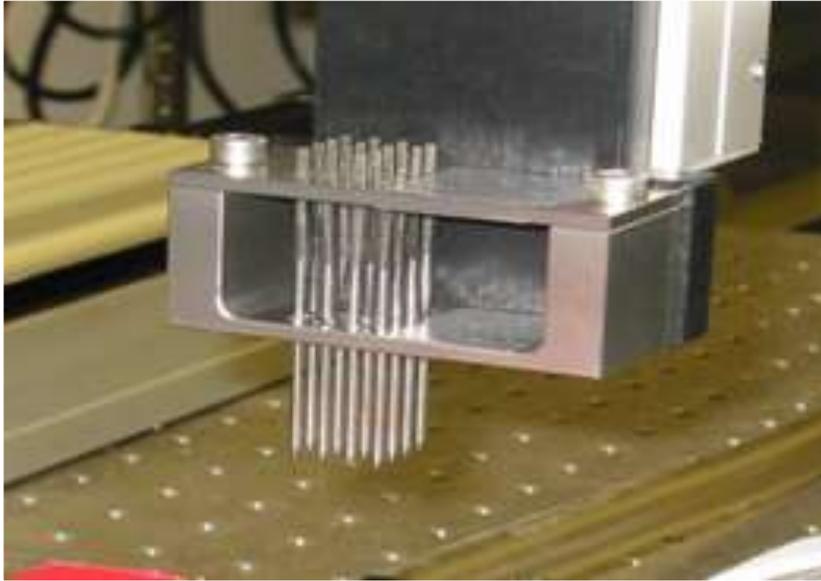


# **CHAPITRE VII**

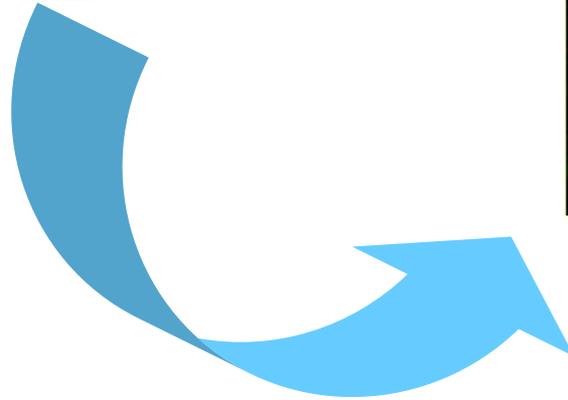
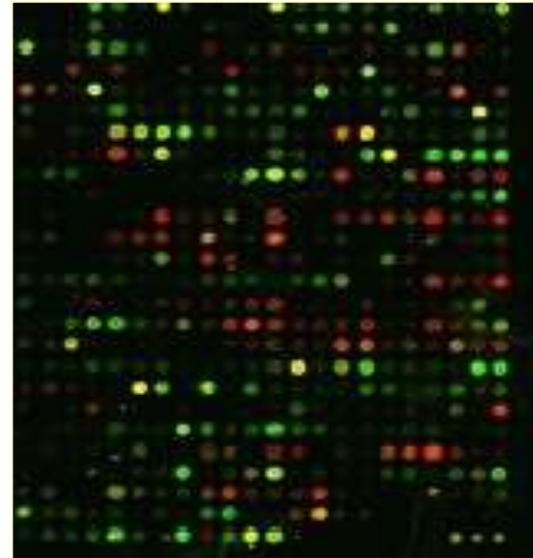
## **Technique des micropuces à ADN**

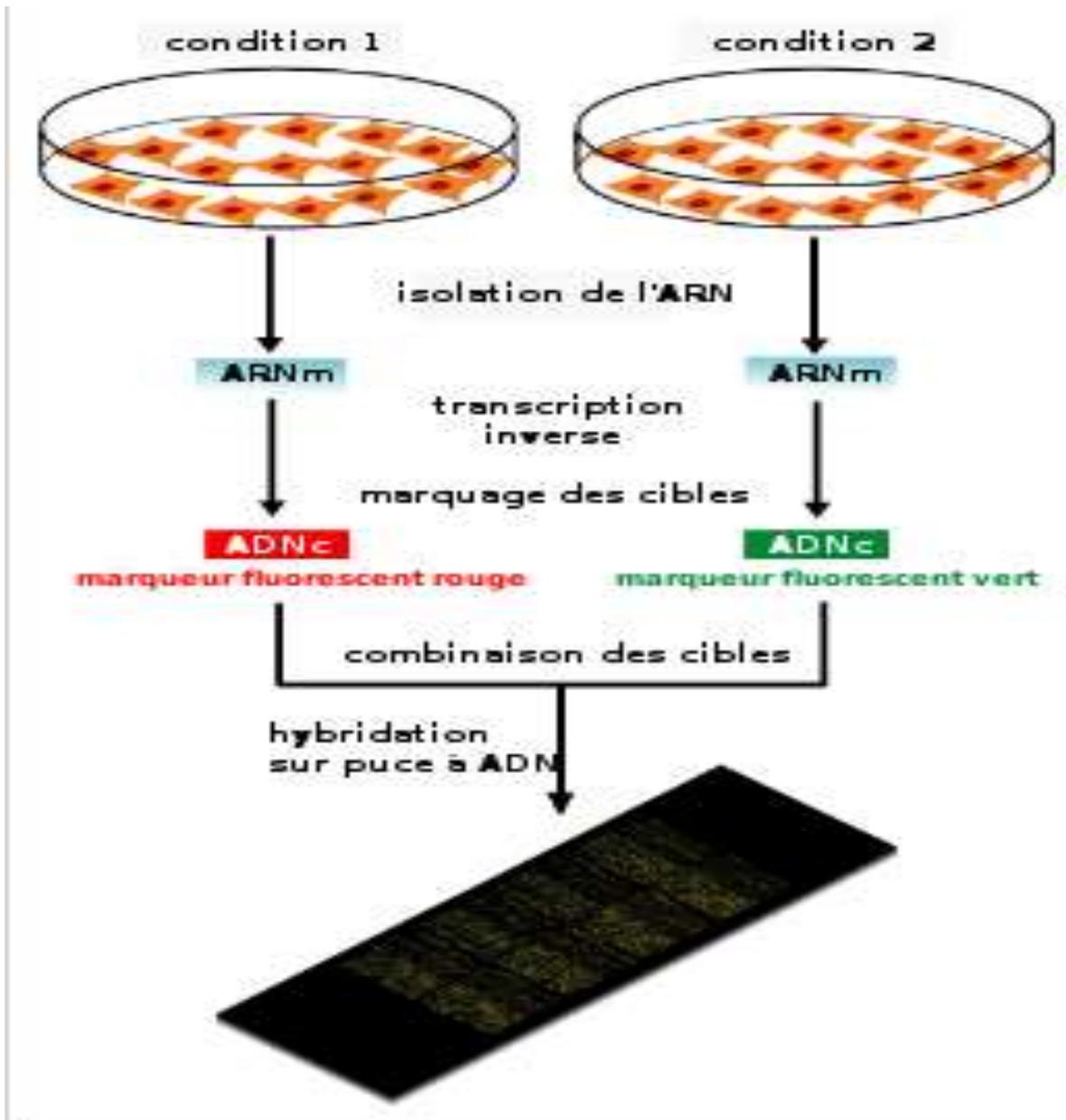
# Définition

- Une **puce à ADN** est un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Cette biotechnologie récente permet d'analyser le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe, à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence.
- Les puces à ADN sont aussi appelées *puces à gènes*, *biopuces* ou par les termes anglais « *DNA chip*, *DNA-microarray*, *biochip* ».



**Puces ADNc**



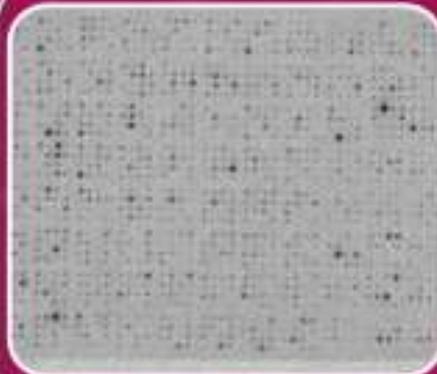


Principe d'utilisation de la puce à ADN.

# Principe

- Le principe de la puce à ADN repose sur la propriété que possède l'ADN **dénaturé** (simple brin) de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est en présence d'un brin complémentaire (réaction d'hybridation). Les quatre bases nucléiques de l'ADN (A, G, C, T) ont en effet la particularité de s'apparier deux à deux par des liaisons hydrogène (A = T et T = A ; G ≡ C et C ≡ G).
- On parle de **sonde** (fragment d'ADN synthétique représentatif des gènes dont on cherche à étudier l'expression, fixé de façon covalente à la surface de la biopuce) et de **cible** (ARNm que l'on cherche à identifier et/ou à quantifier (échantillon)). Les cibles sont marquées par fluorescence

## Les différents types de puces à ADN



### Macroarray:

- utilise des clones d'ADNc.
- disposés sur une membrane de nylon.
- associés avec des cibles Radioactives.



### Microarray:

- lame en verre
- plus miniaturisé
- utilise les produit PCR
- 200-400 microns
- cibles marquées par fluorescence

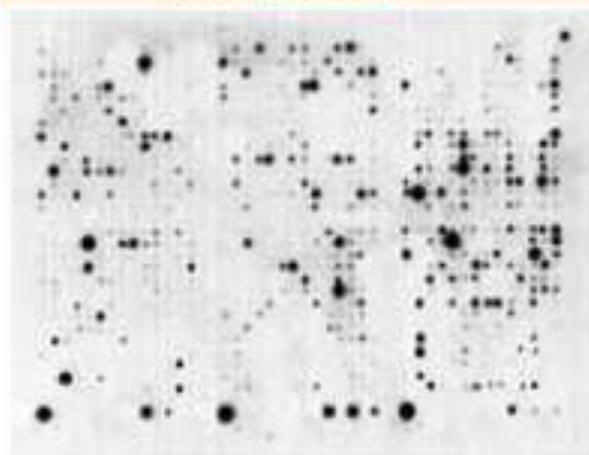


### Oligonucléotides:

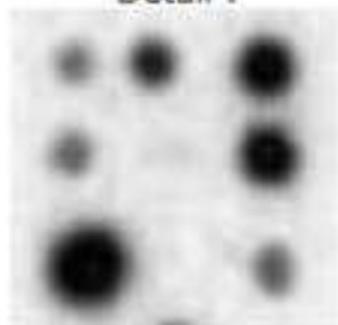
#### Affimetrix

- synthèse chimique d'oligonucléotides In-situ
- sur surface solide
- un procédé de photolithographie

## Filtres haute densité (macroarrays)



Détail :



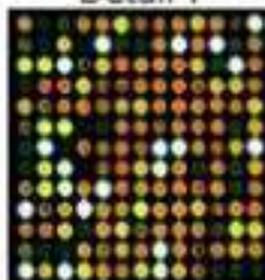
Taille : 12cm x 8cm

- 2400 clones par membrane
- marquage radioactif
- 1 condition expérimentale par membrane

## Lames de verre (microarrays)



Détail :



Taille : 5,4cm x 0,9cm

- 10000 clones par lame
- marquage fluorescent
- 2 conditions expérimentales par lame

## Puces à oligonucléotides



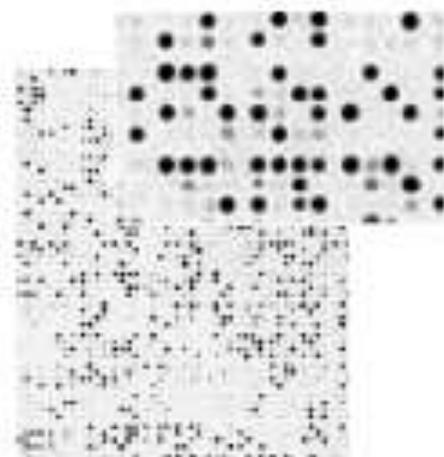
Détail :



Taille : 1,28cm x 1,28cm

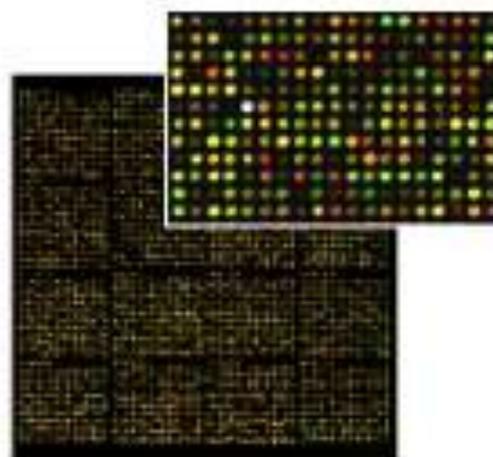
- 300000 oligonucléotides par lame
- marquage fluorescent
- 1 condition expérimentale par lame

### « Macroarray »



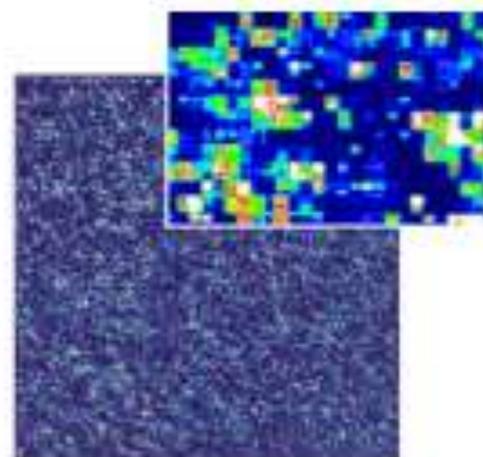
- support : membrane de nylon
- taille des spots : 0,5-1mm
- densité : quelques centaines de spots/cm<sup>2</sup>
- sondes : produits de PCR
- cibles : ADNc avec marquage radioactif au <sup>32</sup>P
- principales applications : analyse de l'expression des gènes

### « Microarray spotted »



- support : lame de verre à revêtement chimique
- taille des spots : ~100µm
- densité : 1000-10000 spots/cm<sup>2</sup>
- sondes : produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70mers)
- cibles : ADNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5
- principales applications : analyse de l'expression, ChIP-on-Chip, CGH-array

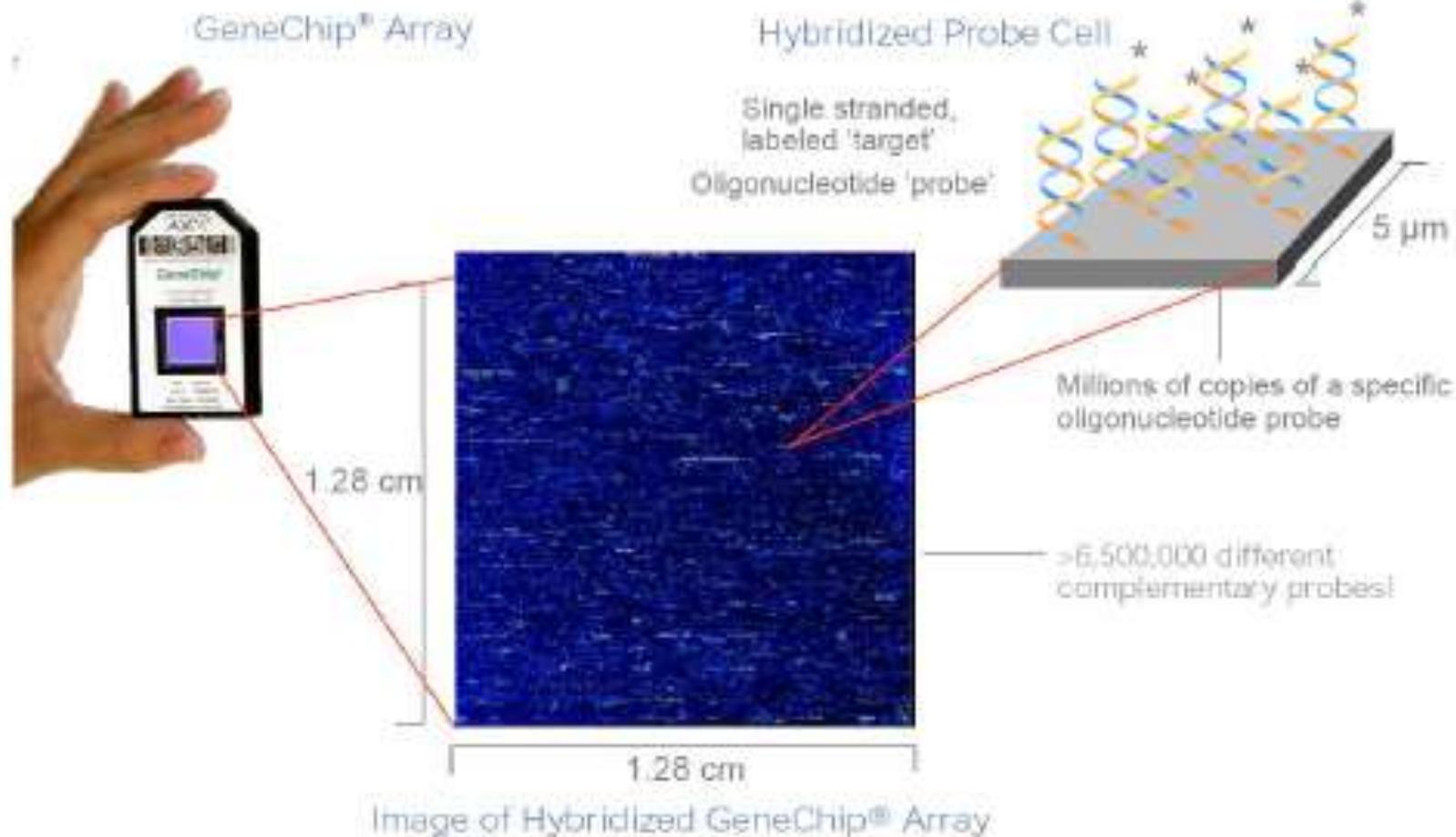
### « GeneChips » de Affymetrix



- support : lame de verre à revêtement chimique
- taille des spots : ~20µm
- densité : jusque 250000 spots/cm<sup>2</sup>
- sondes : oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés *in situ*
- cibles : ARNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine-streptavidine
- principales applications : analyse de l'expression, détection de marqueurs moléculaires

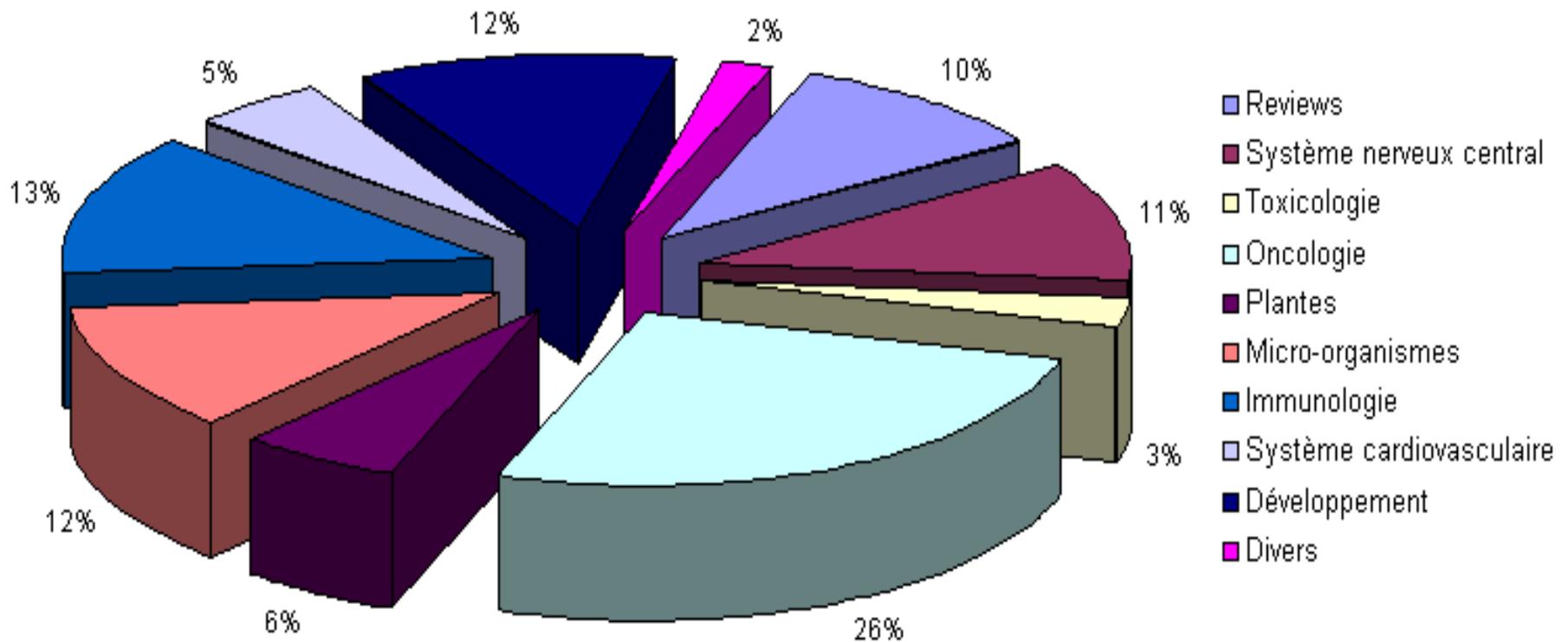
Tableau 1 : Principaux types de puces à ADN

# GeneChip® Array



# Applications des puces à ADN

Nombre de publications en Août 2002



# Domaines d'applications

- **Biologie médicale et cancérologie** : domaine de la cancérologie pour le typage tumoral d'après leur profil génétique. L'utilisation des puces à ADN comme outil de diagnostic présente l'avantage de faire appel à de nombreux marqueurs : plusieurs milliers de gènes peuvent être criblés simultanément pour fournir une signature du type cellulaire étudié. Si l'on considère que chaque type de tumeur présente une signature génétique unique, ce système permet virtuellement de distinguer et classer tous les types de tumeurs. Les puces à ADN permettent donc de comparer l'expression des gènes de deux types cellulaires différents, de faire de l'étude des gènes exprimés sur un grand nombre de patients pour observer l'effet d'un médicament (anti-cancéreux par exemple), de regarder l'effet d'un traitement sur l'expression des gènes, de comparer tissus sains contre tissus malades, traités contre non-traités etc..

- **Microbiologie** : afin de définir les résistances aux antibiotiques, par exemple.
- **Toxico-génomique** : étude de l'influence de diverses **substances toxiques** sur l'expression des gènes. Les **généotoxiques** (comme le benzène, l'amiante, les rayonnements radioactifs, les rayonnements solaires, les produits cancérigènes, etc...,) sont visibles grâce au procédé des puces à ADN. En effet, les puces à ADN permettent d'analyser la réponse cellulaire à la présence de généotoxiques (au niveau du transcriptome). On étudie les effets sur un grand nombre d'individus, ces effets seront différents du au polymorphisme. Cette étude ouvre la porte à la pharmacogénomique.

## • **Génomique environnementale :**

–**détection de bactéries pathogènes** dans un échantillon biologique : la puce contient alors des sondes dirigées contre les ARNr 16S de plusieurs bactéries pathogènes (Salmonelles, Légionelles, Staphylocoques...)

–**détection de substances polluantes** dans l'eau (grâce aux biocapteurs) : même principe que pour la cancérologie, la puce permet l'identification de gènes spécifiquement induits et fortement induits par l'agent polluant introduit dans l'une des cibles.

– **biopuces phylogénétiques** : composition de la communauté microbienne grâce notamment à la présence de marqueurs phylogénétiques : ARN ribosomiques (16S, 18S, 23S, 25S, 28S)

– **biopuces fonctionnelles** : évaluation des capacités métaboliques grâce à des marqueurs fonctionnels (gènes codant pour des enzymes clés dans les processus métaboliques étudiés)

## • Etudes comparatives de transcriptomes

Le transcriptome = population des ARNm exprimés par un organisme à un instant donné.

⇒ résulte d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation des ARNm

⇒ varie en fonction des conditions intra- et extra-cellulaires.

⇒ offre une représentation dynamique de l'état de la cellule et des processus biologiques en cours.

L'analyse du transcriptome permet d'établir le « profil d'expression » de chaque gène considéré, c'est-à-dire la variation de son niveau d'expression selon un ou plusieurs paramètres (temps, type cellulaire, etc.).