

L'eau ultrapure en tant que composant des méthodes de mesure multiparamètres utilisées dans la recherche sur les médicaments

Sven P. Wichert¹, Elmar Herbig², Michael C. Wehr¹

1 Institut Max Planck de médecine expérimentale (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin), Goettingen, Allemagne, maintenant Systasy Bioscience GmbH, Munich, Allemagne

2 Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Goettingen, Allemagne

Correspondance : Michael C. Wehr, Systasy Bioscience GmbH, Adams-Lehmann-Str. 56, 80797 Munich, Allemagne ; e-mail : wehr@systasy.de

Introduction

Dans la recherche biomédicale et dans la recherche pharmaceutique sur les médicaments, on combine de plus en plus souvent des analyses basées sur les cellules avec des méthodes de mesure multiparamètres afin de mieux comprendre les processus pathologiques extrêmement complexes et les effets des substances sur les maladies. Ces analyses requièrent l'implémentation de méthodes de biologie moléculaire et de biologie cellulaire qui nécessitent d'utiliser de l'eau ultrapure, par exemple lors de la réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction, PCR) ou de la culture de cellules.

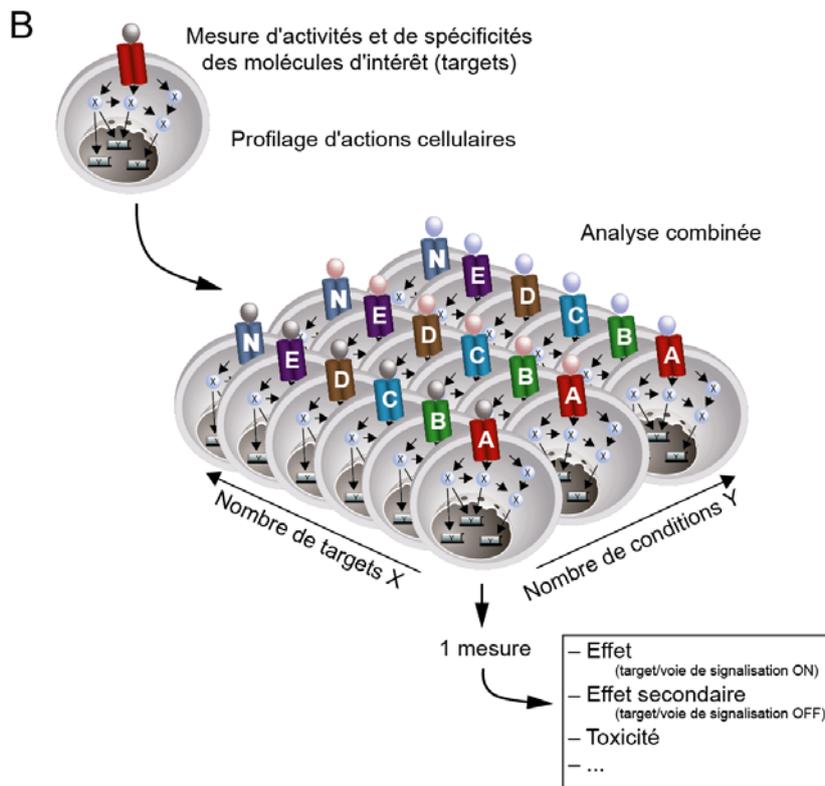
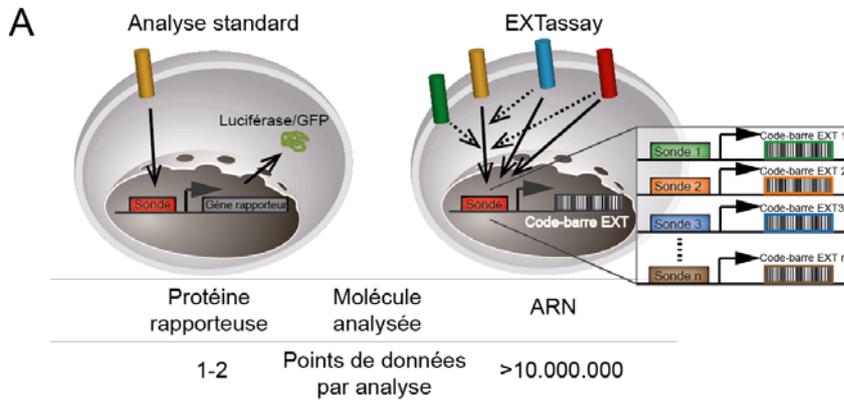
Les analyses basées sur des cellules servent à identifier des différences dans des processus définis de signalisation cellulaire causées, par exemple, par l'ajout de substances précises. Ces différences d'activité peuvent être déterminées par des changements relatifs de classes de molécules rapporteuses définies (par exemple ARN messenger (ARNm), micro-ARN, protéines, etc.). Une analyse des effets de molécules biologiquement importantes, telles que des substances chimiques et des anticorps, sur des processus cellulaires définis prend généralement beaucoup de temps, est coûteuse et exige des quantités considérables de consommables. De plus, il est important d'utiliser des solutions d'une grande pureté (par ex. en ce qui concerne l'eau). Voilà pourquoi les méthodes de mesure multiparamètres jouent un rôle de plus en plus important.

Description de la méthode de mesure

Les méthodes de mesure multiparamètres permettent d'analyser en même temps la manière dont un grand nombre de molécules d'intérêt cellulaire (les targets) réagissent à l'ajout de substances actives et ainsi de créer des profils d'action cellulaires. Ces analyses complètes sont notamment nécessaires pour démontrer l'effet thérapeutique souhaité et déceler les effets secondaires indésirables. Elles sont également importantes pour le développement de nouveaux champs d'application pour les médicaments déjà autorisés. De plus, l'acquisition de plus grandes quantités de données grâce à des méthodes de mesure multiparamètres, par exemple la technologie EXTassay [1], offre d'énormes avantages en terme de coûts.

La technologie EXTassay est basée sur des rapporteurs à code-barres moléculaires et offre des méthodes de mesure inédites et extrêmement parallélisées (EXT signifie *Expressed Sequence Tag* ; les EXT sont de courtes molécules synthétiques d'ARN avec une séquence spécifiquement codée de 49 bp de longueur). Cette technologie permet ainsi de recueillir plusieurs millions de données en une seule mesure étant donné que différents résultats cellulaires peuvent être analysés par des codes-barres moléculaires via séquençage [1] (ill. 1a). Les analyses classiques de gènes rapporteurs permettent de mesurer uniquement un ou deux points de données par "run" si bien que pour relever beaucoup de points de données on utilise des solutions basées sur des appareils. En revanche, le système "Assay" spécifique est basé sur des molécules rapporteuses, appelées rapporteurs EXT ou codes-barres EXT, qui portent des adresses moléculaires et permettent ainsi de tirer des conclusions sur le lieu et le moment de leur expression. À l'aide de ces codes-barres, il est possible d'identifier en même temps un grand nombre de processus cellulaires différents, par ex. des activations de récepteurs et d'autres signaux cellulaires en aval (ill. 1b).

Lors de ces analyses multiparamètres, on utilise la technologie de séquençage haut débit (Next Generation Sequencing, NGS) comme système de détermination des séquences pour une analyse fonctionnelle et quantitative des différents processus cellulaires. Le NGS a d'abord été utilisé pour séquencer des génomes [2]. Du fait de son développement rapide, il est désormais également utilisé pour des aspects médicaux comme les diagnostics thérapeutiques et l'identification de risques de maladies génétiques. Cet article se propose de décrire les possibilités d'utilisation de l'eau ultrapure aux différents stades de cette méthode complexe.



III. 1 : A) Les tests spécifiques permettent l'analyse simultanée de plusieurs activités cellulaires dans une seule mesure. À la différence des analyses classiques des gènes rapporteurs, les tests spécifiques permettent de relever plus de 10 millions de points de données par expérience. B) Les analyses représentent des spécificités et des profils d'action cellulaire de substances. Les profils d'action de différentes molécules d'intérêt X dans différentes conditions Y sont enregistrés en même temps au cours d'une seule mesure (source : sauf indication contraire, toutes les illustrations proviennent des auteurs).

Matières et méthodes

Utilisation d'eau ultrapure pour des méthodes de mesure multiparamètres

L'eau ultrapure joue un rôle décisif dans les différentes étapes que comprend une expérience sur les rapporteurs spécifiques. Au cours de nos études, de l'eau ultrapure autoclavée a par exemple servi à humidifier les incubateurs de culture cellulaire afin de garantir une incubation stérile et sans spores. De l'eau ultrapure a également été utilisée lors de la détermination de paramètres biomoléculaires (par ex. concentrations d'ADN et d'ARN).

Par ailleurs, on a utilisé de l'eau ultrapure lors de la préparation des échantillons pour le NGS, c'est-à-dire lors de la purification des rapporteurs EXT à l'aide du kit d'isolation d'ARN, de l'écriture de l'ADNc ainsi que des étapes PCR suivantes qui sont nécessaires pour l'amplification de la matière rapporteuse pour le séquençage haut débit. L'eau ultrapure a également été utilisée lors des "runs" NGS finaux qui ont été effectués avec une *Ion Torrent Personal Genome Machine*[®] (système de séquençage PGM[™]) de la société Life Technologies (voir ci-dessous).

L'eau ultrapure nécessaire au cours des différentes étapes de la méthode a été produite avec le système arium[®] pro VF (ill. 2) de la manière déjà décrite dans Nitzki et Herbig [3].

Culture cellulaire

Les cellules PC12-tet-OFF (PC12-OFF) (Clontech) ont été cultivées dans un milieu DMEM (concentration de glucose de 1 g/l, Lonza) sur des plaques recouvertes de Poly-L-Lysine dans un incubateur à air humidifié avec de l'eau ultrapure à 37 °C et avec 5 % de CO₂. Le milieu a été supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 5 % de sérum de cheval (HS), 1 % de pénicilline-streptomycine et 1 % de GlutaMAX (Invitrogen).

Transfection des vecteurs rapporteurs de l'analyse

Des cellules PC12-OFF ont été transfectées en suspension avec les vecteurs rapporteurs de l'analyse. À cet effet, elles ont été trypsinées, réduites en fragments et resuspendues dans le milieu DMEM (supplémenté avec seulement 1 % de SVF) avec une densité de 10⁶ cellules par ml. Des complexes ADN-Lipofectamine ont été préparés avec 1 µg d'ADN et 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) dans 100 µl de milieu OptiMEM par 1,5 × 10⁶ cellules. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange a été combiné à la suspension de cellules et mis à incubé à 37 °C pendant 4 heures. Pour éliminer les réactifs de transfection, les cellules ont été lavées une fois avec du milieu DMEM (1 % de SVF). Avant l'analyse, les cellules ont été cultivées dans des conditions identiques. Pour les analyses, on a utilisé 5 ng par ADN de plasmide et par construction de rapporteur EXT. Pour chaque élément cis-régulateur, on a cloné 3–5 constructions de rapporteur avec différents EXT.



III. 2 : Système de purification d'eau actuel arium[®] pro VF (source : Sartorius Lab Instruments).

Préparation des échantillons de séquençage Extraction d'ARN

L'ARN a été purifié à l'aide du kit RNeasy de Qiagen, y compris une digestion de la DNase-I sur colonne selon le protocole du fabricant. Après la purification de l'ARN, les échantillons ont été précipités avec un demi-volume d'acétate d'ammonium 7,5 M (préparé dans de l'eau ultrapure) et 3 volume de 100% d'éthanol. Pour la synthèse du cDNA, on a utilisé 1 µg d'ADN extrait, la transcriptase inverse Superscript III (Invitrogen) et une amorce nonamère aléatoire de 120 pmol. La pureté de l'ADN et les éventuelles contaminations de l'ADN ont été vérifiées au cours de contrôles qui ne contenaient pas de transcriptase inverse (-RT).

Amplification des produits cDNA EXT à l'aide d'une Decoding-PCR

Des Decoding-PCR ont été effectuées avec une polymérase HotStarTaq Plus ADN, des dNTP (tous les deux de Qiagen) et de l'eau ultrapure au cours de 30 cycles (cycle : 30 s à 95 °C, 30 s à 59 °C, 30 s à 72 °C) (ill. 3). Le cDNA rétrotranscrit a servi de produit de départ. Lors du contrôle négatif (dernière trace), on n'a pas utilisé de cDNA.

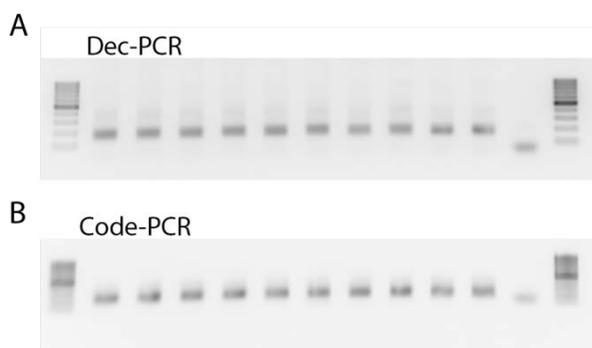
Des PCR codantes ont également été effectuées avec la polymérase HotStar Taq Plus et de l'eau ultrapure, mais seulement au cours de 10 cycles (cycles : 30 s à 95 °C, 20 s à 58 °C, 20 s à 72 °C) (ill. 3). Comme produit de départ, on a utilisé à chaque fois 1 µl d'un échantillon Decoding-PCR dilué à 1:10. Aucun cDNA n'a été utilisé pendant le contrôle négatif. Tous les produits PCR ont été visualisés et contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose.

Séquençage selon la méthode semiconducteur

Le séquençage des molécules rapporteuses EXT a été effectué par NGS avec un système de séquençage Ion PGM™ (ill. 4). Cette technologie de séquençage est basée sur la détection séquentielle de protons qui sont libérés pendant le processus de polymérisation de l'ADN. Selon la base à polymériser (adénine, guanine, cytosine ou thymine) sur le brin complémentaire, le dNTP correspondant est incorporé et un proton est libéré et est détecté à l'aide de détecteurs d'ions [4].

Analyse séquentielle

Pour analyser les données de séquençage, on a utilisé des outils basés sur UNIX du kit FastX [5] (programme de conversion FASTQ-to-FASTA et séparateur de code-barres FASTX). La présence et l'identité de chaque EXT ont été déterminées par une analyse BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [6] sur une bibliothèque de référence EXT et des EXT exprimés de manière différentielle ont été identifiés et quantifiés à l'aide de scripts R [7].



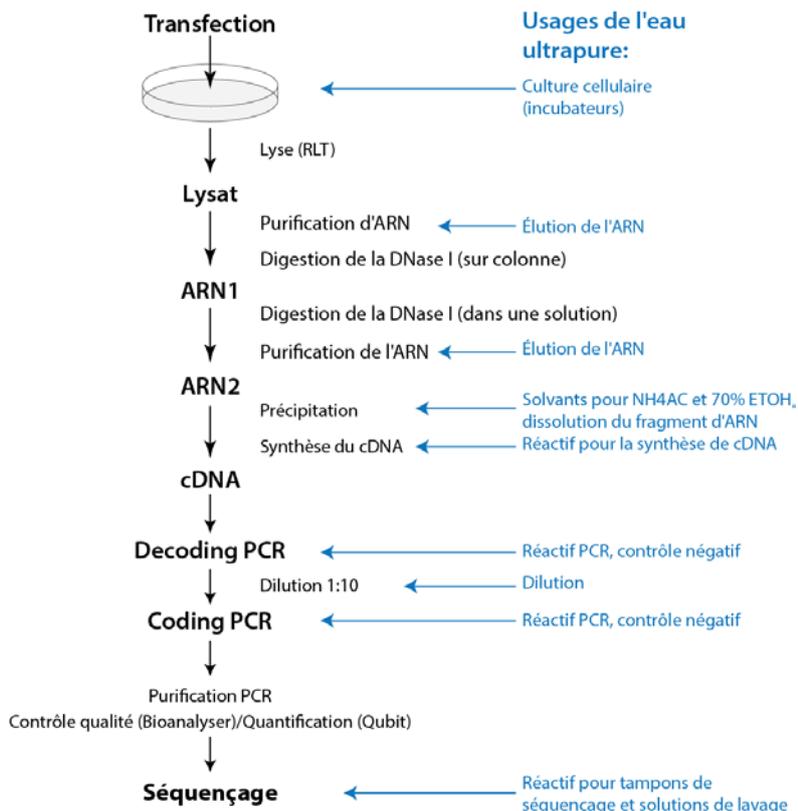
III. 3 : Contrôle qualité des étapes PCR d'amplification des EXT. Gels d'agarose de A) Decoding-PCR, B) Coding-PCR. La dernière trace indique à chaque fois le contrôle négatif avec de l'eau ultrapure ; des dimères d'amorce sont visibles ici.



III. 4 : Ion Torrent Personal Genome Machine® (système de séquençage PGM™)
(source : Labor der Systasy Bioscience GmbH, Munich, Allemagne).

Résultats

La plate-forme d'analyse multiparamètres a été utilisée en combinaison avec NGS et en utilisant de l'eau ultrapure pour mesurer un grand nombre de réactions cellulaires en aval qui se produisent après a) un stimulus spécifique, b) un stimulus à large spectre ou c) l'ajout d'un inhibiteur spécifique. Dans ce cas, des cellules PC12 ont été transfectées avec 33 rapporteurs EXT différents qui peuvent reproduire les activités de onze voies de signalisation cellulaires différentes. Le récepteur ERBB4 a été transfecté pour l'application d'un stimulus spécifique (a). Ce récepteur joue un rôle dans différents processus biologiques, entre autres dans le développement du cœur et de la différenciation fonctionnelle de neurones, mais aussi lors du développement du cancer et de maladies psychiatriques telles que la schizophrénie [8, 9]. Le récepteur ERBB4 peut être activé par le ligand neuréguline 1 et par sa partie bioactive et soluble, le domaine EGF-like (EGFid).



III. 5 : Mode opératoire pour la préparation d'échantillons de séquençage et l'utilisation d'eau ultrapure lors des différentes étapes de travail.

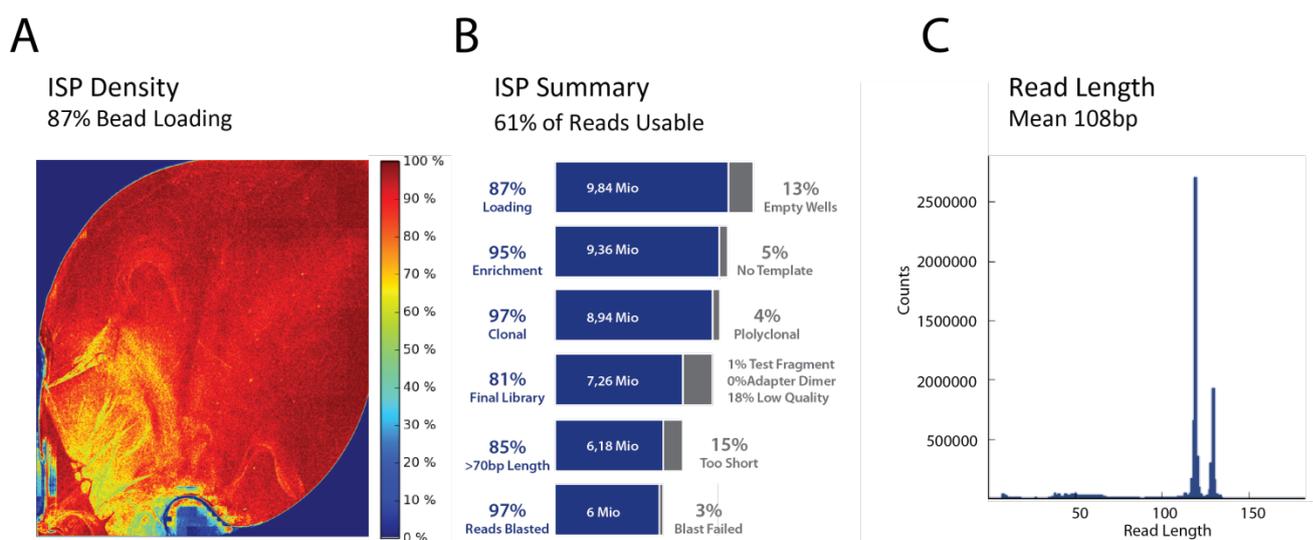
Cette activation a pu être reproduite avec les analyses multiparamètres [1, 10]. L'activité EGFlid de ERBB4 a été bloquée de manière spécifique par le lapatinib, un inhibiteur de la kinase se fixant sur ERBB (c), qui est également utilisé comme agent thérapeutique contre le cancer. Un stimulus combiné de phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) et de sérum a été sélectionné comme stimulus à large spectre (b).

Eau ultrapure utilisée comme composant pour la préparation des échantillons de séquençage

L'eau ultrapure a été utilisée avec succès au cours de plusieurs étapes de préparation des échantillons (ill. 5), notamment lors de travaux de biologie moléculaire, par exemple pour les PCR pour préparer les échantillons (Decoding-PCR et Code-PCR, ill. 3) et pour les réactions de séquençage qui ont été effectuées avec le système de séquençage PGM™ (ill. 6). Conformément aux instructions dans le mode d'emploi du système PGM™, il fallait utiliser une eau d'une qualité élevée avec une conductivité de 18 MΩ × cm (voir le mode d'emploi du système de séquençage Ion-Torrent [11]). Sans une eau de cette qualité, il n'est pas possible de garantir un séquençage fiable. L'eau ultrapure utilisée pour les expériences décrites ne contenait pas de quantités décelables de RNases et de DNases (conc. de RNases et de DNases inférieures à la limite de détection de 20 ng/ml et de 80 ng/ml) et elle fournissait la qualité constante et stable nécessaire pour les expériences avec une très faible concentration de COT (≤ 2 ppb) et une conductivité de 18,2 MΩ × cm compensée à 25 °C.

Analyse quantitative et cinétique des activités de la signalisation cellulaire

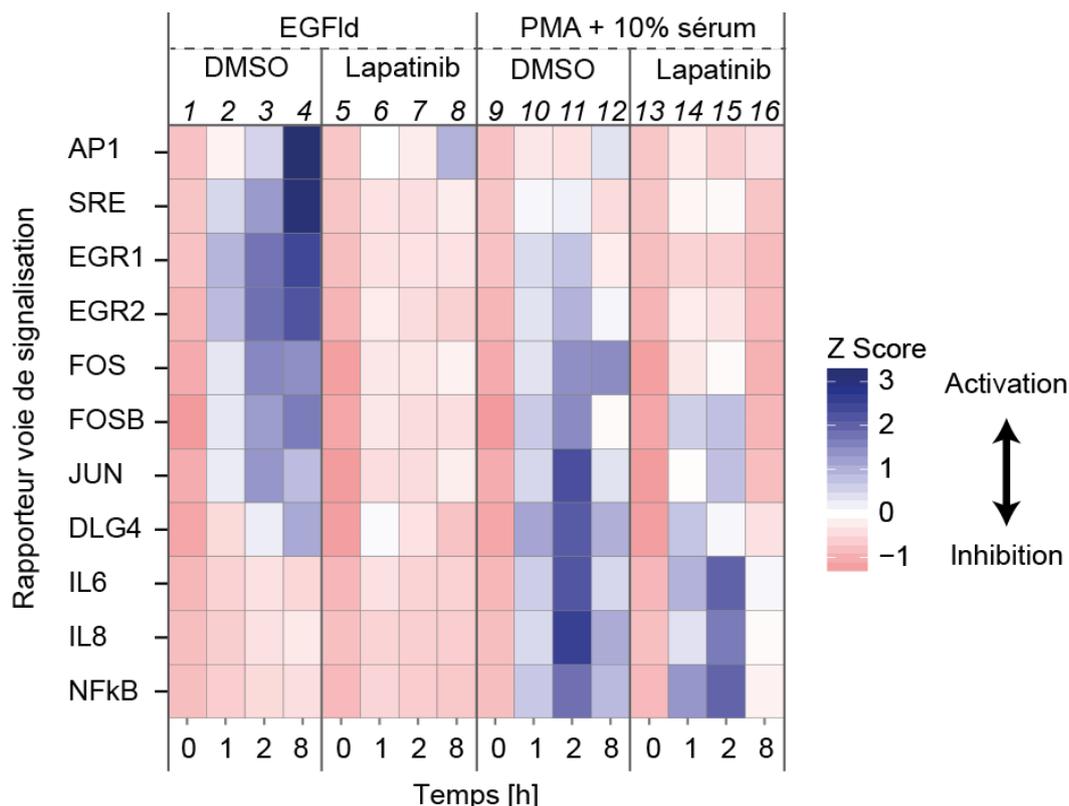
L'analyse quantitative et cinétique des activités de signalisation en aval montre un schéma d'activation différentiel qui est spécifique au stimulus respectif (ill. 7). Ainsi les gènes immédiats précoces ont été activés de manière renforcée dans des cellules traitées avec EGFlid (ce sont les gènes qui sont activés directement après une stimulation et via des cascades MAP-kinase, par ex. EGR1, EGR2, FOS, FOSB et JUN [12]), tandis que les voies de signalisation qui sont attribuées aux réponses au stress (IL6, IL8, et NFκB) n'ont pas été activées (ill. 7, colonnes 1–4). Les cellules qui ont été traitées avec EGFlid et l'inhibiteur lapatinib présentent une inactivation pratiquement complète pour toutes les voies de signalisation mesurées ici (ill. 7, colonnes 5–8). Dans les cellules stimulées avec le PMA/sérum, des réponses au stress ont été induites de manière renforcée (ill. 7, colonnes 9–12). En revanche, elles n'ont été que partiellement inhibées après traitement avec du lapatinib (ill. 7, colonnes 13–16) (cf. par ex. points de données 2 heures après ajout). L'eau ultrapure a été utilisée avec succès pendant les analyses multiparamètres et ensuite lors des analyses NGS.



III. 6 : Contrôle qualité du séquençage avec le système de séquençage Ion PGM™. A) Densité Ion Sphere Particle(ISP), montre la densité de charge des ISP chargés d'échantillons selon la gamme de couleurs. B) Résumé ISP (Summary), contient des informations sur la densité de charge (Loading

87 %, 9,84 Mio. Wells), l'enrichissement en ISP chargés de séquences effectué avant le séquençage (Enrichment 95 %), le nombre d'ISP clonaux (Clonal 97 %), le nombre de séquences obtenues en tout (7,26 Mio. Reads) et le nombre de séquences utilisables pour l'analyse (6 Mio. Reads Blasted). C) Information sur la longueur moyenne des différentes séquences obtenues (Read Length)

Il a été démontré de manière exemplaire que la plateforme de profilage multiparamètres EXTassay permet d'adresser les effets cellulaires de principes actifs. Il sera ainsi possible de mieux connaître les mécanismes d'action cellulaires souhaités et indésirables des principes actifs dès les phases précoces du développement des médicaments et ainsi de diminuer le risque de défaillance et les coûts dans la recherche médicale sur les principes actifs.



III. 7 : Analyse quantitative et cinétique des activités de la signalisation cellulaire (les sites de liaison pour les facteurs de transcription sont appelés AP1, SRE, DLG4. Explication des autres rapporteurs des voies de signalisation, voir dans le texte) à l'aide de la technologie "Assay" spécifique. Les activités de la signalisation qui ont été générés par le stimulus spécifique domaine EGF-like (EGFId) ou par le stimulus à large spectre phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA)/10 % de sérum sont inhibés plus ou moins fortement par l'inhibiteur lapatinib. Les numéros des colonnes sont indiqués en italique.

Discussion

L'eau ultrapure utilisée ici peut servir sans problème pour les applications de biochimie, de biologie moléculaire et de biologie cellulaire décrites ci-dessus et permet d'obtenir des résultats pertinents. Cette eau ultrapure a été utilisée entre autres pour les étapes critiques de la préparation d'échantillons NGS pour la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et lors du séquençage haut débit qui a suivi (ill. 3 + 6). Les analyses multiparamètres ont permis d'identifier une solide réponse différentielle du signal entre un stimulus spécifique et un stimulus à large spectre (ill. 7).

En particulier les réactions de séquençage exigent une eau ultrapure qui répond à des normes élevées telles que celles de l'eau de type 1 utilisée qui est caractérisée par des concentrations de COT très faibles et une qualité constante.

De plus, cette eau ne présente aucune activité des nucléases (une faible activité des nucléases suffit à perturber par exemple des applications sensibles de biologie moléculaire, telles que des PCR) et elle se distingue par une valeur de conductivité constante de $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$.

Le système de purification d'eau utilisé permet donc d'effectuer sans problème, avec le séquenceur PGM™, des séquençages qui requièrent une eau d'une qualité constante avec une conductivité de $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ (des données non publiées montrent que l'eau qui a été traitée avec moins de $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ ne convient pas aux travaux de biochimie et de biologie moléculaire, tels que les analyses western blot et les PCR). Tous les paramètres de qualité de l'eau ultrapure mentionnés doivent être remplis pour permettre d'obtenir des résultats reproductibles.

En revanche, l'utilisation d'eau purifiée avec des paramètres de qualité moins bons ou contenant quelques impuretés ne donne pas de résultats satisfaisants. D'entrée, il faut exclure totalement l'eau du robinet, car elle contient beaucoup de composants (sels, composés organiques, nucléases, microorganismes et ADN libre) qui peuvent également varier fortement selon les régions.

Conclusion

Les analyses multiparamètres permettent un profilage complet des réponses cellulaires et sont de plus en plus souvent utilisées au cours des phases précoces de la recherche sur les médicaments pour pouvoir distinguer rapidement et à moindre coût les effets souhaités des principes actifs des effets secondaires indésirables. Les analyses décrites ici, qui sont basées sur des sondes génétiques avec des rapporteurs à code-barres moléculaires, exigent d'utiliser des matières répondant à des normes qualitatives très élevées. Cela a été démontré avec l'exemple de l'eau ultrapure utilisée avec succès au cours de différentes étapes expérimentales des analyses multiparamètres.

Remerciements

Les auteurs remercient Ben Brankatschk, Sabrina Galinski, Alexandra Rupp et Elena Ciirdaeva pour leur collaboration et les discussions constructives sur ce sujet.

Bibliographie

- [1] Botvinnik A, Wichert SP, Fischer TM, Rossner MJ. Integrated analysis of receptor activation and downstream signaling with EX- Tassays. *Nat Methods*. Janv. 2010 ; 7(1):74–80.
- [2] Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell*. 26 sept. 2013 ; 155(1):27–38.
- [3] Nitzki F, Herbig E. In situ Hybridisierung – Die Bedeutung von Reinstwasser für RNA Technologien. *GIT Labor-Fachzeitschrift*. Mars 2013 ; (année 57, 3):157–9.
- [4] Rusk N. Torrents of sequence. *Nat Meth*. Janv. 2011 ; 8(1):44–44.
- [5] Patel RK, Jain M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*. 2012 ; 7(2):e30619.
- [6] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 5 oct. 1990 ; 215(3):403–10.
- [7] R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012.
- [8] Mei L, Nave K-A. Neuregulin-ERBB Signaling in the Nervous System and Neuropsychiatric Diseases. *Neuron*. 2 juill. 2014 ; 83(1):27–49.
- [9] Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Juill. 2006 ; 7(7):505–16.
- [10] Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grünwald S, Scheek S, et al. Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat Methods*. Déc. 2006 ; 3(12):985–93.
- [11] Life Technologies. Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 [Internet]. 2013. Disponible sur : <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4482006> Consulté le 15/04/2015.
- [12] Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Fév. 2011 ; 12(2):104–17.