

L'analyse Microarray ou biopuce appliquée à la recherche sur les cellules cancérigènes

La réponse est dans les gènes

par Liza Glesener

Francis Crick n'exagérerait pas quand il prétendait, le 28 février 1953, avoir découvert le secret de la vie. En décrivant pour la première fois la structure des éléments constitutifs de la vie, la double hélice de l'ADN, le duo de scientifiques Crick et Watson ont révolutionné la biologie moderne. Sans cette connaissance fondamentale, le Microarray-Center du Centre de Recherche Public (CRP) Santé n'existerait pas aujourd'hui et ses employés et partenaires ne feraient pas de recherches sur les processus micromoléculaires de nos cellules, sous la direction du Dr Laurent Vallar.

Comprendre le travail de l'équipe du Dr Vallar suppose certaines connaissances de base: bienvenue dans le noyau cellulaire. Chaque cellule humaine (excepté les cellules sexuelles ou gamètes) contient l'intégralité de notre information génétique décrite sur 23 paires de chromosomes, eux-mêmes subdivisés approximativement en 24.000 gènes et constitués d'ADN. Dans un souci de simplification, disons que l'ADN se structure en 2 brins complémentaires qui comptent 4 bases, en abrégé A, T, G et C. Si cela peut sembler compliqué, c'est une merveille de simplicité, chaque base étant toujours liée à celle qui lui fait face, A à T et G à C. A partir de 4 éléments seulement, l'ADN livre la clé de la production de protéines, lesquelles déterminent à peu près toutes les fonctions biochimiques et structurales de notre corps. Les protéines n'apparaissent pas directement sur le brin



L'équipe du Dr Laurent Vallar (deuxième à partir de la dr.)

(Photos: Miikka Heinonen)

d'ADN, mais à la fin d'une succession d'événements plus longue, qui commence par la transcription. A certains endroits dans l'ADN, la liaison entre les bases A, T, C et G s'interrompt et la double hélice s'ouvre. Les protéines sont également responsables de ce processus, l'ARN Polymérase II dans ce cas-ci. La transcription effective commence alors sur l'un des brins d'ADN et la polymérase génère une molécule appelée ARN messenger (ARNm), un long brin constitué de bases, comparable à l'ADN. Toute l'importance de la complémentarité se révèle ici, car pour chaque G du brin d'ADN, la polymérase place un C dans le brin ARN nouvellement constitué, pour chaque C un G, pour cha-

que T un A et - petite exception - pour chaque A un U. L'ARNm codifie la composition des protéines: trois bases définissent chaque fois l'un des 20 acides aminés, éléments constitutifs des protéines. Si la séquence de l'ARNm est CUU-AAG-GUG ..., par exemple, la séquence correspondante en acides aminés sera leucine, lysine, valine ... La protéine est prête!

Là où les choses se compliquent un peu, c'est que l'hypothèse de départ selon laquelle chaque gène code une seule protéine est fautive. En fonction des cellules et du stade de développement, un même gène peut déterminer la structure de plusieurs protéines. Le gène DSCAM est un exemple souvent cité: il code un total de 38.000 protéines. Mais comment est-il possible que l'ADN reste toujours le même? «Des séquences que l'on appelle exon et intron se succèdent dans l'ADN, les premières codent les protéines, ce que ne font pas les dernières. Lors de la formation de l'ARNm, les deux sont d'abord copiés et l'ARNm est ensuite épissé: les introns sont éliminés et les exons sont assemblés. La construction de la protéine ne commence qu'à ce stade», explique le Dr Vallar. Mais le processus est encore plus complexe car de nombreuses cellules subissent un épissage alternatif. Ainsi, pour un ARNm déterminé, l'exon 4 peut être éliminé en plus des introns, p.ex., alors que dans un autre ARNm, il s'agira des exons 6 et 7. Si la

succession des bases change dans l'ARNm, la séquence des acides aminés change aussi, avec pour conséquence une modification de la structure et de la fonction de la protéine qui se forme.

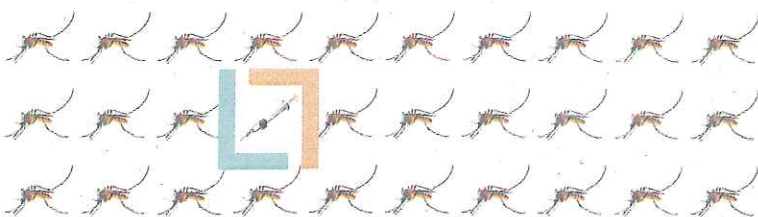
Les cellules cancéreuses présentent un dérèglement de ce processus naturel. Les ARNm sont alors épissés de manière incorrecte et il en résulte la synthèse de protéines anormales ayant des fonctions partiellement délétères. L'équipe du Dr Vallar étudie ce processus plus en détail: «Nous recherchons des formes d'épissage de l'ARNm produites exclusivement dans les cellules pulmonaires cancéreuses. Celles-ci pourraient potentiellement permettre un diagnostic précoce, d'une part, et s'avérer particulièrement appropriées dans le cadre d'une thérapie ciblée, d'autre part», ajoute le Dr Vallar. L'équipe à l'œuvre au CRP Santé étudie plusieurs aspects différents dans ce contexte: l'ARNm issu de cellules cancéreuses isolées à partir de pièces opératoires est d'abord comparé à celui de cellules pulmonaires saines. Les cellules cancéreuses sont ensuite implantées dans des souris ce qui permet de maintenir leur croissance pendant plusieurs semaines. Les cellules cancéreuses, ainsi que les cellules murines se trouvant à leur contact immédiat, sont prélevées et leur contenu en ARNm est analysé. L'objectif est de déterminer l'influence de l'environnement sur les mécanismes d'épissage se

produisant au sein des tumeurs. A chaque analyse, ce sont des milliers de formes différentes d'épissage qui doivent être identifiées et comparées.

Seule une technologie de pointe peut permettre de relever un tel défi: la technologie microarray ou biopuce. Le concept d'une «simple» puce est le suivant: 44.000 infimes gouttelettes appelées sondes sont déposées sur une surface d'environ 2 cm². Chaque sonde est constituée d'un fragment d'ADN spécialement traité. Cet ADN ne se compose que d'un seul brin qui reprend la séquence partielle d'un gène spécifique. Sur une très petite surface se trouvent donc suffisamment de sondes pour représenter le génome humain dans son intégralité. L'ARNm à analyser est lui aussi spécialement préparé. Après extraction à partir des cellules, les ARNm sont amplifiés grâce à une réaction enzymatique, et sont simultanément colorés à l'aide de marqueurs fluorescents. Le mélange d'ARNm ainsi obtenu est incubé à la surface de la biopuce pendant plusieurs heures au cours desquelles chaque molécule d'ARNm s'apparie à l'ADN qui lui est complémentaire. La fluorescence est ensuite analysée: la luminosité mesurée au niveau d'une sonde donnée est d'autant plus forte que les ARNm qui s'y sont fixés sont nombreux. Ainsi, le signal de fluorescence reflète la quantité relative de chaque ARNm présent initialement dans les cellules, et par extension, le niveau d'expression des gènes correspondant. Les puces utilisées dans l'étude du Dr Vallar sont encore plus sensibles: elles comptent non seulement une sonde par gène, mais aussi jusqu'à quatre sondes différentes par exon, soit au total 6,5 millions de sondes concentrées sur une surface de moins de 2,2 cm²! L'analyse des ARNm avec un tel microarray permet à la fois aux scientifiques de déceler quels gènes étaient actifs dans la cellule, mais aussi de déterminer quelles formes d'épissage ont été produites. Les valeurs suivantes suffisent pour illustrer toute la complexité du processus: l'équipe a besoin de deux jours pour préparer l'ARN à analyser, mais il faut plusieurs semaines pour l'analyse informatique des résultats. L'investissement est énorme car cette analyse revient à chercher une aiguille dans une botte de foin. Et si en fin de compte, seuls quelques ARNm pertinents doivent être trouvés, cela peut tout de même constituer un pas important dans la recherche en matière de cancer du poumon.



En fonction des cellules et du stade de développement, un même gène peut déterminer la structure de plusieurs protéines



La recherche au Luxembourg.
Pour vous. Pour votre vie quotidienne.

Fonds National de la
Recherche Luxembourg

www.fnrl.lu

INVESTIGATING FUTURE CHALLENGES