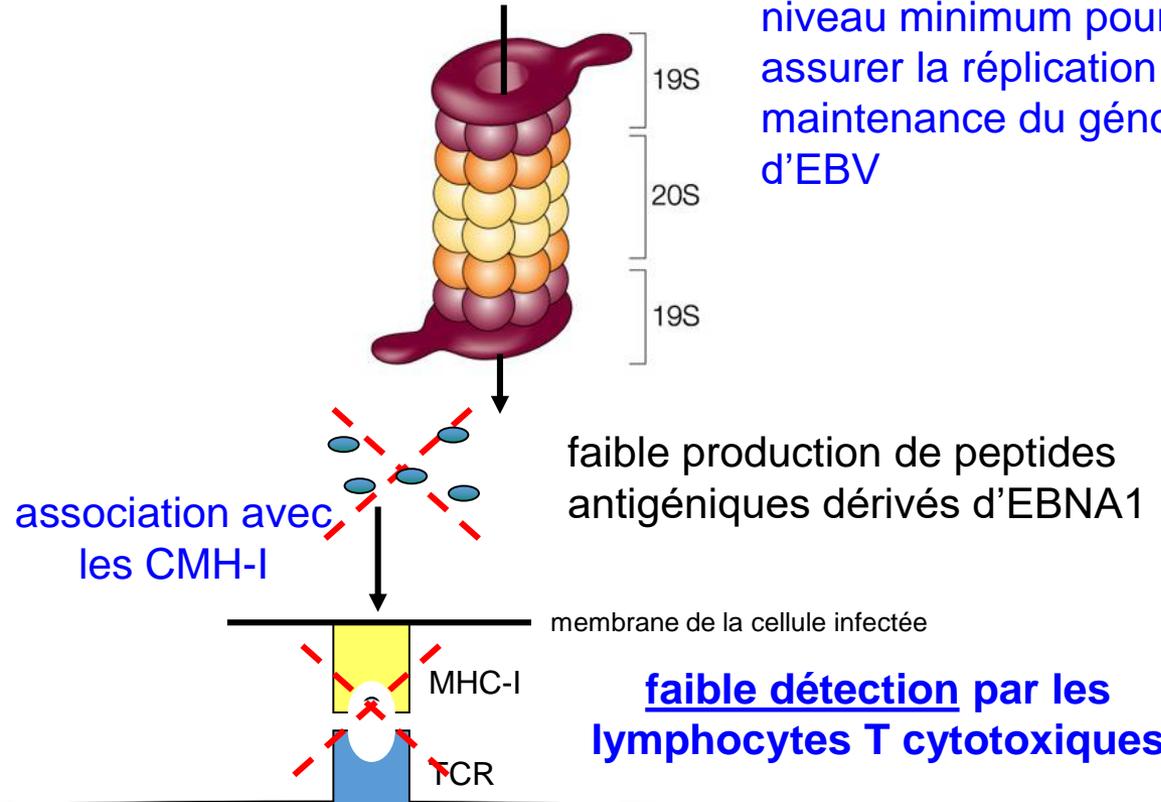
# inhibition de la production de peptides antigéniques par le domaine GAr

Yin et al *Science* 2003 & Tellam et al *J Exp Med* 2004



→ EBV échappe au système immunitaire!

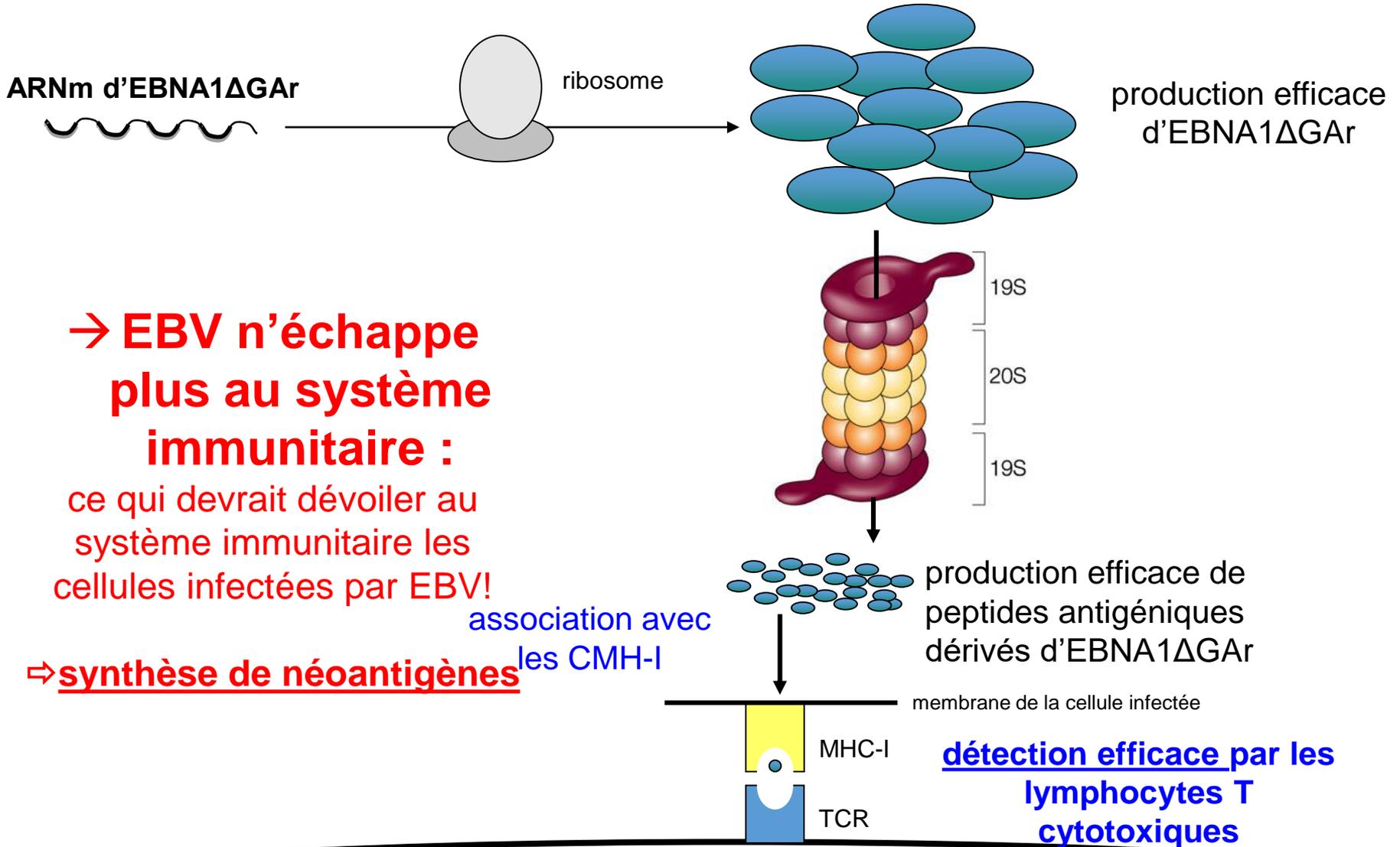
EBNA1 est exprimée au niveau minimum pour assurer la réplication & la maintenance du génome d'EBV



lymphocyte T cytotoxique

# inhibition de la production de peptides antigéniques par le domaine GAR

Yin et al *Science* 2003 & Tellam et al *J Exp Med* 2004



→ **EBV n'échappe plus au système immunitaire :**

ce qui devrait dévoiler au système immunitaire les cellules infectées par EBV!

⇒ **synthèse de néoantigènes** association avec les CMH-I

lymphocyte T cytotoxique

interférer avec la capacité de GAr à inhiber la traduction de son propre ARNm : une nouvelle piste thérapeutique pour traiter les cancers liés à EBV (dans lesquels ~100% des cellules tumorales sont infectées)

preuve-de-principe : l'infection par 1 souche d'EBV exprimant EBNA1 $\Delta$ GAr conduit à une forte production d'EBNA1 $\Delta$ GAr & à une réponse T efficace

Levitskaya et al *Nature* 1995; Yin et al *Science* 2003; Apcher et al *PLOS Pathogens* 2010

la seule possibilité pour du criblage haut-débit est un **test cellulaire basé sur un système de lecture simple** (permettant également de réaliser des criblages génétiques) : d'après des évidences indirectes de la littérature la levure apparaissait comme une bonne option Heessen et al *FEBS Lett* 2003

développement d'un modèle levure pour  
suivre l'inhibition GAr-dépendante de la traduction :

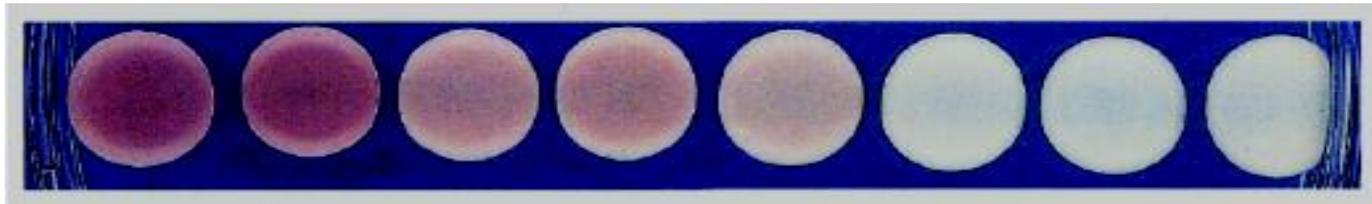
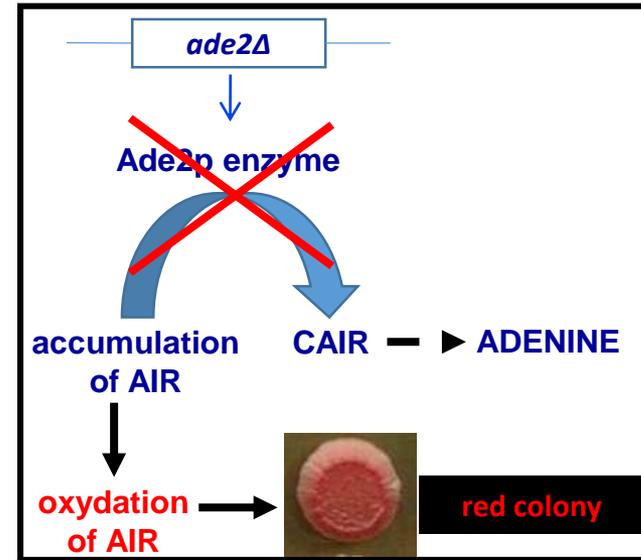
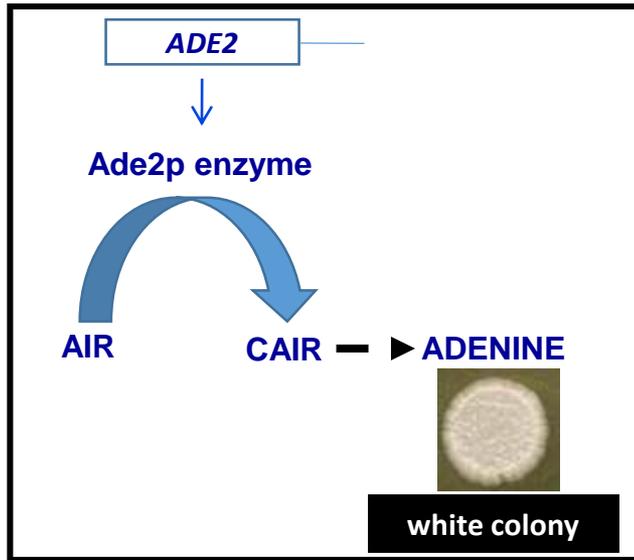
- criblage pharmacologique (drogues candidates)
- criblage génétique (mécanismes physiopathol.)

# développement d'un modèle levure pour suivre l'inhibition GAR-dépendante de la traduction (1)

▪ la protéine de levure Ade2p est utilisée comme rapportrice :

→ protéine très stable (comme EBNA1)

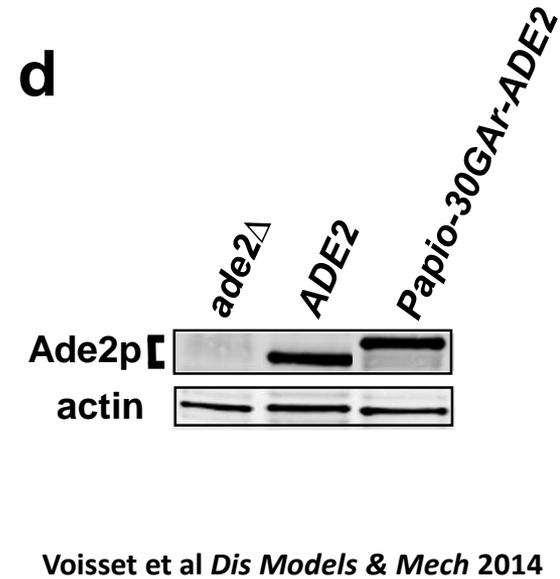
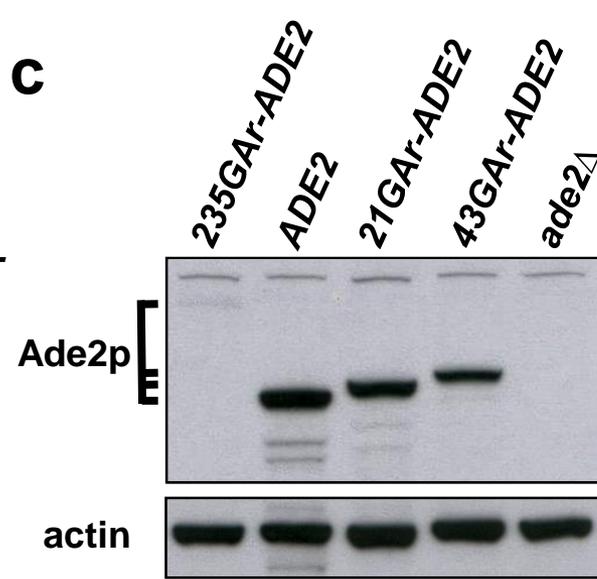
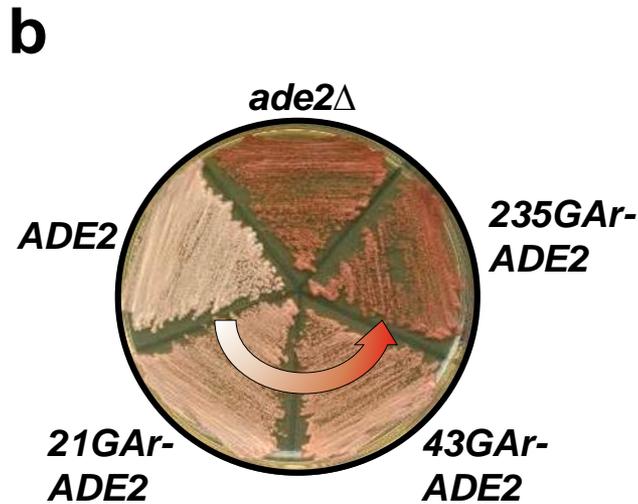
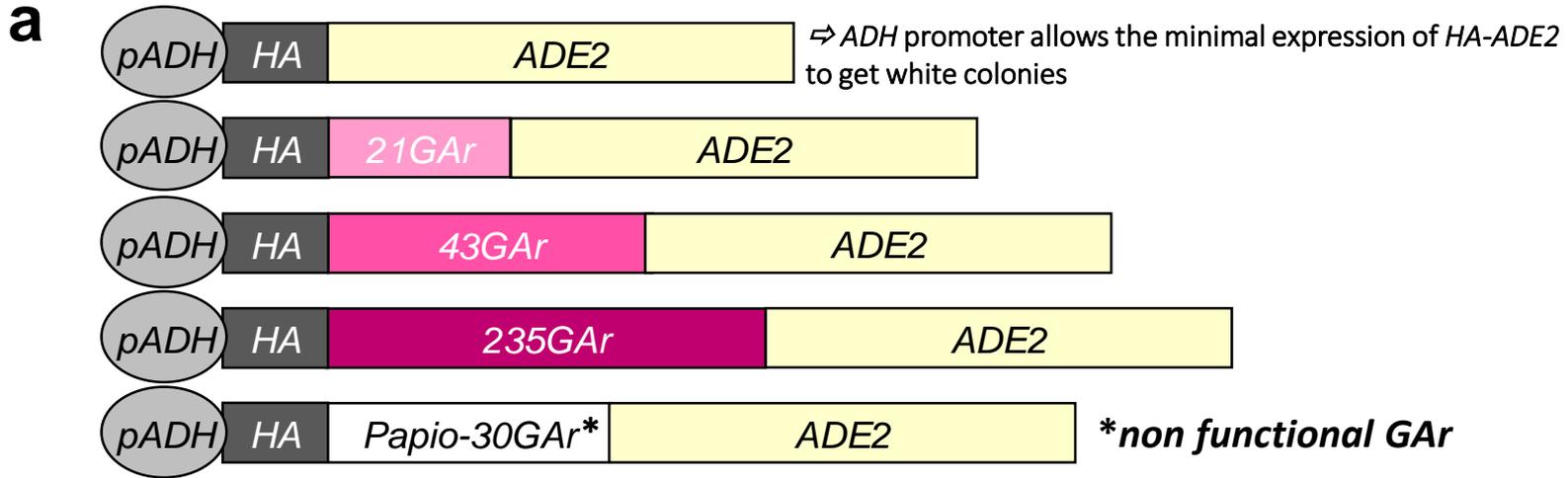
→ un système colorimétrique permet d'estimer très simplement son expression (rouge/blanc)



Colour intensity

Ade2 expression level

# développement d'un modèle levure pour suivre l'inhibition GAR-dépendante de la traduction (2)



Voisset et al *Dis Models & Mech* 2014

→ comme pour EBNA1 dans les cellules humaines infectées par EBV, GAR affecte la traduction en *cis* & plus GAR est long, plus le niveau d'Ade2p est réduit & un GAR non fonctionnel n'a pas d'effet...

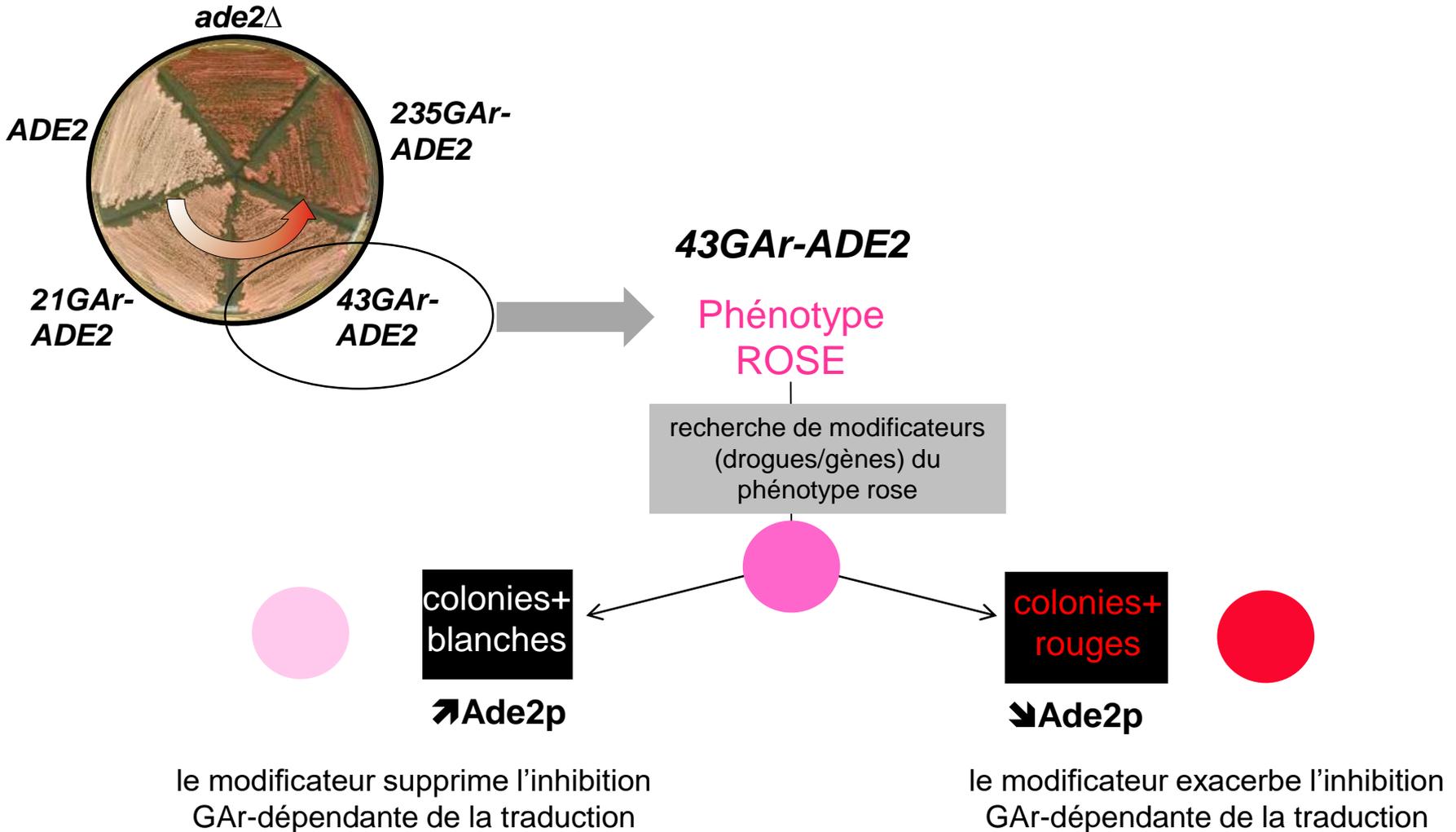
développement d'un modèle levure pour suivre l'inhibition GAR-dépendante de la traduction (3)

**Cl. :** en levure comme dans les cellules humaines, GAR auto-limite la traduction de son propre ARNm de façon longueur-dépendante :

⇒ **conservation du mécanismes & des gènes de la cellule hôte impliqués**

**ainsi ce modèle levure semble pertinent pour des criblages pharmacol.& génét.**

utilisation de ce modèle levure pour chercher des modificateurs de l'inhibition GAR-dépendante de la traduction

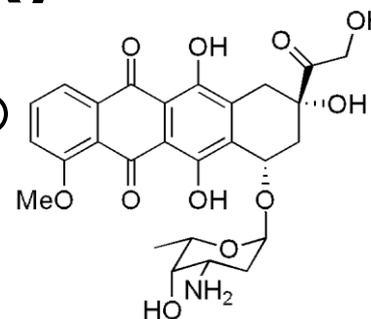


- criblage pharmacologique

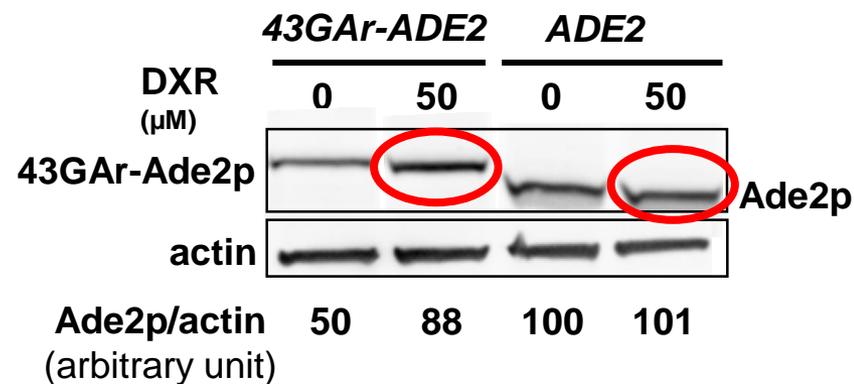
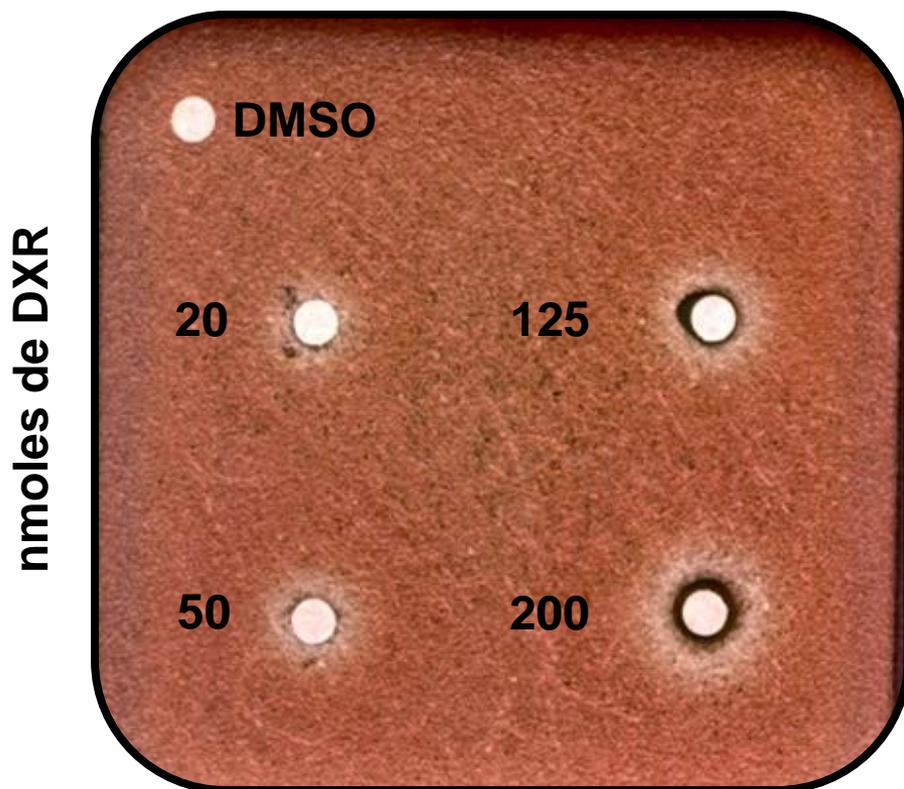
# la doxorubicin (DXR)

isolée à partir de la Prestwick Chemical Library®

(1,200 molécules ayant déjà une AMM)

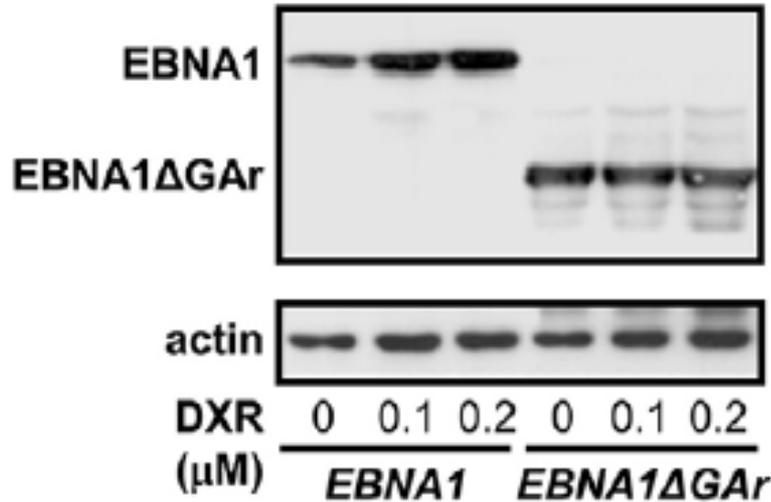


**43GAR-ADE2**

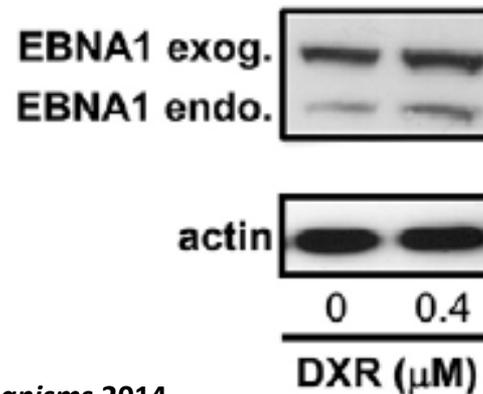


→ la DXR augmente le niveau de la protéine Ade2p de façon GAR-dépendante

# la DXR augmente le niveau d'EBNA1 de façon GAR-dépendante

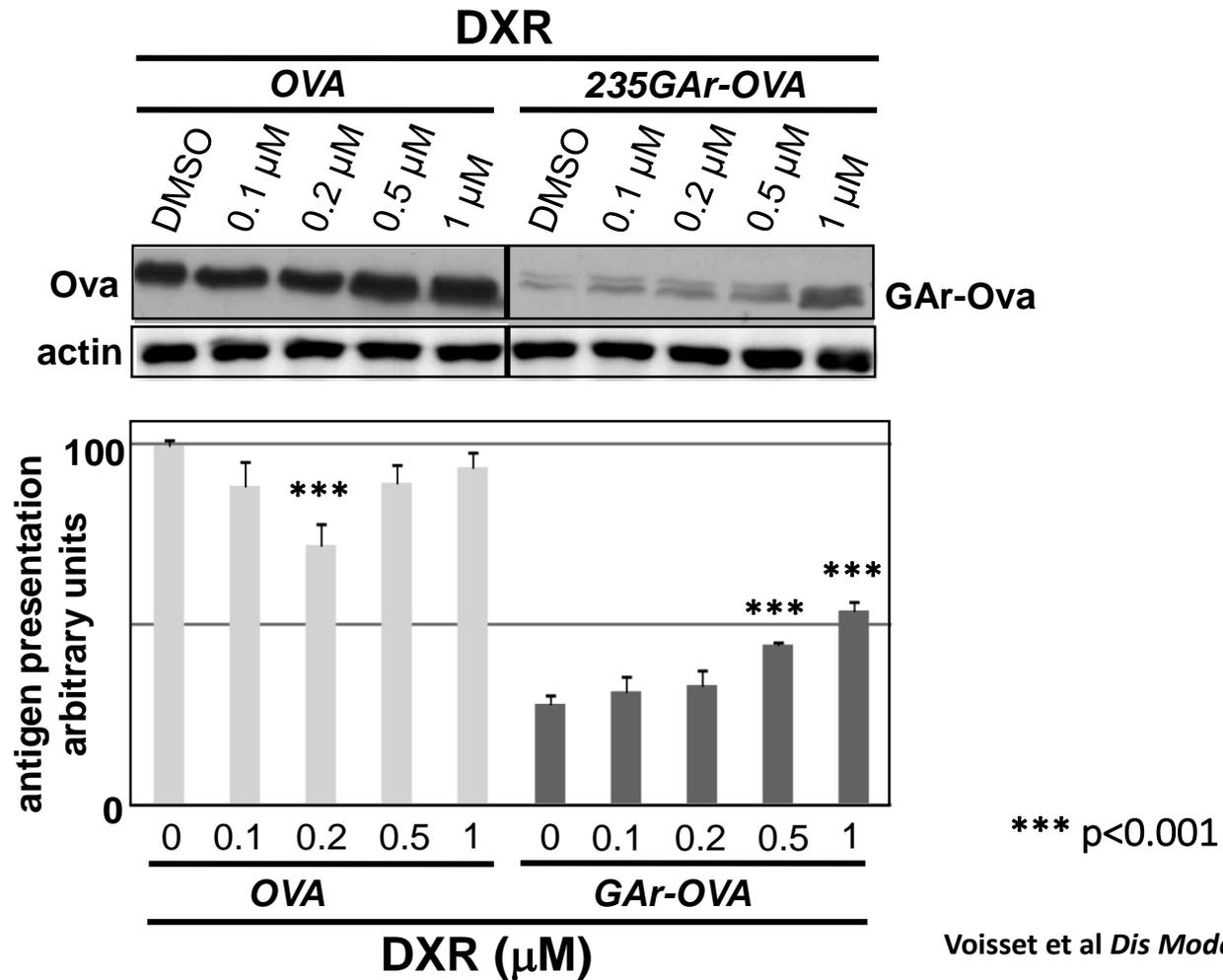


EBNA1 or EBNA1ΔGAR transfecté dans des cellules HEK 293T



EBNA1 endogène dans des cellules Raji (cellules de lymphome de Burkitt infectées par EBV)

# la DXR augmente la presentation antigénique par le CMH de class I de façon GAr-dépendante



Voisset et al *Dis Models & Mech* 2014

→ comme dans le modèle levure, l'effet de la DXR est GAr-dépendant en *T-cell assay* & en *western blot*

la doxorubicin (DXR) valide notre modèle levure & suggère que les facteurs de la cellule hôte impliqués dans l'échappement immunitaire GAR-dépendant d'EBV sont conservés fonctionnellement de la levure à l'Homme

⇒ criblage génétique pour identifier ces facteurs conservés

- criblage génétique

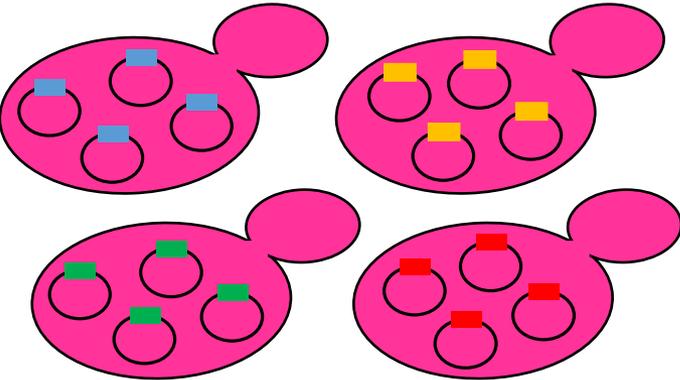
# principe du criblage génétique :

rechercher des gènes de levure dont la surexpression interfère avec l'effet inhibiteur de GAR sur la traduction

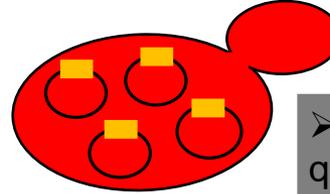


banque d'ADN génomique de levure sur plasmides multicopies 2  $\mu$  (~50-100 copies par cellule de levure)

transformation d'une souche 43GAR-ADE2



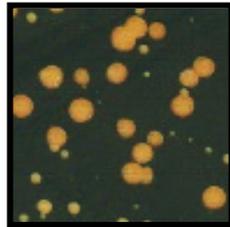
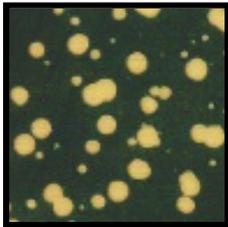
**colonies + rouges** : l'effet inhibiteur de GAR sur la traduction est exacerbé par le gene surexprimé



➤ identification of du gène *NSR1* qui code la nucléoline de levure

ADE2

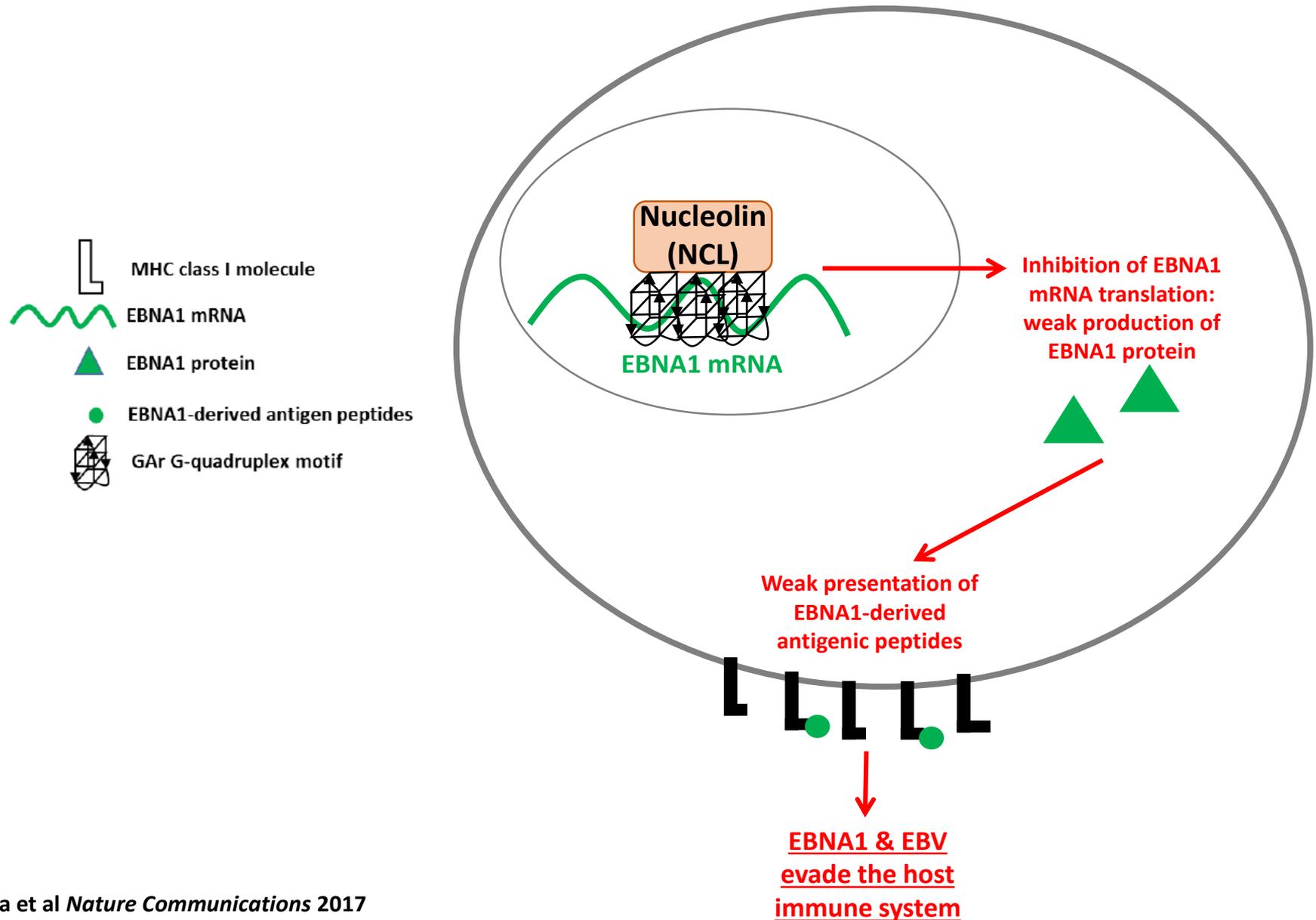
43GAR-ADE2



quand elle est surexprimée la nucléoline de levure Nsr1 exacerbe l'effet inhibiteur de GAR sur la traduction

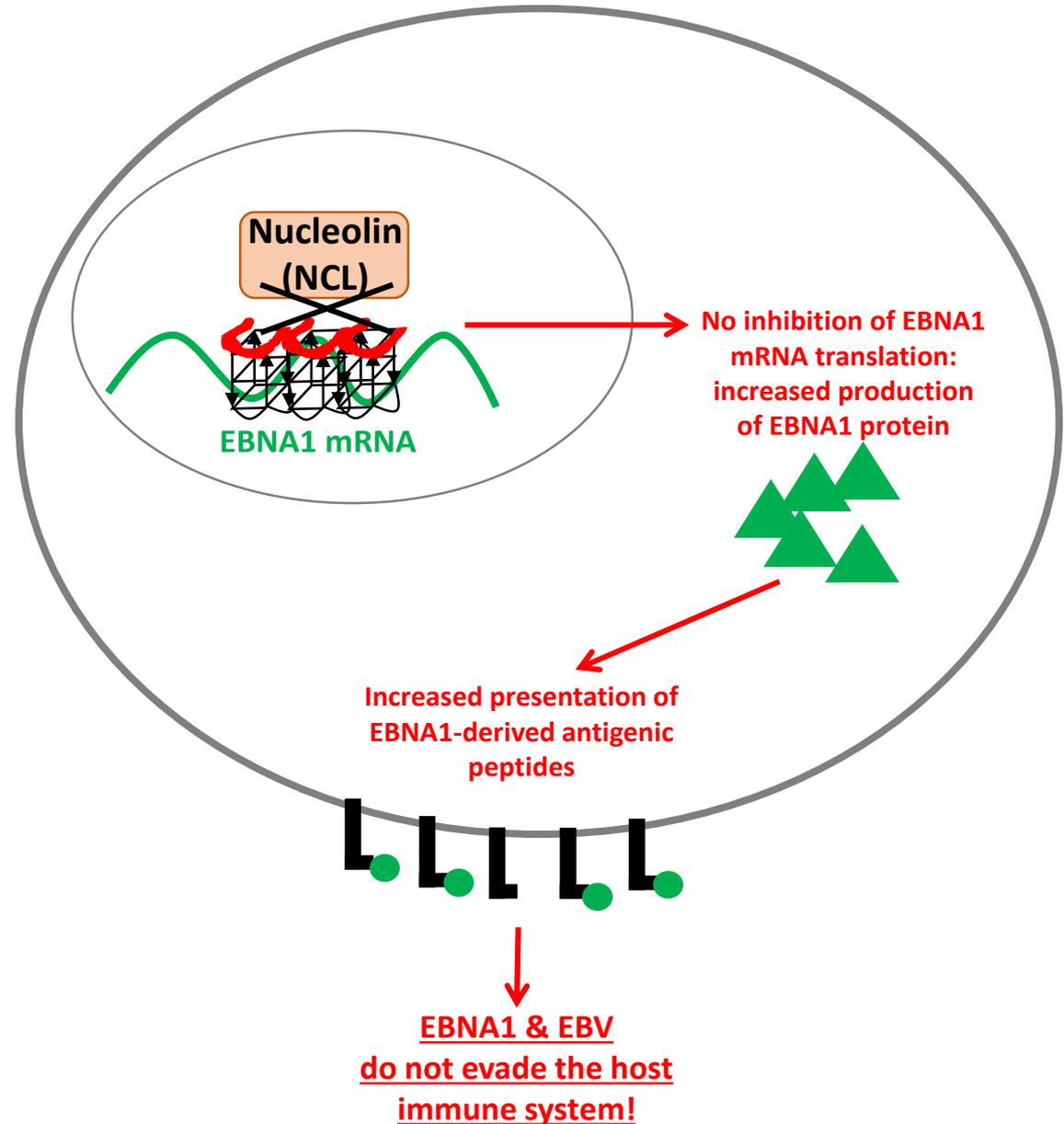
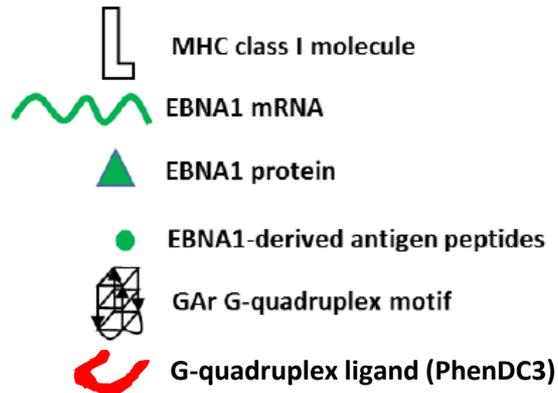
# Modèle (1) : rôle de l'interaction nucléoline/G4 de l'ARNm d'EBNA1

## Resting memory B cell



# Modèle (2) : effet de ligands de G4 rôle de l'interaction nucléoline/G4 de l'ARNm d'EBNA1

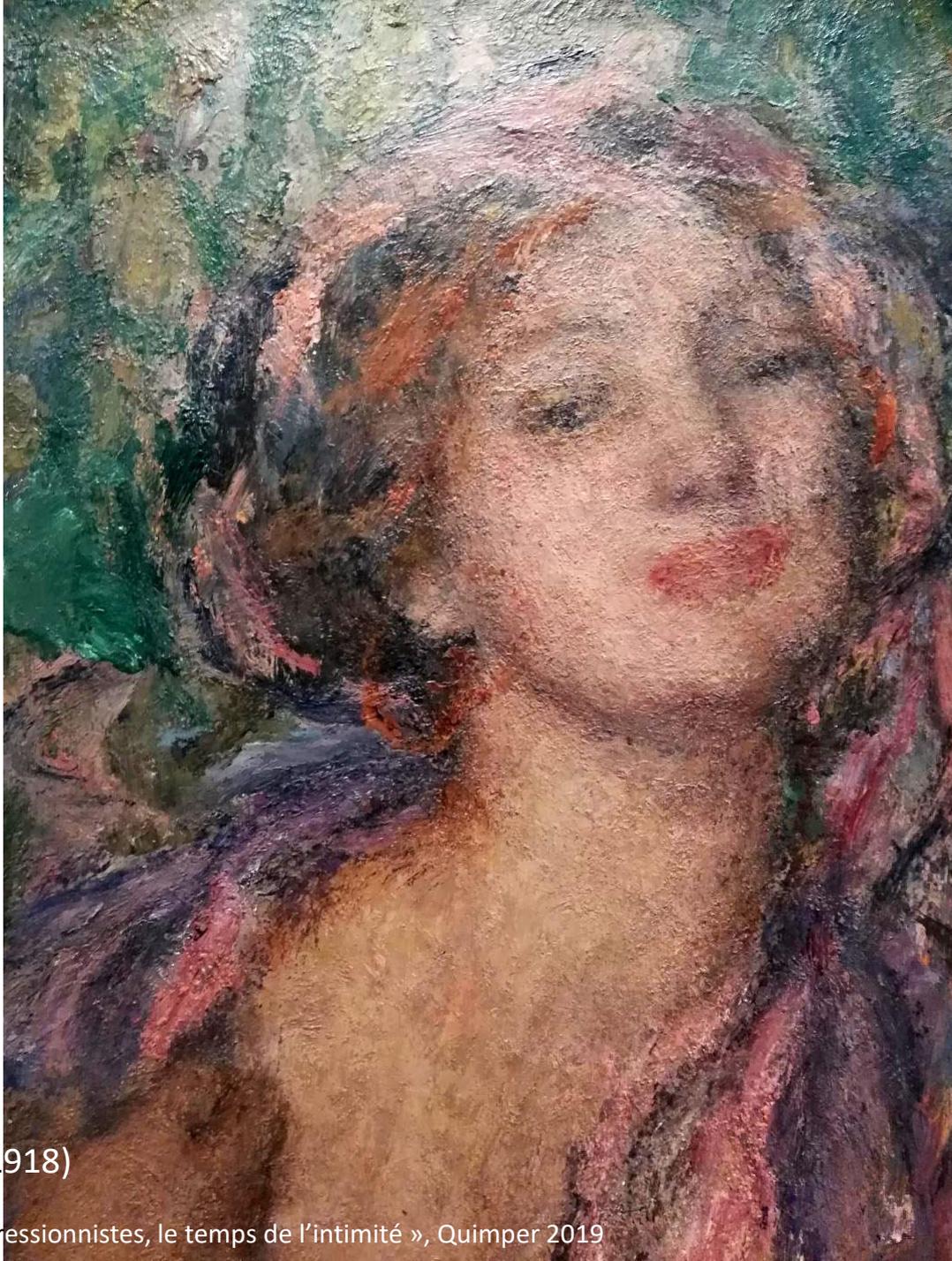
## Resting memory B cell





## Conclusion : la levure un bon système pour des approches de chémobiologie de maladies humaines



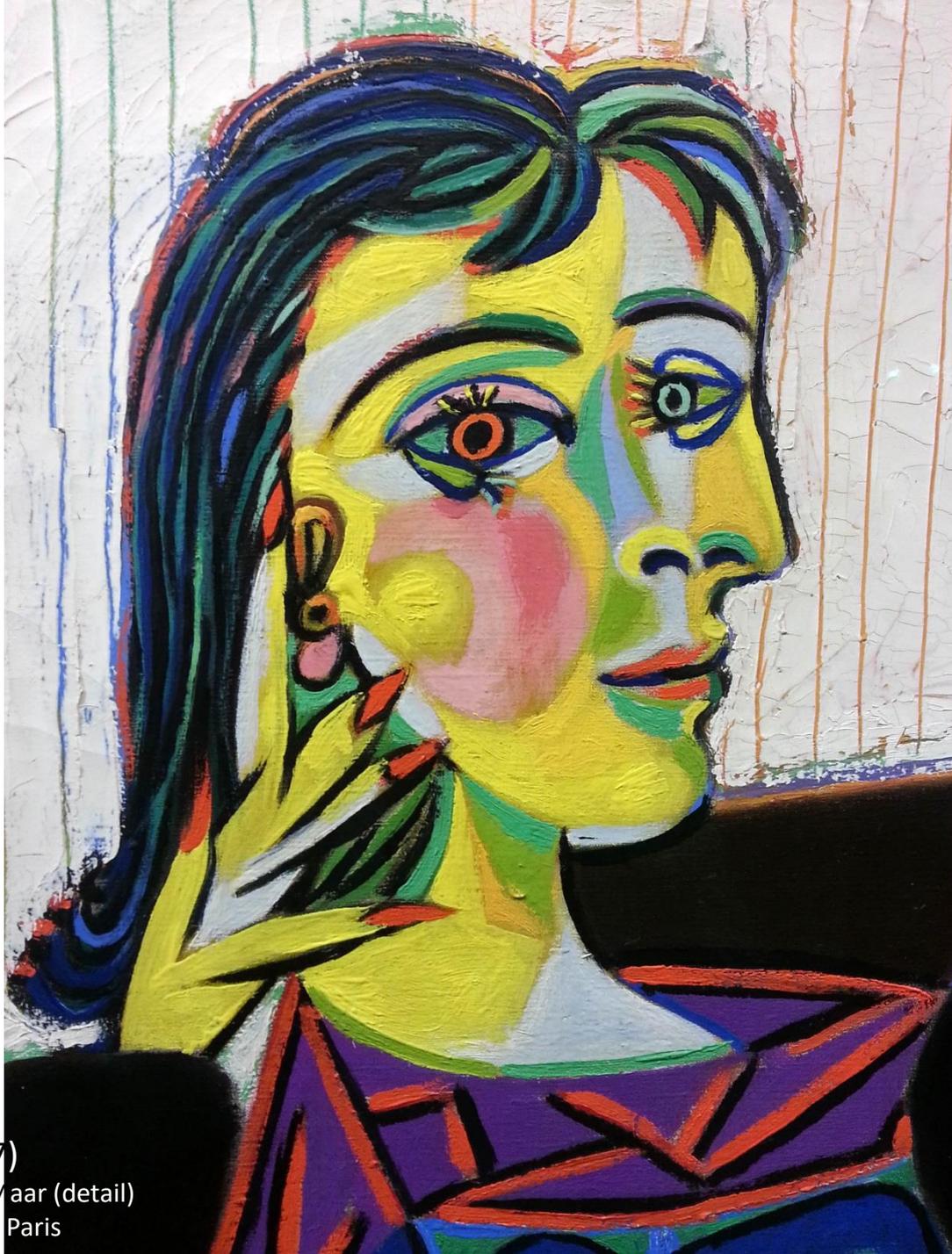


**Merci pour  
votre  
attention...**

**Edmond Aman-Jean (1918)**

Rêverie (detail)

Exposition « Les derniers Impressionnistes, le temps de l'intimité », Quimper 2019



**Merci pour votre  
attention...**

Picasso (1937)  
Portrait of Dora Maar (detail)  
Picasso Museum, Paris