

TRANSCRIPTOME ET PROTEOME : APPLICATIONS DANS L'HEPATITE CHRONIQUE C

Tarik Asselah

Pôle des Maladies de l'Appareil Digestif - Service d'Hépatologie

Université Denis Diderot - Paris7 ; et INSERM CRB3 - U773

Hôpital Beaujon, Clichy.

Introduction, transcriptome et protéome (généralités)

Les avancées récentes en biologie moléculaire ont permis l'analyse des transcriptomes et protéomes (1-7). Le génome (ensemble des gènes) humain a été séquencé récemment. Dans une cellule, un certain nombre de gènes sont activés en fonction du type de la cellule et de son environnement. Les gènes sont transcrits en ARN messagers (transcription). Le transcriptome est l'ensemble des transcrits (ARN messagers). Les ARN messagers sont traduits en protéines. Le protéome est l'ensemble des protéines dans un milieu donné. L'analyse du profil protéique ou protéome, peut être maintenant réalisée par une technique sensible et rapide, basée sur la fixation des protéines suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionisation-Time-of-Flight (SELDI-TOF)).

Ainsi, l'étude de l'expression des gènes fait appel à deux approches : d'une part l'analyse du transcriptome constitué par l'ensemble des ARNm présents dans une cellule dans une situation donnée ; d'autre part l'analyse du protéome représenté par les protéines que codent ces ARNm. Leur finalité commune est d'identifier et de quantifier les produits de l'expression des gènes d'une cellule ou d'un tissu à un instant et dans un environnement donné, dans un but de comparaison entre différents états biologiques. L'approche du transcriptome est aujourd'hui rendue très accessible grâce à des méthodologies bien maîtrisées et au large spectre d'applications. L'analyse du transcriptome à grande échelle est possible grâce à la technique des puces à ADN ou microarrays. Celles-ci sont utilisées pour identifier et quantifier la sur- ou sous-expression d'un ensemble de gènes dans une situation biologique donnée. L'analyse d'une masse suffisante de données d'expériences sur puces peut permettre d'identifier des familles et des réseaux fonctionnels de gènes mis en jeu sous l'effet du stimulus étudié. La PCR quantitative en temps réel est indispensable en particulier pour

valider les résultats des expériences sur puces à ADN. Elle permet de mesurer précisément, de façon relative (comparaison d'états biologiques) ou absolue (nombre de copies du messenger), le niveau d'expression d'un gène d'intérêt au sein d'un type cellulaire placé dans différentes situations physiopathologiques.

Le développement récent des méthodes de protéomique à haut débit, dont la réalisation de profils protéiques par la méthode SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation – Time-of-flight), fournit des outils potentiellement puissants permettant d'établir le protéome global de n'importe quel milieu biologique. Cette approche permet d'obtenir, pour un échantillon biologique (sérum, cellules, tissu...), un spectre composé de plusieurs centaines de pics dont chacun est caractéristique d'une protéine particulière qui est identifiée par sa masse. Des exemples de calibration des masses (calibrant externe), ainsi qu'un spectre de profil protéique sérique (SELDI-TOF) sont représentés sur la **Figure 1**. La comparaison de profils protéiques de sérums provenant de groupes de patients de phénotypes différents permet ainsi d'identifier des biomarqueurs potentiels caractéristiques des phénotypes étudiés.

Grâce à ces nouveaux outils, il a été démontré que l'analyse combinée d'un groupe de gènes et/ou protéines est plus discriminante dans l'évaluation d'un processus pathologique que le dosage d'un seul marqueur (1-4). L'utilisation de ces outils est possible à chaque étape de l'histoire naturelle d'une maladie. Ainsi, concernant l'hépatite chronique C, le transcriptome et/ou le protéome peuvent permettre de mieux comprendre la physiopathologie de l'hépatite chronique C, d'identifier un ensemble de marqueurs ("signature") spécifiques de la progression de la fibrose ou prédictifs de la réponse au traitement.

Histoire Naturelle : Facteurs associés à la progression de la fibrose

L'infection par le VHC est responsable de 70% des cas d'hépatite chronique (8-9). L'évolution de l'hépatite chronique C est très variable d'un sujet à l'autre. La majorité des études ont mis en évidence que l'âge, en particulier au moment de l'infection, le sexe masculin et la consommation excessive d'alcool étaient significativement associés à la progression de la fibrose. Un déficit immunitaire dû à une infection par le VIH ou à d'autres causes est également un facteur de progression plus rapide de la fibrose. Plus récemment, des

études ont suggéré que la stéatose, l'obésité et le diabète sont associés à une progression plus rapide de la fibrose (10).

Apports du transcriptome dans la compréhension de la progression de la fibrose

L'expression hépatique de certains gènes peut être étudiée en fonction du stade de l'hépatite chronique C : passage à la chronicité, progression de la fibrose, etc... (11-12). Nous avons étudié l'expression des gènes intra-hépatiques de soixante trois malades atteints d'hépatite chronique C ayant une fibrose plus ou moins sévère (12). Les biopsies hépatiques avaient été réalisées avant l'instauration d'un traitement antiviral. Deux cent quarante gènes potentiellement impliqués dans la fibrogenèse avaient été sélectionnés (principales voies métaboliques : le contrôle du cycle cellulaire, l'angiogenèse, l'apoptose, la formation et la dégradation de la matrice extracellulaire, la réponse immunitaire, etc...). L'analyse de l'expression de ces 240 gènes avait été effectuée par RT-PCR en temps réel. Nous avons pu établir une signature moléculaire avec 11 gènes (*KRT 19*, *COL1A1*, *STMN2*, *CXCL6*, *CCR2*, *TIMP1*, *IL8*, *IL1A*, *ITGA2*, *CLDN 4*, *IL2*) permettant de discriminer les patients ayant une fibrose minime (score Metavir F1) de ceux ayant une fibrose modérée (F2). A titre d'exemple, le niveau d'expression des ARN messagers de trois gènes de cette signature (cytokératine 19 (*KRT19*), collagène 1 alpha1 (*COL1A1*), et stathmine 2 (*STMN2*) sont représentés en fonction du stade de fibrose (**Figure 2**). Le niveau d'expression de chacun de ces gènes augmente avec chaque stade de fibrose (score Métavir). Avec cette « signature », 15 des 18 échantillons de stade F1 (83%) et 19 des 21 échantillons de stade F2 (90%) étaient correctement classés ($p < 10^{-5}$)(18).

Prédiction de la réponse au traitement

Actuellement, l'utilisation d'une bithérapie associant l'interféron alpha pegylé (IFN PEG) et la ribavirine (RBV) permet d'obtenir une réponse prolongée dans environ 55% des cas (13). Les facteurs pré-thérapeutiques prédictifs de l'efficacité du traitement sont principalement liés au virus (génotype non-1 et charge virale faible) et à moindre degré au malade (sexe féminin, âge jeune et maladie hépatique peu sévère (fibrose minime ou modérée) (14). En effet, en cas d'infection par un génotype 2 ou 3, la probabilité de réponse

virologique prolongée est proche de 80 % ; alors qu'en cas d'infection par un génotype 1 elle est de l'ordre de 50 %.

Même si la probabilité de réponse est statistiquement relativement bien déterminée en fonction d'un certain nombre de caractéristiques liées au virus et au malade, la valeur prédictive pour un malade donné reste imprécise. Le transcriptome et/ou le protéome pourraient permettre d'identifier un ou un ensemble de marqueurs ("signature") spécifiques prédictifs de la réponse au traitement (15).

Transcriptome et prédiction de la réponse au traitement

Une étude récente a évalué l'expression des gènes intrahépatique (puces) de malades atteints d'hépatite chronique C, avant traitement, (16). Le niveau d'expression des gènes était comparé entre 15 non répondeurs et 16 répondeurs. Une surexpression d'un groupe spécifique de gènes (gènes induits par l'interféron) était prédictive de la non réponse au traitement par bithérapie IFN PEG et RBV. Ces résultats nécessitent d'être confirmés.

SELDI-TOF: une approche de protéomique globale à haut débit permettant l'identification de nouveaux biomarqueurs

Une étude récente a rapporté les principaux résultats suivants (17) (i). La comparaison des profils protéiques de sérums de patients atteints d'hépatite chronique C, après bithérapie, a montré des profils protéiques totalement différents permettant de différencier les patients ayant répondu de ceux n'ayant pas répondu au traitement. (ii) La comparaison des sérums de patients obtenus avant la mise au traitement et en fin de traitement a montré deux cinétiques clairement différentes en fonction de la réponse au traitement. Les patients non répondeurs avaient un profil protéique qui ne se modifiait pas sous l'effet du traitement alors que les patients avec réponse prolongée avaient un protéogramme significativement différent entre le début et la fin du traitement. L'ensemble de ces résultats suggère que l'étude de la cinétique du protéome sérique global pourrait être un examen simple permettant de prédire précocement la réponse au traitement anti-viral. Il est également possible que l'analyse globale du protéome sérique avant traitement puisse prédire la réponse au traitement.

Conclusion

Des études préliminaires suggèrent que les nouvelles technologies (transcriptome, protéome) pourraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de l'hépatite chronique C, de définir des «signatures» associées au pronostic de la maladie ou à la réponse au traitement. Ces résultats devraient être confirmés par des études prospectives avec de grands nombres de malades, avec des techniques plus performantes et simplifiées pouvant déboucher sur des tests applicables en routine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Cooper RS, Psaty BM. Genomics and medicine: distraction, incremental progress, or the dawn of a new age? *Ann Intern Med.* 2003;138(7):576-80.
- 2 - Hood L, Galas D. The digital code of DNA. *Nature.* 2003; 23;421(6921):444-8.
- 3 - Balmain A. Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):77-82.
- 4 - Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S. Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *JAMA.* 2001 14;286(18):2296-307.
- 5 - Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15(1):24-30.
- 6 - Wiesner A. Detection of tumor markers with ProteinChip technology. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004 Feb;5(1):45-67.
- 7 - Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt AB, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-577.
- 8 - Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36 :S47-56.
- 9 - NIH consensus development conference : management of hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36.
- 10 - Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut.* 2006;55(1):123-30.
- 11 - Bieche I, Asselah T, Laurendeau I, Vidaud D, Degot C, Paradis V, Bedossa P, Valla DC, Marcellin P, Vidaud M. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology.* 2005;332(1):130-44.

- 12 - Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, Vidaud D, Degott C, Paradis V, Bedossa P, Valla DC, Vidaud M, Marcellin P. Gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2005;129(6):2064-75.
- 13 – Marcellin P, Asselah T, Ripault MP, Boyer N. Treatment of chronic hepatitis c. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2004 Mar;50(1):29-36.
- 14 - Martinot-Peignoux M, Comanor L, Minor JM, Ripault MP, Pham BN, Boyer N, Castelnau C, Giully N, Hendricks D, Marcellin P. Accurate model predicting sustained response at week 4 of therapy with pegylated interferon with ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2006;13(10):701-7.
- 15 – Asselah T, Bièche I, Paradis V, Bedossa P, Vidaud M, Marcellin P. Implications of Genomics and Proteomics for the Diagnosis and the Treatment of chronic hepatitis C. *Seminars in Liver Diseases*. 2007; à paraître.
- 16 - Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*. 2005; 128(5):1437-1444.
- 17 - Paradis V, Asselah T, Dargere D, Ripault MP, Martinot M, Boyer N, Valla D, Marcellin P, Bedossa P. Serum proteome to predict virologic response in patients with hepatitis C treated by pegylated interferon plus ribavirin. *Gastroenterology*. 2006;130 (7):2189-97.

Figure 1 : Niveaux d'ARNm pour 3 gènes (*KRT19*, *COL1A1*, *STMN2*) en fonction du stade de fibrose

Niveaux standardisés
ARNm

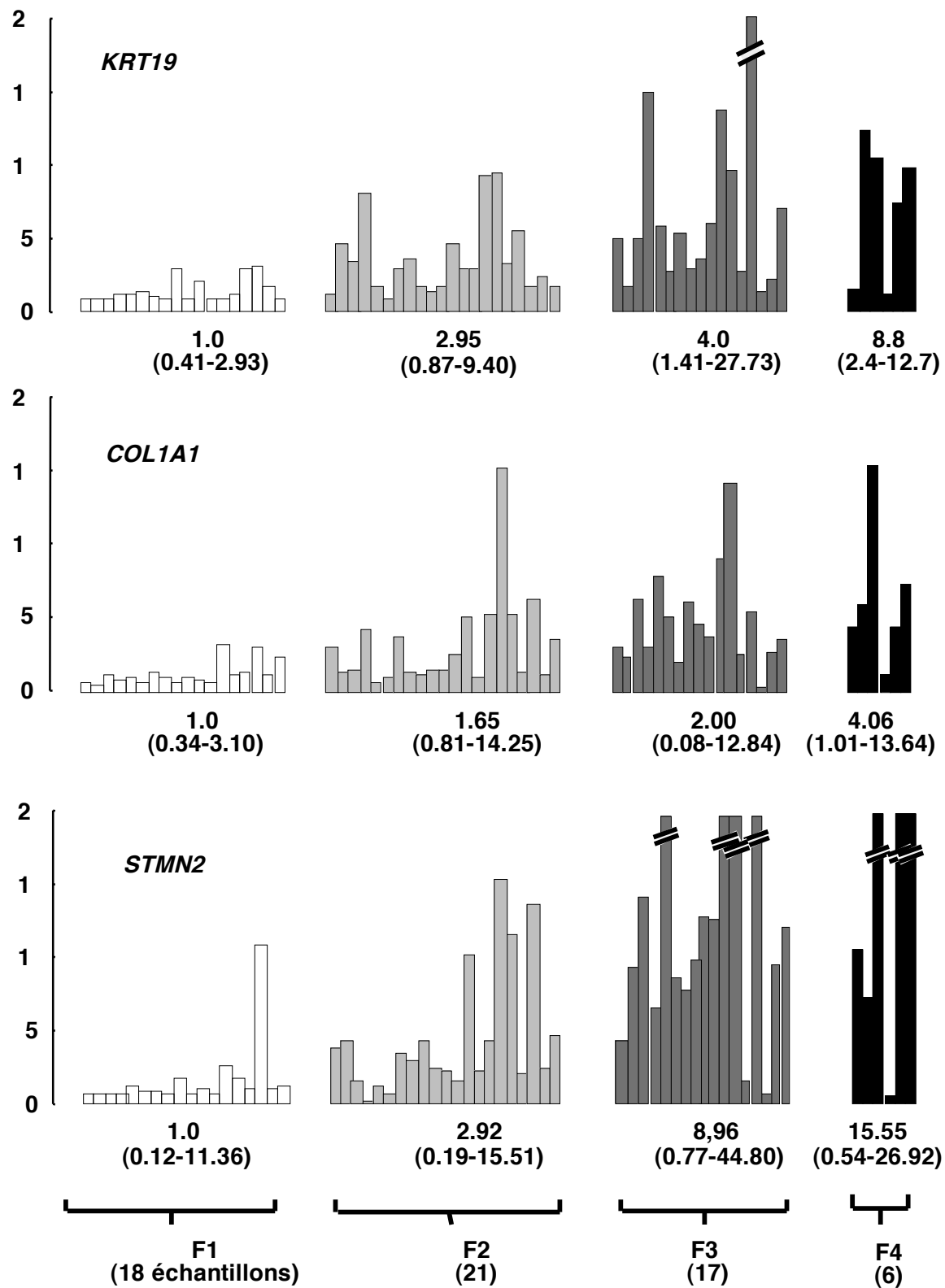
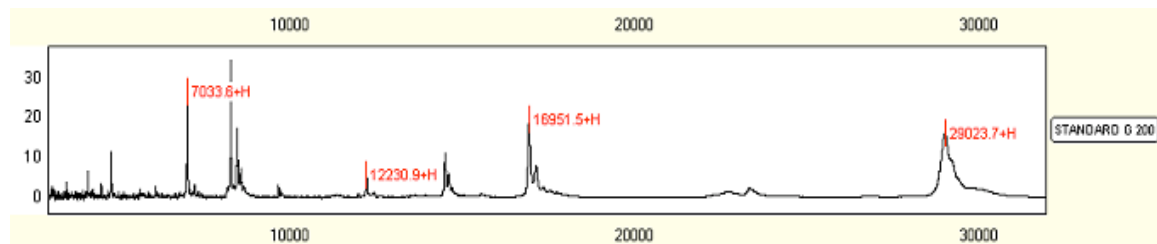


Figure 2A : Etalonnage par protéines de PM connu



- | | |
|-------------------------|-----------|
| - Hirudin BHVK | 7.034 Da |
| - Cytochrome C (Bovine) | 12.230 Da |
| - Myoglobin (Equine) | 16.951 Da |
| - Carbonic Anhydrase | 29.023 Da |

Figure 2B : Spectre de protéome sérique chez un patient

