

## Apport des approches « omiques » dans la compréhension des mécanismes de résistance à des thérapeutiques anticancéreuses

Stéphan Vagner et Caroline Robert

Dans le cas des cancers, les approches « omiques » réalisées sur des échantillons de patients se sont révélées essentielles pour définir des biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou théranostiques.

Au cours du traitement anticancéreux, l'émergence des résistances est un problème majeur. Les approches « omiques » deviennent alors des outils puissants pour définir de nouveaux mécanismes de résistance à des thérapies anticancéreuses permettant d'adopter de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, il est important de pouvoir repérer le plus tôt possible les rechutes. Un des problèmes de l'imagerie est que la tumeur qui a récidivé ou la métastase distante doivent avoir atteint une taille suffisante pour être visibles. Une solution possible consiste alors à analyser l'ADN tumoral circulant (ADNtc) dans le sang. La présence d'ADNtc permet de révéler l'existence d'une tumeur, sa nature (profil mutationnel) et son évolution (apparition de nouvelles mutations). Cette analyse doit permettre de faire des choix thérapeutiques adaptés dans le cas où la tumeur a acquis des mutations qui la rendent résistante au traitement initial et qui touchent des cibles thérapeutiques caractérisées.

Lorsque la tumeur résistante ne possède pas de mutations caractérisées et susceptibles d'être ciblées par un ensemble de solutions thérapeutiques, une recherche dite « translationnelle » (ou recherche de transfert) peut se mettre en place afin de sélectionner de nouvelles molécules ayant une activité antitumorale. Ceci se fait dans plusieurs types de modèles précliniques sur lesquels on peut réaliser un profilage moléculaire utilisant les approches décrites dans le [chapitre 1](#).

Des lignées cellulaires dérivées de tumeurs et injectées dans des souris immunodéprimées peuvent former des tumeurs appelées « xénogreffes » sur lesquelles est évaluée l'activité de ces molécules. Cependant, l'efficacité antitumorale de ces molécules sur de telles xénogreffes et sur les tumeurs des patients n'est pas toujours corrélée. Des modèles de xénogreffe dérivée de la tumeur du patient (PDX pour *Patient-Derived Xenograft*), dans lesquels un fragment tumoral humain est rapidement transplanté chez des souris immunodéprimées, sont plus difficiles à mettre en place mais sont mieux prédictifs de la réalité clinique en oncologie car les PDX conservent une morphologie et une hétérogénéité tumorale proches de la tumeur d'origine du patient. Les PDX constituent réellement des « avatars » de la tumeur des patients mais il reste que l'évaluation de thérapies impliquant la réponse de l'environnement tumoral est limitée par le fait que le micro-environnement est celui de la souris portant le PDX. Finalement, le développement de structures multicellulaires tridimensionnelles appelées « organoïdes », bien que techniquement complexes et difficiles à établir, s'est avéré précieux pour la recherche fondamentale et le criblage de molécules à visée thérapeutique. Ces masses cellulaires microscopiques sont formées à partir de prélèvements tumoraux et semblent reproduire l'organisation et la micro-anatomie tumorale. Grâce à ces différents modèles, pour lesquels on réalise des banques (PDX, organoïdes) pour tester les médicaments comme on le ferait dans des essais cliniques, le fossé entre les études *in vitro* et la réalité du patient se réduit significativement.

de la charge virale plasmatique se décompose en plusieurs phases (Figure 6) :

- la première chute dure 2 semaines : elle est exponentielle et représente l'élimination du virus plasmatique (demi-vie : 6 heures) et des cellules infectées produisant le virus, principalement les LTCD4+ activés (demi-vie : 2 jours) ;
- s'ensuit une seconde baisse (environ 6 mois), plus lente, correspondant à la seconde population de cellules infectées telles que les macrophages (ayant une demi-vie de 2 semaines) ;
- alors que le virus ne semble plus présent dans le sang, l'arrêt de la multithérapie se traduit par un rebond viral. Une hypothèse est alors

émise, celle d'une persistance du virus dans un autre compartiment de l'organisme. C'est ainsi qu'en 1997 l'équipe de R. Siliciano suspecte l'existence d'un petit groupe de cellules dormantes contenant le VIH intégré dans son ADN. On parlera de « réservoirs » latents viraux, et cela correspond à la troisième phase de diminution virale plasmatique, presque stable, de durée inconnue, avec une virémie plasmatique, avoisinant 1 copie d'ARN viral/mL. Cette troisième phase correspondrait à une faible diminution de la population de cellules réservoirs, c'est-à-dire des cellules infectées ayant une demi-vie extrêmement longue (plusieurs dizaines d'années) en phase de quiescence (phase G0).

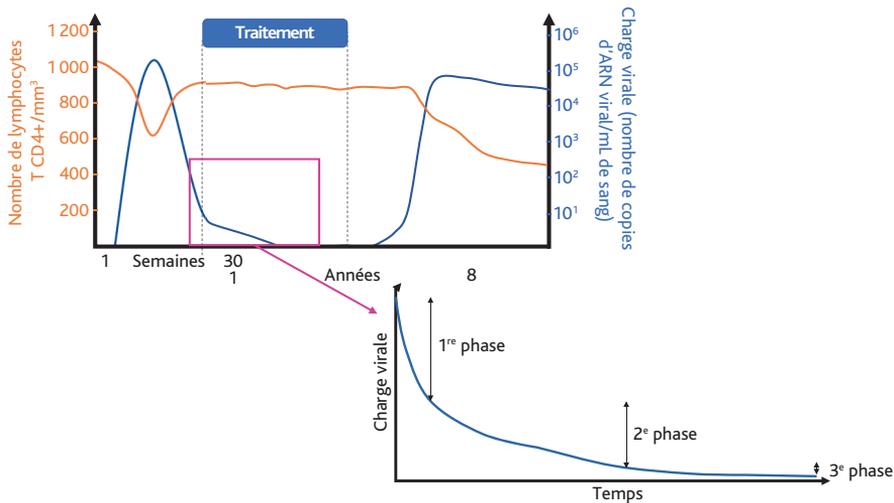


Figure 6 / Évolution de l'infection par le VIH suite à l'action du traitement antirétroviral et de son arrêt.

En 1999, Robert Siliciano revient alors sur les prévisions émises lors de la découverte de la multithérapie, estimant nécessaire une prise de médicaments anti-VIH pendant environ 60 ans pour une élimination complète du virus de l'organisme. Un réservoir viral est donc un type cellulaire dans lequel une réplication virale compétente persiste beaucoup plus longtemps que dans l'ensemble des cellules infectées. Par ailleurs, la production virale peut être réactivée dans ces cellules par de nombreux stimuli cellulaires et constitue une source permanente de nouveaux virions en cas d'arrêt du traitement (Figure 7).

Aujourd'hui, la communauté scientifique se tourne vers la recherche d'une cure totale, sous-entendant l'éradication des réservoirs viraux. Malheureusement, le virus intégré dans l'ADN ne peut pas être pris pour cible par les antirétroviraux et, ainsi, y trouve refuge, restant *a priori* intouchable. Plus de 30 ans ont déjà été consacrés à la recherche d'un traitement définitif contre le SIDA ayant pour but de cibler la totale éradication du virus du corps humain. Cet objectif reste encore aujourd'hui hors d'atteinte.

## Atteinte des réservoirs

Les traitements inhibent bien la réplication du VIH mais n'éradiquent pas le virus. Deux mécanismes majeurs contribuent à cette persistance virale :

- le VIH peut toujours se répliquer, à de faibles niveaux, dans des réservoirs anatomiques dans lesquels les médicaments antirétroviraux peuvent ne pas diffuser correctement, tels que le cerveau, la moelle osseuse, le rein... ;
- le second mécanisme correspond à la mise en place, d'un petit groupe de cellules infectées ayant une longue durée de vie et à infection latente conférant au virus une niche cellulaire qui assure son maintien pendant des décennies. Le principal réservoir cellulaire identifié est constitué des LTCD4+ mémoires quiescents.

Actuellement, le développement de nouvelles molécules vise à interférer avec ces mécanismes de latence, ce qui permettrait de réduire la taille du réservoir viral, une condition préalable à la rémission totale. Les réservoirs viraux constituent ainsi une cible thérapeutique majeure.

## Mécanisme de latence

La majorité des LT latents infectés proviennent de l'infection de LTCD4+ activés qui retournent à l'état de quiescence en tant que cellules mémoires. Les mécanismes de latence moléculaire du VIH dans ces LTCD4+ quiescents sont complexes et peuvent inclure : l'absence de facteurs de transcription, l'absence d'expression de facteurs de transcription du VIH ou encore des changements épigénétiques tels que la condensation de la chromatine par les histones et les méthylations de l'ADN qui suppriment l'expression des gènes *VIH-1*. Puisque ces cellules expriment ainsi peu ou pas de molécules d'ARN et de protéines virales, elles sont difficiles à identifier par le système immunitaire. Pour aggraver les choses, la durée de vie des LTCD4+ quiescents est considérablement augmentée,

avec une demi-vie de plusieurs années. En outre, le groupe de LTCD4+ infectés de manière latente est également maintenu par la prolifération cellulaire clonale (homéostasie) (Figure 7). Lors de l'arrêt du traitement, ces cellules infectées de manière latente peuvent redevenir actives sur le plan transcriptionnel, relançant la réplication du VIH dans l'organisme.

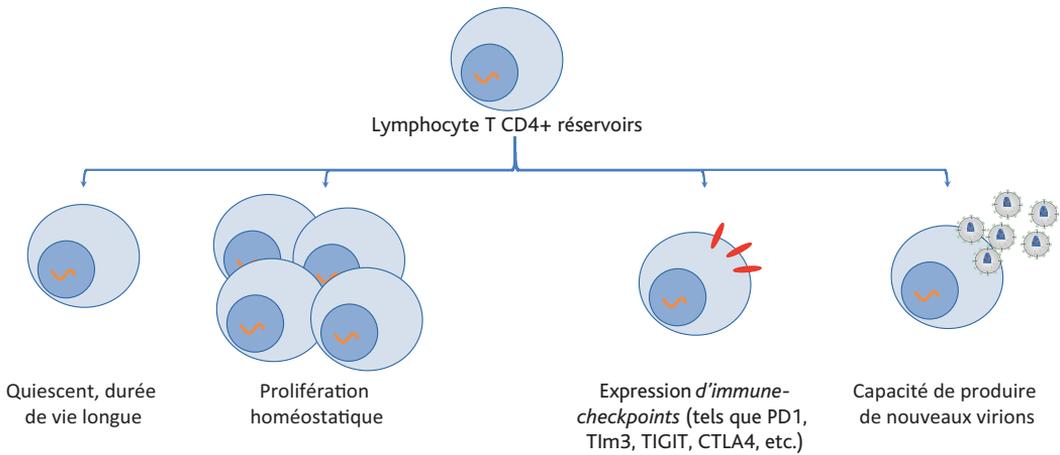
## Une aiguille dans une botte de foin

Afin de mieux examiner le réservoir de VIH latent dans une petite fraction de LTCD4+ au repos et de développer de nouvelles stratégies pour faciliter son élimination, l'identification de biomarqueurs spécifiques à la surface de ces cellules est devenue une haute priorité scientifique. Malgré l'absence d'expression génique virale, la cellule a pu subir des changements à sa surface en réponse à l'activation immunitaire associée à la pénétration du VIH et son intégration, ce qui pourrait permettre son identification comme une signature indirecte.

Étant donné que le système immunitaire ne parvient pas à éradiquer l'infection rapidement, de nombreuses voies inhibitrices sont initiées pour freiner la réponse immunitaire et prévenir des dommages sur les tissus : ce processus est appelé « épuisement ». La meilleure description de ces voies inhibitrices est l'inhibition relayée par plusieurs marqueurs d'épuisement (ou *immune-checkpoints*) comme CTLA-4, PD-1, Tim-3 ou TIGIT (Figure 7). L'expression de ces récepteurs inhibiteurs a été mise en évidence sur des cellules spécifiques du virus et est associée à un dysfonctionnement de la réponse cellulaire et à une charge virale accrue.

## COMMENT IDENTIFIER LES CELLULES RÉSERVOIRS DU VIRUS ?

Au cours de la dernière décennie, les avancées dans l'identification des réservoirs du VIH ont donné des résultats remarquables,



**Figure 7 /** Représentation des 4 conditions essentielles afin qu'une cellule infectée par le virus soit un potentiel réservoir.

permettant d'imaginer à moyen terme un traitement curatif chez les patients atteints par le virus. Par conséquent, il devient essentiel d'élargir notre compréhension des mécanismes de persistance virale. Cela implique des analyses approfondies des cellules infectées par le virus. L'étude de ces cellules reste très complexe sur des échantillons souvent limités et précieux nécessitant des

technologies monocellulaires capables de quantifier de nombreux paramètres avec un minimum de cellules.

## ● De la cytométrie en flux à la cytométrie de masse : considérations techniques

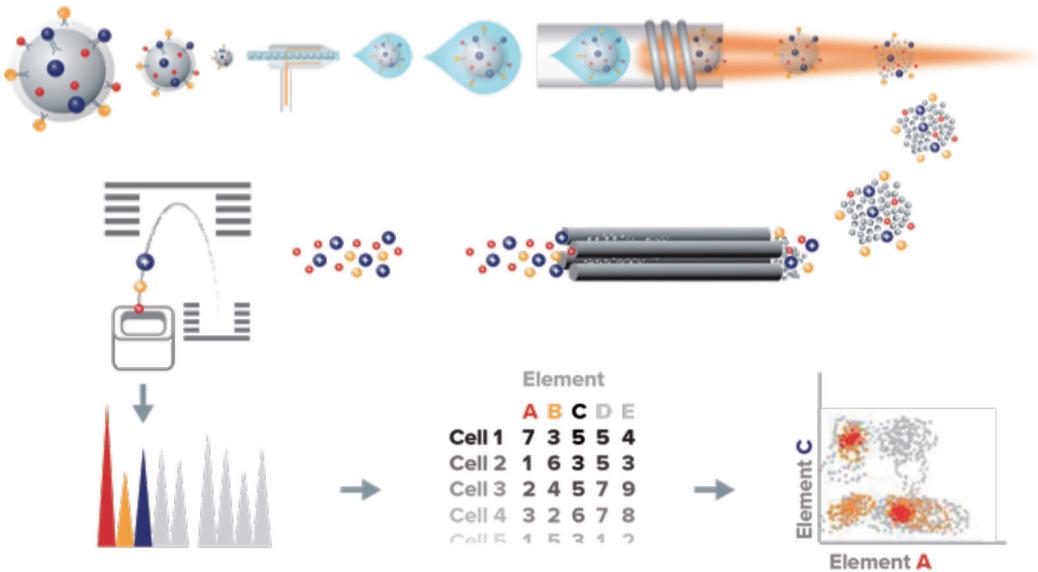
Illustrée par l'utilisation omniprésente de la cytométrie en flux dans les recherches en immunologie, l'analyse unicellulaire est depuis longtemps une obsession des immunologistes cellulaires. En effet, la cytométrie en flux est une technique biologique qui permet l'étude multiparamétrique, quantitative et qualitative, de cellules isolées en suspension entraînées par un flux liquide. L'expansion et le succès de la cytométrie en flux sont indissociables de la production d'anticorps monoclonaux, mise au point par Köhler et Milstein en 1975 et de la possibilité d'y fixer de façon covalente différentes molécules fluorescentes. La cytométrie en flux actuelle permet une collection importante de données (plus de 20 marqueurs protéiques sont identifiables de manière simultanée), permettant des analyses fines de l'échantillon.

### À RETENIR

L'une des principales caractéristiques de l'infection chronique par le VIH est l'activation immunitaire persistante déclenchée dès les premiers stades de l'infection, suivie de l'apparition de phénomènes d'épuisement qui empêchent les cellules immunitaires de réagir. Cet état d'épuisement est caractérisé par une perte des fonctions effectrices des cellules immunitaires telles que la prolifération, la production de cytokines, ainsi que par le potentiel cytotoxique. L'importance des molécules d'épuisement repose donc sur la possibilité de restaurer la réponse immunitaire une fois que ces molécules sont bloquées, constituant une cible thérapeutique potentielle pour le traitement lors d'une infection par le VIH.



**Figure 8 /** Cytomètre de masse de 3<sup>e</sup> génération (Helios™).  
Avec l'aimable autorisation de Fluidigm.



**Figure 9 /** Processus du parcours cellulaire dans un cytomètre de masse.

Les cellules sont introduites dans le nébuliseur par un capillaire étroit. Lorsque les cellules sortent du nébuliseur, elles sont converties par un jet de gouttelettes, qui sont ensuite transportées dans le plasma où elles sont atomisées et ionisées. Le nuage ionique qui en résulte est filtré et sélectionné pour les ions de masse comprise entre 80 et 200 Da, puis cette masse est mesurée dans une chambre de vol. Les données sont ensuite converties pour pouvoir être analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse des données de cytométrie traditionnelle.

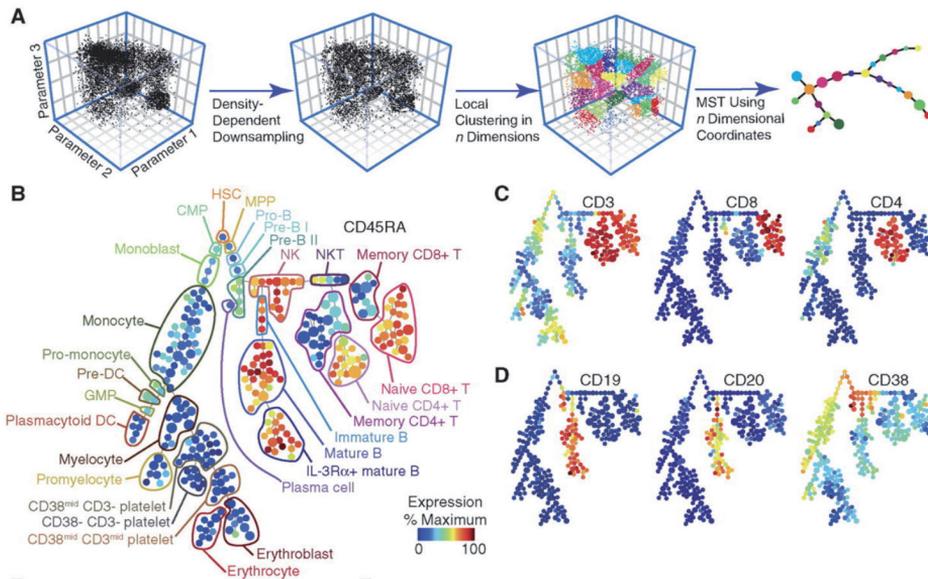
Avec l'aimable autorisation de Fluidigm.

utilisant l'intelligence artificielle ont dès lors été mises en place : l'analyse par "clusters" et l'analyse par réduction de dimensions.

## Analyse par clusters

Le but des algorithmes de "clustering" est de placer chaque cellule dans des ensembles distincts (*clusters*) en regroupant des populations de cellules ayant un phénotype similaire ou très proche. Les algorithmes de clustérisation fournissent un moyen objectif de

générer des données de grande dimension, cependant une part de subjectivité provient des paramètres qui définissent le nombre de *clusters* qui seront identifiés. Les résultats des regroupements peuvent en outre être problématiques car la résolution à l'échelle de la cellule unique est perdue. SPADE (*Spanning Tree Progression of Density Normalized Events*) a été l'une des premières méthodes utilisées pour l'analyse visuelle des données de haute dimension (Figure 10).



**Figure 10 /** Analyse par "clustering" SPADE.

SPADE relie des types de cellules immunitaires connexes dans un continuum multidimensionnel d'expression de marqueurs.

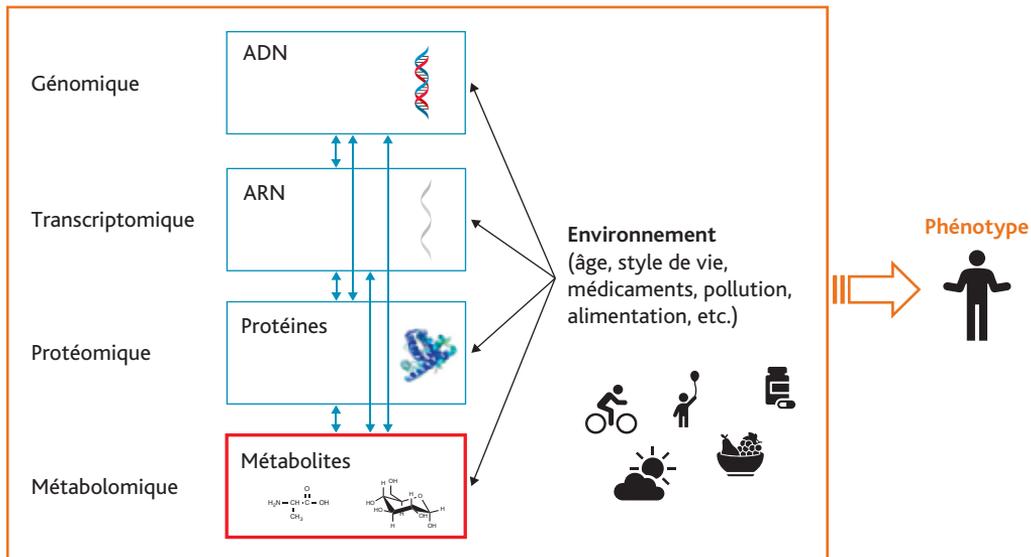
A. Les données sur les cellules individuelles sont échantillonnées en fonction de la densité afin de réduire le nombre total de cellules tout en maintenant la représentation de tous les phénotypes cellulaires. Les cellules voisines sont ensuite groupées par regroupement hiérarchique non supervisé. Les *clusters* résultants sont ensuite reliés formant un « arbre SPADE », qui est transformé en affichage en 2D.

B. Dans cet exemple, on observe la progression immunophénotypique dans la moelle osseuse humaine saine. Un arbre a été construit en utilisant 13 antigènes de surface cellulaire. La taille de chaque *cluster* de l'arbre indique la fréquence relative des cellules. La couleur des nœuds est mise à l'échelle de l'intensité médiane de l'expression des marqueurs dans chaque nœud. Les populations de cellules ont ensuite été annotées manuellement dans des « méta-clusters » encerclant des ensembles de *clusters* qui désignent des sous-ensembles indiqués.

C. Les expressions des marqueurs CD3, CD8 et CD4 sont mises en évidence, permettant de définir les différentes lignées de lymphocytes T.

D. Les expressions des marqueurs CD19, CD20 et CD38 sont mises en évidence, permettant de définir les lignées de lymphocytes B.

Tiré de Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, *et al.* Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Sciences* 2011 ; 332 : 687-96. © American Association for the Advancement of Science, 2011.



**Figure 1 / Relation entre les sciences « omiques ».**

La *génomique* est la science qui analyse l'ensemble des gènes constituant le génome. La *transcriptomique* est la science qui s'intéresse à l'analyse des ARN messagers ou transcriptome. La *protéomique* est la science qui analyse l'ensemble des protéines, c'est-à-dire le protéome. La *métabolomique* est la science qui analyse l'ensemble des métabolites ou métabolome.

champignons, bactéries...) possèdent un métabolisme représentatif de l'ensemble des réactions biochimiques qui mènent à l'utilisation (la production ou la consommation) de petites molécules, appelées « métabolites ». Les métabolites sont aussi bien des briques structurales élémentaires et essentielles des protéines (acides aminés), des acides nucléiques (nucléotides) qu'une source d'énergie (glucides) ou des éléments structuraux (lipides membranaires). Le nombre de métabolites connus chez l'homme a récemment augmenté de manière exponentielle : la version 4.0 de la base de données HMDB (*Human Metabolome DataBase*) contient 114 008 entrées de métabolites, dont des métabolites hydrophiles qui sont abondants ( $> 1 \mu\text{M}$ ) ou relativement rares ( $< 1 \text{nM}$ ) mais aussi les métabolites hydrophobes tels les lipides.

Les troubles métaboliques sont des perturbations du fonctionnement de l'organisme, notamment liées à l'accumulation dans les cellules, à des niveaux élevés, de substances normales ou pathologiques (lipides, glucides, etc.). Depuis l'antiquité, l'homme a cherché à

identifier et classer les pathologies pour mieux les soigner. Les premières traces connues de l'ère pré-métabolomique se retrouvent en Chine, 2 000 ans avant J.-C., où la présence de sucre dans les urines était observée grâce aux fourmis. En Égypte et en Grèce, 300 ans avant J.-C., on sentait et goûtait les urines. Toute une science naîtra ensuite de l'observation des urines, l'uroscopie, qui trouvera son apogée au Moyen-Âge avec, en particulier, les premières roues des urines pour classer les pathologies selon la couleur, l'odeur et la saveur des urines. Heureusement, les méthodes analytiques modernes sont arrivées, mais le principe reste le même : caractériser des pathologies par l'observation et la mesure de variations de marqueurs biologiques, dont les métabolites font partie.

Les développements technologiques récents permettent maintenant d'observer des mélanges complexes de métabolites et de quantifier l'activité métabolique (métabolomique) d'un individu à partir de fluides biologiques, de biopsies ou de cultures primaires de cellules [1]. Ainsi, l'analyse métabolomique apporte un regard pertinent, et à large

spectre, sur les conséquences de l'activité fonctionnelle d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe, voire d'un individu en relation avec son environnement. Elle permet une analyse qualitative et quantitative des dérivés terminaux des voies du métabolisme énergétique, anabolisme et catabolisme, et du métabolisme signalétique. Elle s'affranchit donc de la complexité des régulations transcriptomiques et protéomiques pour ne s'intéresser qu'au résultat des activités cellulaires.

La métabolomique reflète à la fois l'activité cellulaire et l'impact de l'environnement, un effet transverse qu'il est difficile d'appréhender autrement. Chez l'homme, l'expression des gènes, l'activité du microbiote et l'impact de l'environnement (pollution, style de vie, vieillissement, alimentation, etc.) s'expriment dans le métabolome, définissant alors le phénotype propre de chaque individu (Figure 2). Même dans le cas de vrais jumeaux, qui possèdent un patrimoine génétique identique, chacun aura un métabolome différent.

Un déséquilibre de la balance homéostatique peut traduire soit l'émergence d'une maladie, soit une exposition à de faibles quantités d'un ou plusieurs toxiques. Les symptômes associés à la pathologie sont alors l'empreinte d'un dérèglement important que l'organisme n'arrive plus à gérer et contrer. À titre d'exemple, la présence excessive de glucose dans le sang n'est pas forcément un signe pathologique, sauf si cela devient chronique chez la personne à jeun (patient diabétique). Certains métabolites apparaissent en quantité anormale et représentent alors des marqueurs de ce nouvel état biologique. Ces modifications du métabolisme précèdent généralement la survenue des symptômes de la maladie, ce qui fait de la métabolomique une technique innovante pour le diagnostic précoce d'un bon nombre de pathologies chez l'homme.

Différentes techniques analytiques du métabolome sont regroupées sous la même appellation (« métabolomique »). Il ne faut pas confondre « métabolomique » et « métabonomique », qui est l'étude du métabolome

complet d'un système biologique soumis à des perturbations (qu'elles soient pathologiques, environnementales...). La métabolomique est aujourd'hui plus un concept qu'une réalité parce qu'il n'y a pas de technique analytique suffisamment puissante pour produire le profil complet d'un système. Un concept dérivé de la métabolomique est la fluxomique, qui s'intéresse à l'étude des flux métaboliques à l'aide de produits marqués par un traceur radioactif ou luminescent. La lipidomique est une autre branche de la métabolomique qui se focalise sur un groupe de métabolites, les lipides (cf. chapitre 5).

Dès que ce fut possible, les premiers développements instrumentaux et technologiques ont été appliqués à l'analyse métabolomique de fluides biologiques tels que les urines et le sang. Dans ce contexte, les méthodes spectroscopiques les plus employées furent et demeurent la spectrométrie de masse (MS) dès 1913, et la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ( $^1\text{H}$ ), née plus tardivement en 1946.

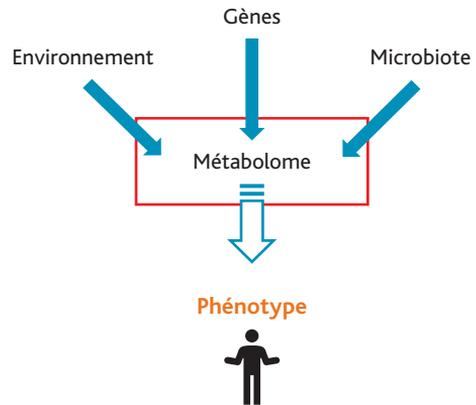


Figure 2 / Le phénotype de chaque individu est influencé par son environnement, ses gènes et son microbiote\*. Ainsi, une modification du métabolisme chez l'homme est le signe de la présence d'une pathologie, d'une exposition à un polluant, d'une modification d'activité...

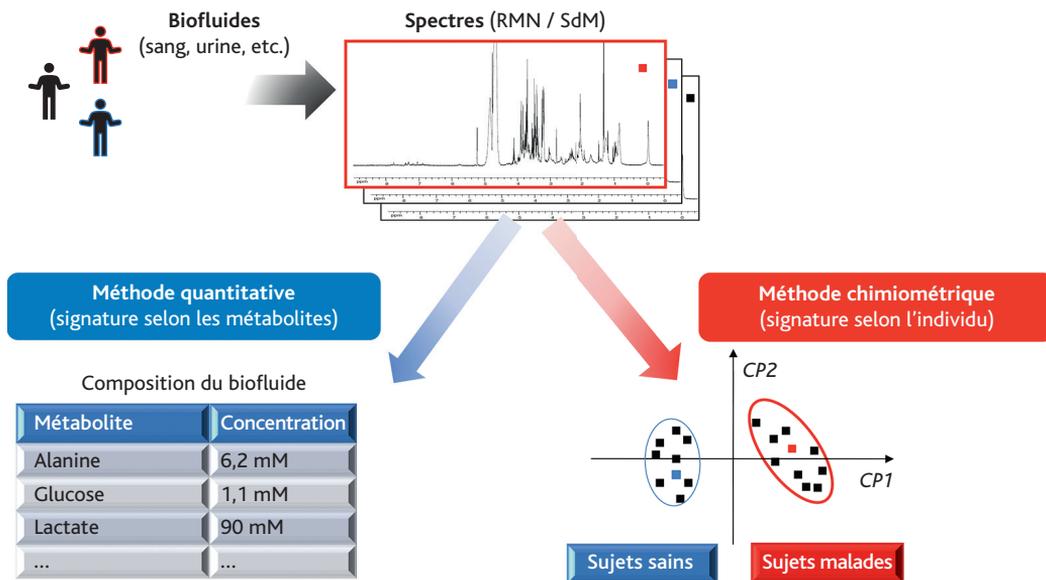
\* cf. *Le charme discret de l'intestin* par Giulia Enders paru en 2015 aux Éditions de Noyelles.

cologique. Cet aspect est clairement un critère important pour une large diffusion et une mutualisation des données de métabolomique par RMN appliquée à la santé ;

- *une méthode quantitative (méthode ciblée)* : des systèmes de mesure standardisée permettant une analyse hautement reproductible et, par conséquent, une validation de la méthode pour des études à grande échelle ont été mis au point récemment, ouvrant la voie pour une analyse simple et automatisée du signal mesuré en RMN, c'est-à-dire la détermination précise de la quantité du métabolite. Grâce à des outils

mathématiques et l'exploitation des bases de données de métabolites purs, il est devenu possible d'objectiver la composition quantitative en métabolites de différents fluides biologiques dans des situations physiopathologiques distinctes. Des rapports intelligibles pour les médecins sont générés, à l'image de ceux fournis par les laboratoires d'analyse médicale ;

- *une analyse non destructive* : l'échantillon n'est pas altéré par l'analyse RMN, ce qui permet sa réutilisation pour d'autres analyses complémentaires telles que la métabolomique ciblée par MS par exemple.



**Figure 3 /** L'analyse métabolomique permet de générer des données spectrales qui sont traitées selon deux méthodes principales.

- La **méthode quantitative** (à gauche) est une méthode ciblée de reconnaissance de signatures de métabolites, qui identifie de façon détaillée chaque métabolite et détermine sa quantité (relative ou absolue). Pour peu que l'on dispose d'une base de données suffisante, la quantification absolue indique si la valeur mesurée est normale pour chaque métabolite. Cette méthode donne un rapport d'analyse tel que celui que l'on obtient dans un laboratoire d'analyse médicale et identifie des marqueurs de pathologie.

- La **méthode chimiométrique** (à droite) est une méthode non ciblée qui donne une signature de maladies avec un aperçu rapide et global du métabolisme de chaque individu par un profil représenté par un point sur une carte dont les axes sont des composantes principales (CP). Cette méthode de classification permet de connaître l'appartenance d'un individu à un groupe possédant les mêmes caractéristiques métaboliques et d'identifier, par exemple, les groupes de patients possédant la même pathologie.

## ANALYSE MÉTABOLOMIQUE PAR RMN DES PORPHYRIES AIGÜES INTERMITTENTES

### ● Analyse multivariée supervisée

L'analyse du métabolome d'une série d'urines de patients PAI et PCT par une méthode d'analyse multivariée supervisée (OPLS-DA) permet d'identifier les variables qui expliquent au mieux la variance d'un groupe présélectionné. Le modèle produit une discrimination claire entre les patients atteints de porphyries différentes (PAI vs PCT) et les patients PAI avant et après traitement par de l'hème-arginate (Figure 7A).

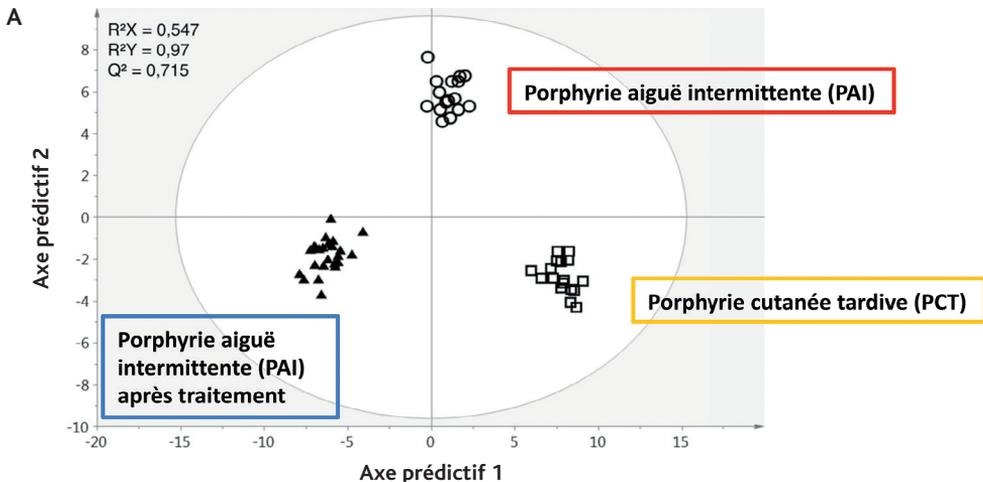
Le modèle génère des variables discriminantes, également appelées *Variables of Influence in the Projection* (VIP) (Figure 7B), parmi lesquelles figurent le PBG (déplacements chimiques à 6,69, 4,2 et 4,17 ppm) et ALA (déplacements chimiques à 4,12 et 2,82 ppm). Ces composés sont identifiés en tant que principales variables responsables de la discrimination entre les trois groupes de patients, définissant la RMN  $^1\text{H}$  comme une méthode robuste pour le diagnostic de la PAI lors des crises.

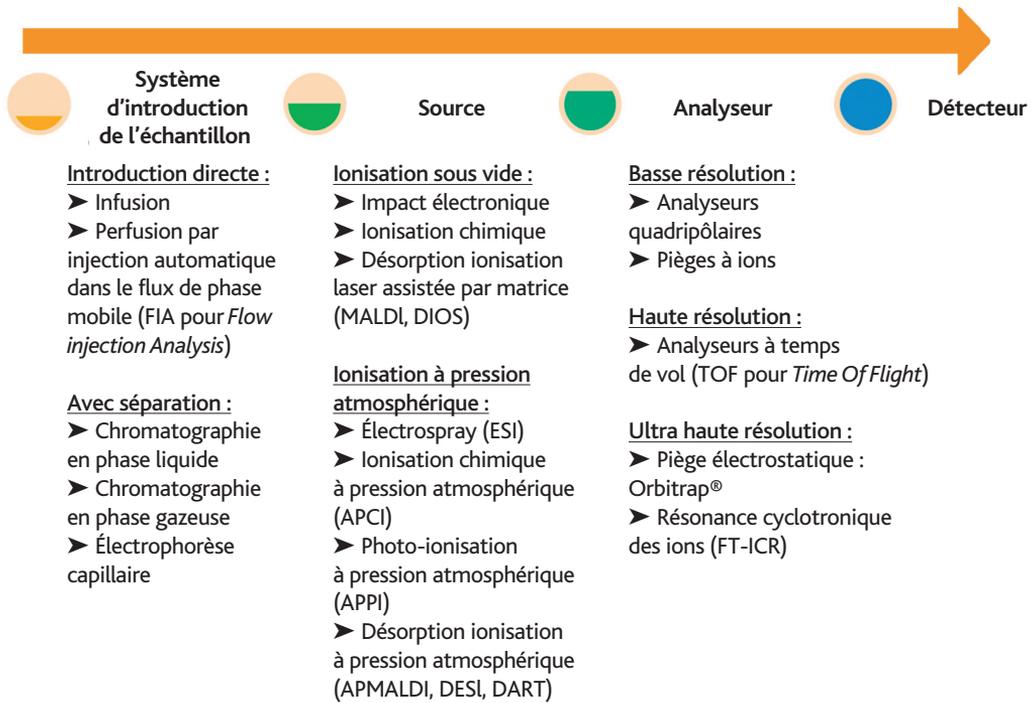
L'inspection visuelle des spectres RMN 1D  $^1\text{H}$  d'un patient en crise et après traitement par de l'hème-arginate permet de mettre en évidence les signaux caractéristiques des

métabolites ALA et PBG (Figure 8A). Le lien entre les signaux de la même molécule est confirmé par les corrélations d'un spectre RMN à deux dimensions de fréquence (Figure 8B).

### ● Analyse multivariée non ciblée

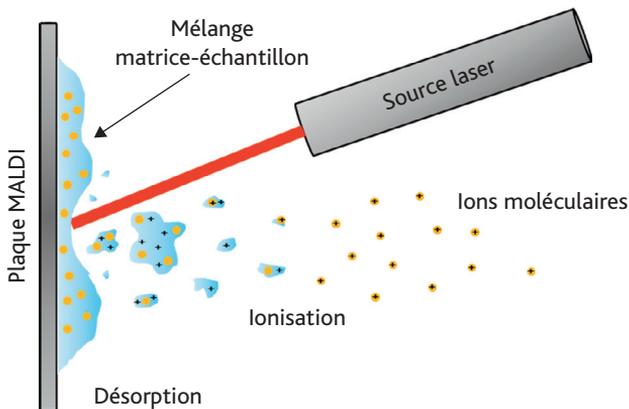
L'ACP multivariée non supervisée permet aussi de suivre l'évolution du métabolome des patients PAI durant leur traitement à l'hème-arginate (Figure 9A). Pour un même patient, le déplacement des points de gauche à droite indique une évolution favorable de l'état de santé du patient PAI depuis sa crise aiguë (T0) jusqu'à sa sortie d'hôpital (T3 ou T4). Lors du traitement, la voie de biosynthèse de l'hème est désactivée car la supplémentation en hème inhibe la voie de biosynthèse de l'hème. Les patients peuvent alors éliminer l'excédent de ALA et PBG par voie urinaire. Ainsi, de droite à gauche, on trouve une corrélation du taux de ALA ou PBG mesuré par dosage biochimique avec celui quantifié par RMN en solution (Figure 9B). Chez un même patient PAI, la concentration urinaire de ces biomarqueurs diminue (Figure 9C) en fonction du traitement, ce qui s'accompagne aussi de la disparition des symptômes associés à la pathologie PAI. Avant sa sortie de l'hôpital, le taux urinaire de PBG ou ALA du patient doit revenir à un niveau minimal.





**Figure 1 /** Principe d'un spectromètre de masse.

Sont indiqués les sources et analyseurs disponibles pour l'analyse de biomolécules.



**Figure 2 /** Principe de l'ionisation MALDI.

MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*.

dans la source, l'échantillon est désolvaté et se transforme en nébulisat (Figure 3). C'est l'une des sources les plus utilisées en LC/MS.

Elle permet d'analyser sous forme intacte des biomolécules thermolabiles ou non pouvant être polaires à moyennement polaires.

du cholestérol, qui catalyse la formation de mévalonate à partir d'HMG-CoA. Pour évaluer l'efficacité des statines, il convient de mesurer l'activité enzymatique en utilisant du HMG-CoA marqué au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) puis en quantifiant le [ $^{14}\text{C}$ ]-mévalonate ou le [ $^{14}\text{C}$ ]-cholestérol. De fait, l'utilisation d'un radiomarquage pour suivre l'incorporation des substrats dans les intermédiaires de synthèse ou les produits finaux de la voie métabolique ciblée est incontournable [3]. Cependant, l'utilisation de ces substrats radioactifs est particulièrement délicate *in vivo*, notamment au cours d'essais cliniques de phase I. En plus du risque inhérent à leur utilisation, l'interprétation des résultats est rendue difficile en raison de la très grande complexité du métabolisme de ces substrats dans l'organisme.

## CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES

### ● Potentialités des analyses lipidomiques par spectrométrie de masse

La lipidomique est une branche de la métabolomique, qui recouvre l'analyse de l'ensemble des molécules de petite masse moléculaire d'un système biologique. Les analyses lipidomiques par spectrométrie de masse permettent d'entrevoir de nombreuses améliorations dans la compréhension et la prise en charge des pathologies métaboliques [4] (Figure 2). Comparées

aux tests de routine comme l'EAL qui ouvre une fenêtre relativement étroite sur le métabolisme lipidique, les analyses lipidomiques par spectrométrie de masse permettent d'analyser simultanément plusieurs milliers d'espèces lipidiques extraites à partir de matériaux biologiques, qu'il s'agisse de tissus et fluides biologiques humains ou échantillons issus de modèles expérimentaux. Ces analyses améliorent ainsi de façon considérable la compréhension du métabolisme lipidique et des mécanismes physiopathologiques qui dépendent des dérégulations de ce métabolisme. De plus, la description exhaustive des modifications du lipidome associées à un état pathologique donné peut déboucher sur l'identification de cibles thérapeutiques et de biomarqueurs d'intérêt prédictif, diagnostique ou pronostique.

Le développement de nouveaux médicaments implique généralement le criblage de plusieurs milliers de composés chimiques. Dans le cas des enzymes du métabolisme lipidique, les tests reposent classiquement sur l'utilisation de substrats radiomarqués (voir *supra* « Caractérisation de nouveaux modulateurs du métabolisme lipidique en recherche »). Cette approche, qui permet d'évaluer l'activité d'un composé en ciblant précisément une étape d'une voie métabolique, manque souvent de spécificité [3]. En comparaison, les analyses lipidomiques par spectrométrie de masse permettent non seulement d'analyser simultanément et spécifiquement les intermédiaires

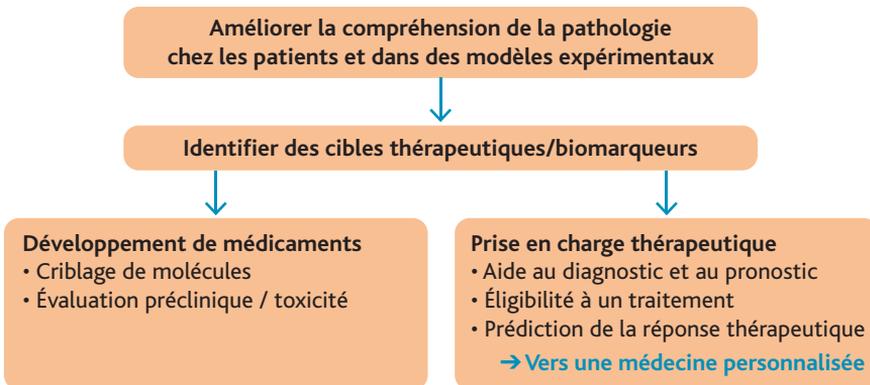


Figure 2 / Potentialités des analyses lipidomiques par spectrométrie de masse (d'après [4]).

et produits finaux d'une ou plusieurs voies métaboliques d'intérêt thérapeutique, mais également de voies métaboliques dont la perturbation sera potentiellement source d'une toxicité et donc d'effets indésirables. En ce sens, l'approche lipidomique offre un bénéfice à l'évaluation préclinique de la substance testée. Côté patient, ces approches ouvrent la voie à une prise en charge personnalisée. Outre l'intérêt diagnostique et pronostique de nouveaux biomarqueurs lipidiques, la connaissance précise du lipidome d'un patient pourrait aider à choisir le traitement le plus adapté, à prédire la réponse thérapeutique et, une fois le traitement instauré, contribuer à évaluer son efficacité et sa toxicité. Dans ce contexte, les analyses lipidomiques s'intègrent dans le champ de la pharmacométabolomique, une branche récente de la métabolomique appliquée à la prévision et au suivi des effets des médicaments chez chaque patient [5].

## ● Principe général de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet l'identification et la quantification notamment de biomolécules à partir de la mesure du rapport masse sur nombre de charges ( $m/z$ ) d'espèces ionisées en phase gazeuse. L'apport considérable de cette technique pour la chimie et la biochimie analytiques a conduit à l'attribution du prix Nobel de physique en 1989 à Hans G. Dehmelt et Wolfgang Paul pour le développement de pièges à ion et du prix Nobel de chimie en 2002 à John B. Fenn et Koichi Tanaka pour la mise au point des méthodes d'ionisation douces. La spectrométrie de masse est ainsi la méthode de choix pour l'analyse de nombreuses biomolécules, protéines, acides nucléiques, métabolites, lipides.

L'analyse des lipides par spectrométrie de masse, qu'elle concerne une cellule, un tissu voire un organisme entier, est appelée analyse lipidomique. On peut distinguer deux types d'analyses lipidomiques : d'une part les analyses globales, non ciblées, qui s'intéressent sans *a priori* à l'ensemble des lipides

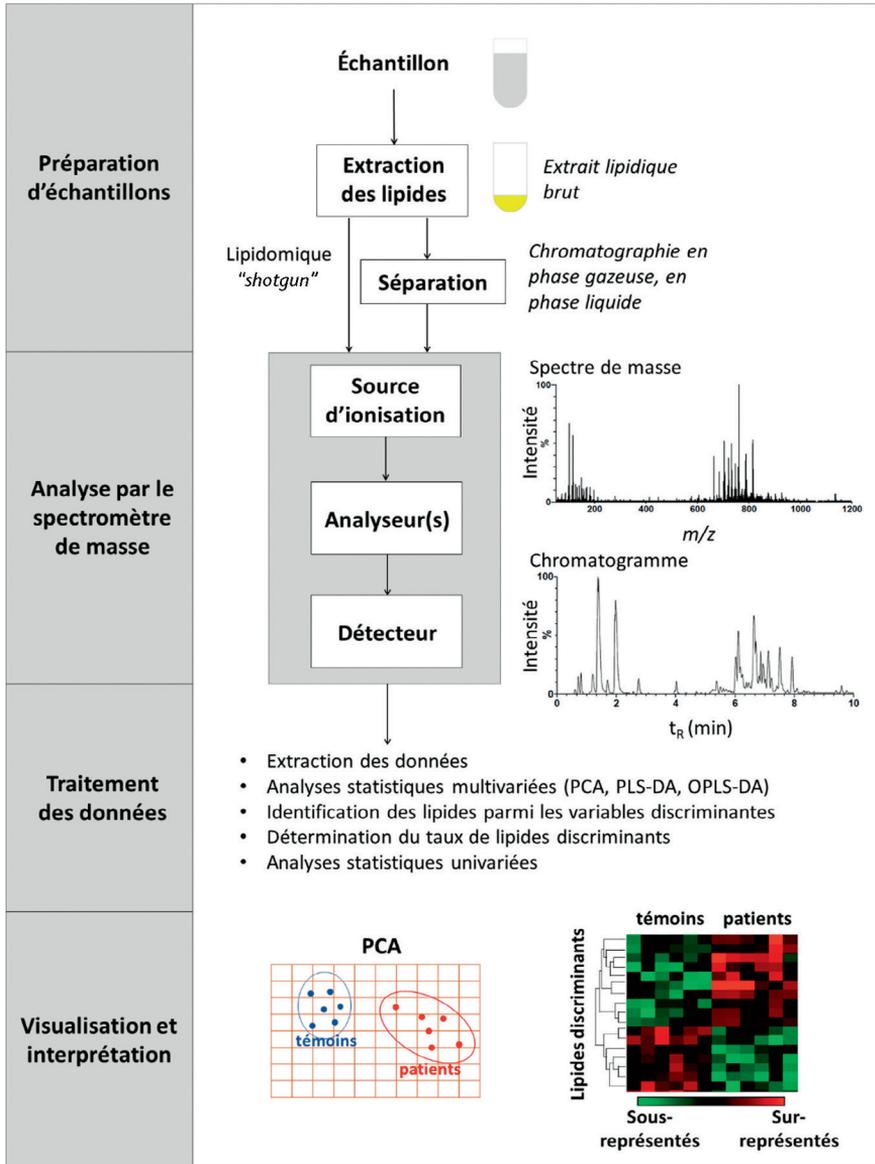
susceptibles d'être détectés et, d'autre part, les analyses ciblées, qui se focalisent sur certaines espèces lipidiques. Les analyses globales, plus longues et complexes, permettent une exploration large du métabolisme lipidique et sont notamment adaptées à l'identification de nouveaux biomarqueurs, voire même de nouveaux lipides. Les analyses ciblées présentent une sensibilité élevée et sont utilisées pour comparer rapidement la teneur des échantillons analysés pour un nombre restreint de lipides d'intérêt.

## ● Étapes de l'analyse lipidomique par spectrométrie de masse

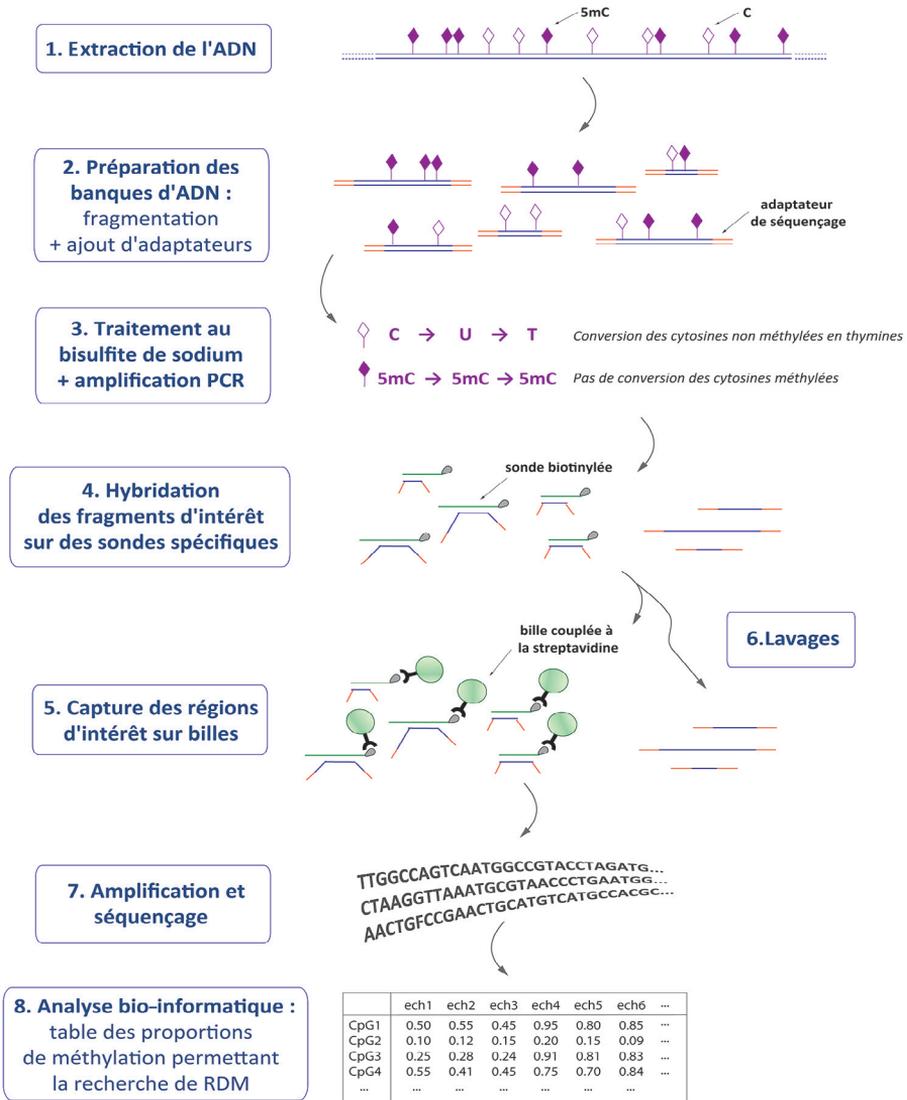
L'analyse lipidomique peut être scindée en trois grandes étapes : la préparation d'échantillons, l'analyse et le traitement des données (Figure 3) [3]. Différentes techniques sont actuellement utilisées pour réaliser les analyses lipidomiques par spectrométrie de masse. Pour chaque étape, nous présenterons le principe des techniques utilisées, en mettant l'accent sur celles permettant de satisfaire aux conditions requises pour une analyse statistique à partir d'un grand nombre d'échantillons de composition lipidique complexe.

### Préparation d'échantillons

La préparation d'échantillons débute par l'extraction des lipides à l'aide de solvants organiques appropriés. Les mélanges méthanol/chloroforme, méthanol/hexane et le méthyl tert-butyl éther (MtBE) sont classiquement utilisés car ils permettent l'extraction d'espèces dont l'équilibre hydrophile/lipophile varie considérablement d'une classe à l'autre de lipides. Les extraits lipidiques bruts peuvent alors être directement soumis à l'analyse par spectrométrie de masse suivant une approche lipidomique "shotgun"; ils sont cependant le plus souvent préalablement séparés par chromatographie en phase gazeuse ou chromatographie liquide haute performance. L'approche lipidomique "shotgun" est d'application plus immédiate que les méthodes incluant une séparation chromatographique



**Figure 3 /** Étapes classiques de l'analyse lipidomique par spectrométrie de masse (d'après [3]). Suite à l'extraction des lipides, ces derniers peuvent être analysés directement (approche "shotgun") ou après une étape de séparation chromatographique. À leur entrée dans le spectromètre de masse, les lipides subissent une ionisation douce puis leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) est mesuré au niveau de l'analyseur. Dans la spectrométrie de masse en tandem, deux analyseurs successifs sont requis. Le spectre de masse résultant de l'analyse représente l'intensité du signal en fonction du rapport  $m/z$ . L'analyse lipidomique couplant la chromatographie à la spectrométrie de masse permet également d'obtenir un chromatogramme, qui représente l'intensité du signal obtenue en spectrométrie de masse en fonction du temps de rétention chromatographique ( $t_R$ ). Les données ( $m/z$ ,  $t_R$ , intensité) sont ensuite extraites et soumises à des analyses statistiques permettant *in fine* d'identifier des lipides discriminants dont les taux sont déterminés. Des représentations graphiques permettent de visualiser la séparation des groupes expérimentaux (par exemple : PCA pour *Principal Component Analysis*) et les variations de taux de lipides discriminants.



**Figure 8 /** Technique de capture à façon permettant l'étude du méthylome de régions d'ADN ciblées, selon la méthode *SeqCap Epi Enrichment* de NimbleGen Roche.

Après extraction de l'ADN, ce dernier est fragmenté avant l'ajout de séquences adaptatrices permettant le séquençage des échantillons. L'ADN fragmenté subit un traitement au bisulfite de sodium convertissant les cytosines non méthylées en thymines, permettant de distinguer les cytosines méthylées (5mC) des cytosines non méthylées (C). Des sondes d'ADN dessinées sur mesure, pour une étude donnée, s'hybrident à des fragments génomiques. Les sondes étant biotinyliées, elles fixent des billes couvertes de streptavidine, par affinité entre biotine et streptavidine. Après des lavages permettant d'éliminer les fragments d'ADN non hybridés aux sondes, seules les séquences d'ADN d'intérêt sont conservées puis séquencées. Une analyse bio-informatique permet d'obtenir une table des proportions de méthylation, pour chaque échantillon et chaque CpG donné. Cette table sert de support à l'analyse statistique visant à détecter les régions différenciellement méthylées (RDM) entre deux conditions (Figure 9).

PCR : *Polymerase Chain Reaction*.

Après la capture et le séquençage de ces fragments d'ADN ayant subi une conversion au bisulfite de sodium, la difficulté réside dans l'alignement des séquences sur le génome de référence. En effet, suite à la conversion des cytosines non méthylées en thymines, on observe une perte de complémentarité entre les fragments séquencés et le génome de référence de l'organisme étudié (Figure 7b). Le recours à des outils bio-informatiques tenant compte de ces modifications est donc indispensable. Il existe des logiciels en accès libre (Bismark, BSMAP, BS Seeker, etc.) qui permettent de faire cette analyse en se basant sur un génome de référence préalablement « converti » : à l'emplacement d'une cytosine, l'alignement sera alors possible, même si la base lue est une thymine. Une fois les *reads* cartographiés sur le génome de référence, le pourcentage de méthylation de chaque cytosine à une position donnée est déterminée grâce à des outils statistiques (MethylKit, RADMeth) afin d'identifier les régions différenciellement méthylées (RDM) entre une situation test et une situation témoin (Figure 9).

## QUELS TESTS DIAGNOSTIQUES POUR APPRÉHENDER DES PERTURBATIONS DU MÉTHYLOME ?

La question d'un diagnostic précoce des TSAF est complexe. Les études de cohortes ont mis en évidence une corrélation entre un stress précoce et des risques accrus, d'une part, de développer des pathologies neuropsychiatriques et, d'autre part, de présenter des perturbations de l'épigénome. Cependant, le lien de cause à effet entre ces signatures épigénétiques et les pathologies neuropsychiatriques observées n'est pas encore clair. Les mécanismes moléculaires en jeu doivent encore être précisés, mais il est hautement probable que ces mécanismes seront caractérisés dans la prochaine décennie. Les études en cours montrent déjà que le cerveau est extrêmement robuste et que

les perturbations observées sont subtiles. Mettre en évidence un risque de développer une pathologie est d'autant plus complexe.

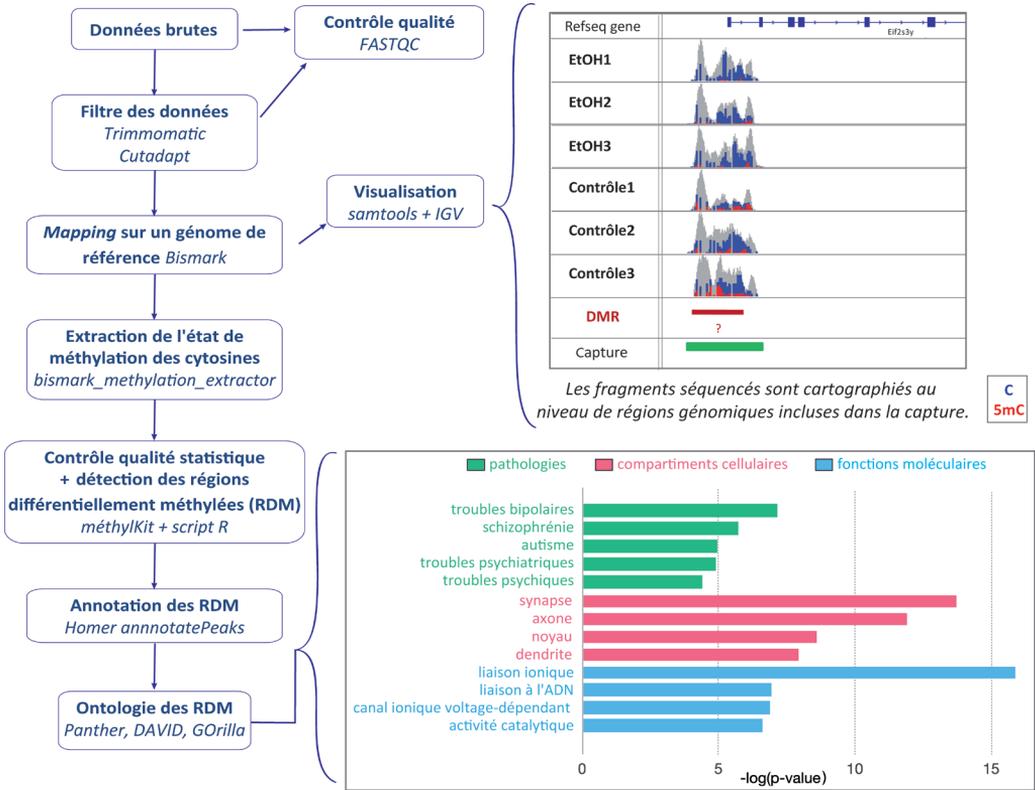
Aujourd'hui les sondes « 450K » ou « 850K » sont généralement utilisées dans des études de cohortes de patients pour des analyses épidémiologiques, rarement à des fins diagnostiques. On notera toutefois depuis peu leur utilisation lors d'analyses de tumeurs du cerveau (cf. encadré « **Autres applications cliniques : l'exemple du cancer** »). Ce test reste coûteux (environ 350 euros) et n'est proposé que dans une poignée d'hôpitaux dans le monde. En dehors du prix, l'analyse d'une telle quantité de sondes ne peut être réalisée dans un test diagnostique de routine. Cependant, dès lors que des régions de méthylation différentielles auront été identifiées comme étant des cicatrices épigénétiques d'un stress, telle une EPA, il sera possible d'envisager des captures ciblées du méthylome pour réaliser des tests diagnostiques.

### ● Quel test diagnostique ?

Aujourd'hui, dans le cadre de diagnostics de cancers du sein, un test a été mis au point sur « puce à ADN » qui rassemble des séquences de 50 gènes potentiellement impliqués dans ces cancers (ce test est nommé PAM50). On pourrait imaginer à terme la définition d'un test de type « PAM50 » pour le diagnostic des TSAF. Réduire le nombre de cibles à tester facilite l'analyse, mais le choix de ces cibles reste complexe.

### ● Comment limiter les coûts ?

Pour limiter les coûts, il est toujours possible d'associer dans un même test l'ADN de plusieurs patients par un système de marquage spécifique (on parle de « **multiplexage** »). De tels regroupements sont déjà réalisés lors d'analyses d'exomes, où seuls les exons des gènes sont testés (on parle de WES pour *Whole Exome Sequencing*, séquençage de l'ensemble de l'exome).



**Figure 9 /** Étapes essentielles à l'analyse bio-informatique d'une capture du méthylome et outils associés.

Exemple fictif d'analyse, les outils bio-informatiques permettant de réaliser chacune des étapes d'analyses décrites sont donnés à titre indicatif et sont indiqués en italique.

Le séquençage à haut débit permet d'obtenir plusieurs millions de séquences en même temps. Une analyse bio-informatique est nécessaire pour étudier l'ensemble des séquences. Après un contrôle de la qualité des fragments d'ADN séquencés (ou *reads*), ces derniers sont filtrés pour ne conserver que les séquences de bonne qualité, avant d'être cartographiés sur un génome de référence. La visualisation des données permet de vérifier que les *reads* sont bien cartographiés dans les régions de la capture. La représentation des cytosines méthylées (en rouge) ou non méthylées (en bleu) permet de visualiser de potentielles régions différentiellement méthylées (RDM) après exposition prénatale à l'alcool (échantillons EtOH). Pour détecter les RDM statistiquement significatives, il est nécessaire d'extraire l'état de méthylation de chaque cytosine étudiée, puis d'utiliser des logiciels statistiques spécifiques. L'analyse de l'ontologie\* des gènes comportant des RDM fiables permet de déterminer si les défauts de méthylation de l'ADN causés par l'exposition prénatale à l'alcool sont observés au niveau de gènes indépendants ou, au contraire, au niveau de catégories de gènes particuliers (par ex. au niveau de gènes associés à une pathologie, à une fonction moléculaire ou à un compartiment cellulaire donné).

FASTQC : *Fast Quality Control* ; IGV : *Integrative Genomics Viewer*.

\* L'ontologie des gènes correspond à la classification et le regroupement des gènes, selon différentes thématiques (pathologies, fonctions moléculaires, processus biologiques, compartiments cellulaires, etc.). L'analyse ontologique d'un groupe de gènes donné permet de définir s'ils partagent des caractéristiques communes ou non.

## L'ESSENTIEL

Les enfants ayant subi une exposition prénatale à l'alcool (EPA) présentent des anomalies variées du développement du système nerveux central. Elles sont à l'origine de symptômes divers que l'on regroupe sous le terme de troubles du spectre de l'alcoolisation fœtale (TSAF). Leur affection se manifeste par des troubles de l'apprentissage, troubles de l'attention et hyperactivité, troubles du spectre autistique, dépression, vulnérabilité aux addictions, voire défauts cognitifs.

Certains de ces défauts résultent de la perturbation du paysage épigénétique sous l'effet du stress alcoolique, qui perdure ensuite au cours de la vie de l'individu, altérant l'expression physiologique de certains gènes. Dans le cerveau particulièrement touché par l'EPA, ces modifications de l'expression génique affectent notamment la plasticité cérébrale.

L'altération épigénétique la plus étudiée à la suite d'une EPA est la perturbation de la méthylation de l'ADN. Chez les mammifères, l'ADN nucléaire peut être méthylé sous forme de 5-méthyl-cytosine (5mC) ou de 5-hydroxy-méthyl-cytosine (5hmC). La majorité des cytosines méthylées se trouvent au niveau de séquences riches en di-nucléotides CpG (les îlots CpG), souvent impliquées dans la régulation de l'expression génique.

Leur méthylation est assurée par des enzymes, les *DNA methyl-transferases* (DNMT). DNMT3A et 3B assurent la méthylation *de novo* de l'ADN, tandis que DNMT1 assure son maintien à la suite de la réplication. Un stress au cours de la période périnatale peut engendrer une perturbation pérenne du méthylome (le profil de méthylation du génome) et modifier durablement la régulation de l'expression génique.

Les enfants ayant subi une EPA ne présentent pas toujours de phénotype caractéristique à la naissance. Ils échappent de ce fait au parcours de soins pourtant nécessaire pour une prise en charge précoce de ces individus vulnérables

face aux pathologies mentales. Le développement d'un test diagnostique adapté, d'une part, et d'une thérapie efficace, d'autre part, est donc crucial.

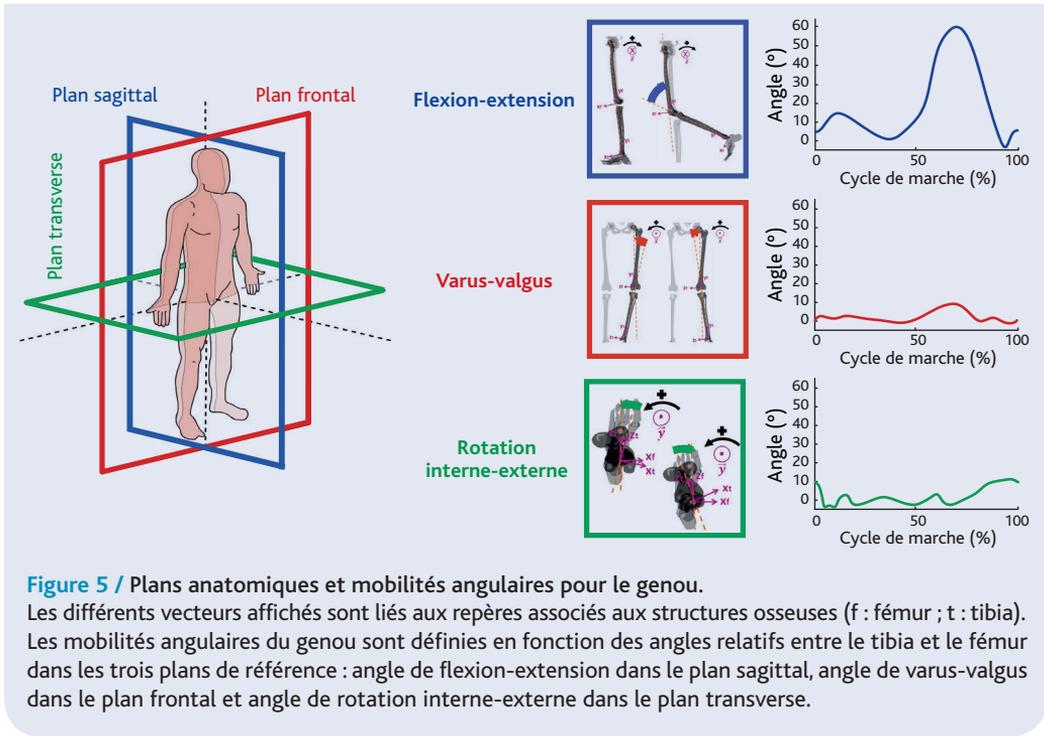
Avec la conception de plus en plus élaborée de technologies d'analyses de séquences à haut débit, il est réaliste de considérer qu'il sera possible, dans un avenir proche, de développer des tests diagnostiques basés sur l'analyse du méthylome de nouveau-nés.

Pour distinguer les bases azotées méthylées de celles qui ne le sont pas, il existe deux grandes familles de techniques : l'une qui convertit des cytosines non méthylées en thymines, par un traitement au bisulfite de sodium, sans affecter les cytosines méthylées ; l'autre qui immunoprécipite l'ADN méthylé grâce à la reconnaissance du groupement méthyle sur l'ADN.

- Le bisulfite de sodium convertit les cytosines non méthylées en uraciles qui seront ensuite transformés en thymines après amplification PCR. L'identification de l'état de méthylation des cytosines se fait par séquençage de l'ADN et comparaison du fragment d'ADN étudié avec un génome de référence.

- Les anticorps reconnaissent soit directement les groupements méthyles sur l'ADN – on parle de MEDIP-seq (*Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing*) –, soit les protéines liées aux groupements méthyle de l'ADN, c'est le MIRA-seq (*Methylated CpG Island Recovery Assay and sequencing*).

Il est possible de restreindre l'étude de la modulation de la méthylation de l'ADN à des sites d'intérêt, en réalisant une capture du méthylome, par hybridation de l'ADN étudié à des sondes spécifiques. Une telle technique pourra être envisagée pour la réalisation de tests diagnostiques de routine dès lors que les sites dont la méthylation est régulièrement affectée sous EPA auront été clairement définis, ouvrant la voie vers une réponse thérapeutique personnalisée des TSAF.



- **Concernant l'analyse cinématique**, l'intégration temporelle des signaux d'accélération et de vitesse angulaire se heurte à des phénomènes de dérive qui nécessitent des méthodes de correction.
- **Pour l'analyse dynamique**, les matériels actuellement disponibles ne permettent pas d'accéder à un niveau suffisant d'informations pour mettre en œuvre le calcul de dynamique complet.

## MISE EN PERSPECTIVE

L'amputation du membre inférieur est à l'origine d'un handicap définitif pour lequel l'utilisation d'une prothèse est la seule alternative pour retrouver mobilité et indépendance au quotidien. Développer des prothèses pour compenser la perte d'une jambe reste de nos jours un véritable challenge car il est impossible de concevoir des dispositifs aussi performants que notre corps humain. En effet, malgré les progrès fulgurants de

la mécatronique\* et de la robotique ces dernières années, la motorisation du mouvement des articulations perdues entraîne une augmentation significative du poids de la prothèse, une faible autonomie et de sérieuses problématiques liées au contrôle de la prothèse.

Les prothèses actuelles résultent donc encore d'un compromis entre les possibilités ouvertes par les différentes solutions technologiques pour se rapprocher au plus près du comportement du membre perdu. Ainsi, que ce soit pour déterminer les spécifications auxquelles devra répondre un composant prothétique ou pour évaluer le fonctionnement de celui-ci lors de la marche d'une personne appareillée, la modélisation et l'analyse du mouvement humain représentent une étape clé afin de quantifier et modéliser le fonctionnement des dispositifs prothétiques.

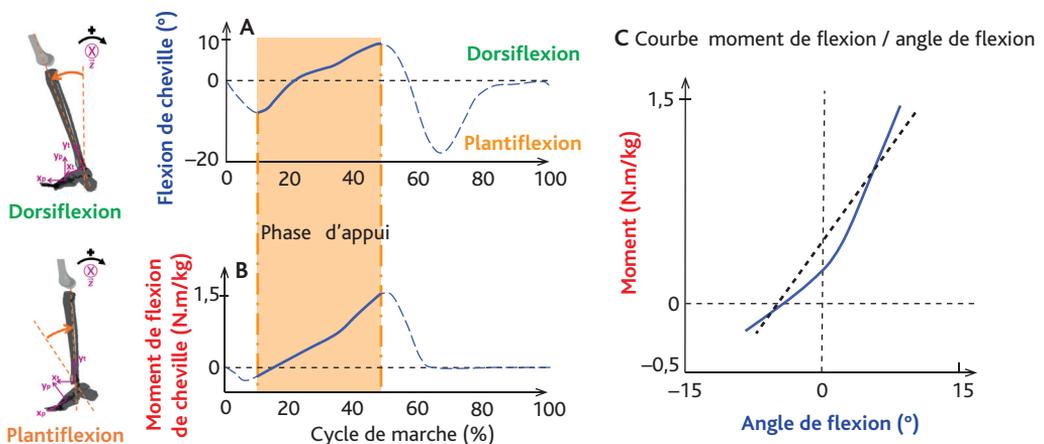
\* Discipline alliant la mécanique, l'électronique et l'informatique.

## ● Optimisation de la rigidité du pied et de la cheville prothétique

Un pied humain comporte 26 os, 16 articulations, une centaine de ligaments et 20 muscles pour l'actionner. Tenter de remplacer le pied en copiant l'anatomie humaine nécessiterait de concevoir autant de solides, de liaisons et d'actionneurs et n'aboutirait sûrement pas à trouver une solution visant à porter le poids de l'utilisateur dans toutes les activités de sa vie quotidienne. Il faut donc se concentrer sur les fonctions principales que sont l'équilibre, l'amortissement et la propulsion et identifier des solutions technologiques viables en vue d'assurer ces fonctions.

Les pieds prothétiques sont constitués à partir d'un assemblage de lames en composites qui, en se déformant, vont rendre possible la reproduction des mouvements des articulations du pied et de la cheville. Ces lames sont dimensionnées afin de supporter une déformation adéquate tout en assurant une résistance mécanique aux chargements cycliques et aux sollicitations extrêmes pouvant intervenir exceptionnellement.

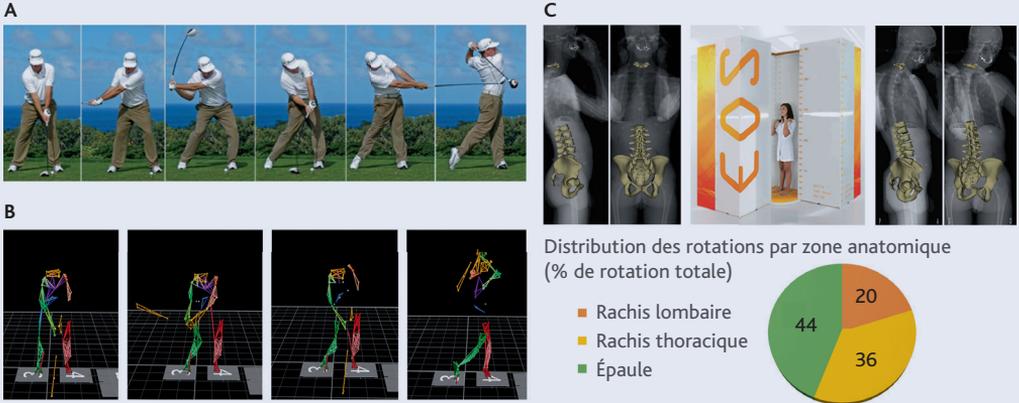
La figure 6 représente l'évolution de l'angle de la cheville au cours de la phase d'appui dans le plan de flexion extension (A) ainsi que l'évolution du moment de flexion dans ce même plan (B). La courbe (C) représente l'évolution de l'angle en fonction du moment ; cette courbe angle-moment de la cheville a été obtenue lors de la marche de sujets non amputés à vitesse de confort. Un pied prothétique reproduisant cette courbe angle-moment en partie ou s'en rapprochant le plus possible autorisera une marche naturelle et fluide. En outre, les lames réalisées en matériaux composites sont capables de restituer l'énergie qu'elles ont emmagasinée lors de leur déformation. Cette énergie peut alors être utilisée en fin de phase d'appui sur la prothèse pour propulser le corps en avant et reprendre appui sur la jambe controlatérale. L'analyse de cette courbe angle-moment (le bilan énergétique) à différentes vitesses de marche montre que le pied et la cheville peuvent être substitués par un système de ressort qui emmagasine et restitue de l'énergie pour les marches à vitesse lente et normale mais qu'un apport d'énergie externe est en revanche nécessaire pour les marches à vitesse rapide [4]. Afin d'apporter cette énergie



**Figure 6 / A.** Angle de flexion-extension de la cheville : quand la cheville est en dorsiflexion, l'angle est négatif ; il devient positif pour la plantiflexion. **B.** Moment (rapporté au poids du volontaire) de flexion de la cheville au cours de la phase d'appui (zone colorée) lors de la marche à plat ; ce moment est moteur s'il est positif. **C.** Variation du moment de flexion en fonction de l'angle de flexion de la cheville pendant la phase d'appui ; la droite noire est la raideur moyenne de la cheville (N.m/kg par degré) pendant la phase d'appui.

humaine Georges-Charpak, l'analyse quantifiée de la cinématique (Figure 8B), combinée à des radiographies biplanaires basse dose (EOS™\*), a rendu possible l'étude des rotations entre chaque vertèbre de la colonne lombaire [6] et donc une analyse plus fine de ses mobilités

(Figure 8C). Plus généralement, l'utilisation de l'imagerie médicale pourrait jouer un rôle crucial dans la compréhension et la prévention des douleurs lombaires, en vue, par exemple, de l'identification d'anatomies de colonne vertébrale à risque.



**Figure 8 /** Analyse quantitative du *swing* de golf.

**A.** Mouvement du *swing*. **B.** Reconstruction de la cinématique du mouvement.

**C.** Analyse cinématique combinée à l'imagerie médicale 3D EOS™ (rotations intervertébrales).

\* EOS est un système d'imagerie médicale permettant l'acquisition simultanée de deux images radiographiques, face et profil, en limitant la dose de rayons X absorbée par le patient. Le système s'appuie sur la haute sensibilité d'un détecteur gazeux inventé par Georges Charpak.

La quantification de ce pic de puissance permet non seulement d'objectiver le défaut de marche mais aussi de quantifier l'adaptation de ce défaut de marche lors du franchissement de différentes situations de la vie courante (montée ou descente d'escalier, marche en dévers, etc.). Il semble donc raisonnable

de penser que la quantification de cette puissance ouvre la possibilité d'apprécier l'effet d'un programme de rééducation ciblé sur ce défaut de marche ou l'apport d'un composant prothétique capable d'assurer une dorsiflexion de la cheville pour faciliter le passage du pied au-dessus du sol [1].

## CONCLUSION

Les développements récents d'outils de modélisation et de quantification ont ouvert la voie à l'analyse et la compréhension du mouvement humain. Ces outils peuvent être utilisés pour définir le mouvement sain, identifier le mouvement pathologique, mais aussi pour estimer l'influence d'un système ou d'un matériel sur un mouvement. Cette quantification ne se

limite pas à la description du mouvement, elle évalue aussi les actions mécaniques transmises dans les articulations du corps humain.

La modélisation et la quantification du mouvement humain ont donc tout leur intérêt dans le domaine clinique, avec l'évaluation de traitements ou d'appareillages, ou dans le domaine sportif, avec la recherche de la performance et des risques associés.

# La révolution optogénétique dans la connaissance des réseaux neuronaux sains et pathologiques

Pascal Fossat

La lumière visible est une composante essentielle de notre environnement et la capacité que nous avons à détecter les photons est un de nos sens les plus précieux. Au cours de l'évolution, les organismes microbiens ont développé des outils de détection de la lumière. Les algues photosynthétiques et certaines bactéries sont ainsi capables de capter des photons et d'orienter leur déplacement en conséquence de cette perception (phototactisme). Chez les animaux, cette capacité est également apparue très tôt au cours de l'évolution puisque les cnidaires (méduses) possèdent déjà des photorécepteurs qui permettent de percevoir l'environnement et d'en construire une représentation. La lumière agit également sur les cellules animales sans intervention de l'œil. C'est le cas, par exemple, du troisième œil (la glande pinéale ou épiphyse) des vertébrés primitifs, qui permet de synchroniser les rythmes des animaux sur les rythmes lumineux.

Au milieu des années 2000, plusieurs équipes de neuroscientifiques ont suggéré d'utiliser la lumière pour modifier l'activité du système nerveux. Leur postulat était que,

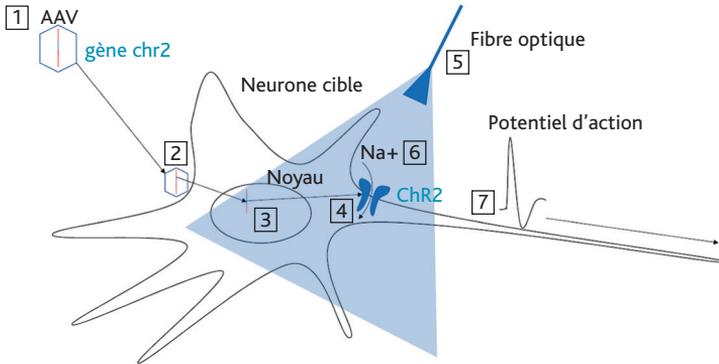
si l'on peut rendre des neurones photosensibles, on pourra utiliser la lumière pour modifier leur activité et étudier les conséquences sur le fonctionnement du système nerveux. Cela pourrait également permettre de rétablir une activité nerveuse après une perte de fonction.

Le développement de cette approche est un excellent exemple de l'importance des approches pluridisciplinaires pour aboutir à de grands bouleversements technologiques et des avancées scientifiques d'envergure. Ce sont les connaissances en microbiologie, biologie moléculaire, génétique, optique et neurosciences qui ont permis la naissance de l'optogénétique, c'est-à-dire combiner l'usage de la lumière et de photorécepteurs pour stimuler spécifiquement certains territoires, notamment certaines populations neuronales.

Il existait au préalable des techniques classiques pour étudier le rôle d'un ensemble (noyau) de neurones dans la physiologie d'un organisme. Les neurones étant des cellules électriquement excitables, des stimulations électriques permettent l'activation de certaines zones du cerveau. De la même façon,

L'ESSENTIEL : UTILISER LA LUMIÈRE POUR MANIPULER DES CELLULES

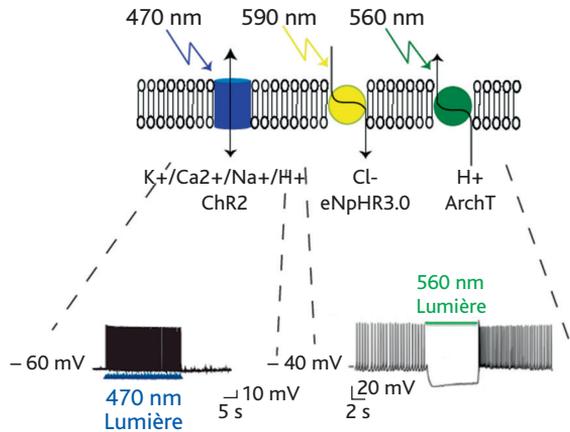
Des opsines photosensibles sont exprimées dans des cellules nerveuses animales par transfection virale.



Principe de l'optogénétique.

1. Un *adeno-associated virus* (AAV) non pathogène est utilisé comme vecteur. Un plasmide contenant un promoteur spécifique d'une population de neurones ainsi que la séquence de l'opsine est inséré dans la capsid du virus.
  2. L'injection du virus entraîne la contamination des cellules.
  3. La séquence promotrice restreint l'expression de l'opsine au neurone ciblé.
  4. L'opsine est exprimée et transportée à la membrane du neurone cible.
  5. Une source de lumière (LED ou laser couplé à une fibre optique en général) transmet de la lumière à la longueur d'onde souhaitée.
  6. En réponse au flash lumineux, l'opsine s'ouvre et laisse entrer des cations, ce qui dépolarise le neurone cible.
  7. La dépolarisation entraîne l'activation des canaux ioniques responsables des potentiels d'action. Le neurone s'active et transmet le message nerveux le long de son axone.
- ChR : channelrhodopsine.

Ces opsines vont permettre de dépolariser ou hyperpolariser des cellules nerveuses et donc les activer ou les inhiber sous le contrôle de la lumière à des longueurs d'ondes précises.



Activation ou inhibition des neurones par optogénétique.

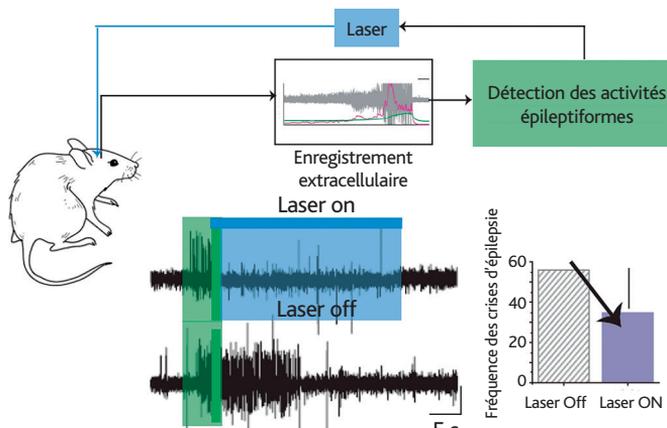
envisageable d'utiliser cette capacité pour développer des modèles pathologiques réversibles et de tester, sur ces modèles, des cibles thérapeutiques potentielles. Par exemple, dans le contexte de la douleur, il est possible de faire exprimer la ChR2 spécifiquement dans les neurones nociceptifs et de déclencher une réponse nociceptive par la lumière. Ainsi, il serait envisageable de tester l'efficacité de substances antinociceptives. Dans le cas de la maladie de Parkinson, l'inhibition optogénétique des neurones à dopamine de la substance noire ou l'activation des neurones du STN pourraient être de bons modèles réversibles de pathologie parkinsonienne.

### Thérapeutiques basées sur l'optogénétique

Pour le moment, aucune étude clinique n'a été lancée pour l'utilisation de l'optogénétique chez l'homme en thérapeutique. En revanche, de nombreuses recherches précliniques

laissent envisager cette possibilité à relativement courte échéance. L'optogénétique est utilisée essentiellement chez le rongeur mais quelques publications révèlent son potentiel chez des primates non humains.

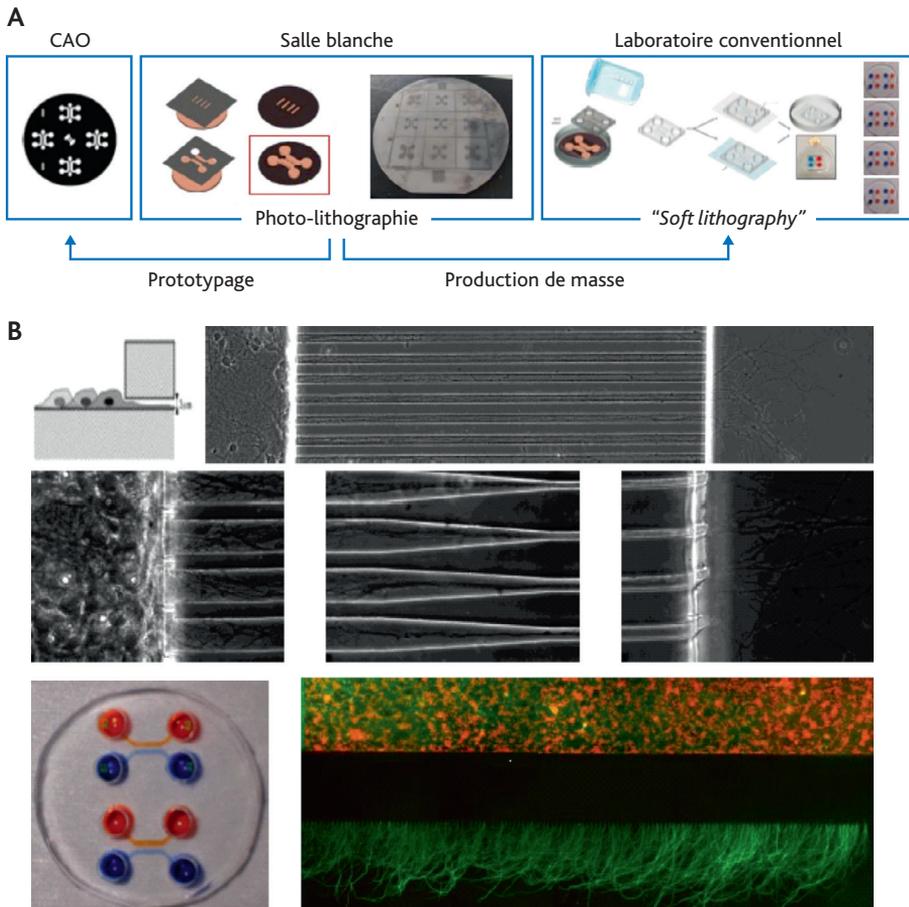
- Chez des modèles de souris épileptiques, un système de boucle fermée permet de réduire l'apparition et la durée des crises par la stimulation des voies nerveuses qui contrôlent le déclenchement des crises. Ainsi, l'activité d'une zone impliquée dans la genèse de crises d'épilepsie (l'hippocampe notamment) est monitorée. Lorsqu'une activité pré-épileptique survient, cela déclenche l'activation optogénétique contrôlant la zone impliquée (Figure 11). Ce contrôle dépendant de l'activité permet de supprimer l'apparition des crises chez un modèle de souris épileptique. Ce principe d'activation optogénétique dépendant de l'activité en système de boucle fermée pourrait être, dans le futur, un principe important du traitement de certaines pathologies.



**Figure 11 /** Détection et contrôle des activités épileptiformes.

Sur un modèle de souris épileptique, on implante une électrode d'enregistrement dans l'hippocampe, lieu de naissance des activités épileptiformes. L'enregistrement est monitoré et un algorithme mathématique repère, sur la base de critères bien définis (amplitude, fréquence de l'activité), une activité pré-épileptique. Le dispositif envoie un signal à un laser qui va activer les neurones d'intérêt. Lorsque l'activité épileptiforme s'arrête, le dispositif indique au laser de s'arrêter également. Sur l'enregistrement présenté, on remarque que l'activité épileptiforme s'arrête très rapidement lorsque le laser est allumé alors qu'elle se prolonge lorsque le laser est éteint. Avec ce dispositif, environ 50 % des crises d'épilepsies sont supprimées chez l'animal.

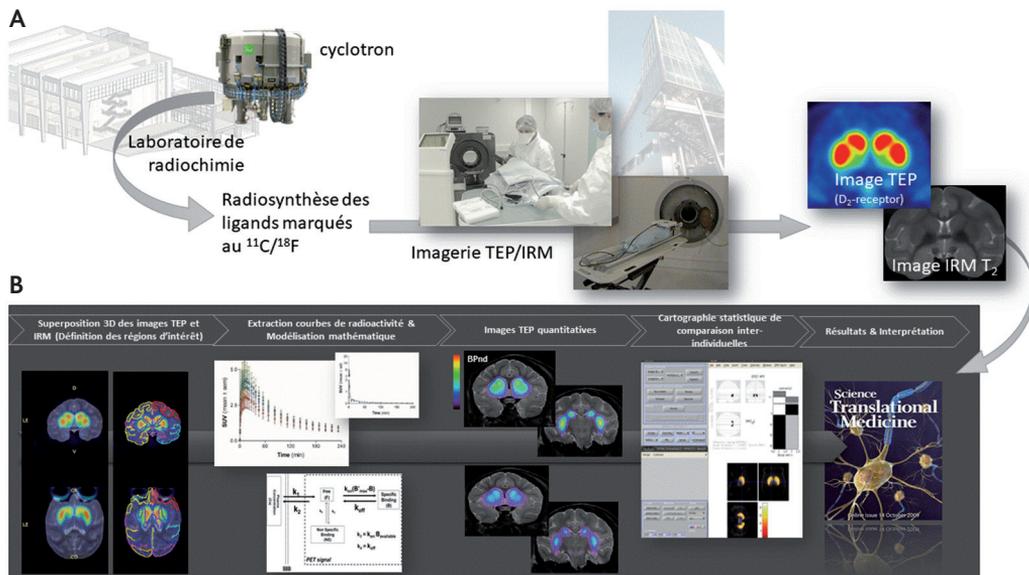
D'après Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 1376.



**Figure 4 /** Combinaison de la micro-photolithographie et de la "soft lithography" pour générer des cultures neuronales compartimentalisées.

**A.** Étapes de micro-photolithographie pour la fabrication de chambres microfluidiques constituée de microcanaux. Le patron de la chambre est dessiné à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) et imprimé à haute résolution sur un masque délimitant des zones opaques et transparentes. L'étape de photo-lithographie est réalisée en salle blanche : i) une résine liquide et photosensible est étalée sur une lamelle de silicium ; ii) la résine est insolée au travers du masque ne laissant passer la lumière que dans les zones transparentes, à une longueur d'onde qui provoque sa réticulation et son durcissement ; iii) un moule en silicium codant la structure des chambres de culture et des microcanaux en positif est ainsi produit. Étape de "Soft lithography" : l'empreinte en négatif du moule avec du polydiméthylsiloxane (PDMS) permet d'obtenir la partie supérieure de la chambre de culture qui sera ensuite collée à une lamelle de verre ou de plastique par activation dans un four à plasma générant de l'ozone.

**B.** Culture de neurones dans un dispositif microfluidique composé de deux chambres de cultures séparées par une série de microcanaux. La hauteur de ces derniers ne laisse passer que les prolongements des neurones. *Photos en noir & blanc* : les neurones sont ensemencés dans la chambre de gauche, et après quelques jours, certains de leurs axones sont piégés par une série de microcanaux ; ils rejoignent ensuite la chambre de droite. Les deux chambres peuvent être perfusées l'une ou l'autre spécifiquement sans que leur contenu ne se mélange, ce qui permet de cibler facilement les sous-compartiments des neurones. *En bas à gauche* : photo en couleurs de deux puces microfluidiques indépendantes dont les chambres ont été perfusées par des liquides de coloration différente. *En bas à droite* : image par fluorescence d'une culture neuronale dans un dispositif. Des groupes de somas de neurones (en rouge, chambre du haut) envoient leurs axones (en vert) dans la chambre du bas.



**Figure 1 /** Différentes étapes de réalisation et de traitement d'un examen par tomographie par émission de positons (TEP).

Dans un premier temps (A), des atomes radioactifs émetteurs de positons ( $^{11}\text{C}$  ou  $^{18}\text{F}$ ) sont produits par un cyclotron, puis incorporés dans des molécules chimiques ou biochimiques d'intérêt, la molécule ainsi marquée (radioligand) étant ensuite purifiée et mise en solution injectable dans une seringue. Dans un second temps, le radioligand émetteur de positons produit est administré par voie veineuse et se distribue dans le corps du sujet. Des images TEP sont ainsi générées au cours du temps par la machine, montrant les concentrations radioactives (codées en fausses couleurs, du rouge le plus radioactif vers le bleu le moins radioactif) mesurées en chaque point de l'image (pixel). Ces images TEP seront ensuite combinées avec l'imagerie anatomique du cerveau (IRM T<sub>2</sub>) du même sujet.

Les dernières étapes (B) portent sur l'analyse des données d'imagerie avec : 1) la définition des régions d'intérêt sur les images TEP en s'aidant de l'imagerie anatomique IRM-T<sub>2</sub> du même sujet, 2) l'extraction des courbes cinétiques d'évolution de la radioactivité au sein de ces différentes régions d'intérêt, 3) la transformation des images TEP en images paramétriques après modélisation compartimentale. À ce stade, chaque pixel de l'image ne représente plus la concentration radioactive mais la valeur d'un paramètre d'intérêt comme par exemple ici la concentration en récepteurs D<sub>2</sub>, 4) l'étape suivante porte sur l'analyse statistique des images paramétriques afin de comparer des groupes expérimentaux d'animaux entre eux.

Crédits photo : N Van Camp (MIRGen).

corporelle de n'importe quelle molécule, pour peu que celle-ci soit radiomarquable. Parmi les émetteurs de positons les plus utilisés, on retrouve le carbone 11 ( $^{11}\text{C}$ ) et le fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ) dont les analogues stables entrent dans la composition de nombreuses molécules organiques, ce qui autorise alors un marquage isotopique (un émetteur de positon remplaçant son analogue stable dans la molécule). Une autre propriété particulière de ces radio-isotopes est leur courte demie-vie radioactive (20,4 et 110 min pour le  $^{11}\text{C}$  et le  $^{18}\text{F}$ , respectivement), qui permettent de limiter l'irradiation du sujet.

## APPORT DE L'IMAGERIE MULTIMODALE EN RELATION AVEC LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES ET LEUR TRAITEMENT

Dans le contexte des maladies neuro-dégénératives, la contribution de l'imagerie cérébrale se positionne résolument dans une démarche de recherche translationnelle visant à proposer, caractériser et mesurer chez l'animal puis chez l'homme l'efficacité

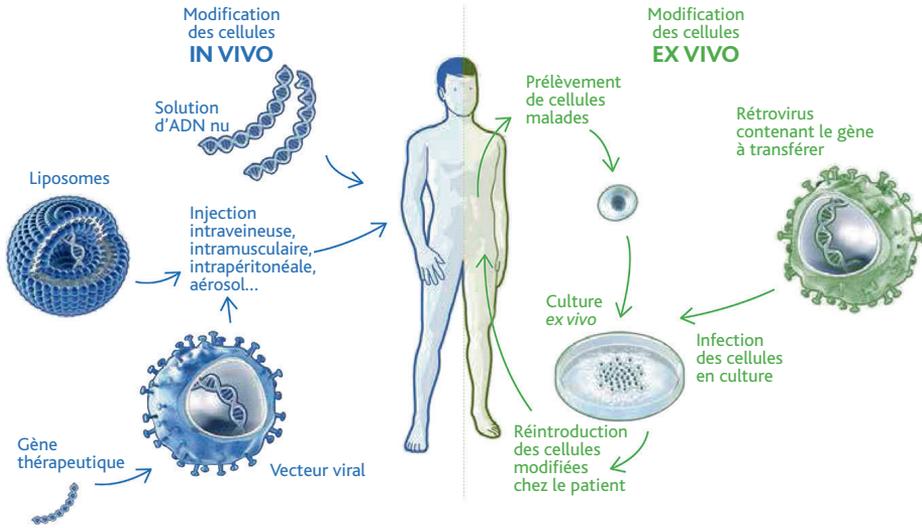


Figure 1 / Principes de la thérapie génique.

Source : Santé 2030 : une analyse prospective de l'innovation en santé. Avec l'aimable autorisation du Leem.

hématopoïétiques par thérapie génique *ex vivo*, puis en les réinjectant dans la circulation sanguine, le système immunitaire d'enfants atteints de déficits immunitaires sévères est devenu à nouveau fonctionnel\*.

■ **Dans le deuxième cas** (en bleu), le vecteur lui-même est directement injecté par voie sanguine ou *in situ* dans l'organe à traiter. Dans ce cas, le transfert du gène se fait *in vivo* à l'opposé du cas précédent où le transfert s'effectue *in vitro*. Plusieurs maladies neuromusculaires (myopathie de Duchenne, myopathies des ceintures, etc.) font l'objet d'essais de thérapie génique par voie intraveineuse directe. Dans le cas de la mucoviscidose, le vecteur peut être administré par voie aérienne dans la trachée ou les bronches.

La théorie est simple mais la concrétisation de la thérapie génique dans la pratique médicale est freinée par plusieurs obstacles :

- la nécessité d'avoir déjà identifié puis isolé le gène en cause ;
- la possibilité de diriger le gène vers les cellules à traiter ;
- l'introduction et l'expression du gène fonctionnel dans toutes les cellules (ou presque) du tissu à traiter ;

- le fonctionnement normal et durable de ce gène dans le tissu, sans effets secondaires délétères.

Résoudre l'ensemble de ces points limitants pour parvenir aux premiers succès cliniques représente trois décennies de recherche dans des champs disciplinaires aussi divers que la génomique et post-génomique, la bio-ingénierie, la biologie cellulaire, la vectorologie ou l'immunologie.

Notons qu'aujourd'hui, la thérapie génique ne cherche à corriger le dysfonctionnement, chez le patient, que d'un seul gène dont la correction aura un effet majeur sur la pathologie.

## ● Avoir identifié et isolé le gène en cause

Le premier séquençage complet du génome humain en 2003 a permis de déceler l'existence d'environ 22 000 gènes. Depuis, les progrès de la génomique permettent d'identifier progressivement, parmi ces gènes, ceux responsables des maladies et particulièrement des maladies génétiques rares. Près de 8 000 maladies génétiques rares sont

\* Essais cliniques des années 1990 sur le déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID, cf. encadré « Quelques dates clés »).

pour des déficits immunitaires, maladies du sang, de la vision et, récemment, de maladies neuromusculaires.

- Des pathologies fréquentes peuvent également bénéficier de la thérapie génique. C'est le cas des maladies cardiovasculaires, en agissant par exemple sur la régulation de

gènes clés de l'activité cardiaque, et de maladies neurodégénératives comme Parkinson, en permettant aux neurones de fabriquer à nouveau la dopamine.

Le [tableau II](#) dresse une liste non exhaustive de maladies concernées par des essais de thérapie génique.

**Tableau II / Exemples de maladies faisant l'objet d'essais de thérapie génique.**

Catégorie	Syndrome / Maladie	Types de maladies (et abréviation anglaise)
<b>MALADIES GÉNÉTIQUES RARES*</b>		
<b>Déficits immunitaires</b>	Déficits immunitaires combinés sévères (SCID) : maladies des bébés-bulles	Déficit immunitaire combiné sévère : – lié à l'X (SCID-X), le + fréquent – par déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID) – par déficit en Artémis
	Granulomatose septique chronique (X-CGD)	
	Wiskott-Aldrich (WAS)	
<b>Maladies du sang (hématologiques)</b>	Thalassémies	Bêta-thalassémie
	Hémophilies	Hémophilie A, B
	Drépanocytose	
	Anémie de Fanconi	
<b>Maladies métaboliques</b>	Déficit familial en lipoprotéine lipase	
	Maladie de Pompe	
<b>Maladies de la vision</b>	Amaurose (ou neuropathie optique) de Leber	
	Rétinopathies pigmentaires	Choroïdémie
<b>Maladies du foie</b>	Crigler-Najjar	
	Hypercholestérolémies familiales	Hypercholestérolémie familiale de type IIa
	Anomalies du cycle de l'urée	Déficit en ornithine carbamyl transférase
<b>Maladies de la peau</b>	Épidermolyse bulleuse dystrophique	
<b>Maladies neuromusculaires</b>	Myopathies centronucléaires (CNM)	Myopathie myotubulaire (XLMTM)
	Dystrophies musculaires	Myopathie de Duchenne Gamma-sarcoglycanopathie
	Amyotrophies spinales	Amyotrophie spinale infantile
<b>Maladies neurodégénératives</b>	Leucodystrophies	Adrénoleucodystrophie (ALD) Leucodystrophie métachromatique
	Sanfilippo	
	Ataxie de Friedreich	
<b>Maladies respiratoires et digestives</b>	Mucoviscidose	