

ANNEXE XX LA TECHNIQUE DES BIOPUCES

Cette technique, développée dans les années 1990, permet de mesurer simultanément l'activité de nombreux gènes dans une cellule ou un organisme. Elle s'inspire du procédé d'hybridation sur réplique mis au point précédemment (*annexe V.B*). Elle consiste à mesurer l'abondance de l'ARN messager correspondant à chaque gène. La technique est surtout utile chez les organismes dont l'ADN a été entièrement séquencé.

XX.A. PRÉPARATION DES PUCES

On commence par fixer sur un support solide un ensemble de molécules d'ADN correspondant à un certain nombre de gènes. Les molécules sont ancrées en des endroits précis du support, qui forment une matrice de points. La distinction entre puce (*array*) et micropuce à ADN (*microarray*), dépend de la nature du support (membrane ou lame de verre) et du nombre de plots par cm². Théoriquement, une micropuce portant quelques dizaines de milliers de plots permet d'étudier en une seule opération l'activité de tous les gènes d'un animal.

Divers moyens sont utilisés pour charger les plots. Le plus simple consiste à synthétiser in vitro des oligonucléotides de quelques dizaines de bases (50 à 70) qui reproduisent partiellement la séquence des ARN messagers que peuvent synthétiser les cellules. Grâce à un système automatique, chaque oligonucléotide est déposé en un point précis de la lame de verre, revêtue d'une couche de polylysine (un polymère portant de nombreuses charges positives). Un plot reçoit plusieurs millions de chaînes d'ADN identiques. Un autre système recourt à la photolithographie, procédé employé pour la construction des puces électroniques. Les oligonucléotides sont synthétisés in situ, le premier élément de la chaîne étant au départ fixé au support.

XX.B. UTILISATION DES PUCES

Pour repérer quels gènes sont actifs, il faut purifier l'ARN des cellules que l'on souhaite étudier. Il faut ensuite préparer à partir de cet ARN des sondes reproduisant la séquence des ARN messagers, mais complémentaires et antiparallèles par rapport à eux. Une méthode couramment employée consiste à copier l'ARN messager en ADN au moyen d'une rétrotranscriptase*. Comme toutes les ADN polymérases, cet enzyme a besoin d'une amorce. On la lui procure sous la forme d'oligo(dT), un ADN de synthèse comportant quelques dizaines de bases identiques. L'amorce est complémentaire de la queue poly(A), suite monotone de bases que la plupart des ARN messagers portent à leur extrémité 3'. Pour préparer les sondes, on réunit dans un tube l'ARN purifié, l'amorce, la rétrotranscriptase et les quatre nucléotides précurseurs de l'ADN (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), dont l'un (par exemple le dCTP) porte un groupement fluorescent (le Cy3 ou le Cy5). L'amorce s'apparie avec la queue poly(A) de l'ARN messager et la transcriptase la prolonge en remontant vers l'extrémité 5' de l'ARN. On obtient de la

sorte des ADN « antisens » fluorescents, capables de s'hybrider avec les ADN « sens » portés par la puce.

La puce est mise en contact, dans des conditions de température et de concentration saline adéquates, avec les ADN marqués qui constituent la sonde. Elle est ensuite lavée, de manière à éliminer l'ADN non hybridé, puis examinée par un spectrophotomètre à balayage (*scanner*) monté sur un microscope éclairé par une lampe à UV. Si un plot a retenu des molécules d'ADN fluorescent, une tache lumineuse apparaît à son niveau. Elle atteste que le gène correspondant à ce plot était actif dans les cellules étudiées. L'intensité du signal correspond au nombre de molécules d'ARN messenger présentes dans les cellules. En principe, elle mesure l'activité du gène.

XX.C. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA TECHNIQUE

Théoriquement, le système permet de comparer l'activité des gènes chez plusieurs catégories de cellules ou d'individus. Pour des comparaisons binaires (par exemple entre cellules d'animaux jeunes ou âgés), on prépare des sondes portant des marqueurs fluorescents distincts (Cy3 ou Cy5) à partir des ARN des deux origines. Les sondes sont mélangées et hybridées avec une puce. Les marqueurs donnent au niveau de chaque plot des signaux lumineux d'intensité et de longueur d'onde différentes, que le spectrophotomètre monté sur le microscope peut distinguer et comparer.

Malgré toutes ses promesses, la méthode ne fournit pas toujours des résultats cohérents. Des travaux semblables réalisés par différents chercheurs associent les produits de gènes différents à telle ou telle activité cellulaire. La cause de ces contradictions reste jusqu'à présent inconnue. Les optimistes mettent en cause l'hétérogénéité des systèmes utilisés par les divers auteurs. Les pessimistes pensent que la méthode n'est pas fiable. En tout cas, elle doit être améliorée.

BIBLIOGRAPHIE

AJ, van Laar RK, Tothill RW, Bowtell DDL. Options available-from start to finish-for obtaining data from microarrays II. *Nature Genet Suppl* 2002; **32**: 481-9.

Jordan B. Pucés à ADN: les brevets contre le progrès ? *Med Sci* 2001; **8-9**: 893-6.

Quackenbush J. Microarrays-guilt by association. *Science* 2003; **302**: 240-1.