

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur**  
**et de la Recherche Scientifique**  
**Université de Jijel**

جامعة محمد الصديق بن يحيى  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
المكتبة  
رقم الجرد : 4042



**Faculté des Sciences**  
**Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

# **Mémoire**

**de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures**  
**(D.E.S)**

**Option : Microbiologie**

## **Thème**

**Biotechnologie des puces ADN et ses**  
**applications Médicales**

**Membre du Jury :**

Encadreur : Mr AICHEUR Ridha

Examineur: Dr RECHRECHE Hocine

**Présenté par :**

LECHGHEB Zahia

YENNOUNE Hakima

MILOUDIE Sara

**Promotion-Juin 2007**



# Remerciement

*Nous remercions vivement dieu de nous avoir aidé et éclairé le chemin du bonheur pour la réalisation de notre mémoire.*

*Par la même occasion, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et apporté leur aide précieux tout au long de la préparation pour la réalisation de ce travail, en particulier notre encadreur Mr : **AICHOUR Ridha** par son attention particulière et ces efforts.*

*Nous remercions les membres jury de avoir honoré par leur présence pour le Jugement de notre travail.*

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Les puces ADN</b>	
I. Définition.....	5
II. Propriétés .....	5
II.1. Les supports.....	5
II.2. La chimie de surface.....	6
II.3. Traitement chimique de surface.....	6
III. Avantages de la technologie de puce ADN.....	8
IV. Principaux types des puces ADN.....	9
V. Principaux fabriquant des puces ADN.....	11
<b>Chapitre II : Fondements des puces ADN</b>	
I. Les sondes.....	13
I.1. Structure et propriétés des acides désoxyribonucléiques.....	15
I.1.1. La Complémentarité.....	15
I.1.2. Les liaisons hydrogènes.....	16
I.1.3. Les autres forces impliquées.....	16
I. 2. Paramètre influençant la conception des sondes.....	16
I. 2.1. Paramètre thermodynamiques.....	16
I. 2. 2. Paramètre stérique.....	17
I. 3. Obtention d'une sonde.....	18
II. Les cibles.....	19
III. Amplification par PCR .....	21
IV. Hybridation.....	22
IV.1. Technique de l'hybridation.....	22
IV.2. Dynamique de l'hybridation.....	22
IV.2.1. Probabilité de rencontre entre la sonde et la cible .....	22
IV.2.2. L'effet de la charge d'ADN .....	23
IV.3. La détection de l'hybridation.....	24

## **Chapitre III : Confection des puces ADN**

I. Principe .....	25
II. Préparation des sondes.....	25
III. Préparation des lames.....	26
III. 1. Le choix des lames .....	26
III.2. Dépôt des produits de PCR par le Robot.....	26
III.3. Coordonnées des gènes sur la matrice imprimé .....	27
III.4. Traitement de finition et pré hybridation des lames.....	28
IV. Préparation des cibles et hybridation des puces.....	28
IV.1. Préparation des échantillons d'ARN.....	28
IV.1.1. Extraction des ARN.....	28
IV.1.2. Purification.....	29
IV.2. Transcription inverse et incorporation des marqueurs fluorescents.....	30
IV.3. Hybridation et lavage.....	30
V. Acquisition et extraction des données .....	31
V.1. La détection et la lecture de signales.....	31
V.2. Extraction des données numériques.....	32

## **Chapitre IV : Applications des puces ADN**

I. Domaines d'applications.....	33
I.1. Domaine médical.....	33
I.1.1. Séquençage par hybridation (SPH ).....	33
I.1.2. Identification des cibles pour la recherche thérapeutique.....	33
I.1.3. Pharmacogénomique .....	33
I.2. Microbiologie.....	34
I.3. Agroalimentaire .....	34
I.4. Toxicogénomique.....	34
I.5. Analyse de mutations .....	34
I.6. Environnement .....	35
II. Quelques exemples d'application des puces ADN.....	37
II.1. Le génotypage des mycobactérium.....	37

II.2. Physiopathologie de l'infection par <i>Helicobacter pylori</i> .....	40
II.3. Etude de la variation transcriptionnelle des gènes de levures au cours de la méiose et de la sporulation .....	43
II.4. Etude de la variation transcriptionnelle des gènes de levures en présence et en absence d'oxygène.....	44
<b>Chapitre V : Discussion et Conclusion.....</b>	<b>45</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>
<b>Glossaire</b>	

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

<b>A</b>	adénine
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>APN</b>	acide ribonucléique
<b>Arg</b>	Arginine
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BSA</b>	bovine sérum albumin
<b>C</b>	cytosine
<b>DEPC</b>	diéthyl pyrocarbonate
<b>G</b>	guanine
<b>Leu</b>	Leucine
<b>µg</b>	Microgramme
<b>MPP</b>	méthyle phosphate
<b>Na<sup>+</sup></b>	ions sodium
<b>ORF</b>	open Reading frame
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PH</b>	potential hydrogène
<b>Ser</b>	Serine
<b>SPH</b>	séquençage par hybridation
<b>SSC</b>	saline sodium citrate
<b>T</b>	thymine
<b>T<sub>m</sub></b>	melting température
<b>U.V</b>	lumière ultra violet

# **Introduction**

L'histoire de la Génétique remonte au XIX<sup>ème</sup> siècle, plus précisément à l'an 1865, quand Gregor Mendel établit les lois de la transmission des caractères héréditaires en observant des petits pois. Une vingtaine d'années plus tard, en 1882, Walther Flemming observait pour la première fois, les acides nucléiques. Le lien entre ces molécules et l'hérédité est démontré en 1944, soit soixante ans plus tard, par Oswald Avery, Colin McLeod et MacLyn McCarty. Ils prouvèrent que l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) renferme le code biochimique de l'hérédité. En 1953, Watson et Crick décrivaient la structure en double hélice de la molécule d'ADN. Ce fut une véritable révolution dans le domaine de la génétique qui, depuis, se développa à grande vitesse et devint très populaire.

Les études qui suivirent les travaux de Watson et Crick, démontrèrent que les brins formant la double hélice pouvaient être séparés en augmentant la température ou en utilisant un milieu basique alors que le phénomène inverse, à savoir, l'appariement de deux brins séparés dépendait de la composition des simples brins mis en jeu et de leur degré de complémentarité. L'idée d'exploiter ces propriétés remarquables pour analyser les liaisons entre acides nucléiques, donna naissance à de nombreuses méthodes analytiques basées sur l'hybridation de brins d'ADN. Le champ d'applications de ces techniques s'étend à un grand nombre de problèmes biologiques notamment : le séquençage du génome humain, l'étude de l'expression d'un gène ou la recherche des mutations ponctuelles responsables de certaines maladies.

Plusieurs méthodes analytiques exploitant l'hybridation moléculaire de l'ADN ont été développées. Les premières consistaient à étudier les hybridations entre ADN et ARN messagers afin d'analyser la diversité des séquences, de déterminer la concentration des ARN ou les taux d'expression d'un gène. En 1969, M.L. Pardue et J.Gall, parviennent à fixer des chromosomes sur une lame de microscope et à étudier leur hybridation avec des ARN messagers marqués par un élément radioactif. Cette réaction leur permet de localiser, par radiographie, la position de séquences spécifiques sur les chromosomes. Leur technique est à la base de la méthode FISH (Hybridation Fluorescente *In Situ*) développée dans le but de repérer, lors de la division cellulaire, des séquences spécifiques sur des chromosomes

étendus sur une surface. Une dizaine d'année plus tard, en 1972, Herbert Boyer et Stanley Cohen introduisent, pour la première fois, des ADN dans des bactéries par l'intermédiaire de plasmides produisant ainsi les ADN recombinants. Au début des années 1970, les méthodes exploitant les ADN recombinants furent utilisées mais leur grand potentiel ne fut exploité qu'à partir de 1975 quand Grunstein et Hogness fournirent les moyens de détecter des séquences spécifiques dans les clones recombinés en appliquant l'hybridation moléculaire directement sur les colonies de bactéries lysées et fixées sur une membrane.

Le besoin de mener des analyses à grande échelle se développa en parallèle. La technique de clonage des bactéries permit d'obtenir des bibliothèques de clones. Et, au début des années 80 se développa la technique de fixation des ADN à forte densité sur des membranes de nylon ou de nitrocellulose selon des motifs bien définis. Ces techniques, les 'dots blots', sont les précurseurs des puces ADN. Elles permirent l'analyse de plusieurs hybridations en parallèle. Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer un 'dot blot' dont les plus connues sont : Southern, Northern et Western blots. Le principe de ces trois tests est le même mais leur application est différente.

Pour les besoins du Projet du Génome Humain (HGP), créé en 1990 par le département de l'énergie américain et l'Institut National de la Santé aux USA, dans le but du décryptage du génome, il a été nécessaire d'augmenter la capacité des dots blots, de délimiter le contour des plots et de contrôler leur taille et leur forme. Les membranes poreuses ne remplissaient pas ce cahier de charge et le passage d'un substrat flexible et poreux à un substrat rigide et imperméable s'est donc imposé. En effet, les surfaces rigides possèdent de nombreux avantages rendent la réalisation des puces rapide et automatisable.

Les puces ADN font partie de ces nouvelles technologies basées sur la sélectivité de l'interaction entre deux acides nucléiques et dont le développement a été suscité par le séquençage du génome humain. Ce sont des systèmes miniaturisés capables d'analyser en parallèle un grand nombre d'informations génétiques différentes. Grâce à cette technique, il est devenu possible d'identifier et même de doser, en parallèle, un nombre considérable

de séquences d'ADN contenues dans un échantillon biologique (sang, biopsie, aliments...).

Pratiquement une puce ADN est constituée d'une surface rigide d'environ 1cm<sup>2</sup> sur laquelle nous pouvons greffer jusqu'à 400 000 brins d'ADN. Cette nouvelle étape de la révolution génomique s'appuie sur une ancienne découverte de la Biologie Moléculaire : la complémentarité des deux longs filaments en double hélice de l'ADN. Ceux-ci sont composés de quatre "bases" (oligonucléotides) fonctionnant par paires : les bases d'Adénine (A) d'un brin de l'ADN s'apparient avec les bases de Thymine (T) de l'autre brin, les bases de Guanine (G) avec les bases de Cytosine (C) et vice versa. Dans sa collection de produits déjà commercialisés, La société Affymetrix propose aussi une puce G110 pour étudier les séquences génétiques les plus couramment impliquées dans divers cancers humains. Ou encore une puce qui permet de détecter les mutations du gène P53 (un suppresseur de tumeurs) actives dans de nombreux cancers. Après son apparition, la puce ADN est en train de bouleverser les méthodes de travail de tous les acteurs du secteur de la santé.

Avant la fin de la décennie en cours, ce bijou de technologie pas plus grand qu'une boîte d'allumettes, qui combine les avancées des technologies de l'information et les acquis des sciences de la vie, permettra de diagnostiquer en un temps record, de quelques heures à quelques instants, la prédisposition ou le développement de maladies génétiques chez des patients. Il deviendra alors possible de prévoir l'évolution de leurs "fondamentaux héréditaires" (tendances à l'obésité, calvitie, etc.) mais aussi de détecter la présence de virus dans l'eau, dans l'air, dans les aliments ou bien l'intrusion des fameux Organismes génétiquement modifiés (OGM) dans les produits issus de l'industrie Agroalimentaire. Le matériel de fabrication de cet outil qui est en train de révolutionner la médecine et la santé ressemble à celui des classiques semi-conducteurs de l'informatique, mais en lieu et place des circuits, les puces sont "gravées" avec des morceaux d'ADN, le support du programme génétique humain. Réservées pour l'instant aux chercheurs des grands laboratoires pharmaceutiques qui travaillent sur la détection des gènes et la préparation de nouveaux médicaments, les puces ADN ont un usage banal dans les hôpitaux et cabinets de médecins.

Ces puces permettent de repérer en une seule fois non pas quelques gènes, mais des milliers (actuellement près de 12.000 sur les puces les plus performantes).

*Chapitre I :*

# **Les puces ADN**

## I. Définition

Une puce ADN, ou Microarray, est un outil d'analyse des acides nucléiques composé d'un support solide sur lequel des fragments d'ADN, des sondes, ont été déposés à des positions spécifiques (31). Le principe d'hybridation de l'ADN selon le modèle de Watson - crick est à la base de la technologie des biopuces. Ainsi, selon sa séquence, chaque fragment d'ADN correspond à une question qui pourrait être décrite ainsi : « le complémentaire de cette sonde de capture est-il présent dans l'échantillon analysé ? ». Dans des conditions appropriées, une puce incubée avec de l'ADN cible marqué permet de répondre aux questions posées. L'appariement des cibles aux sondes de capture entraînera l'apparition d'un signal localisé à la position de la sonde. Ainsi, la présence ou l'absence de signal sur une sonde indique si son complémentaire est présent ou non dans l'échantillon. Après un événement d'hybridation entre les sondes de capture et un échantillon d'acides nucléiques marqués, une étape de détection est effectuée afin d'associer chaque sonde à un signal qui sera proportionnel à la quantité des cibles complémentaires hybridées à la sonde de capture (6, 23).

## II. Propriétés d'une puce ADN

### II. 1. Les supports

Deux éléments composent la puce ADN : un support solide réactif et des sondes immobilisées sur ce support, les supports sur les quels sont fixées les sondes se présentent sous la forme de surfaces planes ou poreuses (percées de puits). La nature et la qualité de la surface utilisée pour immobiliser les sondes aura une influence sur la qualité et la reproductibilité des Résultats obtenus. Plusieurs critères définissent la qualité de la surface utilisée comme support solide d'hybridation (31). Elle doit être plate, uniforme, durable, inerte, efficace et accessible à l'hybridation. Le support peut être solide (verre, plastic, silicium, ... etc.) ou semi solide (gel). Le verre constitue un support inerte Idéal. L'efficacité d'attachement des sondes au support solide dépendra du revêtement et de la chimie d'attachement.

## II. 2. La chimie des surfaces

Pour la préparation de biopuces destinées à l'étude de l'expression génique, des surfaces de verre couvertes de poly-l-lysines peuvent être utilisées pour lier des sondes de plus de 70 nucléotides (6). Les Molécules de poly-lysine, chargées positivement s'adsorbent à la surface de verre, chargée négativement. L'ADN, quand à lui, réagit par électrostatisme avec la poly-l-lysine et il se couche sur le support. Lorsque les sondes des oligonucléotides, il est préférable d'établir un lien covalent entre la surface et une extrémité de la sonde.

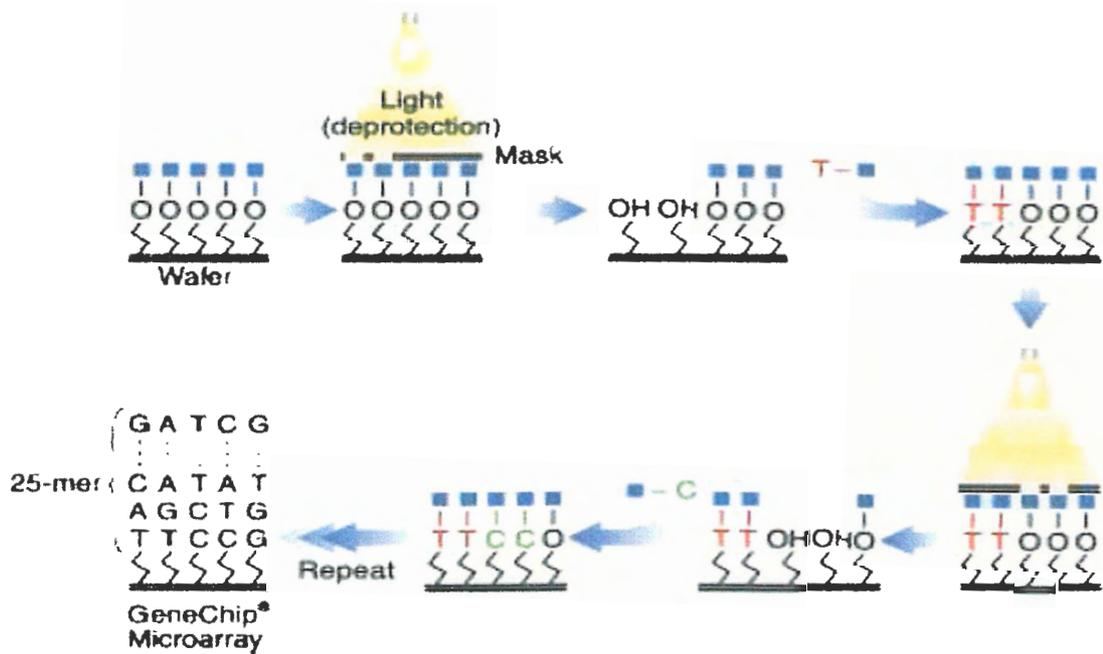
## II. 3. Traitement chimique de la surface

Pour fixer les sondes, les idées ne manquent pas. Ainsi plusieurs techniques ont été développées. Nous pouvons les classer sous trois rubriques : la synthèse *in situ*, les liaisons directes et les liaisons indirectes.

### II. 3. 1. Synthèse *in situ*

La synthèse *in situ*, développée essentiellement par la société Affymétrie dans le cadre des puces ADN lues par fluorescence, est effectuée sur une surface silanisée et nécessite plusieurs étapes. La surface est d'abord traitée avec une molécule bi-fonctionnelle présentant une extrémité OH protégée par un groupement photosensible.

Ensuite elle est recouverte d'un masque et exposée au rayonnement ultraviolet. L'extrémité photosensible est alors détruite localement. La première base de la séquence choisie possédant, à son tour, une extrémité photosensible, est alors couplée à la zone déprotégée. L'opération est répétée jusqu'à ce que les séquences d'ADN soient complètes (Figure 1).



*Figure 1. Principe de la synthèse in situ des sondes*

### II. 3. 2. Liaison directe

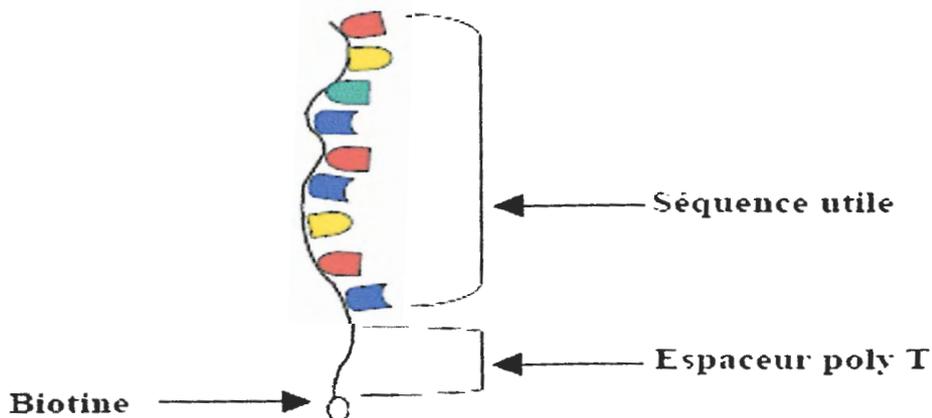
Cette technique consiste à fixer directement, de façon stable et orientée, les molécules biologiques sur un support solide. La forte affinité entre le support et le groupement SH a fait que les chimies de surface développées se sont basées sur des molécules possédant une extrémité thiol. En effet, la fonction thiol a été greffée sur les sondes, puis ces dernières ont été mises en contact avec la surface pour former des monocouches uniformes. Après cette étape, le substrat est exposé à des thiols aliphatiques, afin d'éliminer les interactions non spécifiques, d'éviter les problèmes d'encombrement stérique, d'orienter les molécules et d'optimiser ainsi le rendement des réactions biologiques.

### II. 3. 3. Liaison indirecte

La structure de la surface devient de plus en plus élaborée. Elle est formée de multicouches mettant à profit la grande affinité entre des entités chimiques telles que l'Avidine et la biotine, les maleimides et le thiol, l'ester de NHS et les amines, les thiocyanates et les amines ou même les liaisons électrostatiques.

### II. 3. 3. 1. Système Avidine - Biotine

Le complexe Avidine Biotine est très connu pour la grande affinité existant entre ces deux espèces. Il peut donc assurer une liaison stable entre une surface solide et des biomolécules. Les sondes biotinylées ont ainsi été greffées sur l'Avidine ou sur ses molécules dérivées (la Streptavidine, l'ExtrAvidine...). Ces protéines sont fixées sur la surface par l'intermédiaire de différentes configurations. Elles ont été adsorbées de façon passive sur la surface ou même fixée de façon covalente sur un substrat recouvert d'une molécule assurant d'un côté la liaison avec la surface et de l'autre présentant une biotine capable de fixer la Streptavidine. Les sondes utilisées sont composées de trois parties : la biotine, le bras espaceur qui sépare la séquence utile de la surface et la séquence utile qui s'hybride aux cibles (Figure 2).



*Figure 2. Les trois parties des sondes.*

## III. Les avantages

### *III.1. Une technologie plus précise*

La puce ADN permettra d'identifier de manière précise tout microorganisme recherché dans un échantillon en le reconnaissant à travers son empreinte génétique. Il deviendra plus facile de prendre des mesures adaptées en matière de traitement de l'échantillon de surcroît, la puce ADN devrait permettre de détecter des concentrations plus faibles que celle détectées par les techniques actuelles.

### III.2. Une technologie plus rapide

Avec la puce ADN, les résultats des analyses seront en moins 4 heures. Cette rapidité présente des avantages. Spécialement plus un incident est détecté rapidement, plus vite les traitements adéquats sont mis en œuvre.

### III.3. Une technologie moins coûteuse

Aujourd'hui, l'identification de chaque microorganisme recherché nécessite une analyse spécifique. Une seule puce peut identifier, en une seule fois, plusieurs dizaines de microorganismes. Actuellement avec les techniques classiques une analyse microbiologique complète coûte. Une fois sur le marché, l'analyse par puce ADN pourrait coûter 10 fois moins cher.

## IV. Principaux types de puce ADN

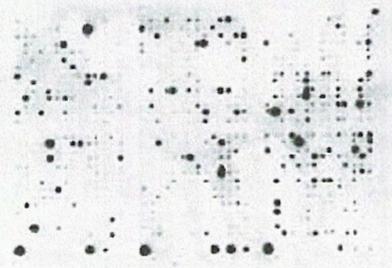
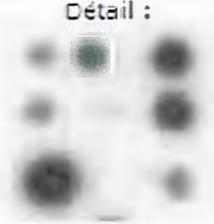
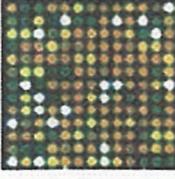
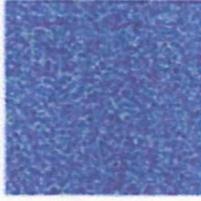
Filtres haute densité (macroarrays)	Lames de verre (microarrays)	Puces à oligonucléotides
		
<p>Détail :</p> 	<p>Détail :</p> 	<p>Détail :</p> 
<p><b>Taille : 12cm x8cm</b>  - 2400 clones par membrane  - marquage radioactif  - 1 condition expérimentale par membrane.</p>	<p><b>taille : 54cm x 0,9cm</b>  -10000clones par lame  -marquage fluorexente  - deux conditions expérimentale par lame.</p>	<p><b>taille : 1,28cmx1,28cm</b>  -300000oligonucléotides  - marquage fluorescente  -1 condition expérimentale par lame.</p>

Figure 3. Principaux types de puce ADN.

On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes de l'hybridation. Les caractéristiques des puces les plus courantes sont résumées dans la figure 3. Les deux technologie dominantes sont les puces dites « spottées » par un dépôt robotisé de produit de PCR ou de long fragments oligonucléiques (« spotted micro array ») et les puces à oligonucléotides synthétisé *in situ*.

#### ***IV.1.Puce de type spottées***

La méthode de fabrication des puces « spottées » a été développée par l'équipe de P. Brown à l'université de Stanford, aux Etats-Unis (09). Des solutions d'ADN sont préparées soit par amplification PCR à partir du génome ou du banques d'ADN complémentaire soit par synthèse d'oligonucléotides longs (30-70mers). Des microgouttelettes de ces solutions sont ensuite déposées par un robot, selon une matrice d'emplacements définis, sur une lame de verre traitée par un revêtement chimique qui permet de fixer l'ADN. En général, chaque spot de la matrice correspond à un gène donné. Les robots nécessaires à la fabrication de ces puces étaient construits à l'origine de manière artisanale dans chaque laboratoire. L'utilisation des puces « spottées » permet d'acquérir une mesure relative du niveau d'expression des gènes dans un échantillon cellulaire par rapport à un témoin du référence par exemple une souche mutée comparée à une souche sauvage, ou des cellules cultivées dans deux conditions différentes.

#### ***IV.2.Puce à oligonucléotides***

Les puces à oligonucléotides synthétisé *in situ* par photolithographie (21) (« Gène chips » de la société Affymétrie) ou par impression « jet d'encre » (17). (Agilent technologies / Rosetta Impharmaceutics) ne peuvent être produites que par les sociétés industrielles spécialisées. L'utilisation des puces à oligonucléotides de type Affymétrie permet de quantifier en théorie l'abondance absolue de chaque ARNm transcrit. Les ARNm de l'échantillon à analyser sont amplifiés, fragmentés et marqué par un système de couplage biotine -Streptavidine pour l'hybridation sur la puce. Chaque gène est représenté par une quinzaine de sondes constituées d'oligonucléotides courts de 20-25 bases couvrant différentes portions spécifiques du gène. Une estimation directe du niveau

d'expression de chaque gène est obtenue en calculant le signal moyen sur l'ensemble des sondes représentant le gène.

## V. Principaux fabricants de puces ADN

LES ACTEURS				
	<b>SYNTENI</b>	<b>AFFYMETRIX</b>		<b>PROTOGENE</b>
Méthode de fabrication	Dépôt de sondes PCR par robot à pointes	Synthèse <i>in situ</i> par photolithographie		Synthèse <i>in situ</i> par micro fluïdique
Nature des sondes	Sonde PCR : spécifique d'un gène	Sonde " oligonucléotide "		Sonde " oligonucléotide "
Densité	10 000 sondes/cm <sup>2</sup>	100 000 sondes/cm <sup>2</sup>		100-400 sondes/cm <sup>2</sup>
Applications	Recherche Pharmacie	Recherche	Séquençage Diagnostic	
	40 000 gènes analysés par puce	1700-7000 gènes analysés par puce	1 gène analysé par puce (BRCA1, P53, HIV)	

*Tableau 1. Principaux fabricants des puces ADN.*

Les Etats-Unis comme dans bien d'autres domaines Biotechnologiques sont en pointe concernant les puces ADN. La société Affymétrie reste un acteur incontournable, elle a mis au point la première puce ADN et bénéficie d'une expérience technologique certaine ; Elle a protégé ses différentes techniques -notamment de dépôt de sondes sur la puce et de séquençage par hybridation -par d'innombrables brevets. Ses concurrents devront donc inévitablement la combattre s'allier avec elle (c'est la stratégie de biomérieux) ou tenter de la contourner en utilisant des techniques différentes (c'est la solution adopté par protogène). Le fait que Galaxo-Welcome détienne 34 % du capital d'Affymétrie lui confère une réelle solidité économique. Elle commercialise aussi les scanners de lecture automatique des puces ADN à ceux qui achètent ses puces ADN et constituent en quelque sorte une clientèle captive.

Les puces ADN sont aussi produites d'autres sociétés américaines, de moindre importance mais parfois associées à de grands groupes de pharmacie ou d'instruments scientifiques : Syntheni (rachetée par Incyte pharmaceuticales à la fin de 1997) Hyseq (associée à Perkin Elmer) Molecular Dynamics, Nanogen. En Europe ; Quelques équipes développent le procédé des puces ADN. L'institut Engel Hardt de Moscou ; travaille avec les groupes américains Motorola et Packard Instrument, ainsi qu'avec le laboratoire national d'Argonne (Illinois). D'autre part, le centre allemand de cancérologie de Heidelberg collabore avec l'université danoise de Copenhague. Par ailleurs, en Angleterre ; la société Oxford Gene Technology a développé une technique particulière de fixation des fragments d'ADN sur les puces. Enfin, en France, la société CIS-Bio-International (Saclay) étudie une technologie spécifique en collaboration avec le LETI (laboratoire d'électronique, de technologie et de l'instrumentation) et le DRFMC (département de recherche fondamentale de la matière condensée) du CEA (commissariat à l'énergie atomique) à Grenoble.

*Chapitre II :*

# **Fondements des puces ADN**

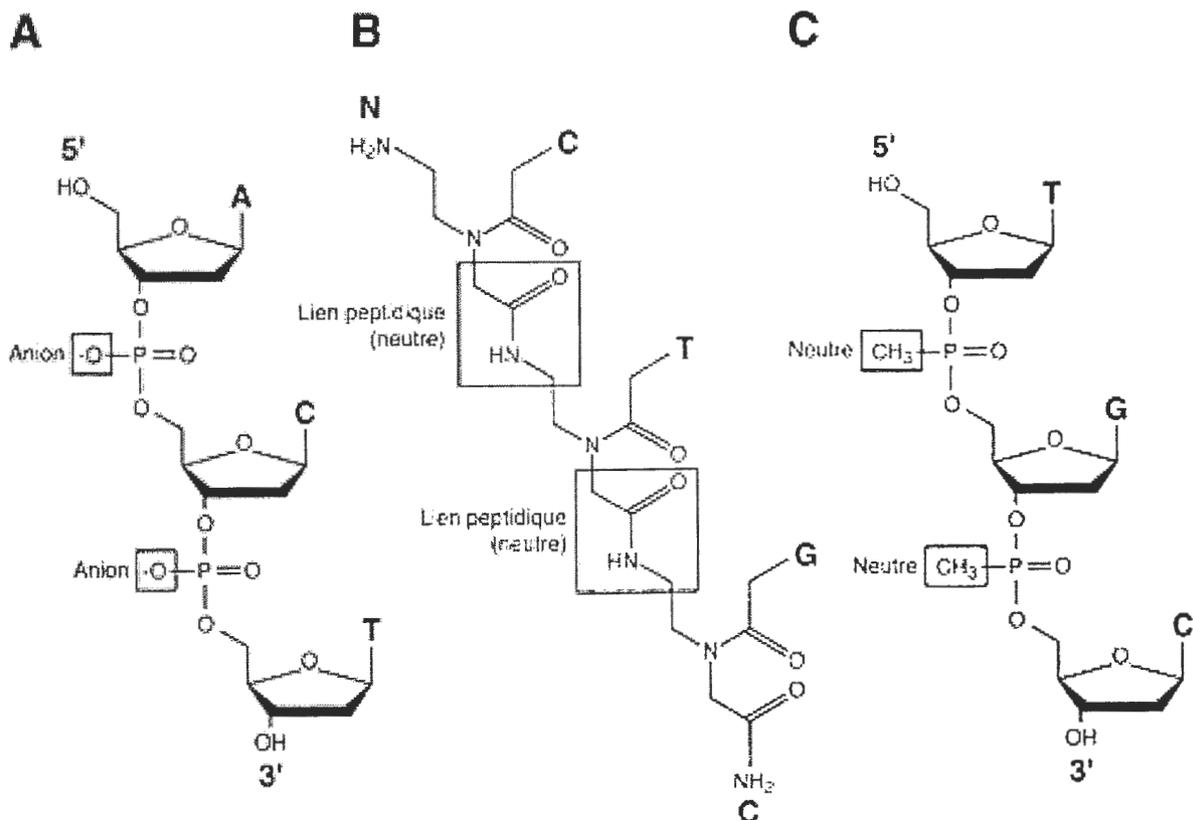
Les acides nucléiques fixés sur la puce ADN sont appelés sondes. Les sondes peuvent être de l'ADN génomique (l'ensemble des gènes) ou des gènes exprimés. Les puces ADN sont des lames de verre activé sur lesquelles sont déposés quelques milliers de « spot ». Un spot correspond à de nombreuses sondes, c'est-à-dire à de nombreuses copies d'une séquence d'ADN spécifique d'un gène donné. Avant l'hybridation, les sondes sont dénaturées : elles sont sous forme simple brin et peuvent ainsi s'hybrider avec le brin complémentaire d'une cible.

## I. Les sondes

Les sondes nucléotidiques sont des segments d'acides nucléiques que l'on utilise pour repérer d'une manière spécifique dans une réaction dite : « d'hybridation moléculaire », le fragment d'acide nucléique auquel on s'intéresse de même que dans le « langage acides aminés », un anticorps reconnaît un antigène de même ici dans le « langage nucléotides ». Une sonde nucléique reconnaît un fragment d'acide nucléique. C'est un segment d'acide nucléique (ADN ou ARN) n'ayant obligatoirement qu'un brin. Elle peut être plus ou moins longue selon les cas, elle peut ne posséder qu'une vingtaine de nucléotides (sondes oligonucléotidiques) ou plusieurs centaines de nucléotides. Elle est complémentaire et antiparallèle du segment d'acide nucléique à reconnaître, Cette reconnaissance pouvant se faire entre ADN - ADN ou ADN- ARN ou ARN- ARN. Il faut que les acides nucléiques à reconnaître soient sous forme d'un brin. La sonde peut couvrir tout ou partie du segment d'acide nucléique à reconnaître. Elle doit être repérable, Des sondes radioactives sont le plus souvent utilisées (12). Selon la séquence des sondes composant la puce ADN, différents gènes et allèles seront ciblés. Un choix adéquat de la séquence des sondes permettra à la puce ADN d'être spécifique et ubiquitaire.

Cependant, il n'y a toujours pas de méthode infaillible permettant. La conception sans erreur de sondes de qualité. Plusieurs auteurs observent des sondes faussement négatives qu'ils sont incapables d'expliquer (44). En plus d'être définies par leurs séquences, les sondes peuvent être de nature chimique différente. Le type de sonde le

Plus utilisé consiste en un acide désoxyribonucléique permettant l'hybridation d'une séquence complémentaire (6, 23). Des analogues d'acide nucléique comme l'Acide peptido-nucléique (APN) et le Méthylphosphonate (MPP) peuvent aussi être utilisés (Figure 4). Comme leurs propriétés différentes de celles de l'ADN, ils sont mieux adaptés à certaines utilisations par exemple les études de spécificité (33). Au cours des dernières années, des protéines, anticorps, toxines, sucres et autres molécules de natures diverses ont été utilisées comme sondes sur des puces ADN (46, 34).

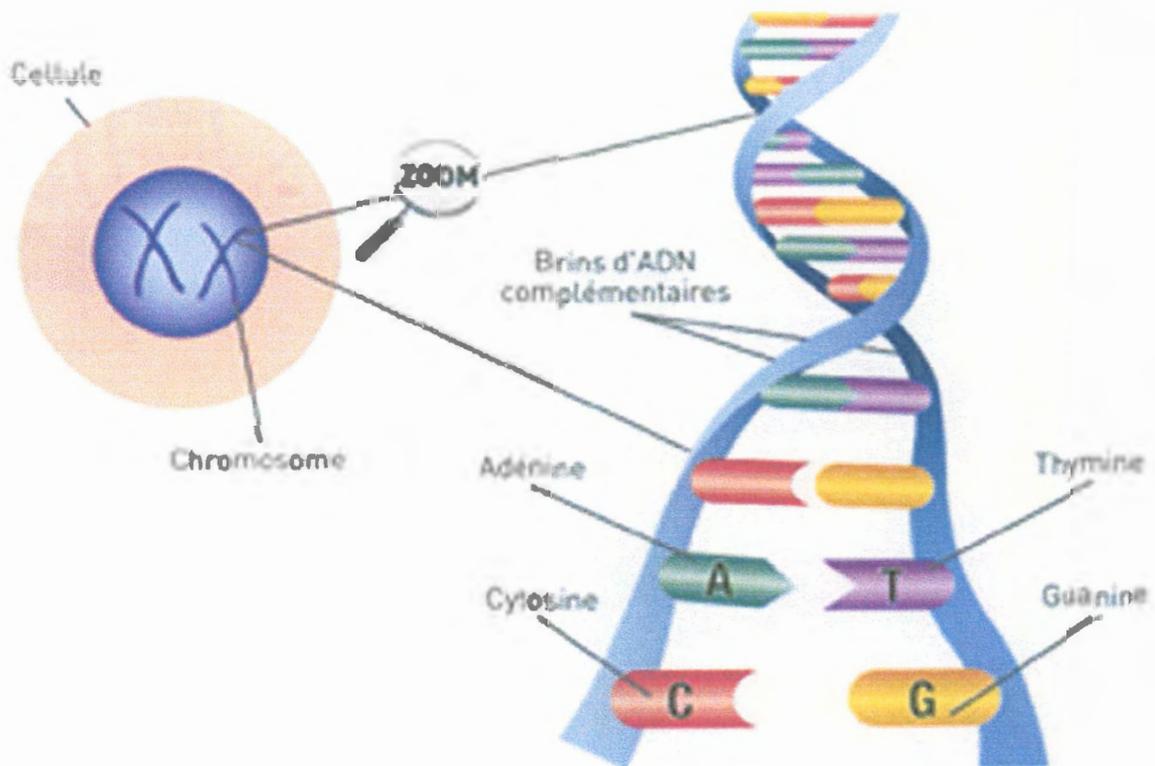


**Figure 4. Représentation schématique de la structure moléculaire d'analogues neutre d'acide nucléique.** (A) : Acide désoxyribonucléique (ADN), (B) : Acide peptido-nucléique (APN) et (C) : Méthylphosphonate (MPP).

## I. 1. Structure et propriétés des acides désoxyribonucléiques

### I. 1. 1. La complémentarité

Dans une cellule, la double hélice d'ADN est composée de deux brins complémentaires et antiparallèles liés entre eux par des ponts hydrogènes. Chaque brin est un long polymère linéaire dans lequel se succèdent quatre nucléotides qui ont le même squelette ribose-phosphate, mais dont la base diffère. Les purines Adénine et Guanine lient respectivement les pyrimidines thymine et cytosine (40). En plus d'être essentiel à sa réplication, la complémentarité de l'ADN constitue le principe fondamental derrière la technologie des puces ADN. En utilisant une séquence d'ADN synthétique, il est possible d'interroger un échantillon sur la présence d'une séquence complémentaire à celle d'une sonde de séquence connue (2, 6, 23).



*Figure 5. La complémentarité de la double hélice.*

### **I. 1. 2. Les liaisons hydrogène**

L'adénine et la Thymine sont liées par deux liens hydrogène alors que la Guanine et la Cytosine le sont par trois liens dans cas de l'ADN simple brin, les ponts hydrogènes entre les bases sont remplacés par des ponts hydrogènes avec des molécules d'eau. Même si des appariements non complémentaires peuvent aussi former des ponts hydrogènes entre les bases, ces interactions sont moins stables (32). Dans un contexte d'hybridation, il est possible qu'un appariement ne suivant pas les règles de Watson et Crick augment la stabilité d'un duplexe partiellement complémentaire (25, 26). Dans le cas d'un duplex complémentaire G-C/C-G, la température de fusion était 70°C. Dans le cas de paires non complémentaires G-A/A-G ou G -G/A-A, les températures de fusion était respectivement de 58°C et 40°C.

### **I. 1. 3. Les autre forces impliquées**

Ce n'est pas sans raison que l'ADN double brin forme une double hélice régulière. Même si les ponts hydrogènes ont une importance primordiale dans la complémentarité de l'ADN, c'est l'empilement des bases qui joue le premier rôle dans la stabilisation de la double hélice. Les bases ayant une structure planaire, elle s'empilent parallèlement les une sur les autres, leur hydrophobicité stabilisant l'hélice. Même si chaque nucléotide peut subir une torsion en six points différents, cette torsion est restreinte ce qui augmente la stabilité de la double hélice. La présence des anneaux ribose et des interactions non-covalentes entre les groupements phosphates raidit la double hélice, restreignant ses possibilités de rotation, aussi les base causent de l'encombrement stérique pour ce qui est du squelette de l'ADN, les interactions électrostatistiques répulsives entre les groupements phosphates (chargé négativement) stabilisent la structure du duplex.

## **I. 2. Paramètre influençant la conception des sondes**

### **I. 2. 1. Paramètres thermodynamiques**

La première étape de la préparation d'une puce ADN est la conception des sondes. Le choix de la séquence des sondes est préalable à la spécificité, à l'ubiquité et même à la sensibilité de la puce ADN. La première étape de la conception d'une sonde est la comparaison de séquence des gènes afin de sélectionner une sonde ciblant les gènes et

allèles appropriés. Suite au choix de la séquence, une recherche dans les banques de données permet de vérifier la spécificité et l'ubiquité théoriques de la sonde sélectionnée (31, 30).

Les paramètres thermodynamique sont aussi étudiés, en particulier l'uniformité de  $T_m$  des sondes utilisées simultanément et la formation de structures secondaire intramoléculaire. Les propriétés thermodynamiques d'une sonde influencent la sensibilité, la spécificité, l'ubiquité et la rapidité de l'hybridation. Trois paramètres thermodynamique peuvent être calculés : l'énergie d'hybridation spécifique, l'énergie de liaison intramoléculaire et l'énergie de liaison avec les séquences non complémentaires présentes dans l'échantillon (22, 19). Ces trois calculs permettront d'éviter des problèmes de sensibilité et d'ubiquité, un autre paramètre pouvant être examiné lors de l'évaluation d'une sonde est la formation de structures secondaires par la cible (8, 24). Si la cible est un ARNm ou ADN simple Brin l'évaluation des structures secondaires de la cible est recommandée (22). La longueur de la sonde est aussi un facteur à considérer, une sonde longue permettra une meilleure sensibilité qu'une sonde courte, mais sa spécificité sera réduite (44, 29). Religio et coll. Ont montré qu'une sonde courte de 30 ou 35 nucléotides était de 2 à 2,5 fois plus sensible qu'une sonde de 25 nucléotides. Cependant une sonde de 25 nucléotides est environ 1,6 fois plus spécifique qu'une sonde de 30 nucléotides et 2,4 fois plus spécifiques qu'une sonde de 35 nucléotides (29).

### **I. 2. 2. Paramètres stérique**

Les paramètres stérique influençant l'hybridation ne concernent pas la séquence de la sonde, mais les autres contraintes physique devant être considérées afin d'améliorer l'hybridation. L'encombrement stérique dépend de trois facteurs : la densité des sondes, la distance entre la sonde et la surface ainsi que les propriétés de cette surface, c'est – à – dire son hydrophobicité et sa charge (38, 35, 39). Selon la longueur de la sonde, ces paramètres auront plus ou moins d'importance. Dans le cas de sondes courtes, l'encombrement stérique aura impact plus important que dans le cas de sondes longues ; c'est pour cette raison que l'ajout d'espaceur entre la sonde et la surface est essentiel (15). Ajoute à la sonde lors de sa synthèse, l'espaceur améliore la liberté de mouvement

de la sonde, ce qui réduit l'encombrement stérique. Un espaceur plus long facilitera l'hybridation tandis que, si l'espaceur est trop court, la sonde sera inaccessible à l'hybridation. La densité de sonde dans chaque dépôt a aussi une importance et plus la couche de sondes sera dense, plus l'ajout d'espaceur sera essentiel à l'hybridation. En général, une densité de sonde trop faible ou trop élevée permettra peu d'hybridation tandis qu'une densité optimale permettra un meilleur signal (35, 25, 11).

### I. 3. Obtention d'une sonde

Toute la difficulté consiste bien évidemment à obtenir une sonde spécifique d'ADN à étudier. Plusieurs possibilités existent peuvent être utilisées comme sondes les molécules suivantes :

**I. 3.1. ADNc :** L'ADNc constitue une excellente sonde. En pratique on utilise le plus souvent un fragment de restriction cloné couvrant la plus grande partie possible du ADNc. Encore faut-il avoir pu construire le ADNc correspondant, ce qui n'est pas toujours le cas surtout lorsque, l'on débute l'étude d'un gène.

**I.3.2. ARNm :** L'ARNm peut également servir de sonde, mais cette fois encore on ne dispose pas toujours du ARNm spécifique.

**I.3.3. Oligonucléotides de synthèse :** Si la séquence du l'ADN n'est pas connue, il faut purifier une petite quantité de la protéine correspondant au ADN étudié déterminer la séquence des a.a d'un court segment de cette protéine en déduire d'après le code génétique. La séquence du segment de l'ADN correspondant, et synthétiser alors de courtes sondes d'ADN on peut imaginer les difficultés rencontrées lorsque le segment protéique séquencé contient des a.a tels que leu, ser, ou Arg codé chacun par 6 codons différents ! Il faut alors synthétiser tout un ensemble de cas courtes sondes de ADN afin de couvrir toutes les possibilités (12).



## II. Les cibles

Les acides nucléiques qui sont hybridés avec ces sondes sont appelés cibles ("targets"). Pour une expérience donnée, une condition expérimentale (stress, pathologie, état de différenciation cellulaire, ...) est comparée à une condition de référence. Les ARN messagers (les cibles) sont extraits des 2 types de cellules que l'on veut comparer. Les ARN messagers sont rétro-transcrits en ADNc par une transcriptase inverse (figure 6). C'est une DNA polymérase qui synthétise un brin d'ADN complémentaire (ADNc) en utilisant un ARN comme matrice. Un hybride [premier brin d'ADNc - ARN] est ainsi formé dans un premier temps. Après synthèse du premier brin d'ADNc, l'ARN matrice est hydrolysé par la RNAase H. Le second brin d'ADNc est ensuite synthétisé. Au cours de cette rétro-transcription, les ADNc d'un type de cellule sont marqués par une molécule fluorescente. Les ADNc de l'autre type de cellule sont marqués par une autre molécule fluorescente. Le marquage des cibles consiste en l'incorporation de nucléotides portant : soit le fluorophore cyanine 3 (Cy3™) sous forme de Cy3-dUTP soit le fluorophore cyanine 5 (Cy5™) sous forme de Cy5-dUTP. Ces 2 molécules sont les plus classiquement utilisées.

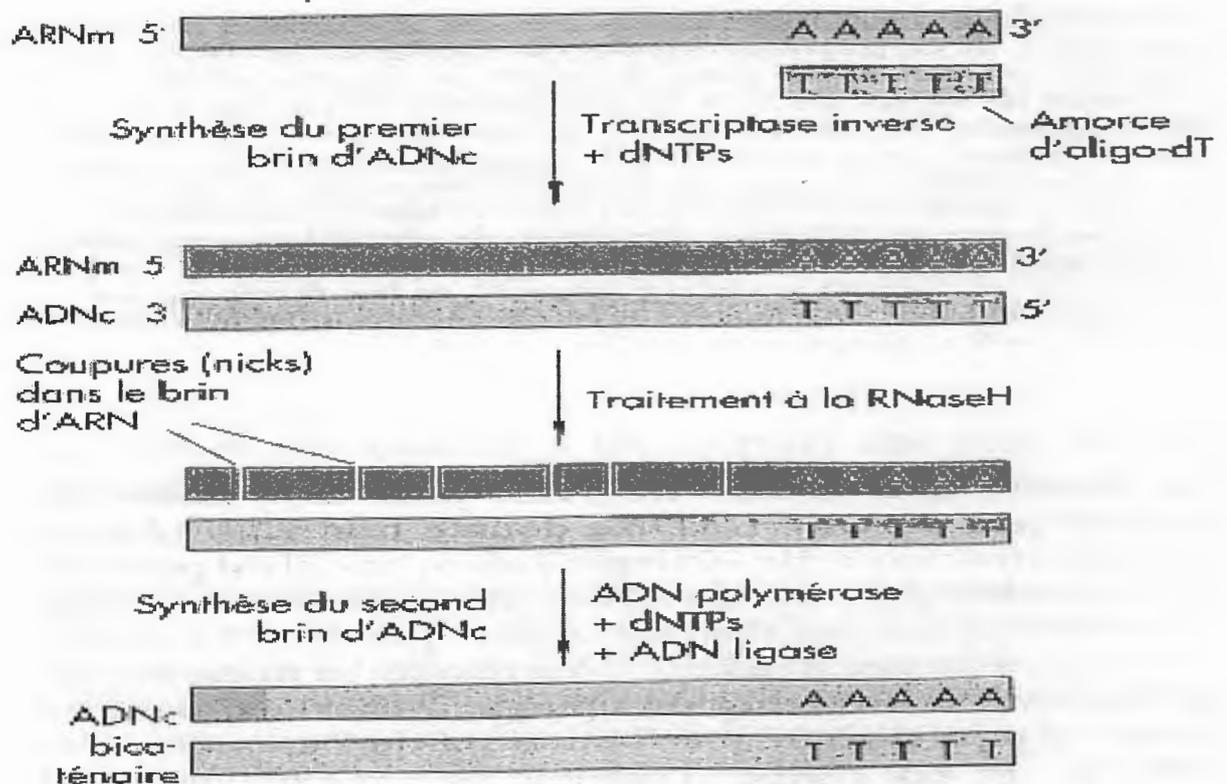
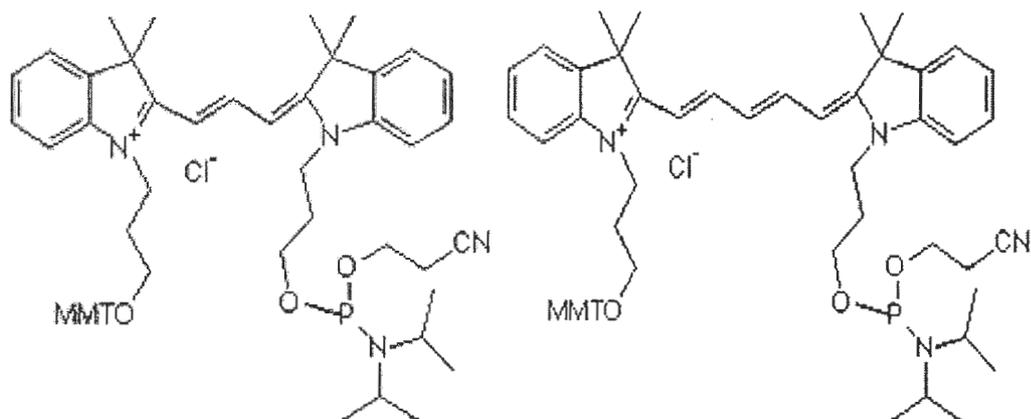


Figure 6. Les étapes de la transcription inverse.



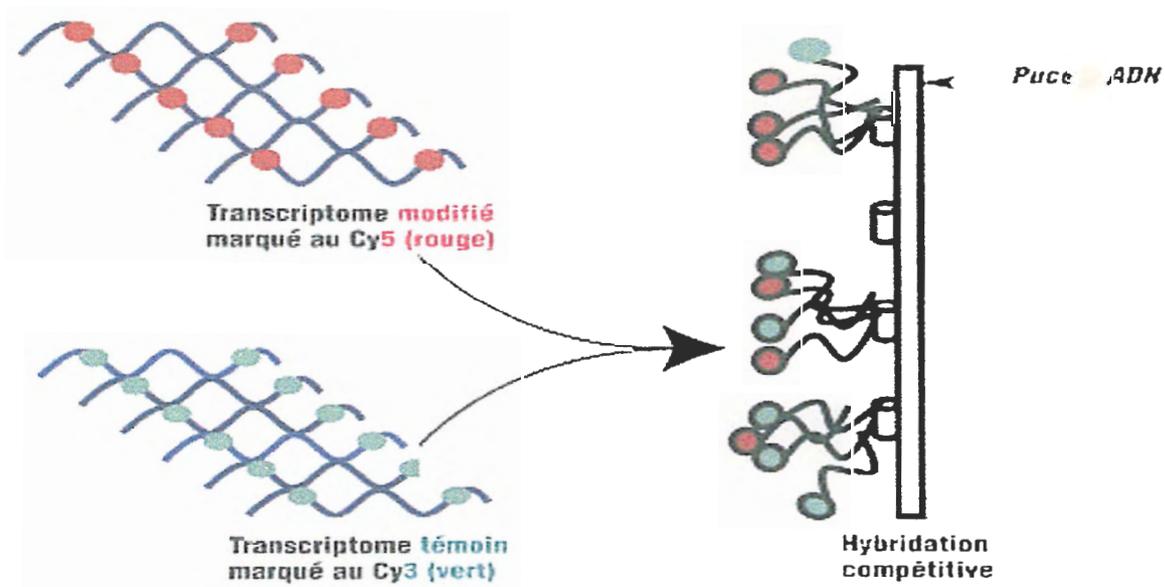
MMT: groupe 4-monomethoxytrityle

Figure 7. Les formules de fluophore cyanine 3 et cyanine 5.

<i>cyanine</i>	<i>nom</i>	<i>longueur d'onde émission fluorescence</i>	<i>couleur</i>
<b>Cy3™</b>	indodicarbocyanine 3-1-O-(2-cyanoethyl)- (N, N-diisopropyl)-phosphoramidite	563 - 570 nm	vert
<b>Cy5™</b>	indodicarbocyanine 5-1-O-(2-cyanoethyl)- (N, N-diisopropyl)-phosphoramidite	662 - 670 nm	rouge

Tableau 2. Les propriétés de CY3 et CY5.

Il existe 2 méthodes de marquage des cibles par fluorescence, soit directe : synthèse d'ADNc marqués par transcription reverse, soit indirecte par synthèse d'ADNc avec incorporation de nucléotides portant un groupement amino-allyl, suivie par la fixation sur les groupements allyl de groupements ester liés au fluorochrome. Les deux familles de cibles sont mélangées et déposées sur la lame. S'il brin d'ADN sonde complémentaire d'un brin d'ADNc cible, ils existe un brin d'ADN sonde complémentaire d'un brin d'ADNc cible, ils s'hybrident pour former de l'ADN double brin fluorescent.



*Figure 8. Le marquage des cibles.*

### III. Amplification par PCR

La technique d'amplification par PCR « Polymerase Chain reaction » consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN encadré par deux séquences connues. Cette technique récente a été rendue possible par deux progrès importants d'un part la possibilité de synthétiser à volonté des « amorces oligonucléotidiques », c'est-à-dire de courts fragments d'ADN simple brin de séquence choisie et d'autre part la découverte d'une polymérase thermostable, La Taq polymérase. Les applications de la PCR sont très variées, nous en décrivons deux principales. La première est la production d'une quantité significative d'un fragment d'ADN donné dans le but de mener des analyses sur ce fragment. Une autre application de la PCR est de déterminer si la séquence recherchée est présente ou moins dans l'échantillon analysé « le résultat est alors du type + ou - » en particulier la technique de PCR peut être utilisée pour cribler un banque. L'ensemble des clones de celle-ci peut être soumis à ce test, afin de déterminer les quels d'entre eux contiennent la séquence recherchée (5).

## **IV. Hybridation**

### **IV. 1. Technique d'hybridation**

Les techniques d'hybridation permettent de détecter une séquence donnée parmi une population de séquence complémentaire de celle recherchée, à l'aide d'une sonde. La sonde est marquée par incorporation d'atomes radioactifs ou fluorescents, la détection d'une séquence homologue à la sonde est possible en vertu de l'appariement spécifique des séquences complémentaires. Dans le cas du Southern blot, l'ADN cible est un mélange de fragment obtenu par digestion enzymatique, séparés par électrophorèse et transférés sur membrane. Il est alors possible de déterminer si un fragment correspondant à la sonde utilisée est présent dans l'ADN cible, et dans l'affirmative de déterminer la taille du fragment correspondant l'hybridation permet aussi de réaliser le criblage d'une banque, dans ce cas l'ADN cible est représenté par l'ensemble des clones d'une banque répartis sur une membrane et il est alors possible d'identifier les clones contenant une séquence apparentée à celle de la sonde (5).

### **IV. 2. La dynamique d'hybridation**

Plusieurs facteurs influencent l'hybridation des cibles aux sondes. La complémentarité des séquences joue un rôle primordial, mais ce paramètre prend une partie de son importance dans certaines conditions. Comme l'hybridation est un processus dynamique, la probabilité de rencontre entre la sonde et la cible ainsi que l'effet de répulsion entre les brins complémentaires jouent un rôle important. En influençant ces deux paramètres, les conditions d'hybridation peuvent modifier la cinétique de la réaction afin d'améliorer la sensibilité, la spécificité et la rapidité de l'hybridation.

#### **IV. 2. 1. Probabilités de rencontre entre la sonde et la cible**

Comme les sondes sont attachées à des positions précises sur la surface de verre, seules les cibles sont libres de se déplacer dans la chambre d'hybridation la probabilité d'hybridation dépendra de la probabilité de collision entre les sondes et les cibles. Ainsi, elle dépendra de la concentration en sondes de chaque dépôt, et de la concentration de cibles en solution cela peut être représenté par l'équation suivante :

$[C] + [S] \longleftrightarrow [C : S]$  où  $[C]$  correspond à la concentration de cible en solution et où  $[S]$  correspond à la concentration des sondes attachées à la surface (11). Le mouvement des cibles dans les chambres d'hybridation et du principalement au mouvement Brownien, qui imprime un déplacement irrégulier et incessant des particules microscopiques dans un liquide. Il est causé par l'agitation thermique des molécules du fluide qui se butent aux particules en solution. Ce mouvement entraîne l'ADN cible et l'amène à se déplacer de façon désordonnée dans la solution. Ce mouvement suffit à assurer des collisions efficaces entraînent une hybridation mais pour que l'hybridation soit sensible plusieurs heures sont nécessaires. La température d'hybridation aura une influence sur le déplacement de l'ADN dans la solution, car elle entraîne une augmentation du mouvement Brownien. L'agitation mécanique des fluides permet d'augmenter le mouvement de l'ADN. Ce qui d'augmente la sensibilité et la rapidité de l'hybridation par exemple Mc Quain et coll, Ont comparé une hybridation passive avec une hybridation pendant laquelle les fluides étaient agités mécaniquement. Ils ont observer q'une hybridation dynamique d'une heure était deux fois plus sensible qu'une hybridation passive de 24 heures.

#### IV. 2. 2. L'effet de la charge d'ADN

Comme les groupements phosphates de l'ADN lui confèrent une charge négative, la relation électrostatistique entre la sonde et la cible a une influence sur l'hybridation. Ainsi, l'électronégativité de l'ADN entraîne une répulsion entre la sonde et la cible. L'hybridation est rendue possible par la présence en solution d'ions chargés positivement (ex :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc....), qui neutralisent les charges négatives de l'ADN, limitant la répulsion entre les brins (36). Plusieurs publications rapportent l'influence sur le signal de la présence de sels dans la solution de l'hybridation. Une concentration élevée de sels favorise une hybridation sensible tandis qu'une concentration moins élevée de sels réduit la sensibilité de l'hybridation tout en augmentant sa spécificité (38, 32). Il existe plusieurs stratégies pour utiliser la charge de l'ADN afin de l'attirer vers les sondes et, ainsi, favoriser l'hybridation. Belosludtsev et coll, Ont montré que l'hybridation à des oligonucleotides immobilisés par des molécules de streptavidine sur une surface couverte de biotine nécessite une concentration 75 fois plus faible d'ions sodium à PH 5,4 qu'à PH

7,0. Cela serait dû à la charge positive des molécules de streptavidine à PH acide. De plus, dans ces conditions, la cinétique de l'hybridation est plus rapide (1). Zhang et coll. ont modifié la surface de leur puce ADN en y ajoutant des peptides dans la charge varie en fonction du PH (45). Lorsque la charge est positive, l'ADN cible est attiré par la surface. Lorsque la charge est négative, l'ADN cible est repoussé en modifiant le PH selon l'étape du protocole (plus acide lors de l'hybridation, plus basique lors des lavages), ils ont accéléré l'hybridation à leur puce ADN tout en améliorant sa spécificité (42, 41).

#### **IV. 3. La détection de l'hybridation**

La méthode de détection de l'hybridation utilisée dans les études d'expression consiste en l'ajout de nucléotides marqués pendant l'amplification des cibles. L'ADN marqué hybridé à la puce ADN sera détecté avec un numériseur confocal. L'avantage de cette technologie est qu'elle permet de marquer différemment deux échantillons et de les hybrider simultanément pour comparer leur contenu. Cette technologie a aussi l'avantage d'être sensible (6). Taroncher-Oldenburg et coll. ont détecté jusqu'à  $10^7$  amplicons marqués avec les fluorophores Cy3 ou Cy5. Cependant, malgré ses qualités, cette technique n'est pas appropriée pour le diagnostic, car elle ne permet pas la détection sans marquage des analytes. Comme l'amplification et le marquage des échantillons augmentent la complexité d'un test diagnostique, il serait utile de développer une méthode de détection sensible ne nécessitant pas de marquage des ADN cibles. Des technologies sensibles et rapides permettant la détection d'ADN non-marqué existe, mais elles sont complexes et coûteuses.

*Chapitre III:*

# **Confection des puces ADN**

## I. Principe

Le principe de fonctionnement de Puce ADN repose sur une technologie pluridisciplinaire intégrant la microélectronique, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'image et la bioinformatique. Il est basé sur la technique d'hybridation, immobilisées sur un support solide (matrice), des oligonucléotides (simple brins) spécifiques de différents gènes ou ADNc connus constituent les sondes dont le rôle est de détecter des cibles marquées complémentaires, présentes dans le mélange complexe à analyser (ARNm extraits de cellules, tissus ou organismes entières et couverts en ADNc). Les sondes sont greffées sur le support par un bras robotique, les signaux d'hybridation sont détectés selon le type de marquage, fluorescence et la lecture nécessite des méthodes optiques sophistiquées (balayage laser, caméra, etc...), couplé à un traitement informatique de l'image.

## II. Préparation des sondes

La première étape à réaliser est la préparation des fragments d'ADN qui constituent les sondes représentant chaque ORF ou région inter génique du génome étudié. La deuxième étape est l'amplification par le PCR, purification et stockage des sondes d'ADN mais de nombreuses difficultés ont été rencontrées au niveau de l'efficacité de l'amplification, de la purification (différentes méthodes de purification ont été testées et conduisent à des concentrations et des qualités de produit de PCR différentes) et de la conservation des produits de PCR (les produits de certaines plaques se sont évaporés et ou dégradés à cause d'un mauvais stockage).

La quantité de chaque produit de PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, la concentration optimale d'ADN pour l'impression des spots est d'environ 100 ng /ml. Cette concentration varie selon les gènes, mais les tests montrent que l'intensité du signal sur les spots diminue nettement s'ils sont déposés avec des concentrations 2 à 3 fois inférieures, et qu'une concentration trop élevée induit au contraire une augmentation du bruit de fond sur les lames à cause de la trop grande quantité de molécules non fixées à la surface.

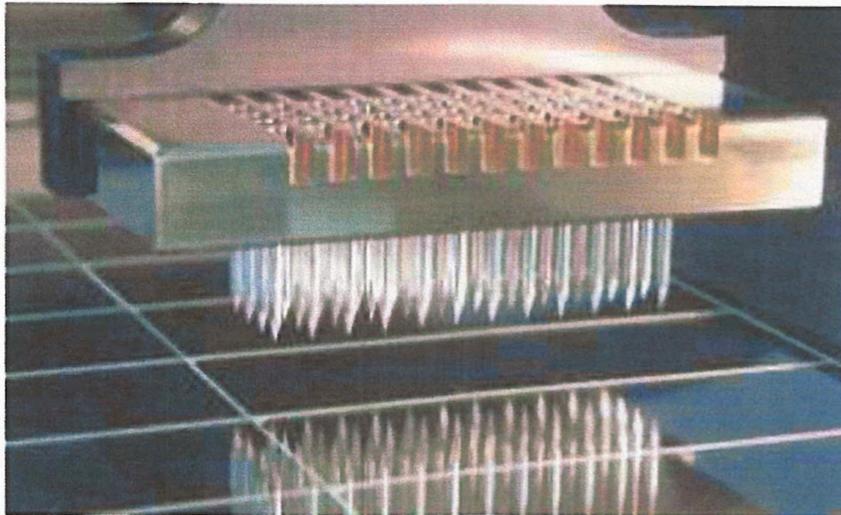
### **III. Préparation des lames**

#### **III.1. Le choix des lames**

Le dépôt est effectué sur des lames en verre traitées par un revêtement chimique qui permet de fixer les brins d'ADN grâce à des interactions électrostatiques. Différentes types de lames sont disponibles aujourd'hui. Les lames recouvertes de poly lysine sont couramment utilisées, car elles sont simples et peu coûteuses à produire au laboratoire à partir de lames de microscope, par une série de trempage et de lavage dans une solution de PBS-poly-lysine. Cependant, il y a de nombreuses difficultés car ces lames se conservent mal et sont souvent d'une qualité inégale d'une série à l'autre, selon le traitement et selon le lot de solution de poly-lysine commerciale utilisé ; le revêtement de poly lysine est fragile, il est souvent percé pendant l'impression, se déchire et parfois se détache de la surface de la lame pendant les traitements et lavages ultérieurs. Par ailleurs, des lames commercialisées par Corning (lame CMT-GAPS II, à surface de gamma amino-propyl silane), comme la poly-lysine, ont des charges des groupements amine qui permettent de fixer l'ADN. Ces lames sont coûteuses mais permettent d'obtenir en générale d'excellents résultats. Elles sont plus résistantes aux variations de température et ne présentent pas de problèmes de déchirement et ont une durée de vie longue.

#### **III.2. Dépôt des produits de PCR par le robot**

Le robot, encore appelé « spotter » ou « arrayer » est muni de pointes métalliques fendues qui prélèvent par capillarité quelques nanolitres des produits d'une plaque de PCR et en déposent une microgouttelette par contact à la surface des lames (figure 9).



*Figure 9. Les aiguilles utilisées pour le dépôt.*

Un seul prélèvement des produits de PCR par les pointes permet d'imprimer sur plusieurs lames à la suite. La qualité de l'impression dépend de plusieurs paramètres tels que ;le tampon de dissolution et la concentration en ADN des produits de PCR, l'état des pointes (qui peuvent s'user ou se boucher), l'humidité et la température ambiante, la vitesse et la force de frappe des pointes sur les lames et dans les puits des plaques de PCR, le nombre et la durée de lavages des pointe permettant d'éviter les contaminations inter -spots (3 cycles de 2 x 5 secondes de rinçage à l'eau et 5 secondes de séchage avant chaque prélèvement). Et en fin, les lames imprimées peuvent être conservées plusieurs mois dans une boîte en plastique propre (à fond non tapissé de mousse ou de liège car il a été montré que cela attaque parfois le revêtement chimique des lames), dans un endroit frais et sec (mais pas dans un réfrigérateur pour éviter la formation de condensation).

### **III.3. Coordonnées des gènes sur la matrice imprimée**

Il est nécessaire à cette étape de pouvoir établir avec certitude l'emplacement exact de chaque gène dans la matrice des spots déposés sur la lame. Le logiciel de pilotage du robot permet en principe de convertir une liste de gènes comportant leurs coordonnées sur la lame.

### III.4. Traitement de finition et préhybridation des lames

Le traitement des lames après le dépôt est une étape cruciale, qui permet notamment de bloquer les charges laissées libres sur la surface autour des spots, une mauvaise réalisation conduit à une forte détérioration de la qualité des images, avec une augmentation du bruit de fond. Le traitement doit être effectué de préférence le jour de l'hybridation. Le traitement requis varie selon la nature des lames et certaines étapes sont supposées optionnelles ou réalisées différemment selon les habitudes des laboratoires. Les étapes communes de ce traitement sont :

La première étape, est la réhydratation (optionnelle) des spots par de la vapeur d'eau chaude ou de tampon, suivie d'un séchage rapide sur une plaque chauffante, afin de permettre l'homogénéisation du dépôt d'ADN à l'intérieur de chaque spot. Puis, la fixation de l'ADN à la surface de la lame (requis pour les puces à oligonucléotides) par irradiation aux rayons UV, formation de liaisons covalentes entre les résidus thymidyl et les atomes de carbone des groupements aminés). Ensuite, la réduction des charges positives restées libres dans une solution d'anhydride succinique (optionnelle pour les lames d' amino-silane, mais recommandée pour réduire le bruit de fond). Puis, la dénaturation de l'ADN dans l'eau bouillante ou de l'éthanol à  $-20^{\circ}\text{C}$  (optionnelle). En fin, la pré hybridation dans une solution de BSA pour diminuer l'hybridation non spécifique (requis pour les lames d' amino-silane, optionnelle pour les lames de poly lysine).

## IV. Préparation des cibles et hybridation des puces

### IV. 1. Préparation des échantillons d'ARN

#### IV. 1. 1. Extraction des ARN

L'extraction est réalisée après une lyse cellulaire qui se fait de plusieurs façons, on citera surtout la sonification (utilisation des ultrasons) ou par broyage (Broyeur à billes). La sonification est le procédé le plus utilisé pour les bactéries, pour les moisissures et les levures particulièrement les cellules en sporulation, il est important de noter que les parois cellulaires sont difficiles à lyser et doivent être broyées par une forte agitation au vortex en présence de billes de verre (contrairement à ce qui est généralement recommandé pour extraire les ARN des cellules d'autres organismes). Nous utilisons ensuite 500-1000  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux (nous avons constaté que le rendement baisse

fortement avec moins de 500  $\mu\text{g}$ ) pour réaliser l'extraction d'ARNm. On signale que les conditions d'obtention de préparation acellulaires varient d'une espèce à l'autre, et l'ARN est très sensible à la dégradation il est nécessaire de travailler très rapidement en portant ces gants et de maintenir les tubes au froid afin d'éviter la dégradation des ARN, la surface de travail et le matériel doivent être parfaitement nettoyés afin d'empêcher la contamination par des ARNases. Toutes les solutions aqueuses sont préparées avec de l'eau stérile préalablement traitée par DEPC, qui inhibe les ARNases.

#### **IV. 1. 2. Purification**

La méthode la plus utilisée pour la purification des acide nucléique est l'ultracentrifugation faite en présence d'un gradient de densité de chlorure de césium CscL, cette technique permet de séparer les molécules ou particules en fonction de leur coefficient de sédimentation qui est lié au poids et à la taille. Une mauvaise purification peut être la cause d'une synthèse inefficace des cibles marquées et d'une augmentation des bruits de fond sur la lame. La purification des ARNm nécessite d'effectuer une étape supplémentaire, qui est délicate et peut conduire à des pertes de rendements, mais qui présente plusieurs avantages. D'une part, L'extraction des ARNm offre un degré de purification supplémentaire. Les contaminations (protéines, polysaccharides, sels, phénol, ADN), qui affectent les étapes ultérieures et favorisent la dégradation de l'ARN, sont plus facilement éliminées.

L'enrichissement en ARNm nous permet d'utiliser des amorces de séquences aléatoires (randon priming), en plus d'une amorce d'oligo (dT) pour synthétiser la cible ADNc marquée. En fin, Nous avons envisagé la possibilité d'utilisation des amorces de séquences aléatoires même avec les ARN totaux, en supposant que les cibles issues d'autre ARN que l'ARNm ne s'hybride pas sur la puce si elle ne contient pas de séquence qui leur sont complémentaires.

## IV. 2. Transcription inverse et incorporation des marqueurs fluorescents

Les cibles sont synthétisées par une transcription inverse des ARNm en présence d'amorces oligo (T)<sub>15</sub> et d'amorce aléatoires afin d'obtenir des brins d'ADN<sub>C</sub> marqués par une molécule fluorescente. Les premières expériences avaient été réalisées en effectuant une incorporation « directe » des colorants fluorescents : la transcription inverse est réalisée en ajoutant des nucléotides couplés à un fluorochrome, les plus couramment utilisées étant les carbocyanine cy3 et cy5. Mais cette méthode a deux inconvénients majeurs. Les nucléotides couplés cy3-dUTP et cy5-dUTP sont extrêmement onéreux. Ces nucléotides ne sont pas les substrats naturels des transcriptase reverse, et leur encombrement stérique est tel que l'efficacité de l'incorporation est très faible et inégale entre la cy3 et la cy5.

Ainsi, une méthode d'incorporation « indirecte » lui est préférée aujourd'hui pour l'analyse sur Puce ADN « spottées ». Dans cette méthode. Des nucléotides portant en groupement amine réactif, l'amino-allyl d'UTP (aa-dUTP), est incorporés lors de la transcription inverse. L'efficacité d'incorporation des aa- d'UTP est nettement supérieure a celle des nucléotides directement couplés aux colorants, et la méthode permet d'éviter les biais d'incorporation des aux spécificités de chaque fluorochrome.

## IV. 3. Hybridation et lavage

Les méthodes d'hybridation sont dérivées de méthodes classiquement utilisées dans les études de Southern et Northern blots. La cible d'ADN<sub>C</sub> est placées dans un tampon de force ionique élevée (ex : SSC). Afin de réduire les répulsions électrostatique et faciliter l'appariement des brins complémentaires des détergents (ex : SDS) et des agents bloquants permettant de réduire l'hybridation non spécifique (ex : poly (A)...) sont ajoutés pour réduire le bruit de fond. La solution cible est déposée au contact des spots de la puce et recouverte d'une lamelle. La puce est placée dans une chambre à hybridation hermétique téléchem et immergée dans un bain-marie à 63°C pendant une nuit. La puce est rincée avant lecture dans des bains successifs de solution de SSC.

## V. Acquisition et extraction des données

### V. 1. La détection et la lecture des signaux

La détection des hybridations consiste à déterminer les sondes qui ont été effectivement hybridées, c'est-à-dire de repérer à quelles adresses les sondes sont complémentaires à des cibles de l'échantillon testé. Une lecture optique permet de révéler les sondes d'ADN devenues fluorescentes (hybridées avec les cibles marquées). Les données récoltées sont analysées par un logiciel de traitement d'images (Figure10), aujourd'hui l'acquisition des images est réalisée exclusivement par lecture des puces sur des scanners Gene Pix. Ces derniers présentent deux avantages indéniables pour une qualité d'image équivalente qui sont la rapidité de lecture et la convivialité de manipulation (le réglage des paramètres de lecture est plus simple). Le scanner Gene Pix est doté d'un logiciel intégré d'acquisition/extraction très performant (la figure10). Le scanner est muni de deux lasers (excitation à 532nm et 635nm) qui permettent l'acquisition simultanée des signaux émis par les fluochromes cy3 et cy5.

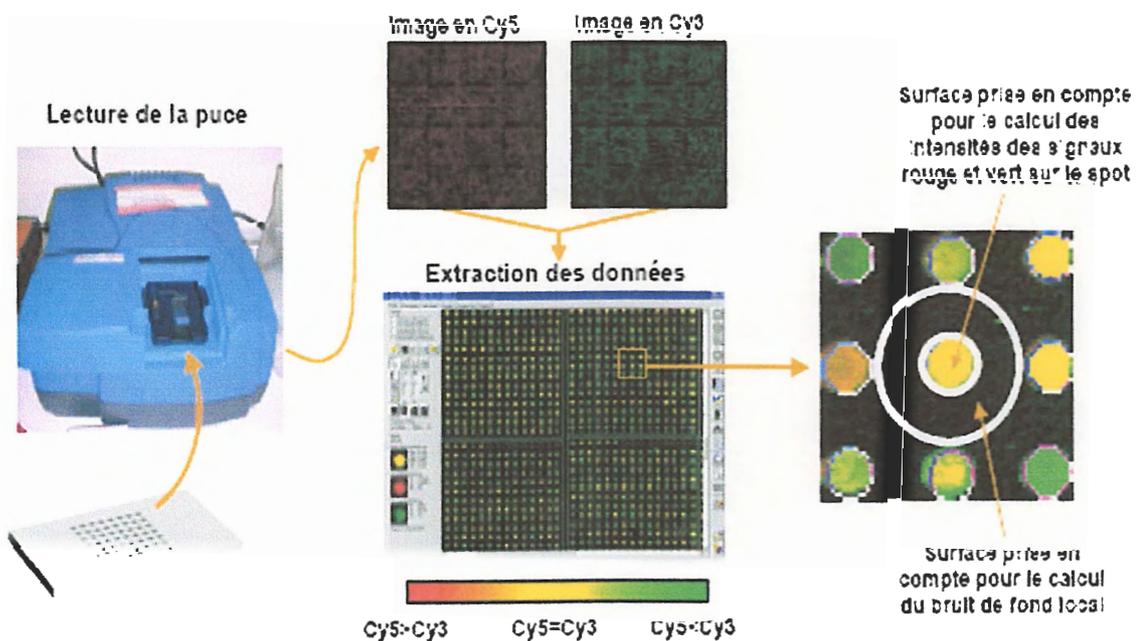
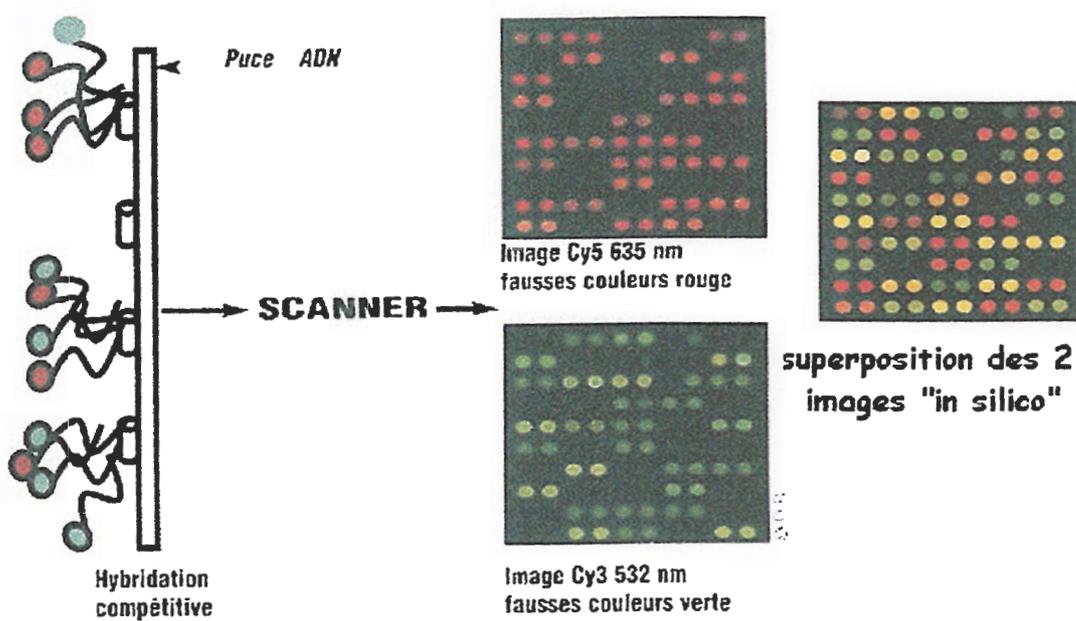


Figure10. Acquisition des données sur le scanner Gene pix Pro.

## V. 2. Extraction des données numériques

Les images sont analysées grâce au logiciel *gene pix pro4* afin d'extraire les données numériques correspondant à chaque spot. Les images sont colorées artificiellement -Celle du canal cy3 en vert et celle de cy5 en rouge- et superposées pour leur visualisation (Figure 11).



*Figure 11. Extraction des données numériques.*

Ainsi, un spot de couleur vert indique un gène dont le niveau d'expression est plus élevé dans l'échantillon marqué avec le cy3 que celui marqué avec le cy5, et inversement pour un spot de couleur rouge. Le spot apparaît jaune lorsque le gène est exprimé de manière identique dans les deux échantillons comparés. Le logiciel génère les données numériques correspondant aux valeurs moyennes et médianes du signal émis par les pixels de chaque spot (Figure 11).

*Chapitre IV :*

# **Les applications des puces ADN**

## **I. Domaines d'applications**

### **I.1. Domaine médical**

#### **I.1.1. Séquençage par hybridation (SPH)**

Alors que la méthode enzymatique dite méthode de Sanger peut être considérée comme une épellation de la séquence, c'est-à-dire une lecture base par base. Le SPH procède par lecture de petits blocs l'analyse porte sur des sous séquences chevauchantes qui sont lues et réassemblées au moyen d'un programme informatique qui reconstitue la séquence étudiée. Le séquençage par puce ADN constitue une alternative intéressante et plus précisée à la méthode classique du séquençage en terme d'automatisation et de réduction des coûts et des durées d'exécution cependant tous les problèmes techniques ne sont pas résolus.

#### **I.1.2. Identification des cibles pour la recherche thérapeutique**

La contribution des puce ADN au séquençage s'accompagne d'une aide à la compréhension plus fine du génome et de sa régulation ainsi, grâce aux puces ADN ont été mis en évidence de nouveaux gènes s'exprimant spécifiquement dans le tissu cérébral de l'enfant ou apparaissant associés à des pathologies inflammatoires rhumatismales ou intestinales les puce ADN devrait contribuer à l'identification de cible thérapeutiques, pour la recherche pharmaceutique. Elles servant aussi à déterminer la résistance aux antibiotique de certains souches microbiennes pour permettre de mieux lutter contre celles- ci.

#### **I.1.3. Pharmacogenomique**

La pharmacogenomique consiste à identifier les gènes impliqués dans l'efficacité (ou l'inefficacité) d'un produits ou ces effets idesirables. Elle conduit à une meilleure compréhension des mécanismes d'action des médicaments. En montrant q'une molécule sur une action variable, la puce ADN ouvre le champ des potentiels thérapeutiques. Elle permet aussi d'identifier les effets secondaires d'un produit et, lors des essais cliniques, de faire des mesures de toxicité.

## I.2. Microbiologie

Détection de micro-organismes (présence, Mutation, capacité à résister à certains antibiotique ou à des inhibiteurs d'enzymes, identification des espèces) par exemple, des matrices des sondes ont été développés pour l'identification de pathotype d'*Escherichia coli* et des gènes de virulence associés (2). De *Mycobactérium tuberculosis* résistantes à la rifampin (37). De bactéries de la flore intestinal (44). Et d'autres cibles importantes pour le diagnostic clinique (42).

## I.3. Agroalimentaire

Détection des séquences provenant d'organismes génétiques modifiés (OGM) dans les semences ou dans certains aliments, détection d'agents infectieux dans l'aliment comme la *salmonelle* ou la *listeria*. Contrôle des micro-organismes utilisés dans certaine fabrication (ferments lactiques, levures , mycélium, etc...).

## I.4. Toxicogénomique

Dans le cas de l'analyse de la réponse toxicologique à l'aide de puces ADN, on doit au départ faire l'hypothèse que l'effet toxicologique, direct ou indirect d'une substance résulte de la modification de l'expression de certains gènes ou du moins qu'il lui est associé. Les mesures consistent alors à évaluer l'expression différentielle de gènes de deux échantillons, grâce à un marquage par fluorescence en deux couleurs (une par échantillon) ce la permet de comparer les profils d'expression génique de deux tissus différents (normal / pathologique ou traité / non traité par une substance).

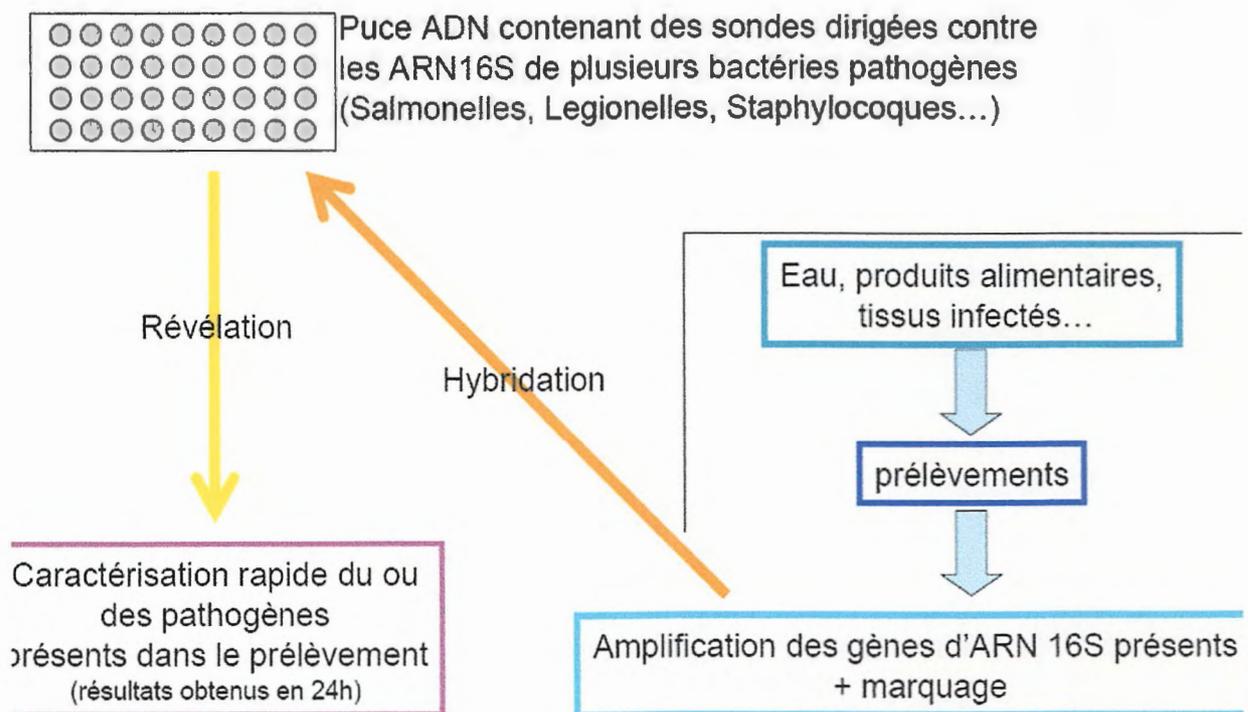
## I.5. Analyse de mutations

A côté de la séquence sauvage (sonde ou référence) on utilisé plusieurs sondes identiques à une mutation prés. Ces sondes vont couvrir l'ensemble des mutations potentielles (substitution, délétion, addition) de manière générale, l'analyse de substitution (pour une position donnée) impliquée donc l'utilisation de quatre sondes une pour la séquence sauvage et trois pour chacun des nucléotides pouvant se substituer au nucléotide original. Cela permet ainsi de repère des séquences mutantes dans un échantillons test.

### I.6. Environnement

La détection des agents infectieux dans l'alimentation, l'air ou l'eau (*Salmonella*, *Listeria*, *Legionella*). Le contrôle de la qualité de l'eau passe aujourd'hui par l'analyse de 64 paramètres de qualité dont certains doivent être surveillés en permanence. Les puces ADN permettent de détecter la présence, même en très faible quantité d'un micro-organisme en le reconnaissant à travers son empreinte génétique. L'utilisation de puces ADN permet un diagnostic et donc une intervention plus rapide et moins coûteuse.

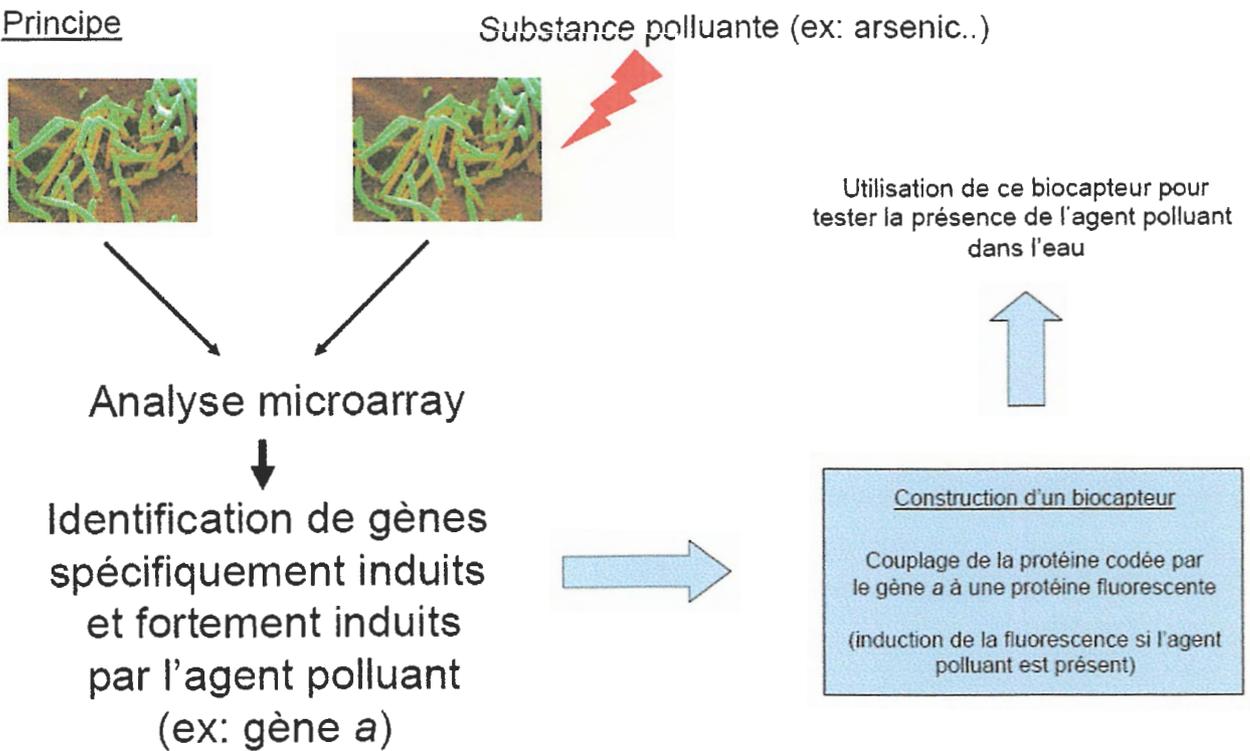
#### 1) Détection de bactéries pathogènes dans un échantillon biologique



**Figure 15. Détection des bactéries pathogènes dans un échantillon biologique.**

2) Détection de substances polluantes dans l'eau (les biocapteurs)

Principe



**Figure16. Détection des substances polluantes dans l'eau (les biocapteurs).**

## II. Quelques exemples d'application des puces ADN

### II.1. Le génotypage des Mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* regroupe environ 80 espèces et sous-espèces de bactéries. Parmi les espèces pathogènes, une dizaine sont responsables de 90 % des mycobactérioses rencontrées chez l'homme. La tuberculose est la principale de ces pathologies. Elle est due aux espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*). Les autres pathologies résultent d'infections opportunistes, particulièrement chez le sujet immunodéprimé, impliquant au total plus d'une dizaine de Mycobactéries dites atypiques. Il s'agit de *M. xenopi* et *M. kansasii* responsables d'atteintes pulmonaires, ganglionnaires, ostéoarticulaires, cutanées et sous-cutanées, et d'espèces du complexe *Mycobacterium avium -intracellulaire*, responsables d'infections généralisées chez les patients atteints du sida.

Dans les travaux qu'ils rapportent, Troesch et coll, sont parvenus, en utilisant une même puce ADN, Gene Chip, à répondre simultanément à deux questions du diagnostic biologique des infections à Mycobactéries : l'identification de l'espèce, et son profil de résistance à la rifampicine (l'antibiotique de référence de la trithérapie recommandée en première intention pour le traitement de la tuberculose). Dans le contexte de l'émergence de souches multirésistantes, les réponses à ces questions sont devenues cruciales pour la mise en oeuvre immédiate d'un traitement adapté. L'identification des espèces de mycobactéries repose sur le génotypage d'une région du génome bactérien présentant un fort polymorphisme, la région de l'ARN ribosomal 16S. Cette région, utilisée dans plusieurs tests de diagnostic moléculaire déjà commercialisés, est considérée comme "l'étalon or" de la spécificité d'espèces pour les Mycobactéries, et son analyse permet d'en retrouver la signature. Une approche similaire permet de définir le profil de résistance à la rifampicine des espèces du complexe *M. tuberculosis*. On sait en effet, que dans 90 % des cas, cette résistance est conférée par des mutations très localisées, situées dans la région du gène codant pour une ARN polymérase bactérienne, le gène *rpoB*. Troesch et

coll. Ont amplifié ces deux régions à partir d'isolats référencés de Mycobactéries. Les produits d'amplification ont ensuite été marqués par fluorescence, puis hybridés à des sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'une ou l'autre de ces régions présentées à la surface de la puce Gene Chip. Ces sondes, que les auteurs ont disposées sur la puce suivant une répartition ordonnée, sont identifiées d'après leur position. Une fiabilité de 100 % pour chacune des réponses cherchées a été obtenue par cette approche méthodologique. Soixante-dix souches représentant 27 espèces de Mycobactéries d'intérêt clinique, ont été testées. Les séquences de toutes ces espèces ont été correctement identifiées. Par ailleurs, parmi les souches de *M. tuberculosis* testées, les 15 souches résistantes à la rifampicine ont été reconnues. L'étude confirme également le pouvoir hautement résolutif du Gene Chip. Les résistances liées à des mutations ponctuelles (n'impliquant qu'un seul nucléotide) ont été détectées, aussi bien que celles impliquant un nombre plus élevé de nucléotides (37).

La technique du DNA chip a été développée par Affymetrix, Elle permet de produire une "puce ADN", destinée à identifier des fragments d'ADN ou d'ARN marqués par fluorescence, grâce à leur hybridation avec de courtes séquences d'ADN, les sondes oligonucléotidiques. Dans le cas de la puce ADN (Gene Chip), développée par Affymetrix, les sondes oligonucléotidiques sont synthétisées in situ, par une technique alliant synthèse chimique sur support solide et photolithographie. Cette technique, issue de la microélectronique s'apparente à celle de la gravure. Elle repose sur la protection ou l'exposition à la lumière, par un jeu de pochoirs, de zone définie de la puce afin de rendre réactifs les groupements chimiques photosensibles désirés. Le support, une surface de verre d'environ 1 cm<sup>2</sup>, constitue l'unité d'hybridation. Chaque unité d'hybridation peut contenir un nombre très élevé de sondes oligonucléotidiques uniques (jusqu'à 400 000), autorisant le traitement de plusieurs marqueurs en parallèle. Pour chaque marqueur, toutes les possibilités de séquence sont représentées sur la puce, une seule d'entre elles devant être rendue positive par l'échantillon tester. La positivité est détectée par l'intensité de la fluorescence, proportionnelle au degré d'hybridation entre la sonde et la séquence cible, et chaque sonde est identifiée d'après sa position sur la puce. Ainsi, parmi les séquences positionnées sur la puce conçue par Troesch et coll, 2 marqueurs sont

représentés : un marqueur d'espèce (la région de l'ARN ribosomal 16S), et un marqueur de résistance à la rifampicine (la région du gène *rpoB*) (20).

Le diagnostic d'une infection à mycobactéries repose sur deux approches : l'approche traditionnelle par examen microscopique du prélèvement, culture bactérienne puis identification des métabolites de la bactérie, et l'approche moléculaire, par reconnaissance de signature génétique des microorganismes. L'approche traditionnelle qui était jusqu'à récemment, la seule méthode disponible, comporte un inconvénient majeur : chez certaines espèces de mycobactéries, 3 à 4 semaines sont nécessaires pour d'obtenir un résultat. Elle est de ce fait peu à peu supplantée par les méthodes moléculaires qui consistent à identifier les mycobactéries par génotypage. Plusieurs tests de ce type ont été récemment mis sur le marché. Produisant un résultat en 4 ou 5 heures, ces tests autorisent une réduction considérable du délai de mise en oeuvre d'un traitement adapté et d'isolement éventuel du patient. Ils peuvent être réalisés directement à partir de l'échantillon biologique dans les cas où l'examen microscopique est positif (quantité suffisante de bactéries dans l'échantillon). Quand cet examen est négatif, les méthodes génotypiques nécessitent, au préalable, de réaliser une amplification par culture du matériel biologique ou une amplification enzymatique du matériel génétique.

La technique de Gene Chip, ne se contente pas d'accélérer le diagnostic. Elle apporte deux avantages supplémentaires au regard des autres techniques moléculaires : son pouvoir résolutif et le traitement en parallèle de plusieurs questions diagnostiques. En effet, son pouvoir hautement résolutif permet de distinguer un bien plus grand nombre d'espèces de mycobactéries pathogènes chez l'homme, contrairement aux autres tests moléculaires, qui n'identifient que les plus fréquentes. Or, l'émergence de mycobactéries atypiques responsables d'infections opportunistes rend nécessaire l'identification précise de chaque espèce. Elle permettra non seulement d'améliorer la prise en charge thérapeutique de ces infections, mais aussi d'améliorer la connaissance épidémiologique des mycobactéries atypiques, et en particulier leur répartition dans l'environnement. Grâce aux possibilités offertes par la puce, il est envisageable de multiplier les réponses

Nom et prénom :

\* LECHGHEB Zahia  
\* YENNOUNE Hakima  
\* MELODIE Sara

Date de soutenance :

19/06/2007

**Titre: La Biotechnologie des puces ADN et ses applications Médicales**

**Nature du diplôme : D.E.S**

**Option : Microbiologie**

## Résumé

Les puces ADN constituent un nouvel outil biotechnologique miniaturisé d'environ 1cm<sup>2</sup>, qui a un potentiel d'applications immense, notamment dans les domaines du diagnostic biomoléculaire, de la recherche de mutations génétiques et du développement de nouveaux médicaments. Née du mariage entre la Microélectronique, la Biochimie, la Chimie combinatoire, la Biologie Moléculaire et la Bioinformatique, elles permettent d'analyser simultanément plusieurs milliers d'informations génétiques différentes en une seule expérience.

Grâce à cette nanobiotechnologie, il est possible d'identifier et de doser, simultanément, un nombre considérable de séquences d'ADN contenues dans un échantillon biologique (sang, biopsies, eau, aliments, ...etc.).

## Abstract

The DNA chips are a new miniaturized biotechnological tool of approximately 1cm<sup>2</sup>, which recently drawn the attention of the scientific community of the fact its immense potential, regarding the biological diagnosis, search of genetic changes and development of new drugs. Born from the marriage of Microelectronics, Biochemistry, Combinatory Chemistry, Molecular Biology and Bioinformatics, DNA chips allow the analyses of several different thousands of genetic information, simultaneously. Using this new tool, we are parallel able to identify and, even, to quantify a considerable number of DNA sequences, contained in a biological samples (blood, biopsies, water, food... and so).

## ملخص

تقنية Puces ADN هي تكنولوجيا جديدة مصغرة قرابة 1سم<sup>2</sup>. حديثا لفتت انتباه المجتمع العلمي لحقيقة طاقتها الهائلة فيما يتعلق بالبيولوجية الجزيئية، وتشخيص الأمراض، البحث الجيني، تغيير وتطوير أدوية جديدة. وهي ناتجة من زواج الالكترونيات الدقيقة والكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية، ومعالجة البيانات وتحليل الصور. وبفضل هذه الاداه الجديدة من الممكن تحليل عدة آلاف من المعلومات الوراثية في آن واحد. بالتوازي فمن الممكن تحليل عدد كبير من العينات البيولوجية (الدم، الجلد، الماء، الغذاء، الخ...).

**Mots clés : Puces ADN, diagnostic, sonde, cible.**