

**Module: Omiques et appliquées à la
pharmacologie**

**Enseignant Dr Zouaghi Mohamed
Fateh**

LES OMNIQUES

I. Introduction générale

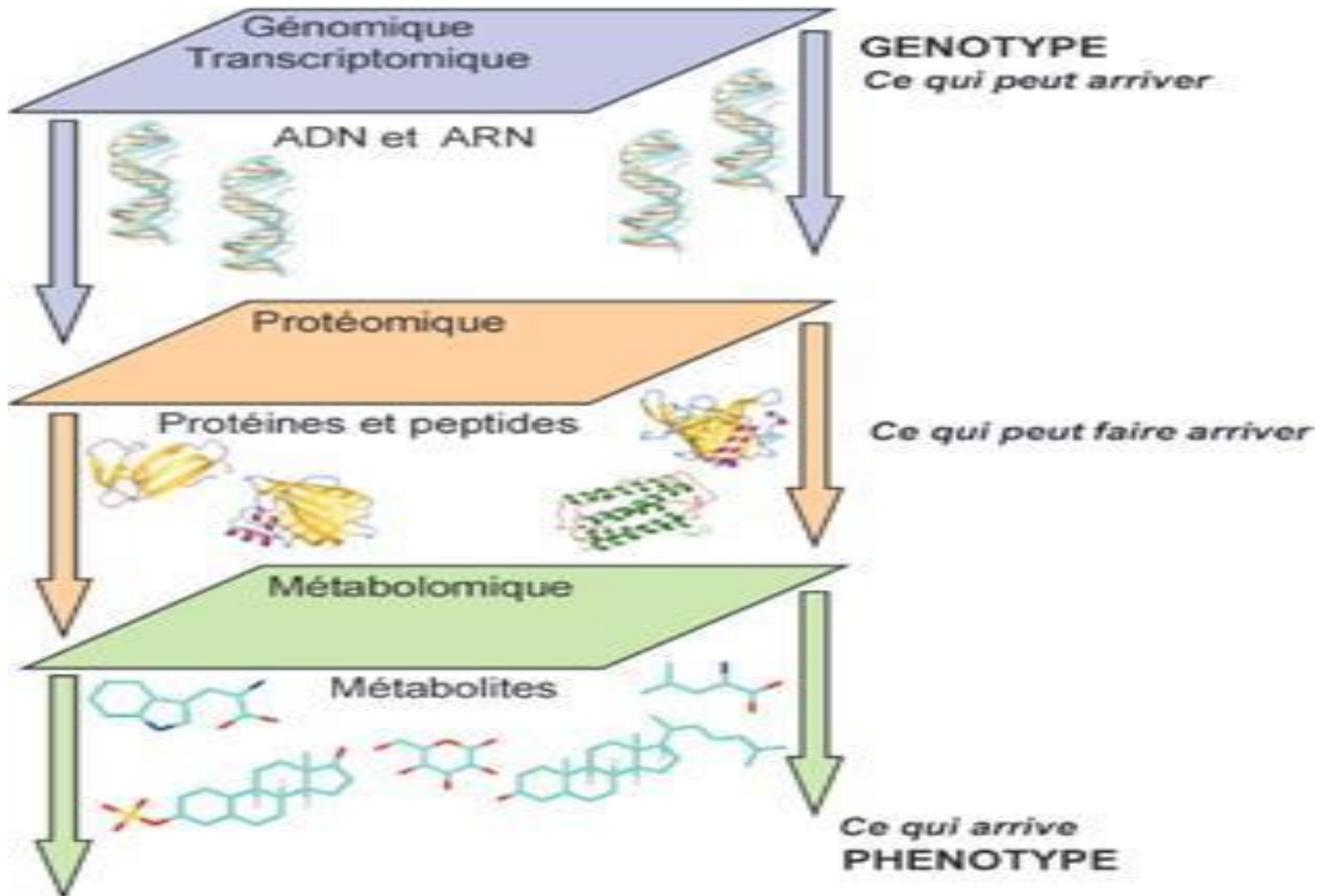
OMIQUE est l'ensemble des technologies permettant d'appréhender dans leur globalité des systèmes biologiques complexes et dynamiques. Elle s'intéresse à l'analyse de quantités massives de données, telles qu'un ensemble de gènes (génomique), d'ARN (transcriptomique), de protéines (protéomique), de métabolites (métabolomique)

Omiques : les outils (études systématiques) de biologie moléculaire permettant de décrire et de comprendre le fonctionnement biologique d'un organisme.

Les Omiques ont bouleversé la conception de la biologie en développant une biologie des systèmes.

Les omiques caractérisées comme des techniques à haut débit permettant une analyse simultanée d'un grand nombre de variables, elles comprennent principalement : la génomique (SNPs par exemple), la Transcriptomique (expression des gènes et leur régulation), la protéomique (analyse des protéines), la métabolomique (étude des métabolites produits)

Ces techniques permettent d'obtenir de très nombreuses informations sur la réponse cellulaire et/ou tissulaire à une exposition in vitro ou in vivo. À nos jours, se développe un concept de « Big Science », basant sur la génération et l'analyse d'un nombre de données jamais atteint auparavant, un des objectifs étant d'exploiter simultanément les données issues de ces différentes approches, comme autant d'angles de prise de vue complémentaires décrivant les systèmes biologiques étudiés. La puissance de ces outils sur le plan descriptif permet aujourd'hui une caractérisation des systèmes biologiques à une échelle et une profondeur jamais atteintes



Représentation schématique des trois grands niveaux de caractérisation des systèmes biologiques

- ✓ Les « omiques » ont bouleversé la conception de la biologie en développant une biologie des systèmes ,
- ✓ les sciences « omiques » regroupent des champs d'étude de la biologie qui s'intéressent aux interactions dans et entre des ensembles vivants complexes (espèces, populations, individus, cellules, protéines, ARN, ADN) en prenant compte de l'environnement auquel ces ensembles vivants sont exposés et de l'écosystème dans lequel ils vivent.
- ✓ Les « omiques » les plus connus sont la génomique, la protéomique, la transcriptomique et la métabolomique.
- ✓ Les « sciences omiques » permettent le développement et l'application de nouvelles technologies pour la prévention de la maladie (biocapteurs, outils diagnostiques, nouveaux traitements...).

Alors que la biologie traditionnelle se fondait sur des hypothèses que le chercheur essayait ensuite de vérifier expérimentalement, désormais, le vivant est appréhendé dans sa totalité et le chercheur essaie de rapporter l'information biologique obtenue à des pathologies connues.

Actuellement, il s'agit principalement des secteurs thématiques suivant :

*** la santé (via le développement des biomarqueurs, via le diagnostic moléculaire et via la recherche de nouveaux médicaments, avec en particulier les études de toxicologie, précliniques et pharmacocinétiques). Les secteurs médicaux les plus en pointe seraient de ce point de vue l'oncologie, la neurologie et ce qui concerne le système cardiovasculaire. Les études de prospectives évoquent aussi la médecine personnalisée et la médecine prédictive.**

***l'alimentation; dans ce domaine la métabolomique peut contribuer au développement de :**

- . l'épidémiologie nutritionnelle (dont en aidant à caractériser les consommations alimentaires individuelles réelles, et à vérifier les effets métaboliques de divers types de régimes alimentaires »**
- . La nutriginomique, qui est également mobilisable pour l'étude des interactions entre gènes et nutriments : le phénotypage des métabolites de nutriments et micro-constituants issus de la digestion et l'étude des interactions entre génotype, alimentation et métabolisme permettent l'amélioration de la prévention de certaines maladies métaboliques ou chroniques (cancers, obésité, diabète, problèmes cardiovasculaires, etc.)**
- . la génétique appliquée aux biotechnologies, avec par exemple l'amélioration variétale des végétaux**
- . La sécurité alimentaire car la métabolomique peut qualifier plus objectivement la valeur nutritive des aliments ou mettre en évidence une contamination chimique, biologique ou radioactive de cet aliment. Elle peut détecter des effets synergiques (négatifs ou positifs) avant même qu'ils soient compris.**

*** l'environnement ; car la métabolomique vise l'analyse de milieux et systèmes complexes, par des biomarqueurs plus précis. La métabolomique permet par exemple de détecter des perturbations d'espèces végétales, animales ou fongiques ou microbiennes (réponses face à un stress biotique ou abiotique, une présence de contaminants, etc.), ou d'affiner la détection de variétés végétales ou animales, ou des espèces ou variantes nouveaux de bactéries utiles ou pathogènes, et d'étudier les réponses de ces taxons à des toxiques, à des perturbateurs endocriniens ou à des changements discrets de leur environnement (température, salinité, trophie, radioactivité, etc.). Elle peut guider le chercheur dans l'identification des voies métaboliques impliquées dans ces réponses, et aider à expliquer certains mécanismes de toxicité ou d'écotoxicité de certaines molécules actives ou d'adjuvants, même quand les causes sont « sociales » ou multifactorielles et complexes ; ceci pour tous les compartiments de l'environnement (eau, air, sol, écosystèmes, microbites...).**

*** la biologie prédictive (dans un futur encore hypothétique), au profit de la sécurité alimentaire et de l'adaptation au changement climatique**

Domaine en constante évolution (nouveaux ...omiques) en raison...

– De l'évolution des connaissances

– De l'évolution des technologies.

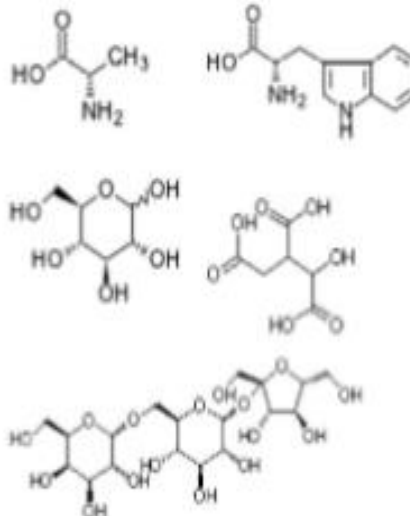
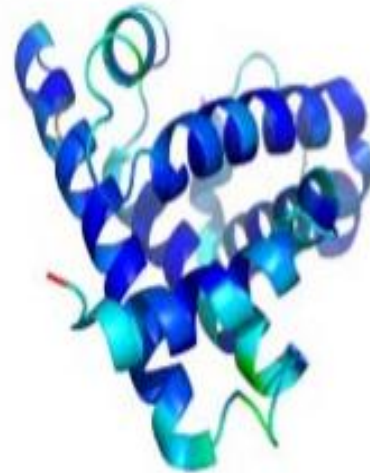
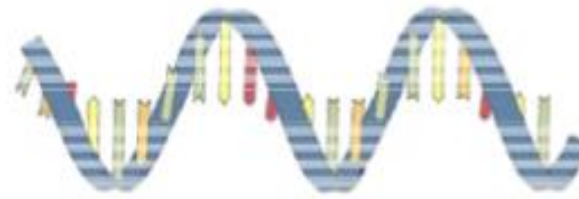
*** *Individu > Organe > Cellule (1800-50) > Noyau(1900) > ADN (1950) > ARNProtéines(1960) >La biologie moléculaire(1970) > Technologies à haut-débit (1990).***



Les gènes
Le génome

↓
génomique
polymorphisme

GENOTYPE



PHENOTYPE

Les ARN messagers
Le transcriptome

↓
transcritomique

Les protéines
Le protéome

↓
protéomique

Les métabolites
Le métabolome

↓
métabolomique

ADN



Génomique

ARN

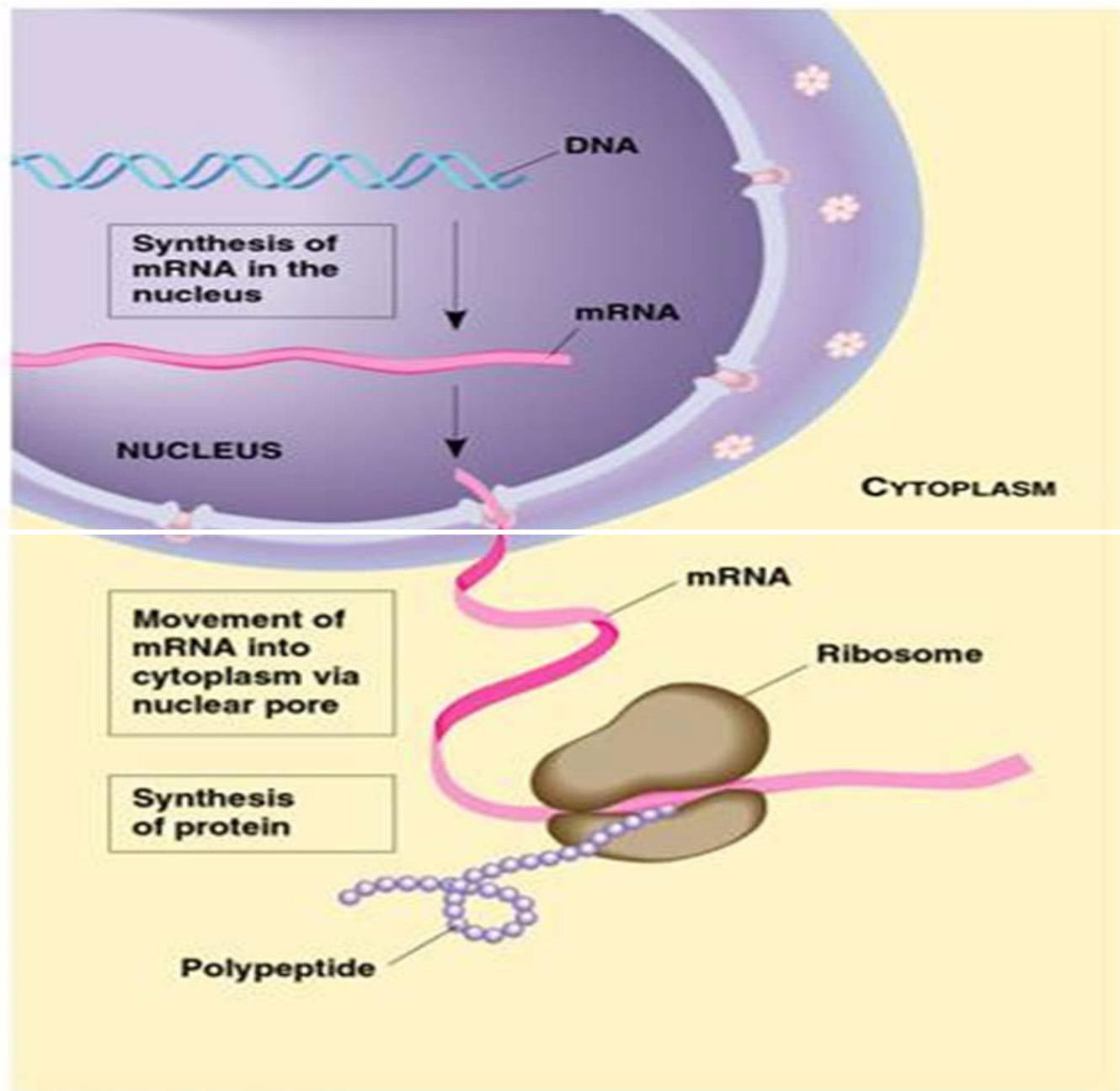


Transcriptomique

Protéines



Protéomique



- **Pour chaque ...omique on peut distinguer :**

- **Les études structurales**

- **Les études fonctionnelles**

Les outils de la génomique structurale :

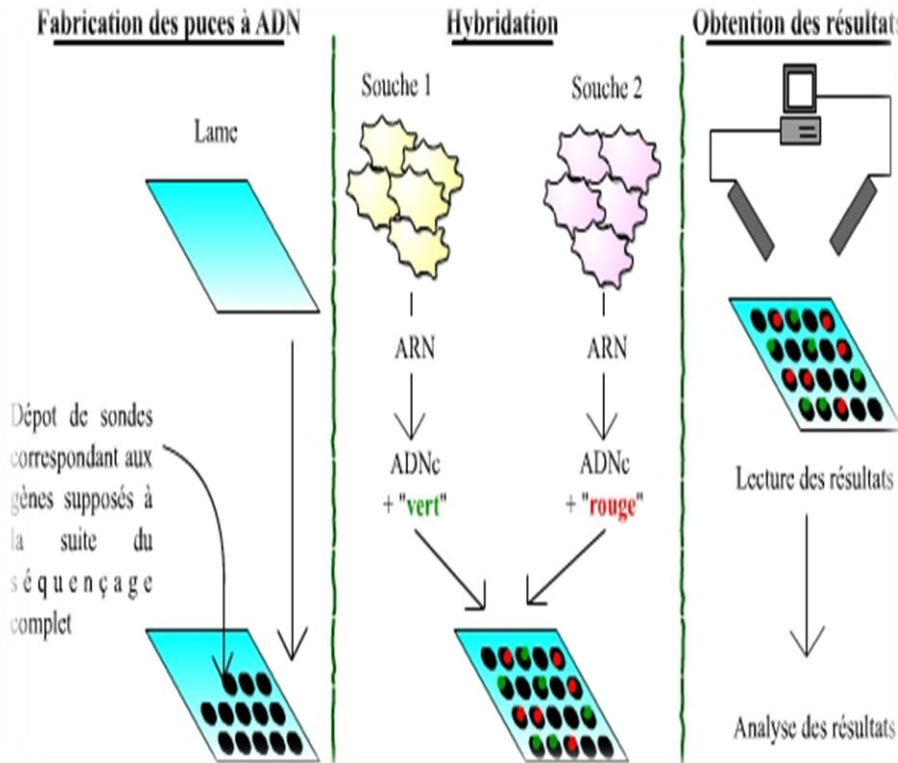


Fig1. Séquençage des génomes

correspond à la lecture nucléotide par nucléotide de la molécule d'ADN

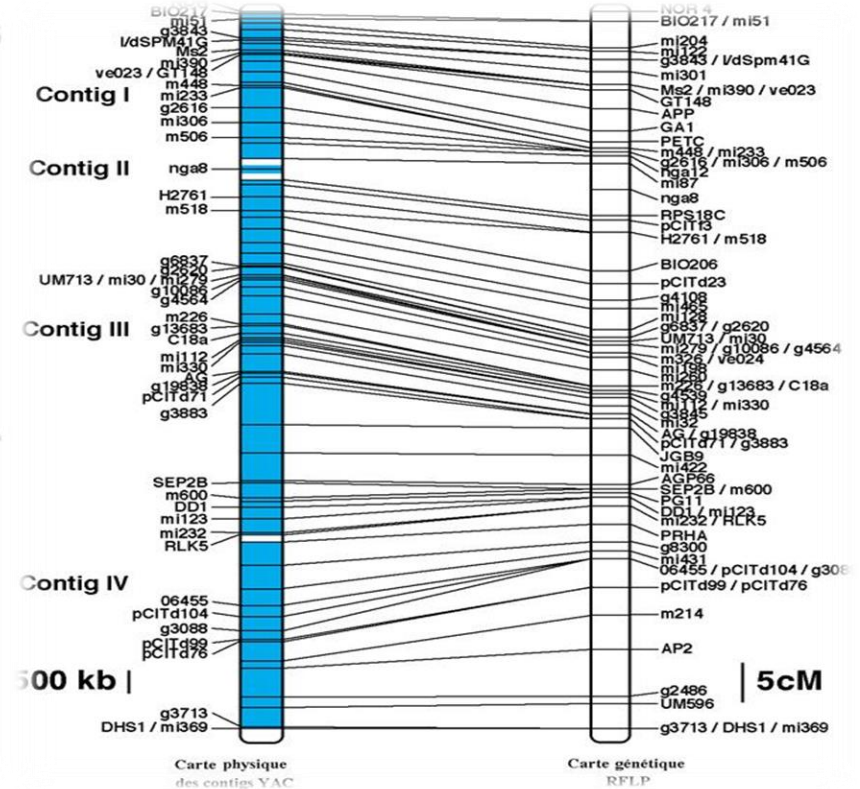


Fig2. cartographie génétique

Permet de connaître et exploiter les génome grâce a des carte génétiques

Apports fondamentaux des OMIQUES

- _ Epigénétique et régulation des gènes
- _ Epissage des ARNm
- _ Dégradation des ARNm



Transcriptomique

- _ Stabilité des protéines
- _ Régulation post traductionnelle
- _ Interactions protéine-protéine



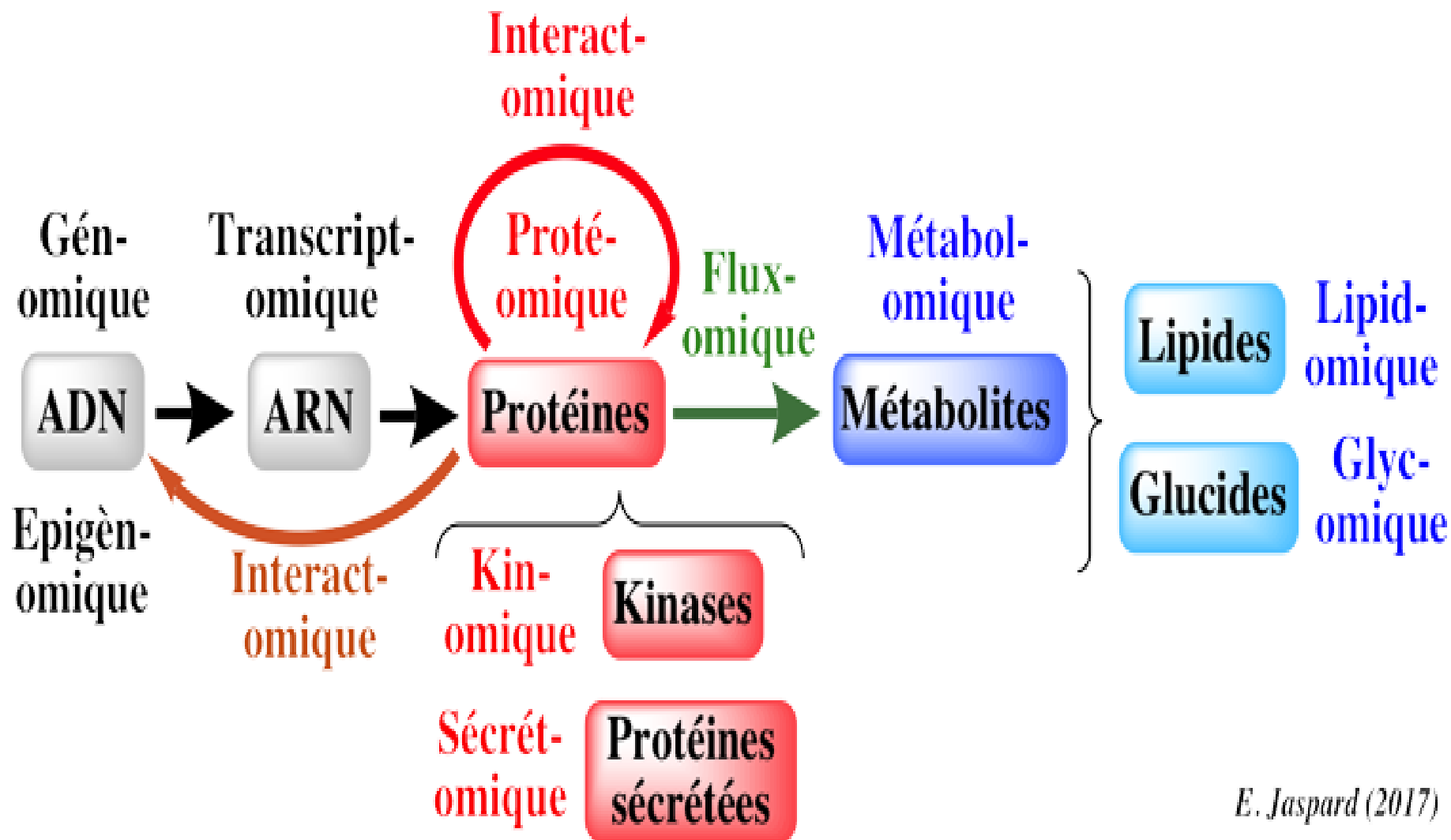
Protéomique

- _ Réseaux de voies métaboliques

Métabolomique

- _ Biologie de systèmes

II. Principe et application de la génomique et transcriptomique



E. Jaspard (2017)

Ces dernières années, les techniques de très haut débit ont envahi le monde de la recherche. Comme nous le verrons, ces techniques ont pour caractéristique d'évaluer simultanément un très grand nombre de cibles, des centaines, voire des milliers, sans se focaliser nécessairement sur l'une d'entre elles. Elles font suite au décryptage complet du génome humain et de nombreux génomes d'espèces différentes. Le premier terme en « omique » utilisé a été la génomique qui est devenue une discipline à part entière visant à exploiter l'ensemble des données obtenues grâce au séquençage de génomes entiers et à la caractérisation des profils d'expression de ces génomes.

*** La génomique**

La génomique est la science qui étudie le génome. Il existe plusieurs champs d'application de la génomique, par exemple : la génomique des populations étudie les différences, la fréquence des différences et la distribution des différences dans le matériel génétique et entre les populations

Comme le matériel génétique interagit avec l'environnement et entre les populations; la pharmacogénomique s'intéresse aux relations entre le matériel génétique d'un individu (ou d'une population) et la réponse à l'exposition à des médicaments.

Le programme génome humain qui demeure un des rares programmes à avoir respecté, sinon devancé, les délais d'exécution prévus a été à l'origine d'une véritable révolution technologique. Rappelons que notre génome comprend 25 000 à 30 000 unités génétiques (ou gènes). Le génome est principalement localisé dans le noyau de la cellule, mais il existe aussi un génome mitochondrial. Chaque gène est constitué par un enchaînement de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers ou dizaines de milliers, de bases nucléiques qui sont au nombre de quatre (A, C, G ou T). Cet enchaînement de bases constitue la molécule d'ADN (ou acide désoxyribonucléique) et l'ordre des bases correspond à un code précis qui va identifier le gène et dicter la nature de son produit final

La génomique initialise avec le premier grand projet de séquençage. Suite à de nombreux projets de séquençage de mitochondries et de bactériophage, un projet ambitieux a été créé en 1990 dans l'objectif de découvrir la séquence complète du génome humain. Le projet du génome humain (Human Genome Project), a permis de séquencer les 3×10^9 paires de bases d'ADN dans la version préliminaire de la séquence fut obtenue en 2001

Le génome est les informations nécessaires à la construction d'un être vivant, ces informations sont écrites dans la structure d'une molécule géante, l'ADN, qui résulte de l'enchaînement linéaire de quatre molécules élémentaires plus petites, les nucléotides. L'accumulation ordonnée de ces nucléotides au sein de l'ADN et appelée « séquence » ; il constitue la mémoire qui stocke et transmet les informations génétiques, de génération en génération

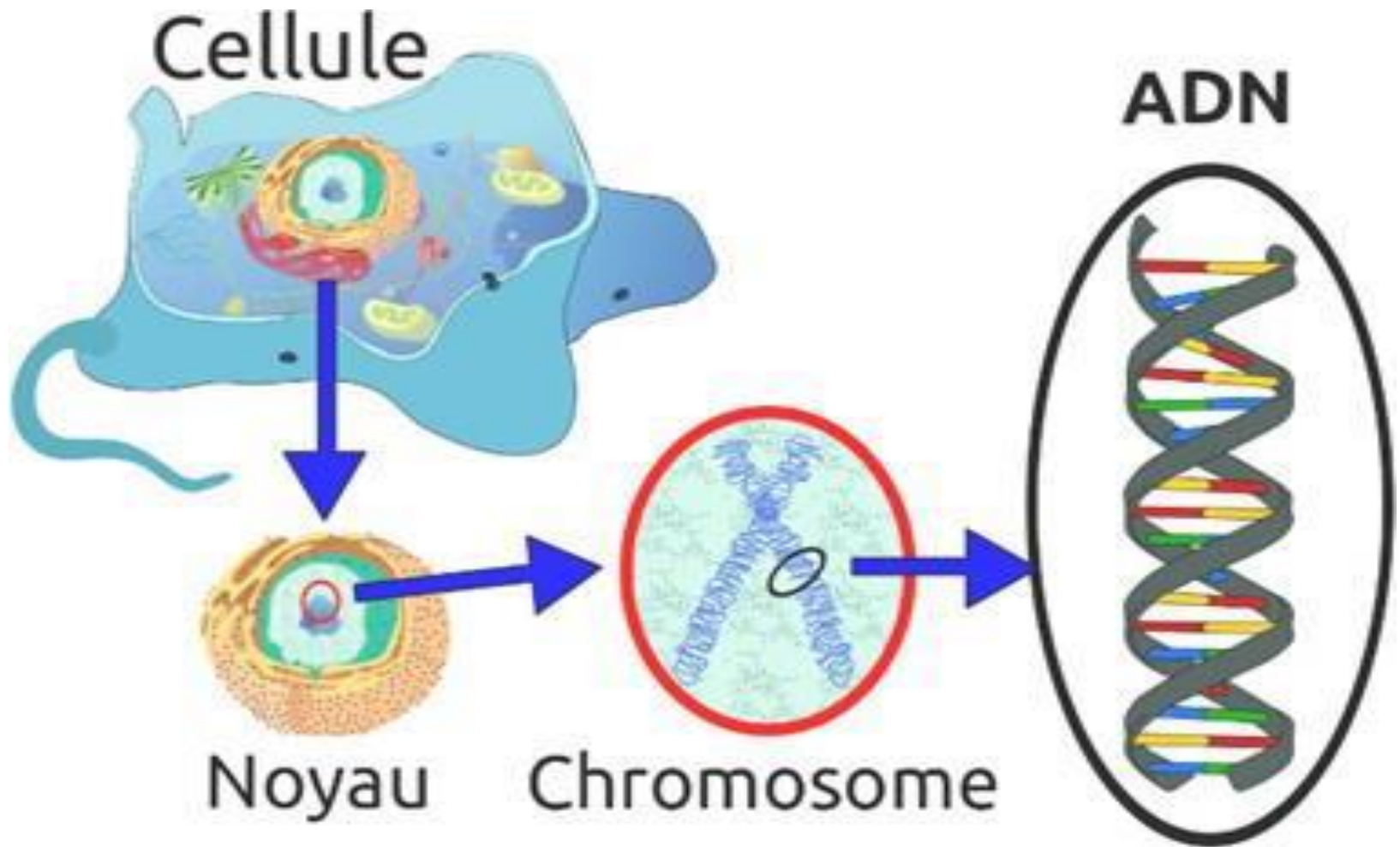
La génomique est la science qui étudie la structure, le fonctionnement et l'évolution des génomes par des approches globales et systématiques, en bénéficiant désormais de technologies d'analyse à haut débit. Elle se subdivise en deux disciplines complémentaires. La première est la génomique fonctionnelle, domaine scientifique situer entre la génétique et la physiologie et qui vise à déterminer la fonction et l'expression du génome en caractérisant l'ensemble des transcrits (transcriptome), des protéines (protéome) et des métabolites (métabolome), ainsi que les éléments de la régulation de cette expression. Elle est à distinguer de la génomique structurale, dont l'objectif principal est de comprendre l'architecture et de L'évolution des génomes

La médecine basée sur les « omiques » a débuté avec la science génomique qui se fonde sur des différences individuelles innées du génome. Elle a permis d'étudier de polymorphismes associés à certaines maladies. Elle a également facilité une prescription mieux individualisée des médicaments compte tenu de différences, d'origine pharmacogénétique/pharmacogénomique, dans la réponse aux médicaments. Ainsi, la génomique incontestablement, inauguré la voie vers une médecine personnalisée de plus en plus perçante, qui verra son univers encore s'enrichir par l'apport des avancées de l'ère post génomique .

Le premier séquençage du génome humain complet, réalisé en 2002, a coûté 3 milliards de dollars et a duré 10 ans. Aujourd'hui, un séquençage coûte moins de 1.000 dollars et peut être fait en une seule journée. Il est évident que ces avancées technologiques de séquençage rapide, et à un prix accessible, vont rendre les études de génomique de plus en plus importantes, mais aussi de plus en plus sophistiquées

Parmi les techniques : PCR, séquençage de Sanger, southern blot, et génotypage sur puce etc...

Nous intéressons par la technique de génotypage sur puce qu'est une technique qualitative et quantitative à cette revue.



les applications médicales

- **Immunisation orale avec des centrales** : Vaccins oraux de centrale, qui emploient l'ADN et les transgènes pour produire les antigènes de surface qui stimulent l'immunité une fois absorbés, promesse d'exposition à la recherche d'immuniser des êtres humains contre l'hépatite B.
- **Vaccin hétérologue de principal-poussée pour la malaria** : On s'attend à ce que des vaccins en deux parties avec l'ADN du falciparum de P. suivi du virus modifié d'Ankara réduisent le risque d'infection de malaria jusqu'à de 80%.
- **Examen critique pour des thalassémies** : On a évolué des tests qui emploient l'amplification en chaîne par polymérase d'observer les mutations géniques qui sont responsables de produire la structure de la molécule d'hémoglobine. Le conseil génétique en raison du test de dépistage a des régimes réduits de thalassémie en Sardaigne de 1 dans 250 à 1 dans 4000 nouveau-nés.

Les applications de biotechnologie

Il y a plusieurs applications de la connaissance génomique dans le domaine de la biologie et de la bio-ingénierie synthétiques.

La recherche scientifique a expliqué la création d'une substance partiellement synthétique des bactéries.

Par exemple: le génome du *genitalium de mycoplasme* a été employé pour synthétiser le *laboratorium de mycoplasme* de bactérie, qui a des caractéristiques distinctes des bactéries originelles.

Les applications de la science social

➤ **Les défenseurs de l'environnement se sont servis des caractéristiques des ordonnancement génomiques pour évaluer les facteurs clé qui sont impliqués dans la conversation d'une substance.**

Par exemple: la diversité génétique d'une population ou l'hétérogénéité d'une personne pour un état héréditaire avec une configuration récessive d'hérédité peut être employée pour prévoir la santé et la conservation de la population.

L'ADN est transcrit (ou copié) en une molécule intermédiaire, l'acide ribonucléique messenger (ou ARNm), elle-même constituée d'un enchaînement de quatre bases nucléiques reflétant la structure de l'ADN.

La transcription d'un gène en ARNm est très variable d'un tissu à un autre et dépend du contexte cellulaire. Elle est sous l'influence de séquences promotrices ou régulatrices présentes aussi dans l'ADN génomique.

Les ARNm subissent par ailleurs une maturation importante dans le noyau. L'ARNm est transporté vers le cytoplasme où il est traduit en protéines, qui peuvent elles-mêmes subir des modifications dites posttraductionnelles. Les ARNm et les protéines sont donc bien le reflet du code stocké dans leurs gènes correspondants, mais leurs niveaux d'expression et leurs structures subissent en plus des modifications propres liées au stade de développement, au type et à l'environnement cellulaire. Ainsi, en raison de ces étapes de maturation dépendantes du contexte cellulaire, plusieurs ARNm et plusieurs protéines différentes peuvent être issus d'un seul gène. En conséquence, l'étude de la quantité et de la structure d'une protéine ou d'un ARNm fournit des informations supplémentaires par rapport à l'étude de la structure du gène correspondant. Le terme de génomique recèle parfois une ambiguïté selon qu'il s'adresse à la structure même de l'ADN (qu'il est possible d'analyser à grande échelle) ou qu'il s'adresse à l'expression des gènes, donc à l'étude à grande échelle des ARNm ou des protéines. On pourra parler plus précisément de génomique fonctionnelle lorsque l'expression des gènes est étudiée.

La Transcriptomique étudie les ARN transcrits à partir d'un gène dans le noyau [2][9]. Elle appuyé sur la quantification systématique de ces ARNm, ce qui permet d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données. Plusieurs techniques permettent d'avoir accès à cette information, en particulier celle de la réaction en chaîne par polymérase (PCR correspondant à l'expression anglaise Polymérase Chain Réaction) quantitative, celle de l'ADN sur puce, celle du séquençage systématique d'ADN complémentaires ou encore le séquençage d'ARN à haut débit. La caractérisation et la quantification du transcriptome dans un tissu donné et dans des conditions données permettent d'identifier les gènes actifs, de déterminer les mécanismes de régulation de leurs expressions et de définir les réseaux d'expression de ces gènes.

La transcriptomique consiste à:

- mesurer le niveau d'expression des gènes dans diverses situations (stades de développement, tissus sains vs malades...);**
- mettre en évidence des modifications dans le niveau d'expression des gènes dans ces diverses situations;**
- établir des relations de causes à effet entre les diverses variations détectées et les situations physio-pathologiques.**

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de transcription d'un génome. Elle repose sur la quantification systématique de ces ARNm, ce qui permet d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données.

➤ Il y a Plusieurs techniques permettent d'avoir accès à cette information, en particulier celle des puces à ADN, celle de la PCR quantitative ou encore celle du séquençage systématique d'ADN complémentaires.

La applications de La transcriptomique

- Etude de variations d'expression de plusieurs transcriptomes
- Annotation du transcriptome par comparaison avec une banque de référence.
- Clustering (création de séquences consensus à partir de séquences similaires).
- Recherche de l'ensemble des séquences spécifiques au transcriptome étudié.
- Cette étude permet notamment d'identifier les gènes actifs et ouvre des portes sur celle des maladies héréditaires en travaillant sur leurs causes.

La technique de revers transcriptase (qRT-PCR) :

La RT-PCR (reverse transcriptase-polymérase Chain réaction) ou PCR quantitative en temps réel, qui permet de dénombrer les transcrits (ARN) issus d'un gène donné et la mise en évidence de l'accumulation d'un ARNm rare dans un tissu, un organe ou une cellule. Elle est surtout utilisée pour valider les différentiels d'expression observés entre deux conditions données.

Le principe consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les copier in vitro en ADNc simple brin, grâce à l'action de transcriptase inverse. Les molécules d'ADN obtenues servent alors de matrice à une réaction PCR en utilisant un couple d'amorce spécifique de la séquence d'ARN d'intérêt. Les fragments PCR obtenue après les cycles de PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel

Les appareils qui permettent de faire de la RT-PCR quantitatives sont des thermocycleurs qui permettent de visionner en temps réel la synthèse des fragments d'ADN. Pour cela, des molécules fluorescentes qui se fixent sur l'ADN sont utilisées. La fluorescence de l'échantillon augmente proportionnellement au nombre de molécules d'ADN.

La nutriginomique étudie les relations et les interactions entre le matériel génétique et l'alimentation. La métagénomique correspond au séquençage des gènes de la flore intestinale. Les objectifs médicaux de l'approche génomique des maladies multifactorielles sont les suivants :

- identifier leurs étiologies et en comprendre les mécanismes physiopathologiques, afin d'en permettre un démembrement nosologique en sous-groupes plus homogènes pour lesquels une prise en charge rationnelle pourra être proposée

- déterminer le rôle de chaque déterminant génétique, et ses interactions avec d'autres gènes et l'environnement (par approximation du risque attribuable)

- faciliter un dépistage précoce des sujets prédisposés à ces maladies ou et à leurs complications métaboliques et dégénératives (groupes à risque), dans un objectif de médecine préventive, et pour mieux cibler les thérapeutiques efficaces chez eux

- mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques, plus efficaces et plus étiologiques. Ces nouveaux traitements seront dirigés vers des cibles spécifiques identifiées par les études génétiques. Il pourrait s'agir de médicaments traditionnels ou même de thérapies géniques, utilisant l'ADN comme médicament.

Face à l'explosion des coûts de recherche et développement et compte tenu de la part importante de médicaments prescrits mais inefficaces, le but ultime de la génomique est de parvenir à instaurer une prise en charge à la carte. On peut ainsi imaginer que dans un avenir plus ou moins proche, les patients n'attendront plus quelques semaines pour vérifier si le médicament fait de l'effet, mais subiront un test génétique qui permettra de prédire son efficacité.

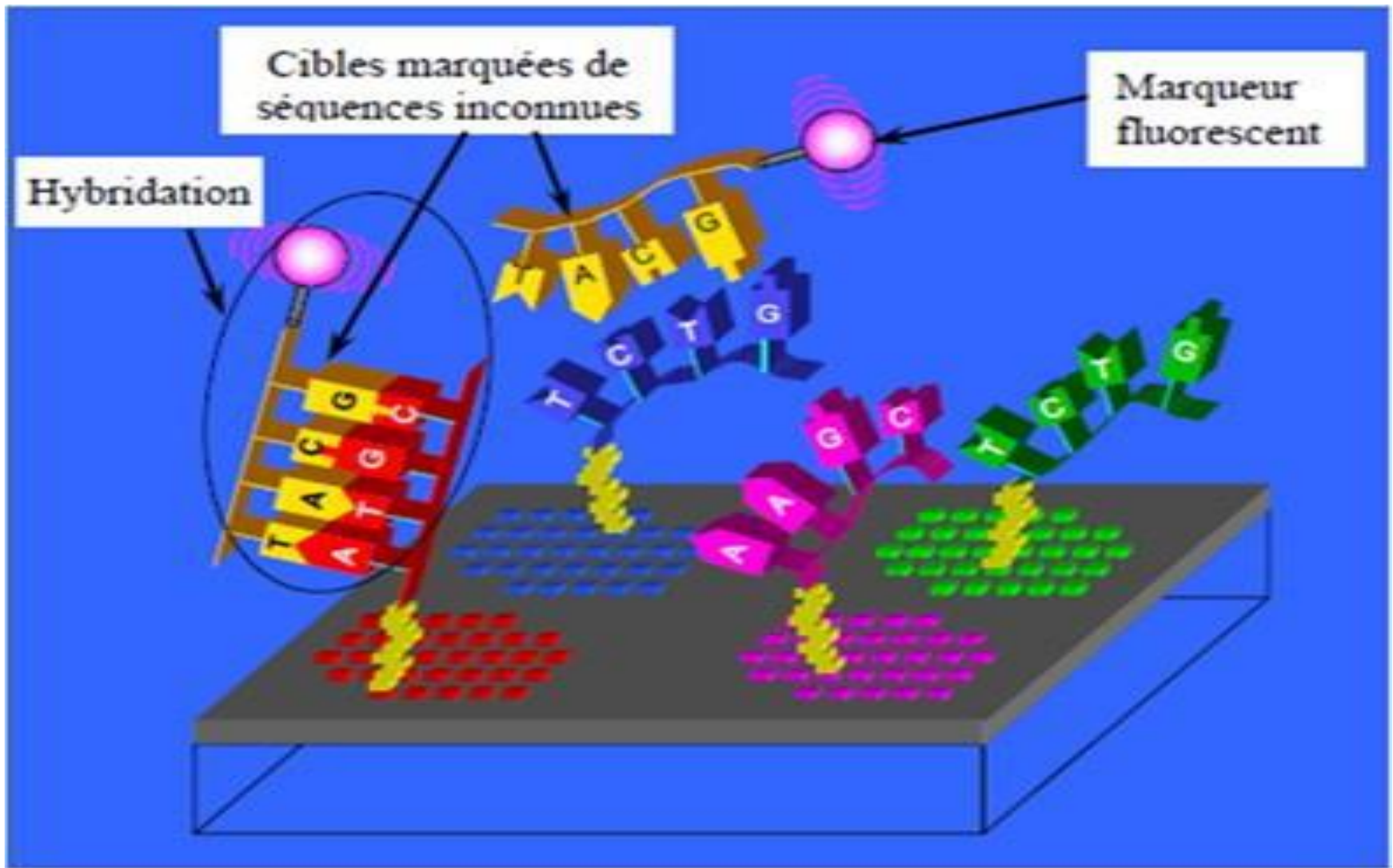
ADN

- Déterminer l'enchaînement des 3.109 bases que constitue le génome d'un mammifère : **Séquençage**
- Caractériser les portions importantes de cette séquence (gènes, les éléments de régulation des gènes) : **Annotation**
- Répertorier l'ensemble de la **variabilité** de l'ADN au sein d'une espèce.

Le développement des puces à ADN sur membrane de nylon puis sur lame de verre a permis d'obtenir des mesures massivement parallèles de la concentration des ARN messagers d'une cellule dans un état physiologique donné.

Les puces à ADN ressemblent plusieurs disciplines dont l'électronique, l'automatisme, la mécanique, la chimie, combinatoire, organique, la physicochimie de surfaces, la biologie moléculaire et l'informatique. Elles permettent d'analyser des milliers de gène simultanément et trouve de nombreuses application dans le domaine de recherche médicale (séquençage, étude des mutations et l'expression des gènes), de la pharmacie (adaptation des médicaments en fonction du virus ciblé). De l'agroalimentaire et de l'environnement.

Les puces à ADN comptent sur le principe de complémentarité des bases azotées. Elles se forment de fragments d'ADN de séquence connue. Appelés sondes, fixés par l'intermédiaire d'un groupement espaceur sur un substrat fonctionnalisé. En outre, chaque sonde de séquence identique est fixée de manière localisées sur le substrat pour former ce qu'appelé « plot ». Le principe des puces à ADN consiste à les confronter avec une solution de séquence biologique inconnue, qui s'appelle cible, préalablement marquées, généralement par une molécule fluorescence. Si la séquence de la cible est complémentaire à la séquence de la sonde, elles vont s'hybrider par le phénomène d'hybridation. L'appariement se fait par la formation de liaisons hydrogène entre les bases azotées. Nous avons alors formation d'un double brin. Avant d'imager les zones d'hybridation, nous procédons à un lavage de la puce pour éliminer les fluorescences parasites dues à un excédent de cible ou de poussières adsorbées sur le substrat. De plus, ce lavage permet d'augmenter le contraste de fluorescence entre les différentes sondes en supprimant des mésappariements entre les sondes et les cibles pas entièrement complémentaires . Analyse des donnés à l'aide d'un logiciel approprié



principe fonctionnement d'une puce à ADN

Cependant la principale avancée des puces à ADN a été de changer d'échelle : l'analyse simultanée de l'ensemble de tous les transcrits d'un génome.

La technologie des puces à ADN a permis de générer des "images" de l'état de l'expression des gènes d'une cellule.

L'application immédiate a été d'améliorer et de préciser le diagnostic, le pronostic et l'orientation thérapeutique dans le cas de pathologies diverses.

•Définition de la puce à ADN:

Petite lame de verre, de silice ou une membrane de nylon de quelques centimètres carrées sur la quelles des fragments d'ADN ont été fixés en grand nombre, permettant par hybridation de détecter la présence ou de mesurer l'expression de très nombreux gènes dans un échantillon.

•Le principe des puces à ADN :

Le principe de la puce à ADN est basé sur la complémentarité des deux brins de l'ADN et donc de façon plus générale sur la technique d'hybridation. Les puces à ADN permettent des tests plus rapides, plus sensibles et plus spécifiques. En évitant certaines étapes préliminaires telle que la culture, cela permet d'obtenir un résultat en quelques heures là où plusieurs jours

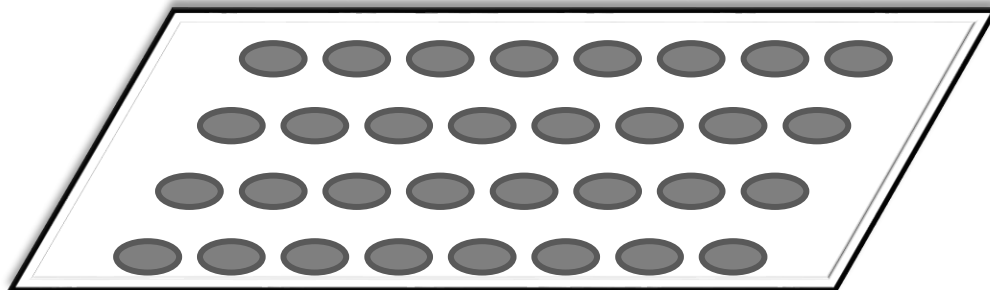
•Les types des puces à ADN :

Macroarrays, microarrays et puces à oligonucléotides

•Dans les macroarrays, on a une densité de fragments d'ADN d'environ 25 spots/cm² et les dépôts se font sur une membrane de nylon

•pour les microarrays la densité du dépôt est plus élevée (1000 ADN/cm²) et il se fait sur une lame de verre (photo du centre). Les ADN sont des fragments amplifiés dont la taille varie entre 200 et 2000 pb mais peuvent aussi être des oligonucléotides de 50 à 70 pb.

•Les puces à oligonucléotides représentent la miniaturisation la plus poussée (300 000 oligonucléotides/cm²) dans ce cas la taille des oligonucléotides est d'environ 25 pb.



I. Utilisation des puces à ADN :

Les utilisations sont multiples : analyse de l'expression de gènes, détection et caractérisation d'espèces, recherche de mutations...

+ *Mesure de l'expression de gènes :*

Dans le cours est illustrée l'utilisation d'une même puce à ADN pour hybrider deux populations d'ADNc marqués différemment, le but est de comparer le profil d'expression des gènes (dont les sondes sont sur la puce) dans les deux conditions expérimentales.


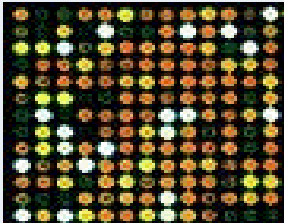
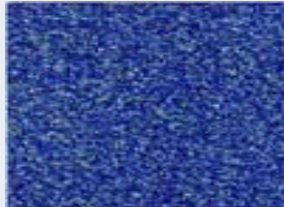
+ *Détection de SNP :*

Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont des variabilités ponctuelles de la séquence d'ADN. Les SNP constituent la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain. Ils représentent plus de 90% de toutes les différences entre individus.

Ici, seules deux formes de sondes ont été représentées : TCGGAG ou TCAGAG. Le sujet qui a fourni l'ADN ne porte que la forme G et pas A, il est homozygote G/G pour ce marqueur.

Le protocole détaillé des puces à ADN :

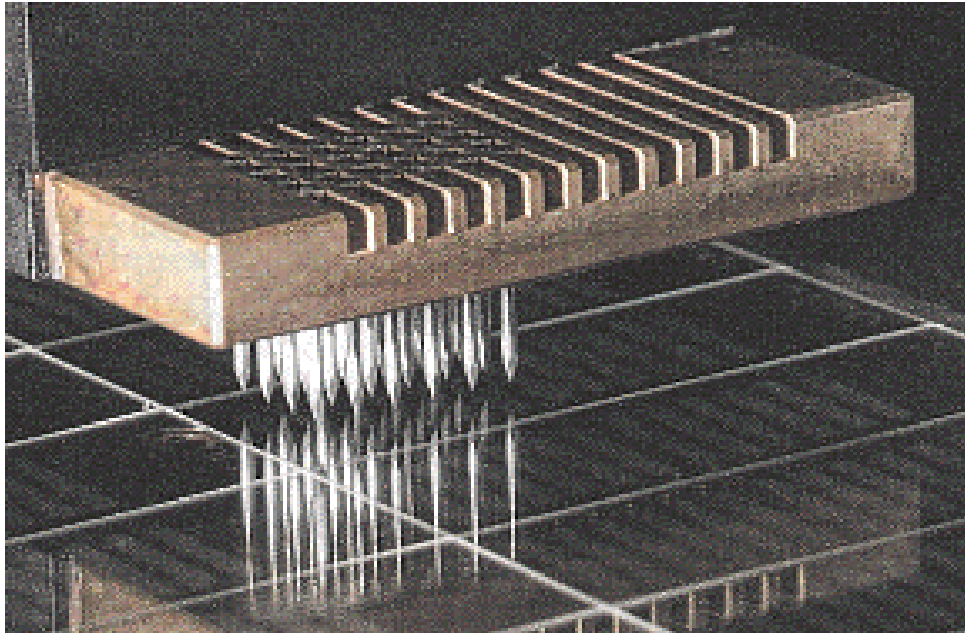
Etapas	Modalités
1. Fabrication de la puce	<p>Les fragments d'ADN dont on souhaite déterminer le niveau d'expression sont amplifiés par la technique de PCR puis déposés sur une lame préalablement recouverte de polylysine (cette substance assure la fixation de l'ADN via des interactions électrostatiques). Ces fragments d'ADN fixé à un support constituent des sondes. Ces puces sur lame de verre sont appelées microarrays. Les lieux de dépôts de l'ADN sur le support solide sont des spots.</p> <p>L'ADN est dénaturé pour qu'il se trouve sous la forme simple brin sur la puce, ce qui lui permettra ultérieurement de s'associer au brin complémentaire contenu dans la cible.</p>
2. Préparation de la cible (= préparation de l' ADN des cellules dont on souhaite étudier l'expression)	<p>Des ARN sont extraits de différents types de cellules (notés arbitrairement ici cellules 1 et cellules 2) pour lesquelles on veut comparer le niveau d'expression du gène étudié (c'est-à-dire celui qu'on a fixé sur la puce). Les ARN messagers permettent d'obtenir des ADNc par transcription inverse.</p> <p>Les ADNc sont ensuite marqués de manière différente : par exemple, l'ADN des cellules 1 est marqué avec un fluorochrome vert, tandis que l'ADN des cellules 2 est marqué avec un fluorochrome rouge.</p>
3. Hybridation de la cible et de la sonde	<p>Les ADN marqués en vert et ceux marqués en rouges sont mélangés (cet ensemble constitue la cible) puis déposés sur la sonde. La puce est alors incubée une nuit à 60 degrés : à cette température, un brin d'ADN s'apparie avec son complémentaire ce qui forme de l'ADN double brin. Les ADN fluorescents vont ainsi s'hybrider sur les gènes qui avaient été déposés sur la sonde.</p>
4. Lecture brute des données	<p>Chaque spot (c'est-à-dire chaque emplacement sur la puce) est excité par un laser et on enregistre la fluorescence émise d'une part dans le rouge , d'autre part dans le vert. On obtient alors deux images dont le niveau de gris représente l'intensité de la fluorescence lue. En remplaçant les niveaux de gris par des niveaux de vert pour la première image et des niveaux de rouge pour la seconde, on obtient en les superposant une image en fausses couleurs composée de spots allant du vert (cas où seulement de l'ADN des cellules 1 s'est fixé à la sonde) au rouge (cas où seulement de l'ADN des cellules 2 s'est fixé à la sonde) en passant par le jaune (cas où l'ADN des deux types de cellules s'est fixé en quantité égale).</p>
4. Traitement des données	<p>Il s'agit, à partir des deux images de la puce, de calculer le nombre de molécules d'ADNc qui se sont hybridées avec les molécules d'ADN de la sonde. Pour cela, on mesure l'intensité du signal dans la longueur d'onde d'émission du fluorochrome vert et l'intensité du signal dans la longueur d'onde d'émission du fluorochrome rouge. Puis on normalise ces quantités en fonction de divers paramètres (quantité de cellules au départ , puissance d'émission de chaque fluorochrome, ...). On suppose que la quantité d'ADNc fluorescent fixée est proportionnelle à la quantité d'ARNm correspondant dans la cellule de départ et on calcule le rapport</p>

Type	"macro-array" ou filtre à haute densité	"micro-array"	puce à oligonucléotides
principe	dépôt direct de l'ADN sur le support 1 condition expérimentale par puce	dépôt direct de l'ADN sur le support 2 conditions expérimentales par puce	sondes oligonucléotidiques synthétisées in situ par photolithographie 1 condition expérimentale par puce
	marquage radioactif criblage par excès de cibles	marquage par <u>fluorescence</u>	marquage par fluorescence
fragments d'ADN déposés	2400	10000	<u>jusqu'à 4,2 millions oligonucléotides</u>
aperçu			

Principaux fabricants de puces à ADN

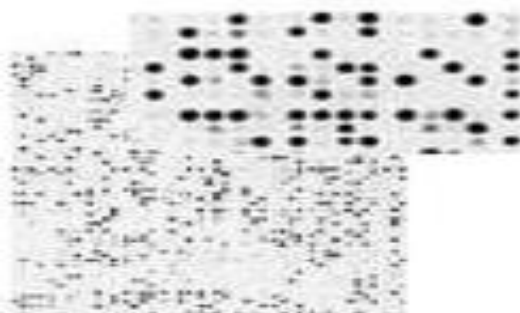
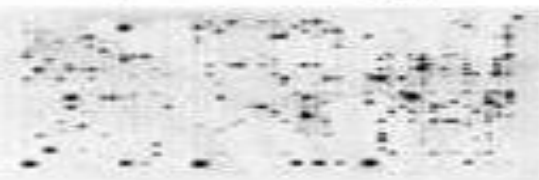
- Affymetrix (USA - californie) : côté au NASDAQ (environ 14 dollars l'action). De prestigieuses collaborations soulignent la position de "leader" de la technologie *Affymetrix* (rapprochement des technologies des biopuces *SpliceArrays* d'*ExonHit Therapeutics* et *GeneChip* d'*Affymetrix* / avril 2005 : accord entre *Affymetrix* et bioMérieux - tests de diagnostic).

- Agilent Technologies (*Arabidopsis 2 Oligo Microarray Kit*) : puce à oligonucléotides 60-mer (plus de 21,500 sondes) qui couvre environ 80% du génome de *Arabidopsis thaliana*. Les annotations sont celles de la base de données TIGR ATH1 v. 3 (au [TAIR](#)).

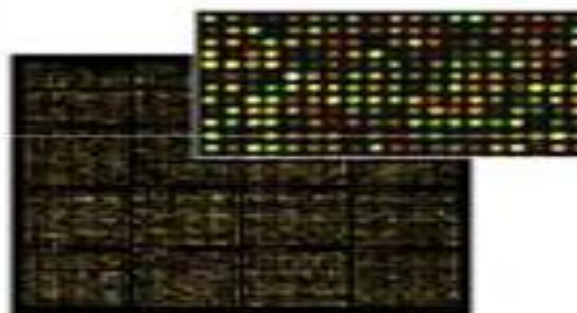


Les puces à ADN sont des lames de verre activées sur lesquelles sont déposées de nombreuses copies d'une séquence d'ADN spécifique d'un gène donné.

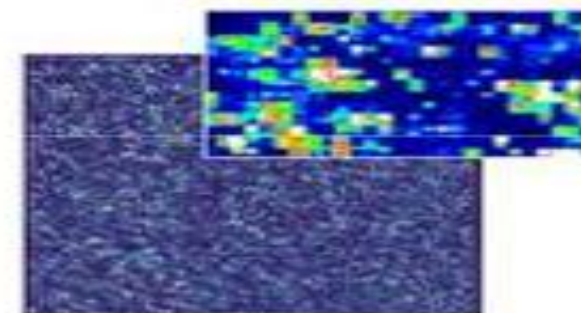
Filtres haute densité
(macroarrays)



Lames de verre
(microarrays)

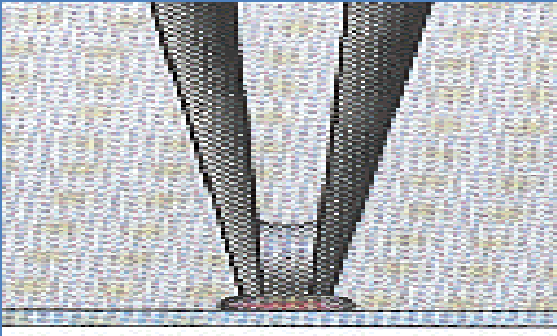


Puces Affymetrix

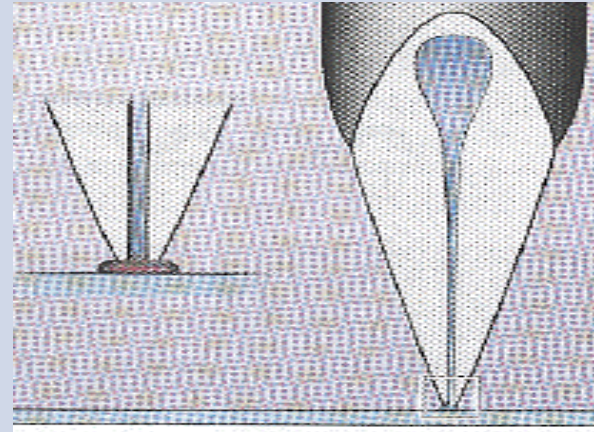


	FILTRES A HAUTE DENSITE	LAMES DE VERRE	PUCES AFFYMETRIX
Support	Membrane de nylon	Lame de verre	Silicium
Taille des spots	0.5-	100 μ m	20 μ m
Nombre de gènes représentés sur la puce	\approx 2.500	\approx 10.000	\approx 30.000
Nature des sondes	Clones d'ADNc ou produits de PCR	Oligonucléotides ou produits de PCR	Oligonucléotides
Méthode de marquage des cibles	Radioactif	Fluorescence	Fluorescence

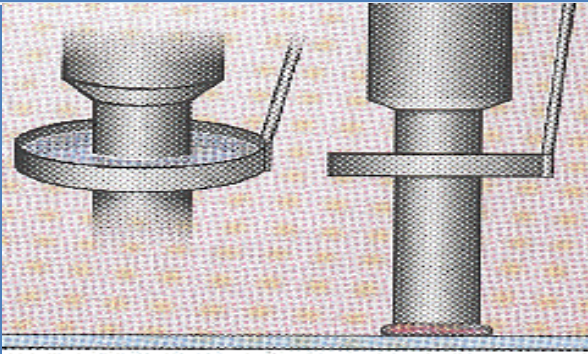
Les différents types d'aiguilles d'impression



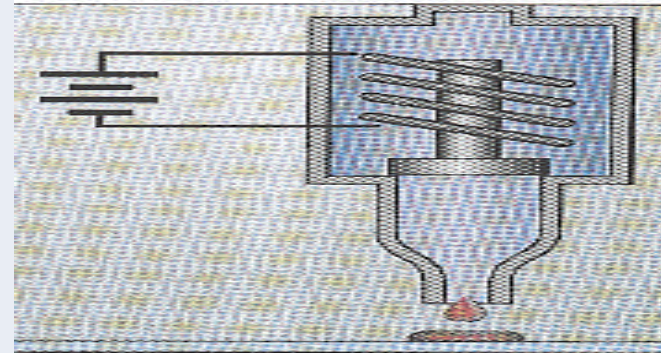
Les clavettes ou aiguilles fendues transfèrent quelques nanolitres de solution d'ADN sur l'alignement par tension capillaire quand la pointe entre en contact avec la surface.



Les pointes et les aiguilles TeleChem appliquent de petites gouttes par contact entre l'aiguille et le support



La construction pointe et anneau prélève l'ADN sur un petit anneau. Une aiguille plaque la solution sur la lamelle avec une densité uniforme.

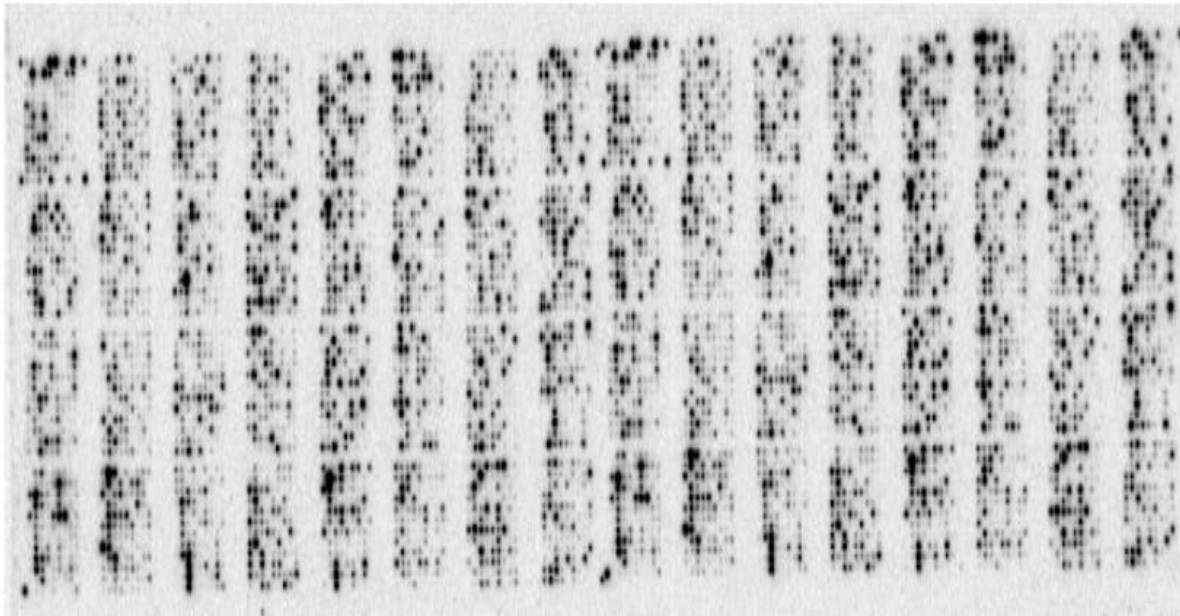


Une imprimante à jet d'encre pulvérise des gouttelettes de quelques picolitres de liquide sous pression.

- **Banques de cDNA issues de tissus différents :**
 - **Connaître les gènes (Annotation)**
 - **Lieu d'expression (Tissus)**
 - **Abondance (Niveau expression)**
- **Mise en place d'outils génériques**
- **Nouvelles technologies d'analyse**

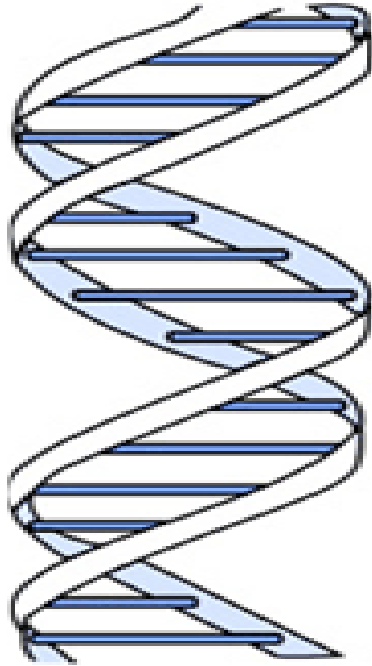
Micro-arrays

- 10000 clones par membrane
- marquage radioactif
- = MONO couleur
- 1 condition expérimentale par membrane



- **Puce (Agilent-Affimetrix)**
- 10000 clones par lame
- 4 x 44 000 oligos (60-mers)
- puis 8 x 60000 oligos (60-mers)
- marquage fluorescent
- 1 ou 2 conditions par lame
- = MONO ou DOUBLE couleurs
- 24 000 transcripts
- 600000 oligonucléotides (2*11*20-mers)
- marquage fluorescent
- = MONO couleur
- 1 condition par lame





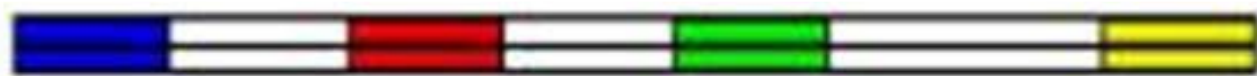
DNA

Transcription



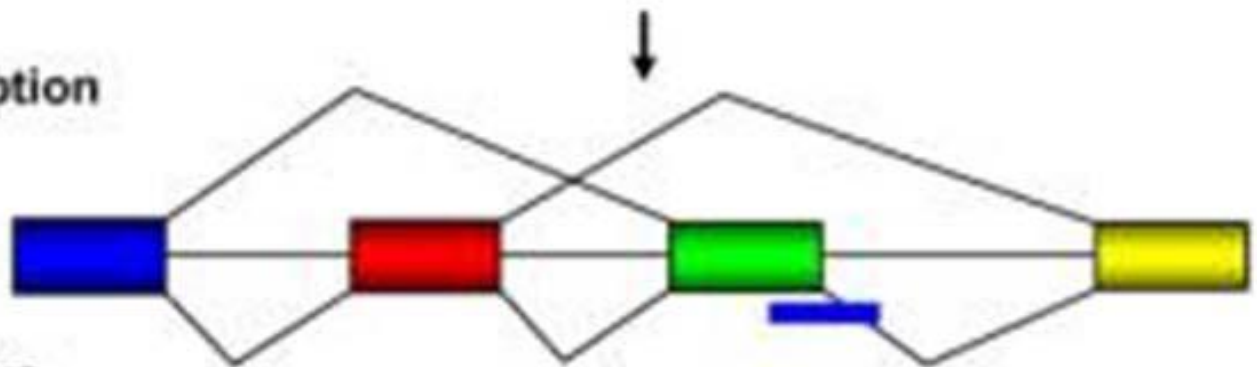
mRNA

- **Ratio de transcription 1/10 000 au sein d'un échantillon**
- **30 000 gènes (ADN) = 100 000 ARN**
- **Un gène peut être transcrit en plusieurs ARN**
- **Les ARNnc ne sont pas à négliger**
- **Etre le plus exhaustif possible ...
séquençage (RNAseq)**



DNA

Transcription



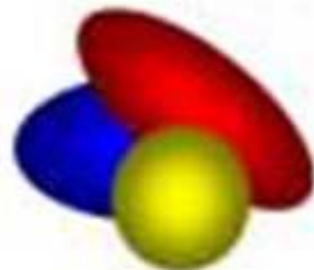
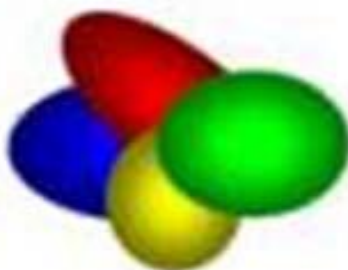
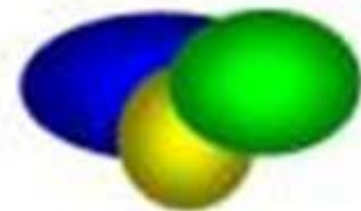
pre-mRNA

Alternative Splicing

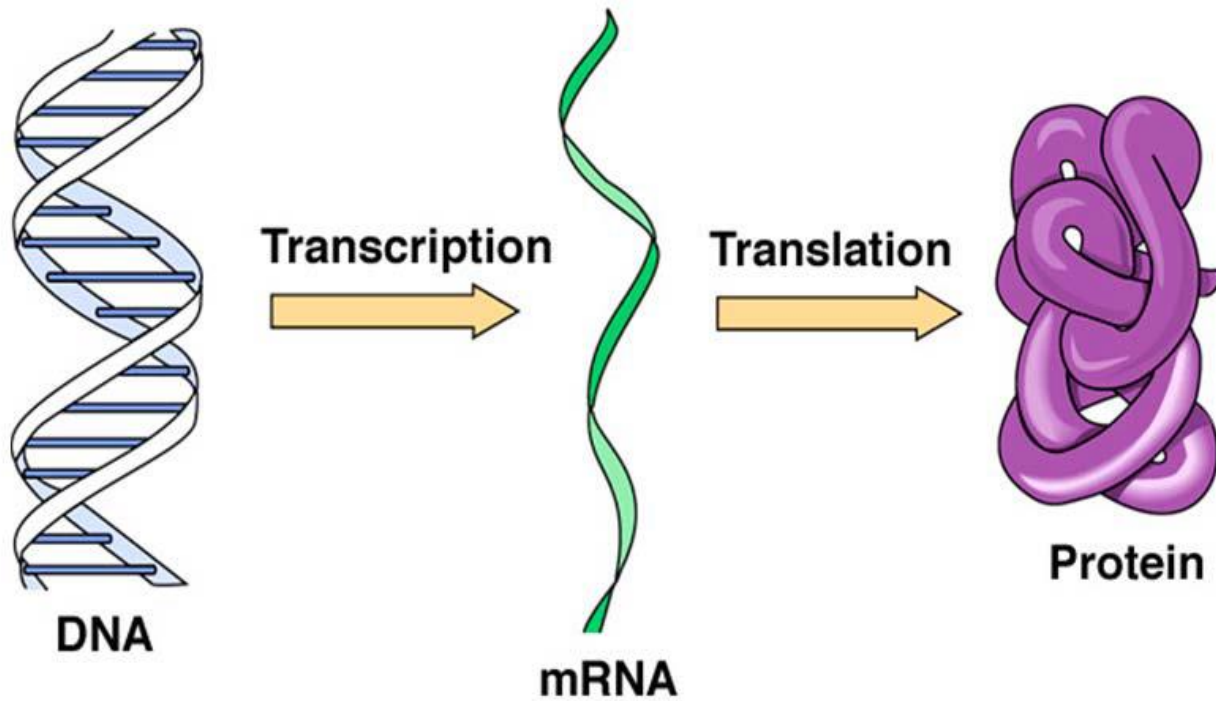


mRNA

Translation



protein



**A: Correlation of protein and mRNA
across all 165 protein spots**

0.12

- 1 gène (ADN) = 2-3 ARN différents
- 1 ARN = 5-10 protéines différentes (modifications post-traductionnelles)

. L'objectif de ces techniques est de mesurer simultanément dans un échantillon biologique (tissus normal, tumeurs) les espèces d'ARNm exprimés et leurs quantités respectives.

. Il s'agit de méthodes globales (de 1000 à 40 000 gènes étudiés simultanément) qui permettent d'avoir des résultats qualitatifs (quels sont les gènes exprimés dans telle situation biologique) et quantitatifs (à quels niveaux sont-ils exprimés) :

- **SAGE et séquençage d'EST** : Serial Analysis of Gene Expression
 - Technique basée sur deux principes
 - La représentation de chaque espèce d'ARNm par des étiquettes (tags) correspondant à de petites séquences (10-15 pb)
 - La concaténation de ses tags avant clonage et séquençage
 - **Séparation de fragments** : DDRT-PCR Expressed sequence tag.
- Séquençage systématique de tous les clones d'ADNc d'une banque
- Biais liés à la sous-représentation de certains gènes (absence des transcrits les moins abondants)
 - Coûteux mais très informatif
 - Base de travail pour l'utilisation d'autres méthodes d'étude du transcriptome (ex: macro- ou microarrays) chez des espèces dont le génome n'a pas été séquencé
 - **Macroarrays et microarrays**

LES AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES PUCES À ADN

AVANTAGES

- **Étude simultanée des profils d'expression de plusieurs milliers de gènes**
- **Les données sont cumulables**
- **Les groupes de gènes affichent des comportements identiques dans une situation biologique donnée**

INCONVÉNIENTS

- **L'équipement de départ est d'un coût relativement élevé**
 - **Le grand nombre de résultats obtenu très rapidement nécessite un traitement informatique et statistique non négligeable**

4. APPLICATION FONDAMENTALE ET CLINIQUE DES « TISSUS ARRAYS »

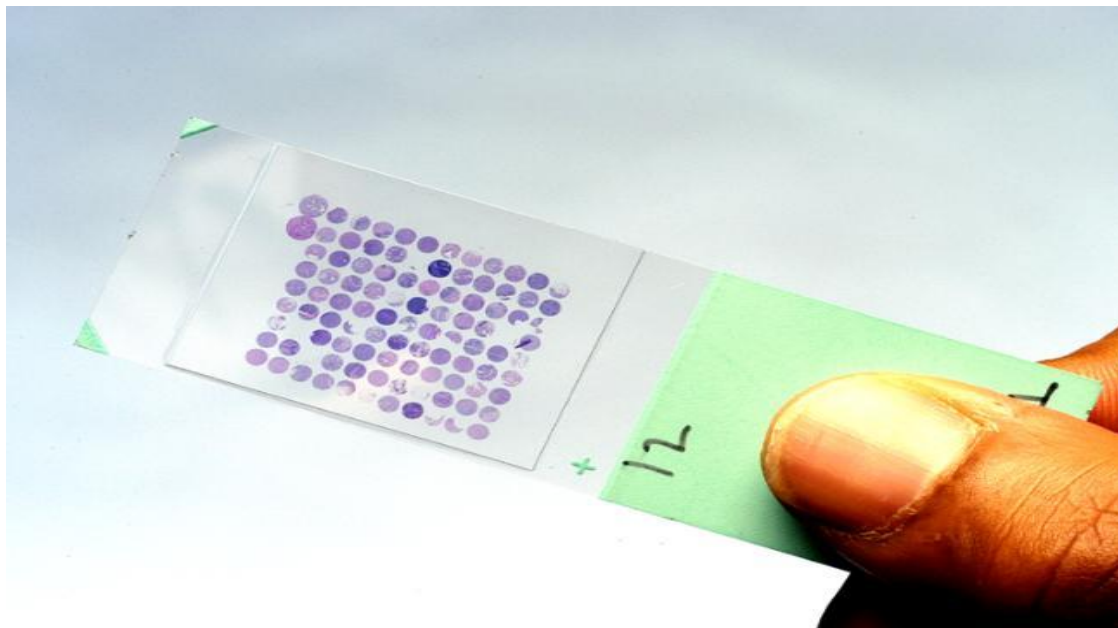
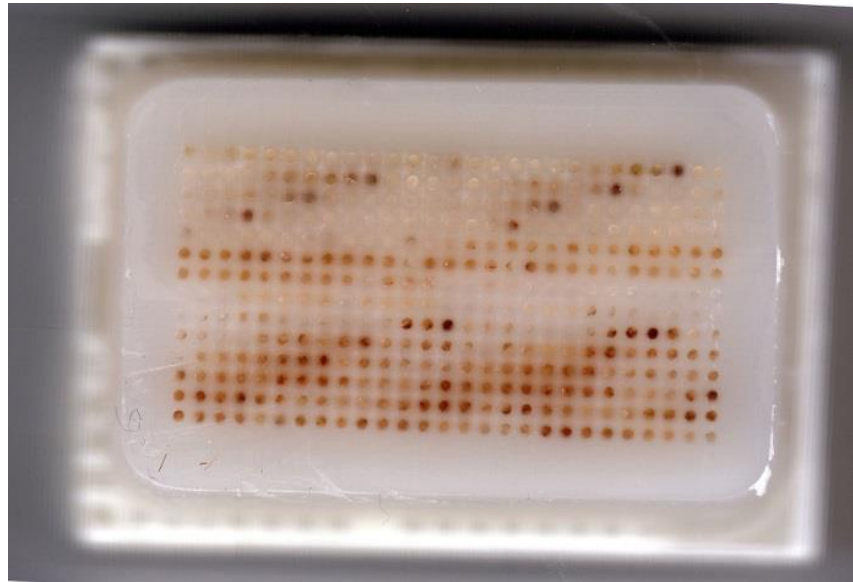
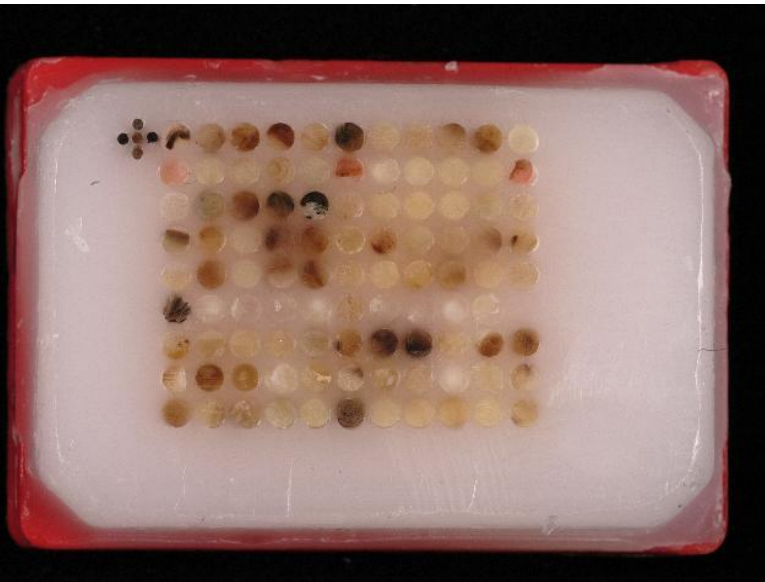
La technique des tissue arrays (TA) permet l'analyse simultanée du phénotype de plusieurs centaines de tumeurs, rapidement, à moindre coût, et surtout avec une consommation tissulaire minime. Nous avons testé la faisabilité de cette technique pour l'étude immunohistochimique des tumeurs urothéliales des voies excrétrices hautes (TUVEH), tumeurs rares et donc précieuses en termes de consommation tissulaire.

Le TA a été construit à partir de 90 TUVÉH, opérées entre 1994 et 2002. Pour chaque patient, 3 à 6 spots de 0.6 mm ont été arrayés, comprenant du tissu tumoral et de l'urothélium normal (UN) quand celui-ci était disponible, l'analyse finale incluant 375 spots. Après contrôle histologique, un marquage immunohistochimique a été effectué par les anticorps anti Ki67 et P53. Après évaluation du pourcentage de spots non informatifs, les résultats immunohistochimiques ont été quantifiés en pourcentage de cellules marquées, puis corrélés au stade pathologique et au grade de la tumeur (Student t test).

L'association des index de Ki67 et P53 avec le grade et le stade de la tumeur reproduit les données de la littérature sur coupes standards. L'utilisation des TA paraît donc prometteuse pour étudier et valider les profils d'expression génique dans des cohortes de TUVÉH.

Dans la technique des tissue arrays, une aiguille creuse est utilisée pour extraire des noyaux de tissu aussi petits que 0,6 mm de diamètre à partir de régions d'intérêt dans des tissus inclus en paraffine, tels que des biopsies cliniques ou des échantillons de tumeurs. Ces noyaux de tissu sont ensuite insérés dans un bloc de paraffine récepteur dans un motif de réseau précisément espacé.

Les sections de ce bloc sont coupées à l'aide d'un microtome, montées sur une lame de microscope puis analysées par n'importe quelle méthode d'analyse histologique standard. Chaque bloc de tissue arrays peut être découpé en 100 à 500 sections, qui peuvent être soumises à des tests indépendants. Les tests couramment utilisés dans les microréseaux tissulaires comprennent l'immunohistochimie et l'hybridation fluorescente in situ. Les tissues arrays sont particulièrement utiles dans l'analyse d'échantillons de cancer.



La protéomique

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, un tissu ou un organisme particulier

Pourquoi s'intéresser à la protéomique ?

- ❖ **la Protéomique globale** permet d'identification toutes les protéines par présentes dans un environnement donné (établissement de la cartographie protéique).
- ❖ **La protéomique fonctionnelle** permet l'analyse des complexes protéiques et la recherche de biomarqueurs.
- ❖ **La protéomique qualitative** permet d'identification des modifications post-traductionnelles ,la protéomique qualitative permet l'analyse des variations de l'abondance des protéines.

Le protéome représente, à un temps donné, l'ensemble des protéines et aussi les formes ayant subi des modifications post-traductionnelles dans un échantillon (cellule, tissu, fluide biologique, organe, etc.). Dont ces modifications post-traductionnelles sont très nombreuses (il existe jusqu'à 100 types de modifications post-traductionnelles), et parmi ces modifications on distingue : Phosphorylation, Acétylation, Méthylation...etc

La protéomique est la science qui étudie les protéomes. Elle a pour but d'identifier et de quantifier l'ensemble des protéines synthétisées, autrement dit le protéome, à un instant donné et dans des conditions bien déterminées au sein d'un tissu, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire

Comme tous les omiques on distingue deux types de protéomique qui sont la protéomique structurelle et la protéomique fonctionnelle. La première étape de la protéomique consiste à identifier des protéines dont l'expression varie en relation avec des modifications de l'environnement cellulaire ou au cours de processus physiopathologiques. Cette protéomique descriptive permet de dresser un répertoire qualitatif et quantitatif des protéines impliquées (protéomique cartographique) et définir la structure primaire, secondaire et tertiaire. La seconde étape (protéomique fonctionnelle) est basé sur le mieux comprendre de la dynamique des relations fonctionnelles entre les structures biologiques et des adaptations survenant face à une situation particulière, qu'il s'agisse d'une exposition à un processus pathologique, d'un facteur environnemental ou d'un traitement pharmacologique.

L'analyse du protéome répond à la théorie générale des systèmes. Il s'agit d'un système structuré, programmé par le génome, mais dont chaque élément est une variable aléatoire. Il peut être modélisé grâce à l'analyse bioinformatique des mouvements des protéines, ouvrant un accès possible, direct et novateur, à la protéomique fonctionnelle, qui est complémentaire et la finalité même de la protéomique structurelle. Ainsi, le protéome nous révèle la vie infra moléculaire avec le principe fondamental de la précession de phénomènes biologiques sériques sur les phénomènes cliniques. Ce profil d'expression en réponse à une perturbation peut se révéler un outil prédictif, voire préventif.

Nous intéressons par la technique de western blot On a plusieurs type de western blot comme : SDS-PAGE, Native PAGE, Focalisation isoélectrique.

Les techniques des protéomiques

```
graph TD; A[Les techniques des protéomiques] --> B(L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel); A --> C(La spectrométrie de masse); B --- D[La stratégie la plus courante est de séparer dans un premier temps les protéines par électrophorèse bidimensionnelle sur un gel de polyacrylamide. Du fait de leur composition en acides aminés, les protéines diffèrent les unes des autres par leur masse molaire et leur charge nette à un pH donné. La charge nette est caractérisée par le point isoélectrique.]; C --- E[L'ionisation électronique (souvent appelée impact électronique) et l'ionisation chimique sont les principales méthodes d'ionisation];
```

L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel

La stratégie la plus courante est de séparer dans un premier temps les protéines par électrophorèse bidimensionnelle sur un gel de polyacrylamide . Du fait de leur composition en acides aminés, les protéines diffèrent les unes des autres par leur masse molaire et leur charge nette à un pH donné. La charge nette est caractérisée par le point isoélectrique.

La spectrométrie de masse

L'ionisation électronique (souvent appelée impact électronique) et l'ionisation chimique sont les principales méthodes d'ionisation

les applications de La protéomique

- 1) **Etudes à visée diagnostique ou thérapeutique (cibles vaccinales) sur des agents pathogènes** Ce type d'études permet de caractériser différentes souches d'agents pathogènes, d'identifier plus précisément des protéines impliquées, soit dans la pathogénicité de ces souches, soit dans les interactions hôtes-pathogènes, et d'évaluer différents types de mécanisme de résistance.
- 2) **Evaluation et développement de nouveaux médicaments** Cela correspond à des possibilités d'évaluer de nouvelles cibles pharmacologiques, d'étudier l'efficacité d'un médicament et également d'explorer sa toxicité potentielle. pathologies neurodégénératives.
- 3) **Constitution d'outils diagnostiques** Il s'agit là d'un champ d'investigation extrêmement étendu. En effet, la capacité à établir et à comparer des profils protéiques doit contribuer à la mise en évidence et au développement de marqueurs spécifiques de pathologies.

C'est le cas par exemple, pour les maladies auto-immunes, les pathologies cancéreuses, les pathologies rénales (étude en particulier de protéomique « urinaire »), et les pathologies du système nerveux central, tout particulièrement les pathologies neurodégénératives .

5. Métabolomique et cancer

La métabolomique l'étude de l'ensemble des petites molécules organiques du métabolisme ou métabolites présents dans les biofluides (sang, urine, salive, liquide cérébro-spinal) ou des extraits tissulaires, à l'aide des techniques comme (Résonance magnétique nucléaire RMN et spectrométrie de masse SM). Les données obtenues sont traitées par des méthodes statistiques

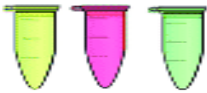
Deux approches métabolomiques:

- **ciblée s'intéresse à des familles particulières de métabolites ex les glucides ou les lipides ...**
- **Non ciblée l'analyse non spécifique de la modification de l'ensemble des métabolites.**

Les étapes de métabolomique



Prélèvement d'échantillons



Extraction et purification



**Identification des métabolites :
CG-CL/SM-RMN**



**Analyses :
normalisations et statistiques**

La répétitivité
des résultats

Validation technique



Validation biologique



Confirmant la
valeur
prédictif

**Métabolite d'intérêt diagnostique,
pronostique ou thérapeutique**

La métabolomique est, par définition, l'étude scientifique de tous les métabolites de l'organisme et de leur rôle dans la croissance, la santé et les maladies. Ces métabolites sont les marqueurs grâce auxquels on pourra obtenir des diagnostics précoces. Elles sont produites par les protéines qui, ensemble, prennent part aux réactions et aux processus biochimiques vitaux à l'intérieur de la cellule.

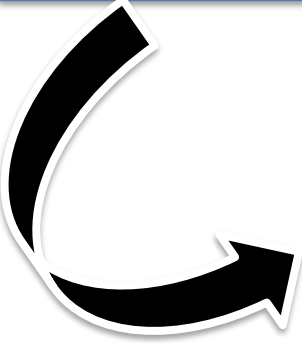
L'organisme malade révèle une variation des métabolites visible grâce à la résonance magnétique nucléaire.

La métabolomique combine des outils analytiques comme la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN) et des méthodes statistiques comme l'analyse en composante principale (PCA) et la régression des moindres carrés partiels (PLS).

L'analyse métabolomique consiste à passer au crible la totalité (dans le cas d'une approche non ciblée) ou une famille particulière de métabolites (lipides, acides aminés, nucléotides, etc.) présents dans une matrice biologique (plasma et urine le plus souvent, mais aussi salive, sperme ou extrait tissulaire) à la recherche « d'anomalies » témoignant d'un processus pathologique ou de l'action d'un xénobiotique sur l'organisme

Métabolisme et cancer


le métabolisme des cellules tumorales montre que même en présence d'oxygène, ces cellules préféreraient paradoxalement l'utilisation de la **glycolyse** plutôt que la phosphorylation oxydative mitochondriale, alors que cette dernière voie est pourtant plus efficace pour produire de l'ATP. En contrepartie

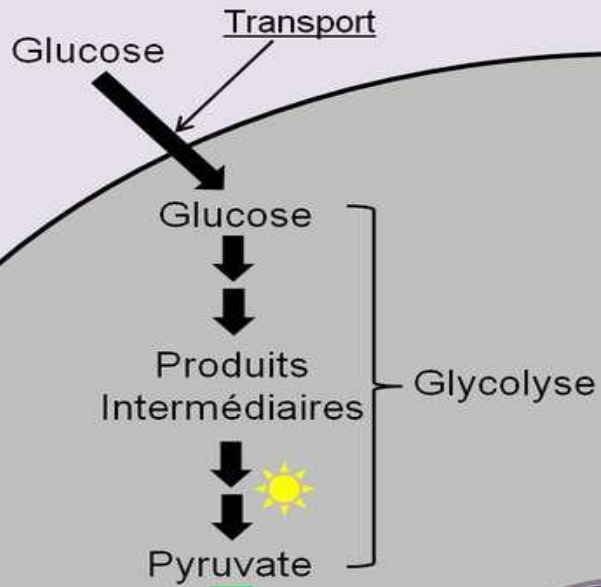


la voie glycolytique permettrait notamment la production accrue de **nucléotides, acides aminés et lipides**, offrant ainsi **des substrats pour la biosynthèse cellulaire**, ce qui représente un atout essentiel pour des cellules proliférantes qui conduit à un cancer .

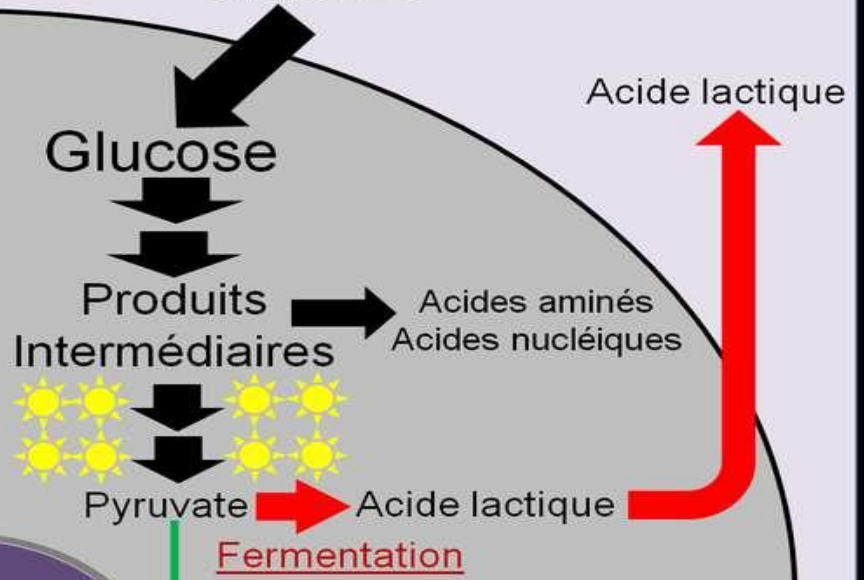
CELLULE SAINE

CELLULE CANCEREUSE

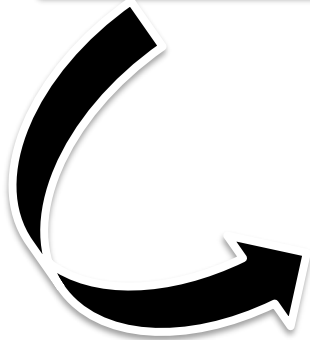
 : Energie



Glucose

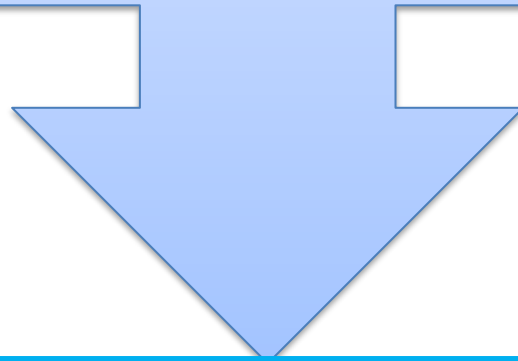


des mutations de gènes codants pour des enzymes du cycle de Krebs ont été décrites à l'origine de plusieurs types de cancers. On peut citer la mutation avec perte de fonction de la fumarate hydratase (FH) à l'origine de léiomyosarcomes et de cancers du rein, les mutations avec perte de fonction de la succinate déshydrogénase (SDH) dans le développement de paragangliomes et de phéochromocytomes et les mutations avec gain de fonction de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) en cause dans certains glioblastomes et leucémies aiguës myéloïdes



Tout cela conduit à considérer qu'il y a une **reprogrammation du métabolisme énergétique** par les cellules tumorales.

une des dix caractéristiques du cancer une modification des gènes et des protéines (mutation) conduit à une **reprogrammation du métabolisme** qui aboutit à une variation des métabolites qui considéré comme des biomarqueurs métabolique pour certain pathologie (cancer).



La métabolomique est une technique d'analyse à large échelle ayant pour but de détecter, identifier et quantifier le plus grand nombre possible de biomarqueurs métabolites présents dans un système biologique en oncologie.

Application de la métabolomique en cancérologie

La métabolomique un nouvel outil pour la recherche translationnelle en cancérologie pour :

Explorer le lien entre le métabolisme et le cancer.

la compréhension de la physiopathologie tumorale, les voies et les cibles métaboliques responsable de changements physiopathologiques.

l'identification de biomarqueurs métabolique pour le diagnostics ,pronostiques ou prédictifs et l'identification des nouvelles cibles thérapeutiques.

La métabolomique appliquée au cancer a été définie comme l'étude des variations métaboliques globales ainsi que la mesure des profils biochimiques liés aux voies métaboliques connues sous l'influence d'un processus oncogène.

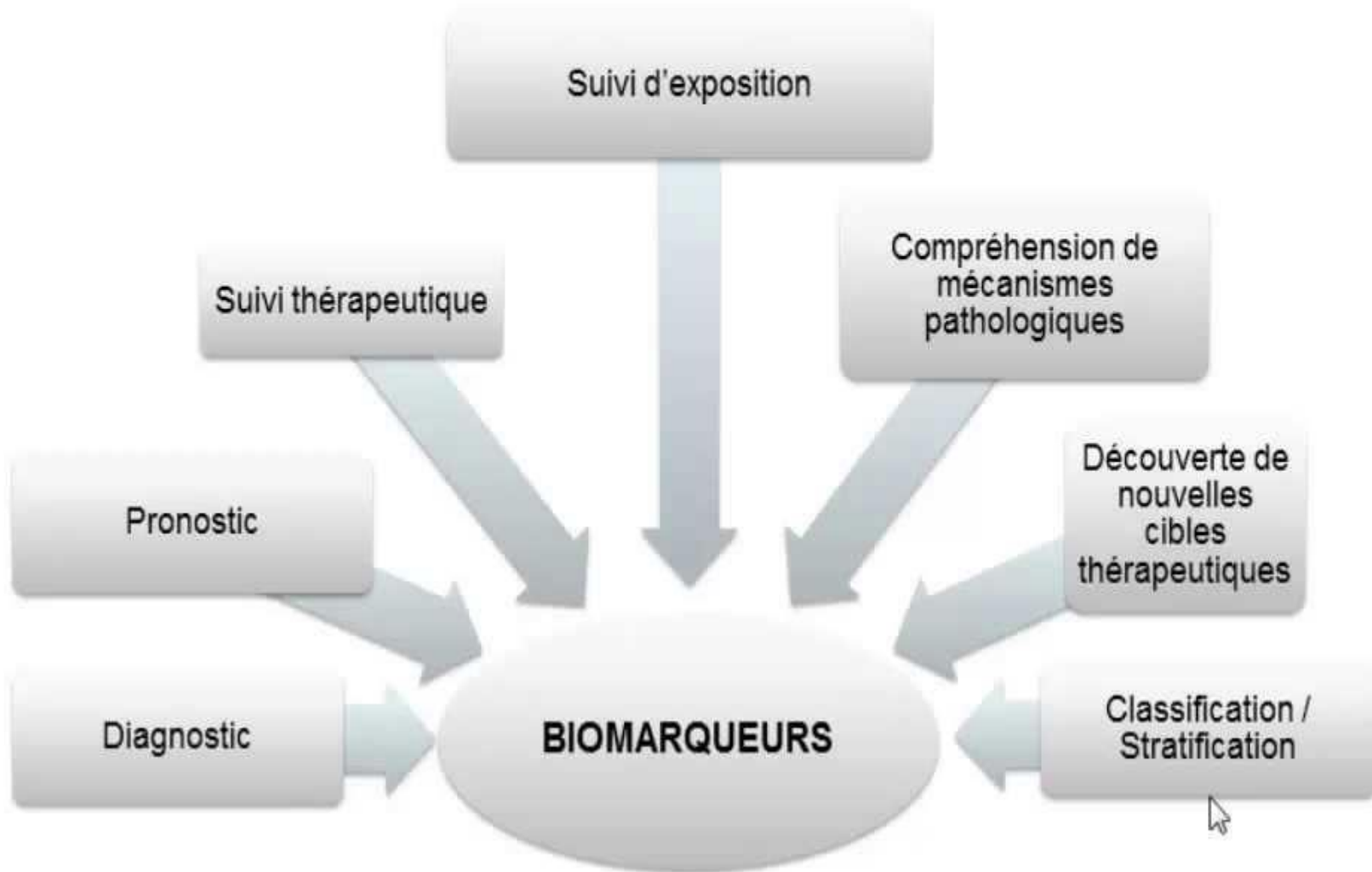
Deux niveaux d'utilisation peuvent être proposés: une approche fondamentale s'intéressant à la compréhension de la physiopathologie tumorale, et l'identification de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou prédictifs.

- une approche fondamentale s'intéressant à la compréhension de la physiopathologie tumorale

- une approche s'intéressant à l'identification de biomarqueurs métabolique pour:

- le diagnostic précoce du cancer**
- Le suivie thérapeutique**
- Le pronostique du cancer**
- Compréhension de mécanisme pathologique du cancer**
- un meilleur diagnostic et un meilleur suivi du traitement**

Pourquoi rechercher de nouveaux biomarqueurs?



Le métabolisme pour l'identification de biomarqueurs métaboliques dans le cancer

Dans le champ de la toxicologie, ce nouvel outil a récemment montré son intérêt pour examiner les effets de l'exposition à des agents chimiques.

Cet article passe en revue les études expérimentales existantes, qui concernent des phtalates (di-2-éthylhexylphtalate [DEHP], di-n-butylphtalate [DnBP] et butyl-benzylphtalate [BBP]), le bisphénol A, plusieurs pesticides organochlorés et organophosphorés et quelques autres substances (tributylphosphate, acide perfluorododécanoïque, benzène et acrylamide).

Les auteurs relèvent l'aptitude de l'analyse métabolomique à détecter des perturbations discrètes du métabolisme reflétant les premiers stades d'un effet toxique.

Sa sensibilité peut être supérieure à celles de l'examen histopathologique ou des analyses biochimiques sanguines.

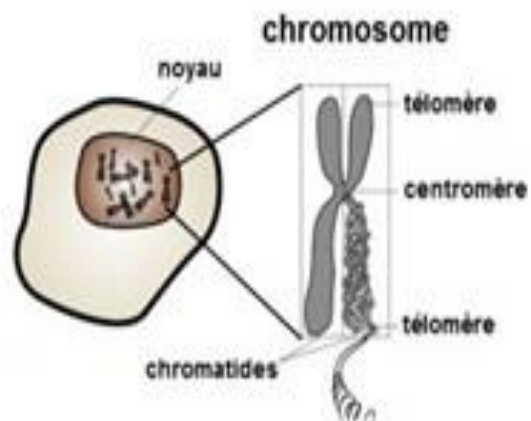
Si la plupart des protocoles comportaient l'administration de doses élevées d'un seul agent, trois études ont examiné les effets de la coexposition à plusieurs substances à faibles doses. Dans l'une d'elles, un mélange de pesticides fréquemment utilisés dans la production de fruits et de légumes en France (alachlor, diazinon, endosulfan, maneb, mancozeb et captan à leurs doses journalières acceptables) a été administré par gavage à des souris pendant quatre semaines.

L'analyse des extraits tissulaires hépatiques a montré que l'exposition avait entraîné un stress oxydant et perturbé le métabolisme du glucose.

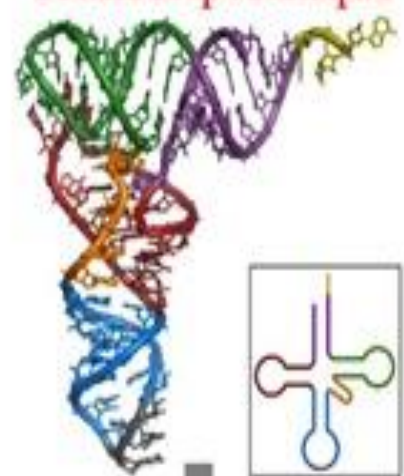
Ces éléments suggèrent l'apport de la métabolomique pour explorer les effets de l'exposition chronique à de faibles doses d'un mélange de substances, correspondant à la réalité de l'exposition environnementale humaine.

Son application à des études épidémiologiques nécessite toutefois certaines considérations.

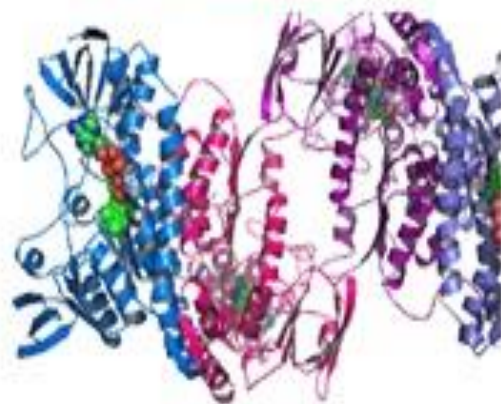
Génomique



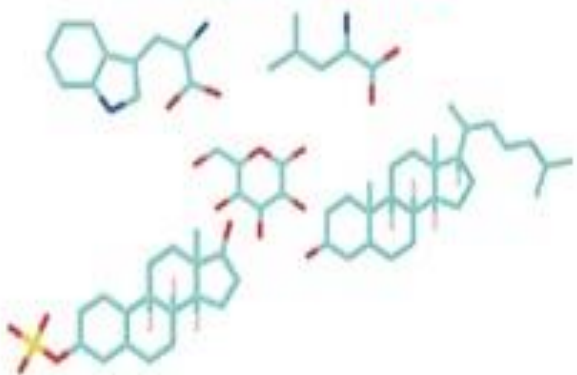
Transcriptomique



Protéomique



Métabolomique

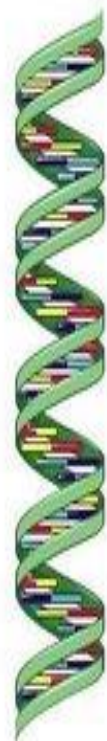


Génomique

Transcriptomique

Protéomique

Métabolomique



ADN

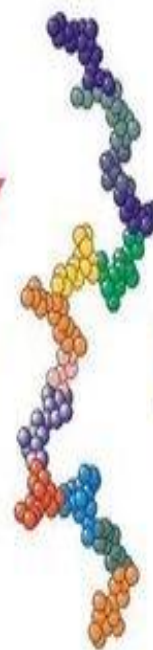
Transcription



ARN

Flux

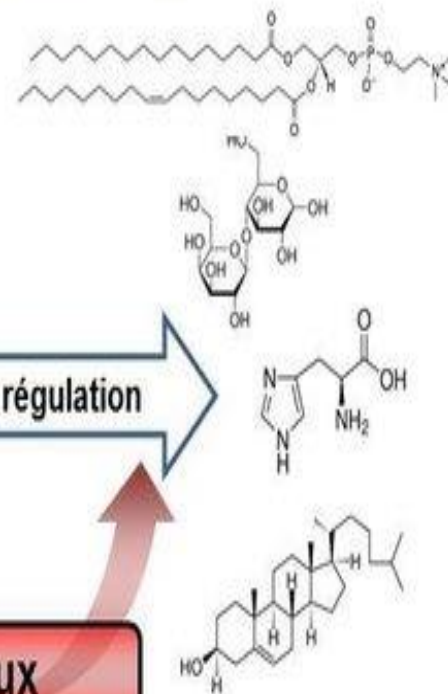
Traduction



Protéines

Synthèse, régulation

Flux



Métabolites

De la prédiction à l'observation des altérations métaboliques

De toutes les formes de cancer, peu sont aussi agressives que l'adénocarcinome pancréatique.

La découverte d'une tumeur dans le pancréas est souvent accompagnée d'un très mauvais pronostic même quand la chirurgie est possible. Mais, une nouvelle technique pourrait aider les médecins et chirurgiens à mettre en place une meilleure stratégie thérapeutique pour les patients présentant ce type de cancer.

Des études ont mis en évidence une nouvelle approche prometteuse afin de distinguer rapidement les cellules pancréatiques cancéreuses des cellules pancréatiques saines et de prédire les chances de survie des patients après le diagnostic.

Un tel pouvoir prédictif permettrait aux médecins et aux chirurgiens de mieux évaluer les besoins chirurgicaux des patients et de recommander un traitement plus personnalisé.

En utilisant une technique à haute résolution, la spectroscopie RMN, ils ont comparé la composition chimique d'échantillons tissulaires de deux sous-groupes de patients présentant un cancer du pancréas : les patients appelés dans la littérature « longs-survivants » (définis comme ceux ayant vécu plus de 3 années après le diagnostic) et les patients appelés dans la littérature « courts-survivants » (définis comme ceux ayant vécu moins d'une année après le diagnostic).

Chaque groupe avait un profil chimique (profil métabolomique) unique. Parmi les composés étudiés, l'éthanolamine s'est avéré être le plus révélateur dans la détermination du devenir des patients. Des niveaux élevés de cette molécule étaient associés à une diminution de la survie chez les patients.

En utilisant la même technique, nous avons été capables de distinguer le tissu pancréatique cancéreux du tissu pancréatique « sain » en moins de 20 minutes. Ce qui rend la technique possible dans les délais d'une chirurgie, ce qui veut dire qu'il serait possible pour les chirurgiens d'analyser les échantillons pendant la chirurgie, comme un moyen de détecter les cellules cancéreuses résiduelles en temps-réel.

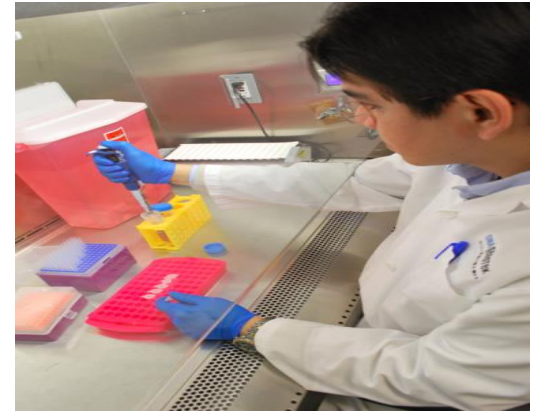
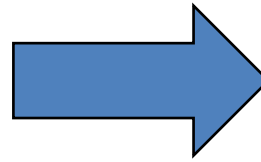
Cette empreinte chimique à la volée est un outil très prometteur dans l'identification des cellules tumorales et la prédiction de la survie des patients présentant un cancer du pancréas.

Une telle information permettrait aux médecins et chirurgiens de déterminer rapidement et précisément la sévérité de la condition des patients et de prendre des décisions importantes concernant la nécessité et, l'extension de l'intervention chirurgicale.

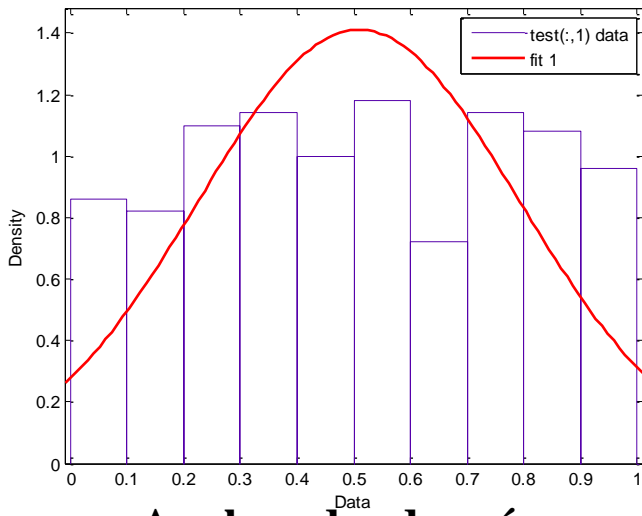
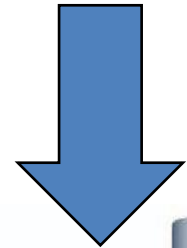
Déroulement d'une analyse métabolomique



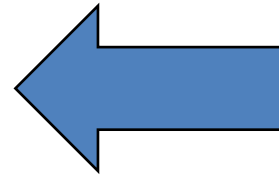
Collecte des échantillons



Préparation des échantillons



Analyse des données



Acquisition des données

6. MÉTABOLOMIQUE ET MALADIES MÉTABOLIQUES

Historiquement, la métabolomique a été proposée comme outil pour étudier l'impact de la délétion de gènes chez l'Homme. Les premières études de ce domaine, nommées à l'époque études d'empreinte ou de profilage métabolique, mesuraient seulement quelques métabolites

Le métabolome, est le dernier niveau de régulation après la transcription et la traduction, est le plus proche de la fonction et est souvent employé comme reflet du phénotype d'un individu. L'ensemble des métabolites retrouvés dans un échantillon biologique à un temps donné est appelé le métabolome. Il excite entre 104 et 105 métabolites dans le métabolome humain. Les métabolites réfèrent à des molécules endogènes, qui sont impliquées ou résultent du métabolisme primaire, et aux métabolites exogènes, qui ne sont pas produits naturellement dans l'organisme. Les métabolites primaires sont impliqués dans les processus physiologiques fondamentaux 12

tels que la croissance, le développement et la reproduction. Ils sont divisés en différentes classes les quelles incluent : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques

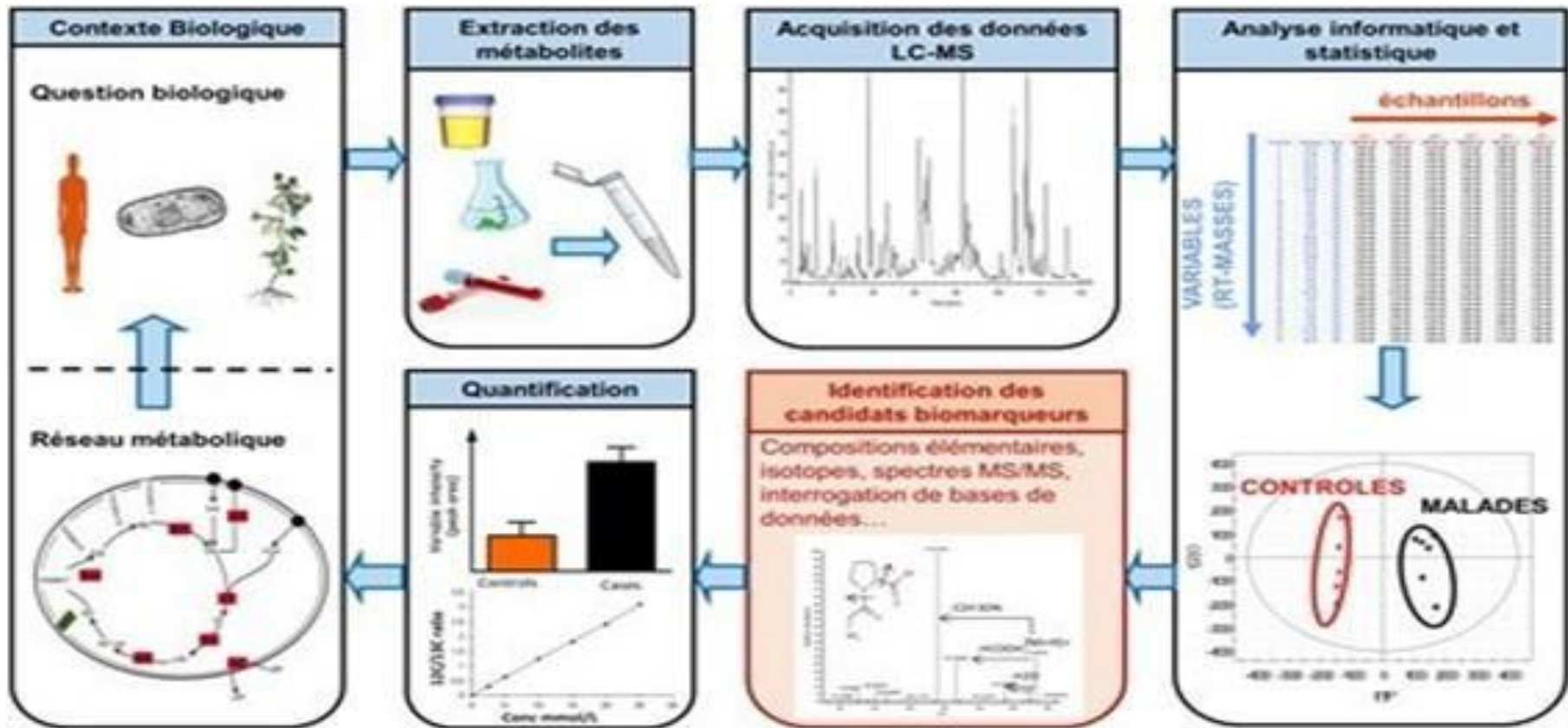
La métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites, le métabolome, dans un système biologique. La métabolomique permet l'étude complète, qualitative et quantitative, des métabolites d'un échantillon biologique grâce à des techniques analytiques de plus en plus performantes .

La métabolomique permettaient d'identifier l'impact du défaut d'un gène sur les niveaux de ces métabolites dans le contexte des maladies innées du métabolisme, et servaient ainsi d'outil diagnostique. Outre l'impact de la génétique sur les niveaux de métabolites dans ce type de maladie, il a été précédemment démontré que des perturbations enzymatiques (et donc protéiques) pouvaient également influencer directement le métabolome intracellulaire

❖ les métabolites :

- **appartiennent à toutes les familles de macromolécules biologiques : acides aminés, oses, lipides, acides nucléiques, protéines, vitamines, hormones**
- **ils sont très nombreux**
- **ils sont de nature physico-chimique, de masse molaire et de concentration très diverses.**

L'objectif principal de la métabolomique en médecine est la découverte de biomarqueurs métaboliques des maladies.



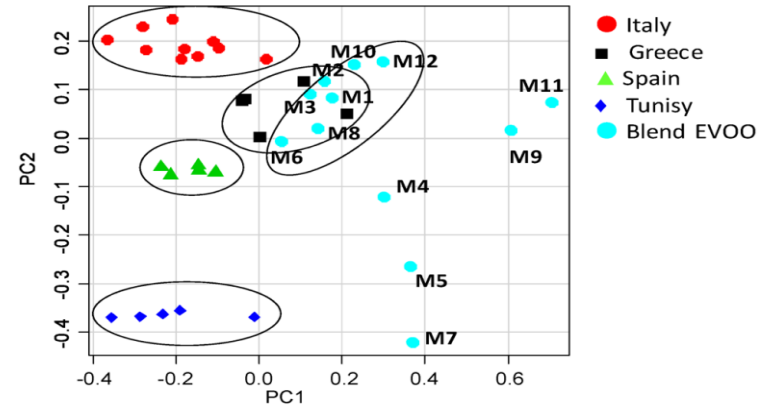
Les différentes étapes d'une analyse métabolomique

Applications de la métabolomique:

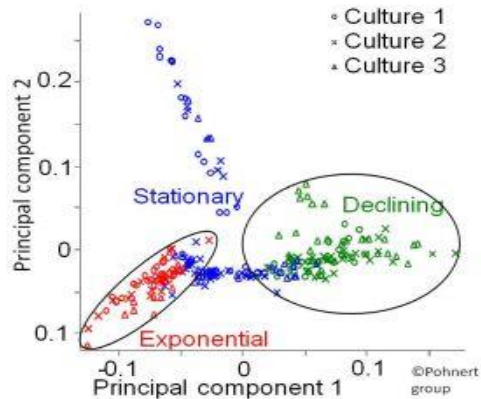
Médecine



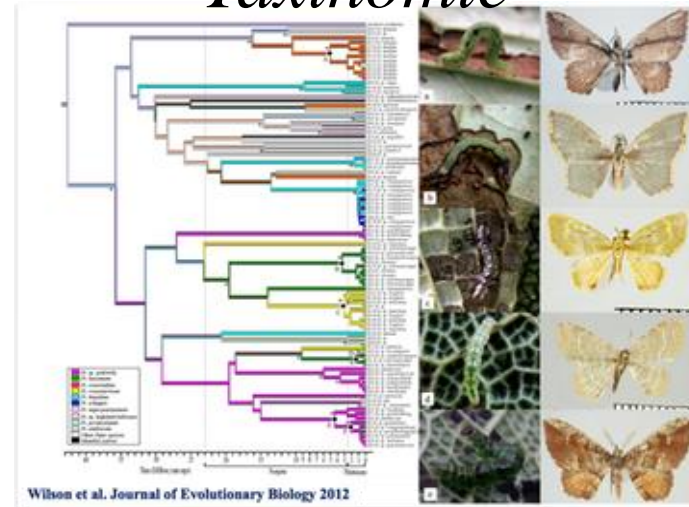
Agrochimie



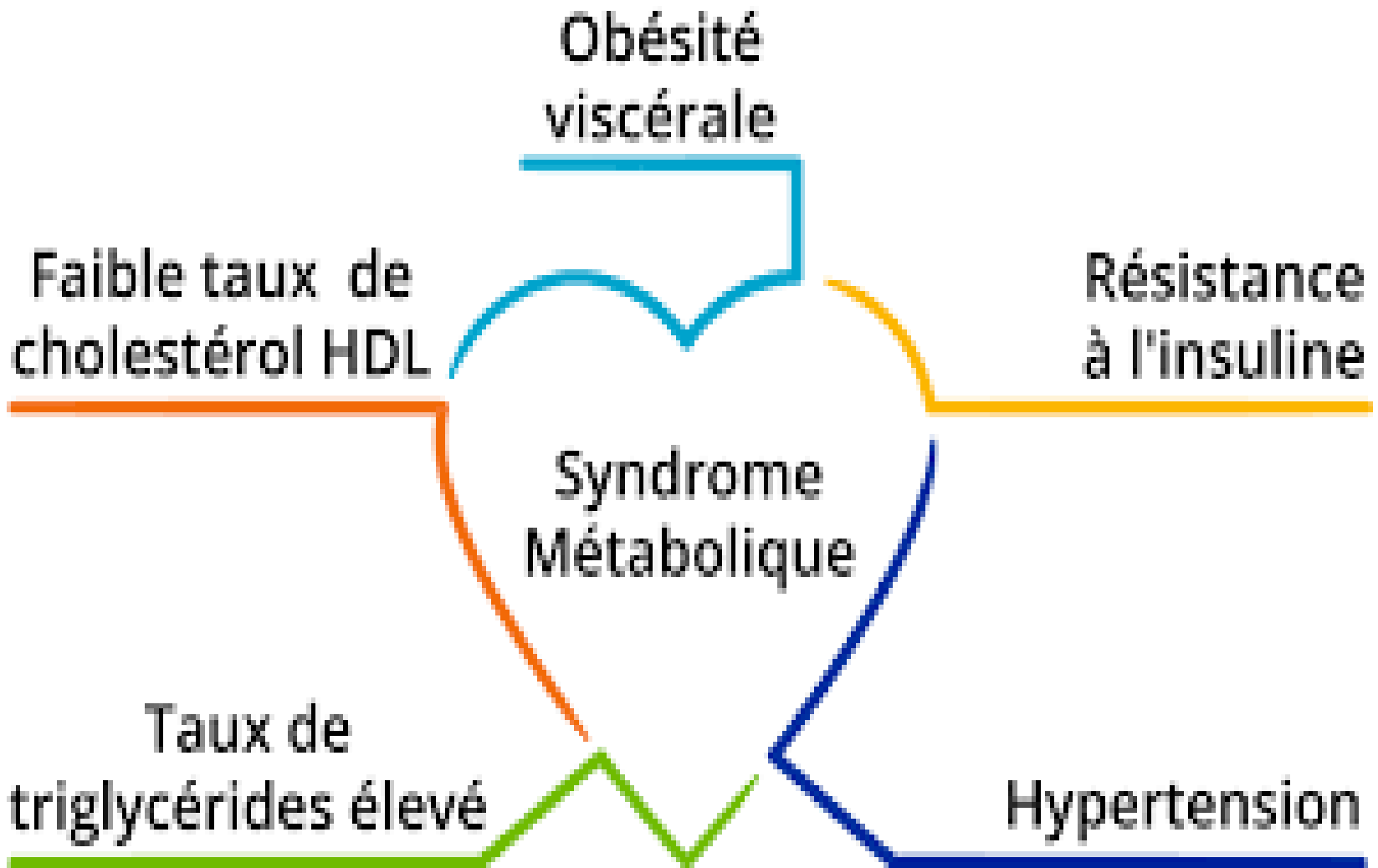
Ecologie chimique



Taxinomie



Syndrome métabolomique:

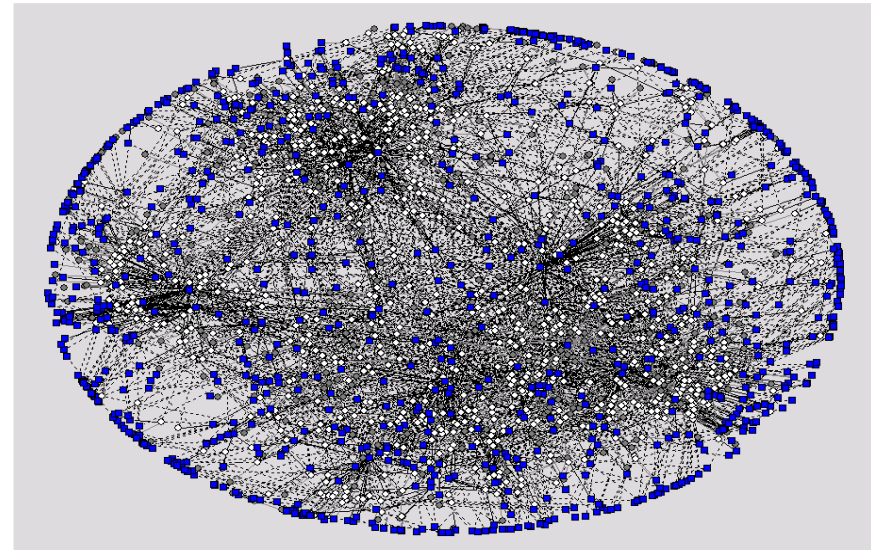


❖ **métabolome:**

L'ensemble des métabolites présents dans une cellule, tissu, organe ou individu est appelé: **métabolome**

- ❑ C'est un ensemble très dynamique puisqu'il résulte des modifications du métabolisme en réponse aux variations de conditions de vie d'un organisme.
- ❑ Le métabolome résulte du métabolisme : l'analyse métabolomique permet d'étudier l'adaptation du métabolisme aux modifications d'environnement ou de comparer les métabolismes de différents organismes.

Métabolome de levure (560 métabolites)



Une maladie métabolique est un trouble médical qui affecte les métabolismes dans la cellule, en particulier la production d'énergie.

La plupart des maladies métaboliques sont génétiques, bien qu'un petit nombre d'entre elles soient du fait du régime alimentaire, d'agents toxiques ou de toxines, d'indfections etc.

Les maladies métaboliques génétiques sont également appelées maladies métaboliques congénitales.

La maladie métabolique est un terme utilisé pour englober l'ensemble des maladies qui perturbe l'activité métabolique normale, cette catégorie de maladie inclut le diabète, l'hypertension artérielle ou l'obésité.

Notre métabolisme a pour rôle de décomposer les aliments ingurgités, tels que les sucres, les graisses et les protéines et de les convertir en énergie. Il permet aussi de débarrasser le corps de tout déchet, comme l'urine par exemple. Quand ce processus ne fonctionne pas normalement, les vaisseaux sanguins sont endommagés et cela peut engendrer des problèmes cardiovasculaires graves ou un AVC.

On distingue ;

L'anémie par carence en vitamine B12

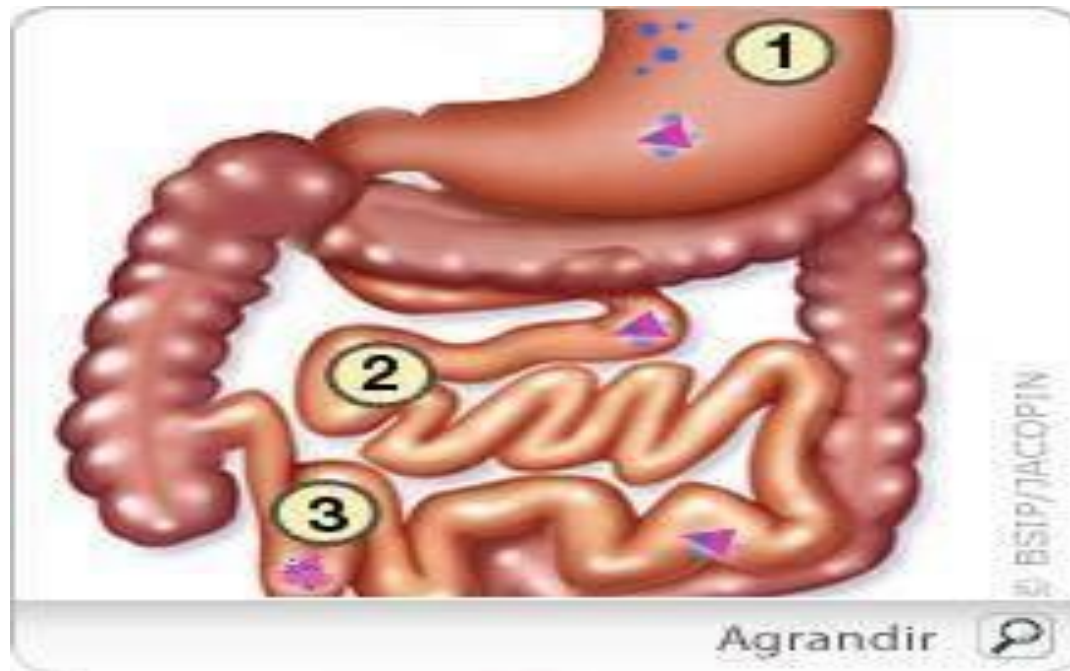
Cette forme d'anémie survient en conséquence d'un manque de vitamine B12 (cobalamine).

La vitamine B12 est essentielle à la formation des globules rouges, notamment. Cette anémie se forme très lentement, après des mois ou des années de carence vitaminique. Les personnes âgées en sont les plus touchées : environ 12 % d'entre elles seraient atteintes d'une carence en cette vitamine, sans qu'il y ait nécessairement d'anémie.

La vitamine B12 s'obtient en consommant des aliments d'origine animale, comme la viande, les oeufs, le poisson et les crustacés.

Pour la plupart des gens, la nourriture apporte au corps beaucoup plus de B12 qu'il n'en a besoin. L'excédent est stocké dans le foie. Il est possible de souffrir d'anémie à cause d'un manque de B12 dans l'alimentation, mais c'est peu fréquent.

Le plus souvent, l'anémie résulte d'un problème d'absorption de la vitamine.

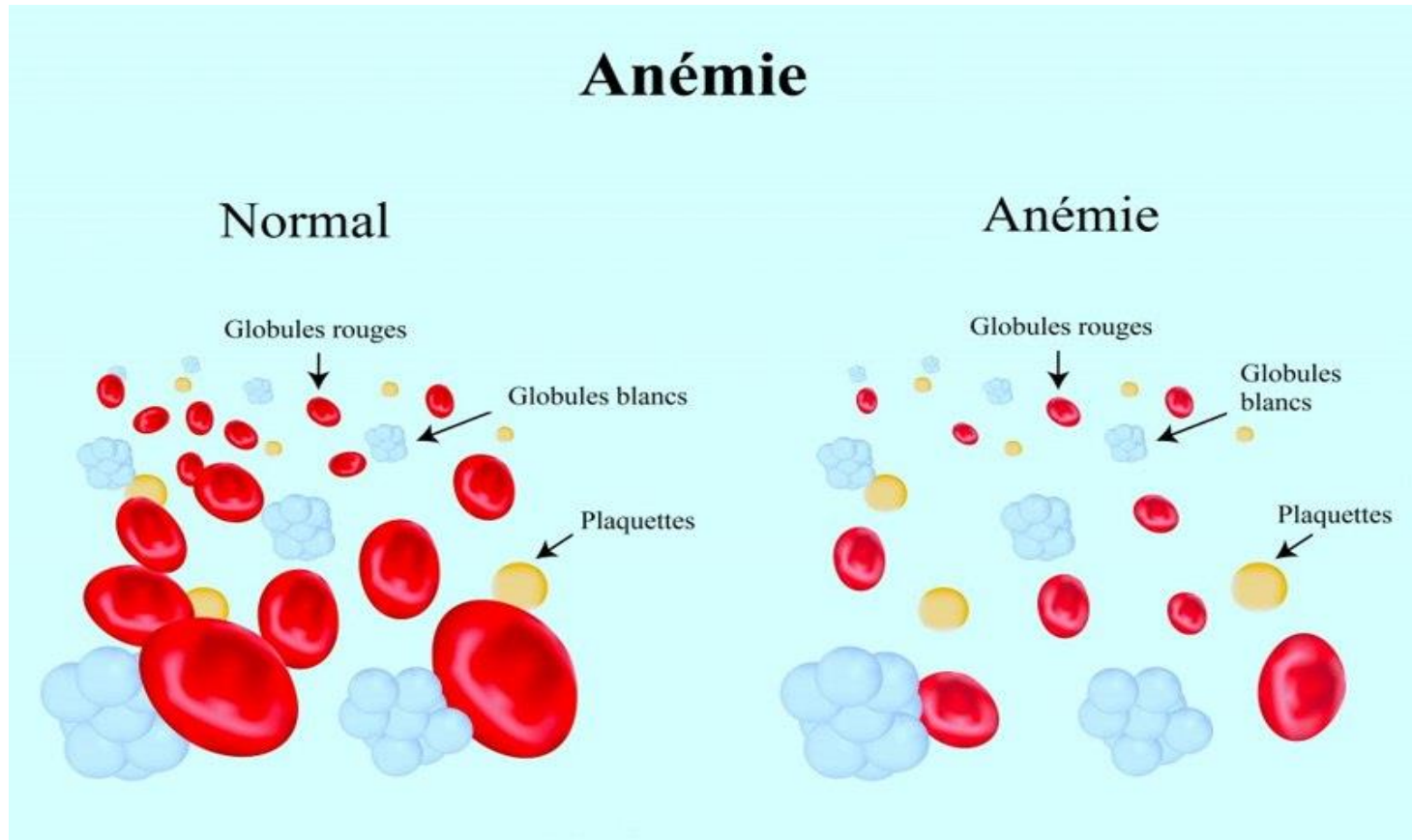


L'anémie ferriprive

L'anémie se caractérise par une diminution du nombre de globules rouges dans le sang ou de leur teneur en hémoglobine.

Les principaux symptômes, lorsqu'il y en a, sont la fatigue, un teint pâle et un essoufflement plus prononcé à l'effort.

L'anémie ferriprive survient en raison d'une carence en fer. Le fer se lie au pigment « hème » de l'hémoglobine qui apporte l'oxygène aux cellules du corps. L'oxygène est un élément essentiel aux cellules pour qu'elles puissent produire de l'énergie et accomplir leurs fonctions.

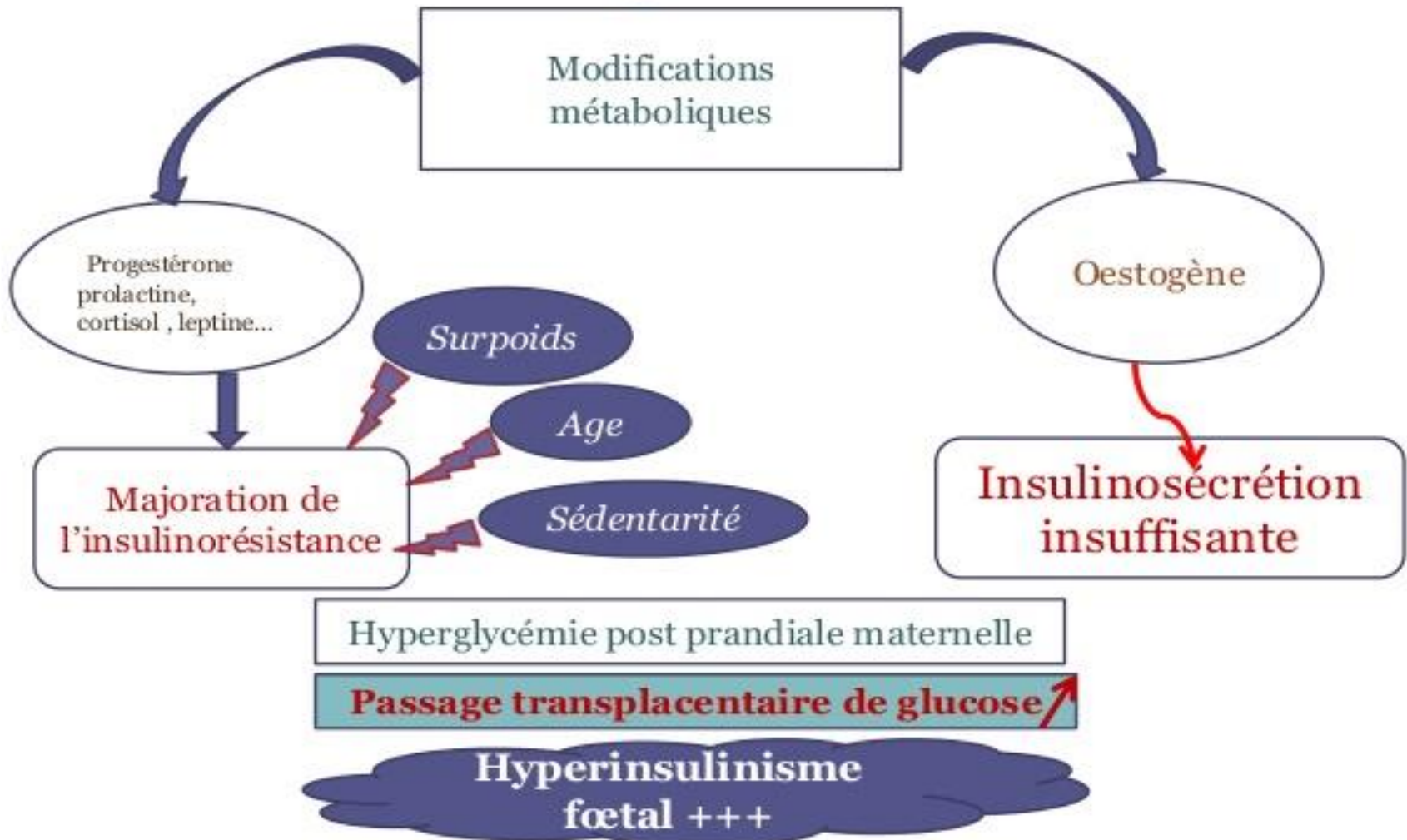


Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel ou diabète de grossesse est un diabète qui apparaît durant la grossesse, habituellement pendant le 2^e ou le 3^e trimestre. Les médecins posent aussi un diagnostic de diabète gestationnel lorsqu'une intolérance au glucose (état prédiabétique) est détectée chez une femme enceinte.

Autrement dit, le diabète gestationnel n'est pas toujours un diabète franc, mais dans tous les cas, la glycémie (ou taux de « sucre » dans le sang) est supérieure à la normale.

Diabète gestationnel



L'hypothyroïdie

L'hypothyroïdie est la conséquence d'une production d'hormones insuffisante par la glande thyroïde, cet organe en forme de papillon situé à la base du cou, sous la pomme d'Adam. Les personnes les plus atteintes par cette affection sont les femmes après 50 ans.

L'influence de la glande thyroïde sur l'organisme est majeure : son rôle est de réguler le métabolisme de base des cellules de notre corps. Elle contrôle la dépense énergétique, le poids, le rythme cardiaque, l'énergie musculaire, l'humeur, la concentration, la température du corps, la digestion, etc. Elle détermine ainsi l'intensité de l'énergie faisant fonctionner nos cellules et organes. Chez les personnes présentant une hypothyroïdie, cette énergie fonctionne au ralenti.



Illustration : Michel Houliou

Agrandir



La dysfonction sexuelle féminine

Les dysfonctions sexuelles féminines, ou troubles sexuels féminins, sont définies par le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux américain, le DSM qui est utilisé de manière internationale.

Le DSM est remis à jour régulièrement en fonction de l'avancée des connaissances..

7. Lipidomique et Protéomique en pharmacologie

Les lipides sont des molécules globalement solubles dans les solvants organiques. Ils sont connus pour leur rôle dans le stockage de l'énergie et dans la structuration des édifices cellulaires, mais ils jouent également un rôle très important de signalisation dans bon nombre de pathologies.

Les lipides peuvent être présents en très faibles ou au contraire très fortes quantités, avec des structures extrêmement hétérogènes. Il est donc difficile de proposer une analyse globale de ces molécules, du fait de leur complexité.

Les analyses sont donc majoritairement famille-dépendantes.

MetaToul propose de quantifier ces molécules par des méthodes classiques de chromatographie gazeuse et liquide couplée ou non à la spectrométrie de masse, mais aussi par RMN, dans tout type de micro-échantillons : fluide biologique (plasma, urine...), cellules, végétaux, tissus (foie, cerveau, rein, cœur, intestin, muscle ...).

Méthodes analytiques utilisées : GC, GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS, HPLC...

- **Analyse et caractérisation moléculaire des lipides :**

Lipides structuraux :- composition en acides gras des phospholipides, triacylglycérols, esters de cholestérol-classes, sous-classes et espèces moléculaires de phospholipides- stérols et oxystérols

Lipides de signalisation :- métabolites oxygénés : octadécanoïdes (HODEs...), eicosanoïdes (prostanoïdes, leucotriènes...), docosanoïdes (protectines, marésines...)- autres : diacylglycérols, phosphatidate, sphingosine, sphingosine-1-phosphate

Marqueurs de la peroxydation lipidique :- hydroxy-alkénals (4-HNE, 4-HHE...)- isoprostanes- Vitamines liposolubles et caroténoïdes

*** Biosynthèse et synthèse de lipides marqués ou non aux isotopes stables.**

Les données pharmacologiques classiques ne permettent pas d'apprécier simplement le devenir d'un médicament dans l'organisme. L'utilisation de modèles pharmacocinétiques et pharmacodynamiques a largement contribué à la compréhension des phénomènes observés en pratique clinique. L'intégration de ces modèles dans des logiciels adaptés est à la base de l'anesthésie intraveineuse à objectif de concentration.

7. Analyse phylogénétique, les cytochrome P450

La phylogénétique moléculaire est l'utilisation de séquences de macromolécules biologiques pour obtenir des informations sur l'histoire évolutive des organismes vivants, et notamment sur leurs liens de parenté (leur phylogénie).

C'est un important outil d'étude parmi ceux de l'évolution moléculaire.

Le produit d'une analyse de phylogénétique moléculaire est soit un arbre phylogénétique, soit un graphe du réseau phylogénétique.

Les macromolécules biologiques telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines sont des composants fondamentaux de tous les êtres vivants. Ces molécules sont des polymères constitués de l'enchaînement de briques moléculaires de base (les monomères) dont la succession constitue la séquence primaire. Ainsi, l'ADN peut être considéré comme un texte écrit dans un alphabet à 4 lettres, les nucléotides : Adénosine (A), Thymidine (T), Guanosine (G) et Cytidine (C) et les protéines comme un texte écrit dans un alphabet à 20 lettres, les 20 acides aminés.

Elle s'appuie sur le principe suivant lequel les séquences biologiques des organismes vivants évoluent sous l'influence de mutations successives qui s'accumulent au cours du temps et font l'objet de processus de sélection naturelle.

La parenté entre les organismes vivants est reflétée par le niveau de similarité des séquences primaires de leur ADN et de leurs protéines. Des espèces très proches ont un ancêtre commun récent, et donc peu de mutations ont eu le temps de se produire depuis qu'elles ont divergé.

Jusqu'à une date assez récente, la séquence primaire des molécules biologiques n'était pas directement accessible. Cependant, au cours des 20 dernières années, l'avènement de la PCR et du séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger ont permis un développement très important de cette approche, ce qui a eu pour conséquence de profondément remanier la vision traditionnelle de la classification des organismes. Malgré les problèmes qu'elle a pu rencontrer, la phylogénétique moléculaire a ainsi permis de redonner un nouveau souffle à la science taxonomique en permettant de mieux comprendre l'évolution de certains traits morphologiques des organismes.

Par ailleurs, la phylogénétique moléculaire peut être associée de domaines tels que la médecine légale ou les tests génétiques. Toutes les régions de l'ADN des organismes (et donc les protéines qu'elles codent) n'évoluent pas à la même vitesse ; certains gènes sont « contraints » car ils assurent des fonctions essentielles à la survie des organismes (des mutations même minimales de ces gènes limitent drastiquement la viabilité de leurs porteurs).

Inversement certaines régions, comme les gènes codant des marqueurs du système immunitaire évoluent rapidement. Ces types de marqueurs permettent donc d'étudier des relations évolutives à faible échelle, par exemple au sein d'une population ou entre espèces proches.

C'est a fortiori vrai pour les régions non-codantes sur lesquelles la pression de sélection est faible ou inexistante.

Pour réaliser des études globales, il est nécessaire de s'appuyer sur des séquences ou des gènes qui sont présents chez toutes les espèces vivantes, afin de pouvoir effectuer des analyses exhaustives et systématiques. Ces gènes sont dits "ubiquitaires". Les plus importants et classiques sont les marqueurs l'ARN ribosomique 16S et 23S (procaryotes) ou 18S et 28S (eucaryotes) qui sont généralement utilisés. Ces ARN structuraux sont les constituants principaux des ribosomes responsables de la traduction des ARNm en protéines dont la fonction est essentielle à la vie et présents chez tous les organismes.

Les progrès du séquençage ont permis d'augmenter le nombre de marqueurs disponibles pour réaliser des études de phylogénétique moléculaire.

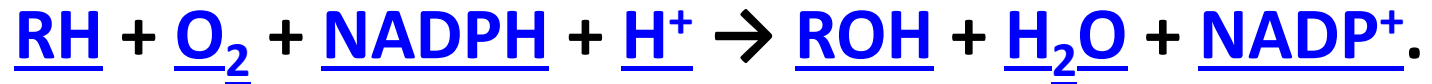
Ainsi, les génomes mitochondriaux et chloroplastiques qui contiennent plus d'une dizaine de gènes ont été utilisés pour étudier les relations des animaux et des plantes, respectivement. Plus récemment, l'augmentation des données de génomes ou de transcriptomes complets disponibles a rendu possible d'étudier l'ensemble des gènes dont l'homologie peut être vérifiée.

Des jeux de données incluant une centaine de gènes sont aujourd'hui utilisés couramment pour résoudre les relations des eucaryotes ou des animaux, cette nouvelle approche est appelée phylogénomique.

Les cytochromes P450 (CYP450) sont des hémoprotéines — protéines ayant de l'héme comme cofacteur— qui interviennent dans des réactions d'oxydoréduction d'un grand nombre de grandes ou de petites molécules, qu'il s'agisse de métabolites ou de xénobiotiques — polluants ,toxines, drogues, médicaments, etc. Ce sont généralement les oxydases finales d'une chaîne de transport d'électrons.

Le terme P450 provient de la spectrophotométrie et du pic d'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm lorsque ces enzymes sont à l'état réduit et complexées avec le monoxyde de carbone.

La réaction la plus courante catalysée par les cytochromes P450 correspond à une activité de monooxygénase, c'est-à-dire à l'insertion d'un atome d'oxygène sur une position aliphatique d'un substrat organique tandis que l'autre atome d'oxygène du dioxygène O₂ est réduit en eau H₂O :



Le CYP transfère un atome d'oxygène moléculaire (O₂) sur le substrat et produira avec l'autre une molécule d'eau. Pour réaliser ces transferts, le CYP a besoin d'électrons qui vont réduire le fer de l'hème permettant la fixation de l'oxygène moléculaire. Ces électrons sont apportés par le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) au cours du cycle catalytique de l'enzyme

On connaît plus de 18 000 protéines différentes de la famille des cytochromes P450. Ces enzymes ont été identifiées aussi bien chez des animaux que chez des plantes, des mycètes, des protistes, des bactéries, des archées et même des virus. Elles n'ont cependant pas été observées chez E coli.

Pour remonter aux origines des P450s, les chercheurs ont essayé de retracer leur évolution au moyen de techniques phylogéniques. Cependant, la construction d'arbres phylogénétiques n'est pas aisée pour cet enzyme car elle se base sur des matrices de distances calculées à partir d'un alignement multiple en séquences primaires (MSA). Cet alignement dépend fortement du degré de similarité entre séquences utilisées. En raison des divergences en séquence primaire, il est facile de comprendre qu'un alignement multiple qui prendrait en compte tous les P450s serait difficilement réalisable. La classification des P450s en famille et sous famille, basée sur la similitude en séquence, a rendu plus abordable dans un premier temps, la construction d'arbres phylogénétiques ainsi que d'autres formes d'analyses qui étudient l'évolution des relations entre gènes de P450s.

Un nombre très varié de méthodes a été utilisé pour comparer les séquences de P450s conduisant la plupart du temps à des arbres assez proches pour un gène ancestral commun à 2 milliards d'années.

Nebert et Nelson ont également exploré les variations au sein des arbres phylogénétiques produits par le Neighbor Joining (NJ) et l'UPGMA pour 39 séquences, où ils trouvèrent une légère différence entre les deux méthodes principalement en raison des familles de CYP1 et CYP2.

Toutes les méthodes d'analyse de séquences ont montré que la forme bactérienne CYP102 (P450BM3) du *Bacillus megaterium* se regroupe avec les P450s d'eucaryotes, tandis que les autres formes de procaryotes ségrégent clairement dans des classes différentes. Une des raisons évoquées serait liée à la similitude des partenaires redox partagés par CYP102 et les P450s microsomaux d'eucaryotes comme il a été vu précédemment lors des classifications à 4 formes.

Il existe des cytochromes différents, répartis dans des familles (CYP1, CYP2, CYP3 et CYP4). On distingue également des sous-familles (CYP1A, CYP2D, etc.) et des isoenzymes (CYP3A4, CYP2D6, etc.). Chaque type de cytochrome P450 a une fonction différente

