

# La puce ADN : un multi-réacteur de paillasse

Michel Bellis, Pierre Casellas

*La puce ADN est une méthode révolutionnaire pour identifier et doser les constituants d'un mélange complexe d'ADN ou d'ARN grâce à l'hybridation en parallèle sur une centaine de milliers de microsursfaces greffées avec des sondes. Le développement industriel des puces ADN repose sur la combinaison des techniques*

*de la microélectronique, de la chimie, de la biologie moléculaire et de l'informatique. Leurs applications concernent tous les domaines de la génétique médicale, du séquençage des génomes, à la recherche de mutations responsables de maladies génétiques et au développement de nouveaux médicaments.*

La clôture prochaine du séquençage de tous les gènes humains donne à la biologie un territoire immense et inexploré. Face à cette augmentation exponentielle des données, la bioinformatique se constitue en une nouvelle discipline, la génomique, dont l'objectif est de modéliser le fonctionnement du génome et son rôle dans la régulation cellulaire. Le « transcriptome » d'une cellule, c'est-à-dire l'ensemble de ses ARNm, occupe à cet égard une position clé puisqu'il est à la fois le produit de l'état transcriptionnel du génome et le précurseur du « protéome », l'ensemble des protéines responsables du phénotype cellulaire. L'étude de la dynamique de la cellule et du génome impose donc de relever un défi technologique gigantesque : l'analyse simultanée d'un mélange complexe de plusieurs dizaines de milliers d'espèces d'ARNm, dont les niveaux d'expression varient de 1 à 10 000 transcrits par cellule ! Jusqu'à récemment, un tel instantané de l'état transcription-

nel d'une cellule était inaccessible. Aujourd'hui, la puce ADN, qui associe parallélisme et combinatoire, est l'outil idéal pour atteindre cet objectif (figure 1). Pour prendre la mesure de l'apport de cette nouvelle technologie, nous pourrions dire que le passage de l'étude individuelle des gènes à l'étude par filtres à haute densité peut être comparé, dans l'évolution de la cartographie géographique, à l'abandon des méthodes de triangulation au bénéfice de la photographie aérienne. La puce à ADN, elle, correspondrait à l'avènement de la cartographie par analyse d'images satellite. Dans les deux cas, le pouvoir de résolution et l'étendue du territoire scruté sont multipliés de façon extraordinaire, et la nature des informations collectées s'enrichit en qualité et en quantité.

## Historique et description

La technologie actuelle des puces ADN vient tout juste d'apparaître et des améliorations décisives sont à attendre au cours de la prochaine

décennie. Une série d'articles, parus récemment [1-5], démontre déjà le haut degré de sophistication atteint par cette technique dont les premières réalisations datent de 1993. Cette montée en puissance qui frappe l'esprit par sa rapidité, s'inscrit dans un processus complexe et aux nombreuses ramifications. Tout d'abord, la puce ADN, en tant qu'objet technologique, est le résultat, dans sa forme la plus simple, du mariage des techniques de miniaturisation propres à l'informatique (masques de photolithographie, techniques de dépôt par jet) et de la chimie des nucléotides (synthèse et greffe d'oligonucléotides). Très rapidement, la famille des partenaires s'est agrandie par l'intervention des micromécaniciens, microchimistes, micro-opticiens, qui tous apportent les techniques dérivées des micro-technologies (biocapteurs, travail du silicium, contrôle des microflux liquides). D'un point de vue conceptuel, les promoteurs du séquençage par hybridation et les précurseurs de l'étude de l'expression qui ont pro-

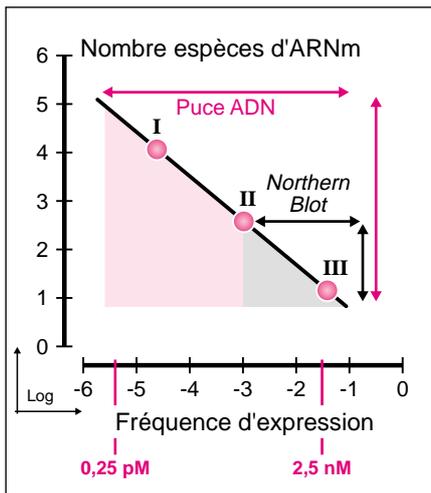


Figure 1. **Les trois classes d'ARNm sont accessibles à la puce ADN.** Les techniques classiques détectent les quelque 500 espèces d'ARNm exprimés dans une cellule à une fréquence supérieure à 1/1000 (classes II et III). Mais tous les autres ARNm, soit environ une dizaine de milliers d'espèces, appartiennent à la classe I et ont une fréquence d'expression bien plus faible. La puce ADN permet de quantifier l'ensemble des ARNm d'un type cellulaire ou d'un tissu. Les concentrations d'un ARNm exprimé à 1 ou 10 000 copies par cellule sont respectivement de 0,25 pM et 2,5 nM (ces valeurs sont calculées sur la base de 300 000 copies d'ARNm par cellule, de 2 kb de longueur moyenne, et d'une préparation de 50 µg/ml).

posé et mis au point la technique de filtres à haute densité, ont joué un rôle décisif. Enfin, la puce ADN a bénéficié et bénéficie encore dans son développement des multiples apports des programmes « génomes », sous forme de technologies mais surtout d'informations de séquence. Dans sa conception, sa technologie et son développement, la puce ADN est donc à un carrefour où se rencontrent des acteurs et des compétences multiples.

La puce ADN peut être comparée à un four à hybridation miniaturisé, capable de traiter cent mille filtres en parallèle ! La mise en œuvre du procédé implique une succession d'étapes : construction de la puce, préparation des cibles et hybridation,

détection et traitement du signal. La puce ADN est constituée d'un réseau dense et régulier de micro-surfaces, les unités d'hybridation (UH) gravées sur un support plan (figure 2). Chaque de ces UH a une adresse individuelle et est greffée avec des molécules simple brin d'ADN. Le rôle de chaque UH est de reconnaître, dans un mélange appliqué sur la surface de la puce, une séquence d'ADN ou d'ARN particulière, par réaction d'hybridation. Les molécules greffées sur la puce constituent les sondes et les ADN (ou les ARN) en solution, marqués par exemple par fluorescence, sont les cibles. A l'issue de la réaction d'hybridation, les signaux émis sur chaque UH sont mesurés et analysés. Leurs caractéristiques reflètent directement le résultat de l'hy-

brida-tion : ainsi par exemple (cas de la figure 2), le traitement des données d'intensités permet l'évaluation de la concentration des cibles. Le parallélisme de la puce ADN permet dans ce cas de déterminer en une seule opération la concentration d'une centaine de milliers de cibles différentes. Les dimensions de l'UH conditionnent à la fois la capacité de la puce (le nombre d'UH) et sa complexité (le nombre de gènes ciblés). Les plus hautes densités proposées à ce jour sont d'environ  $10^5$  à  $10^6$  UH/cm<sup>2</sup> (UH de 30 à 10 µm de côté) et sont adaptées à la quantification de l'expression de tous les ARNm d'un type cellulaire donné (10 000 à 50 000 gènes exprimés). Grâce à la très grande sensibilité du système (0,1 attomole de fluoro-

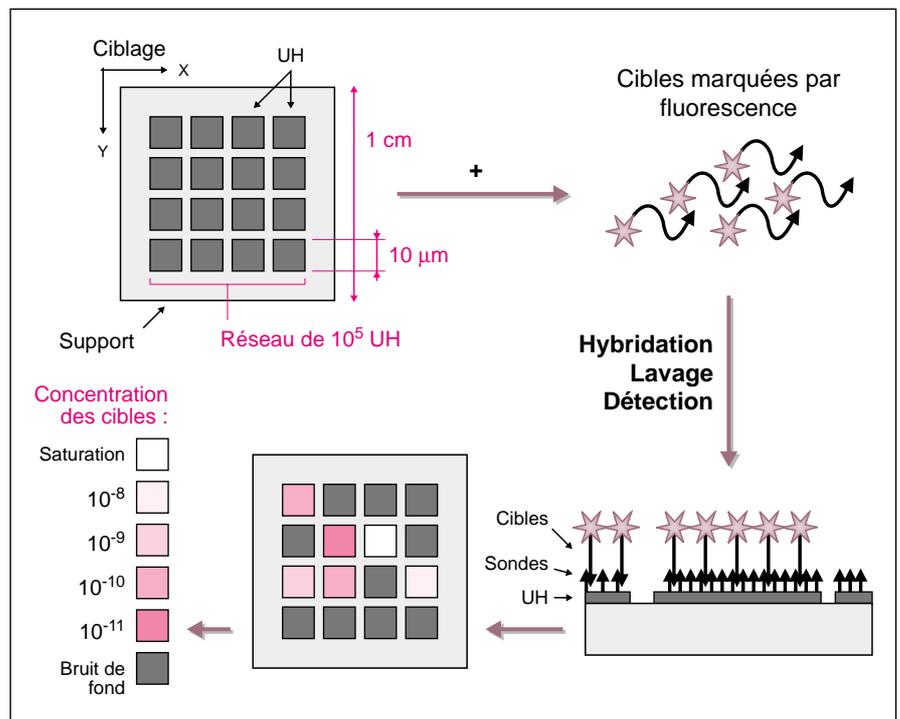


Figure 2. **Schéma d'une puce ADN et principe d'utilisation.** Les oligonucléotides ou polynucléotides simple brin greffés sur la puce constituent les sondes dont le rôle est de détecter les cibles complémentaires, marquées par fluorescence, présentes dans le mélange complexe à analyser. Les sondes sont, soit déposées par une tête d'impression commandée par un robot, soit synthétisées in situ (uniquement pour les oligonucléotides). L'élément matériel principal de la puce ADN est l'unité d'hybridation (UH) qui a une adresse connue sur la puce et qui correspond, par exemple, à un gène indexé dans un catalogue. Après hybridation et lavage, le signal moyen de chaque UH est enregistré grâce à un microscope confocal. Enfin, le traitement numérique du signal permet d'établir la concentration exacte des cibles.

chrome par UH de cent micromètres de côté), même les ARNm exprimés à raison d'une copie par cellule, soit 0,25 picomolaire, sont visualisés. La puce ADN est donc un outil capable d'appréhender toute la complexité et la singularité d'un système.

La réaction cardinale qui opère dans les puces ADN est celle-là même qui a fondé la biologie moléculaire, à savoir l'hybridation entre séquences nucléotidiques complémentaires. Ce phénomène, essentiel à la vie et à son évolution depuis trois milliards d'années, se caractérise notamment par une diversité quasi infinie assurée par le caractère combinatoire des polymères formés et une capacité de discrimination des séquences selon leur degré de complémentarité. La puce ADN, en utilisant un senseur ADN, reproduit ces performances et possède des propriétés de sensibilité et d'exactitude qui lui ouvrent une vaste palette d'applications.

### Les différents procédés de construction de la puce ADN

La fixation ou la synthèse ciblée des sondes est réalisable sur un grand nombre de supports différents. Cependant, le matériau sélectionné doit présenter les caractéristiques suivantes: faible niveau de dispersion de la lumière, bruit de fond de fluorescence négligeable, bonne stabilité chimique, grande capacité de fixation, absence de liaison non spécifique. Répondant à ces critères, le verre est le support le plus couramment employé, mais l'on trouve aussi des puces ADN à base de silicium, polyacrylamide, résine epoxy... Le ciblage des sondes est assuré indépendamment de la synthèse lorsque les sondes sont déposées, par une tête d'impression, sur une surface activée: verre recouvert de poly-L-lysine, pour la greffe de polynucléotides (procédé Synteni) ou gel d'acrylamide portant des groupements hydrazides, pour la fixation d'oligonucléotides (procédé Mirzabekov). Le ciblage en cours de synthèse *in situ*, technique réservée pour l'instant aux sondes oligonucléotidiques, décuple les possibilités de la puce ADN (procédé Affymetrix).

#### Procédé de Southern

E. Southern est un pionnier des puces ADN et a déposé un des premiers brevets en 1988. Le système de synthèse *in situ* d'oligonucléotides qu'il a privilégié est très simple et peu coûteux mais n'utilise pas le parallélisme (figure 3). Il a été cependant très utilisé pour tester l'effet de nombreux paramètres sur l'hybridation [6-8]

#### Procédé Affymetrix

La société Affymetrix, spécialisée dans les puces ADN, dont un des fondateurs, Stephen Fodor, est co-inventeur du procédé de synthèse de peptides et d'oligonucléotides *in situ* (VLSIPS pour *very large scale immobilized polymer synthesis* [9]), est une société très dynamique qui existe depuis 1993. Elle est impliquée dans de nombreux partenariats avec les grands groupes pharmaceutiques (Roche Biosciences, Merck, Glaxo Wellcome, Bristol-Myers Squibb, bio-Merieux Vittek, etc.).

Le procédé Affymetrix repose sur la synthèse *in situ* d'oligonucléotides avec des méthodes sophistiquées empruntées au procédé de gravure des puces informatiques par photolithographie (figure 4). La puissance de ce procédé provient en premier lieu de la méthode appliquée qui est « massivement parallèle »: chaque étape de synthèse concerne environ le quart de tous les oligonucléotides présents dans le produit fini. En second lieu, l'absence de limitations sur la complexité du dessin des masques permet de bénéficier entièrement de l'aspect combinatoire de la méthode et assure par exemple une liberté totale dans le choix des sondes.

#### Procédé Synteni

La société américaine Synteni, fondée en 1994, s'est spécialisée dans la technique concurrente de dépôt automatisé de sondes ADNc sur la surface activée de la puce. Le système a été conçu pour l'exploitation de banques ADNc, dont les clones sont stockés dans des plaques de microtitration. Un robot commandant le

déplacement d'une tête d'impression à quatre pointes dépose, en cinq heures, en parallèle sur 36 puces de 1 cm<sup>2</sup>, environ un millier d'ADNc [10].

#### Procédé Mirzabekov

L'architecture développée par le groupe d'A.D. Mirzabekov, actuellement basé à Argonne (USA), permet de multiplier par 100 la densité de sonde en greffant les oligonucléotides à l'intérieur de blocs de polyacrylamide de 20 µm d'épaisseur. Le phénomène de diffusion retardée, dans le gel, modifie de manière complexe les caractéristiques cinétiques de l'hybridation [11].

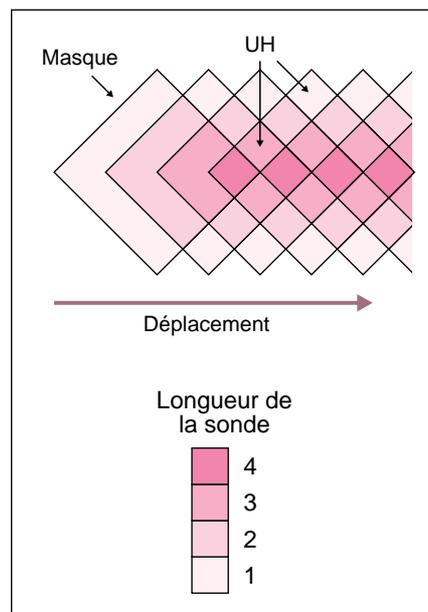


Figure 3. **Synthèse *in situ* d'oligonucléotides chevauchants par le procédé de E. Southern.** La synthèse d'oligonucléotides utilise le même procédé que celui mis en œuvre dans les synthétiseurs commerciaux. L'ajout d'une base se fait à l'intérieur d'une surface (ici un losange) délimitée par l'ouverture d'un masque mobile. Avant chaque nouvelle étape de synthèse, le masque est déplacé d'un pas fixé, toujours dans la même direction. Les sondes ainsi engendrées ont des tailles différentes selon leur position par rapport à l'axe de symétrie horizontale et les séquences des sondes situées dans des UH adjacentes se chevauchent.

La seconde innovation de ce procédé est le recours à un deuxième oligonucléotide très court (pentamère) destiné à s'hybrider à côté d'une cible plus longue. Ce procédé, baptisé *continuous stacking hybridization* (CSH) utilise l'énergie de stabilisation existant entre deux oligonucléotides contigus. L'effet très déstabilisant d'un mésappariement situé en extrémité est d'un grand intérêt puisque, dans les autres procédés utilisés, les cibles ayant ce type de mésappariement sont stables. Une stratégie de détection de mutations, fondée sur le phénomène de CSH, a été proposée [12].

### Procédé Nanogen

La société Nanogen explore les possibilités offertes par leur système *active programmable electronic matrix* (APEX) de contrôler individuellement chaque UH, par un champ électrique. Ce contrôle permet le ciblage et la fixation séquentiels des sondes, l'accélération de l'hybridation et l'amélioration de la spécificité du

signal par l'adaptation des conditions locales de stringence de lavage à la constante de dissociation de la sonde portée par une UH. Ces puces n'atteignent pas encore un degré élevé d'intégration et ne comprennent que 25 à 64 UH de 80 µm de diamètre, disposées sur une surface de 1 mm de côté [13].

### Procédé Cis Bio-international

La société Cis Bio-international (Saclay) développe avec l'aide du CEA/LETI (Grenoble) une méthode originale de ciblage d'oligonucléotide [14]. Le concept d'origine est analogue à celui développé par Nanogen, et la puce, composée d'un support de silicium, comprend plusieurs micro-électrodes de platine contrôlées individuellement. Les oligonucléotides sont couplés à un groupement pyrrole par l'intermédiaire d'un bras, et sont dirigés par un champ électrique sur l'électrode activée où s'effectue la copolymérisation en présence de pyrrole libre.

## Le moteur de la réaction : l'hybridation

La réaction entre une cible C et une sonde S pour donner un hybride H est représentée de manière simplifiée par l'équation réactionnelle :  $C + S \rightleftharpoons H$ . Mais le principe même de la puce est de mettre en présence un grand nombre de sondes et de cibles ce qui rend difficile la modélisation du système. Ainsi, les paramètres qui gouvernent aussi bien la vitesse d'hybridation que le résultat du lavage varient avec les caractéristiques propres de chacune des sondes (taille, séquence...). Cette première difficulté est contournée grâce à l'ajout, dans le mélange à analyser, d'agents chaotropes qui minimisent ces variations indésirables [7]. La présence d'homologies entre certaines cibles pose aussi un problème. Elle se traduit par une compétition pour les mêmes sondes et, pour assurer la spécificité du signal, il faut rendre cette compétition favorable aux cibles parfaitement complémentaires. Les sondes oligonucléotidiques sont très discriminantes car l'existence de plusieurs mésappariements provoque une diminution importante de la constante d'équilibre [15] et assure donc une bonne spécificité dès l'hybridation.

La quantification de la concentration des cibles détectées par la puce est un objectif fréquemment recherché. Il n'y a pas encore eu d'étude systématique de l'effet des paramètres physico-chimiques, thermodynamiques et cinétiques sur le résultat de l'hybridation en phase solide afin de s'assurer que le dosage est possible dans tous les cas. Dans la pratique, l'incorporation de témoins internes et divers contrôles montrent cependant que le dosage est effectif sur trois ordres de grandeur [4].

## La détection

Les qualités requises pour un détecteur sont la résolution spatiale, la sensibilité, la miniaturisation et la mesure en parallèle. La détection par fluorescence a d'abord été presque systématiquement adoptée car les procédés de marquage des cibles et la détection à haute résolution (grâce à la microscopie

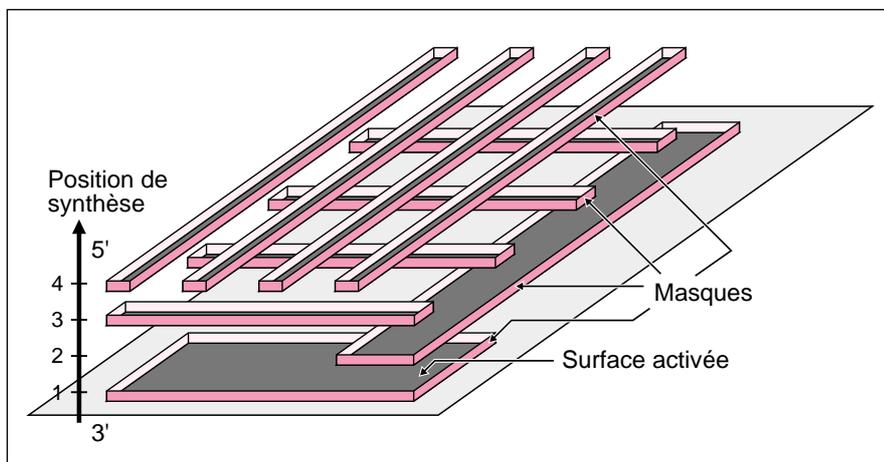


Figure 4. **Synthèse in situ d'oligonucléotides par le procédé Affymetrix.** La synthèse d'oligonucléotide repose sur l'utilisation de nucléotides protégés par un groupement photolabile. L'ouverture du masque, dont la forme peut être dessinée à volonté, permet par illumination, d'activer la surface destinée à recevoir le nucléotide suivant. La synthèse de 15-mères ne nécessitera donc, à raison de quatre masques par position, que 60 étapes de synthèse quel que soit le nombre de sondes et leur degré de chevauchement. Dans cet exemple, où n'est représentée que la série de masques correspondant à un seul type de base, les 256 tétramères sont synthétisés en 16 étapes. La partie colorée en noir représente la découpe du masque qui délimite la surface sur laquelle s'effectue la synthèse. Au fur et mesure que l'on allonge les sondes, la complexité géométrique des masques s'accroît.

pie) étaient déjà mis au point. D'autres solutions performantes sont développées en parallèle. La caméra CCD (*charged coupled device*) est sans doute le système qui se rapproche le plus du système idéal. Très efficace en terme de rapport signal sur bruit, elle collecte 50 % ou plus du rayonnement et peut être aisément miniaturisée sur une puce de silicium [16]. De plus ce système répond à une très large gamme de longueurs d'onde, entre 0,1 et 1 000 nm et peut s'appliquer à la détection des sondes radiomarquées ou fluorescentes [17].

D'autres procédés de détection sont en cours de développement. Le Genosensor Consortium, un groupement de chercheurs et d'industriels américains, propose une technique fondée sur la variation d'impédance (*permisivity chip*) provoquée par la concentration des groupes phosphates à la surface de la puce [18]. Un système apparenté, le GENFET, reposant sur un effet de champ est développé à l'École Centrale de Lyon (cité dans [19]). La technique de résonance de plasmon de surface\* est également très prometteuse car elle évite le marquage des cibles et capte en temps réel les cinétiques d'association et de dissociation lors de la réaction d'hybridation [15]. Enfin, signalons un procédé optique analogue, l'onde évanescente qui a été appliqué avec succès aux puces ADN [20] et qui est très performant pour la détection de variants présents à faible concentration [21]. Le signal brut acquis par une de ces méthodes subit un traitement numérique pour en extraire l'information recherchée: présence et caractérisation d'une mutation, carte d'identité d'un clone ou, plus souvent, concentration d'une cible.

## Les applications actuelles

### Séquençage

Le séquençage par hybridation est une des applications les plus poin-

\* La résonance de plasmon de surface est un phénomène optique. Lorsqu'un rayon lumineux se propage à l'intérieur d'un matériau, il se produit une absorption d'énergie pour une certaine valeur de l'angle d'incidence par rapport à la surface recouverte de métal. Cette angle dépend de l'indice de réfraction, qui est modifié en cas d'hybridation.

tues et un moteur du développement des puces ADN. Dans le principe, cette approche qui vise à reconstruire une séquence à partir des mots qui la constituent, est séduisante mais se heurte à la présence de séquences répétées qui empêchent de calculer une solution unique. L'utilisation de puces de très grande capacité et l'extension de la longueur des mots par double hybridation (CSH) est la solution privilégiée par le groupe de A.D. Mirzabekov [22].

Un nouveau concept d'analyse, développé par A.B. Chetverin et F.R. Kramer [23], surmonte définitivement cet obstacle en même temps qu'il décuple les possibilités de la puce. Ces auteurs proposent d'incorporer à la technique de séquençage par hybridation, la propriété qui a fait le succès du séquençage classique, c'est-à-dire la séparation, selon la taille, des fragments synthétisés. Cela impose l'hybridation de tous les fragments engendrés par raccourcissement successif à partir d'une extrémité. Cela paraît à première vue surprenant car l'analyse d'un fragment de 1 000 pb nécessite environ 990 hybridations indépendantes ! Cependant cette méthode présente deux avantages décisifs: elle ne nécessite aucune étape de clonage et permet l'analyse simultanée de mélanges d'ADN comportant 20 ou 30 molécules différentes.

### Profil d'expression d'ARNm

Une autre application majeure des puces ADN est l'étude du transcriptome. La majorité des résultats ont été obtenus par le procédé Synteni, avec des sondes ADNc. La mesure de l'expression des gènes est effectuée, soit en ajoutant dans la cible des standards de concentration connue (dosage absolu), soit en analysant, sur la même puce, un échantillon test et un échantillon de référence marqués par deux fluorochromes différents (dosage relatif). Les premières études concernaient *Arabidopsis thaliana* [3] et un mélanome humain [2], et étaient réalisées avec une sensibilité de détection de 1:50 000. Maintenant, les systèmes atteignent une sensibilité de détection de 1:500 000 grâce à la réduction

du bruit de fond allant de pair avec l'amélioration des conditions de couplage de la sonde [1]. Cette approche a permis de caractériser les familles de gènes impliqués dans les maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde [5].

Les puces ADN construites avec des sondes oligonucléotidiques se prêtent également à l'étude du profil d'expression des gènes. Le travail de D.J. Lockhart *et al.* [4] est particulièrement démonstratif de la puissance du procédé Affymetrix. Sa stratégie consiste à faire correspondre à chaque ARNm un grand nombre de couples d'UH (20 mères), l'un des membres du couple contenant un mésappariement en son centre (MM pour *mismatch*), l'autre non (PM pour *perfect match*). La moyenne des différences PM-MM donne une valeur qui est proportionnelle à la concentration de l'ARNm sondé. La sensibilité de détection et la spécificité sont remarquables: des expériences menées avec des dilutions connues d'ARNm montrent une réponse linéaire pour des dilutions de 1 à 1 000 et une concentration minimale détectable de 1:300 000 (un messenger par cellule). Grâce aux progrès dans la conception de la puce (choix des sondes) et dans les conditions d'hybridation, le nombre moyen d'UH par gène devrait diminuer et ce type de puce pourrait ainsi atteindre une complexité de plusieurs dizaines de milliers de gènes.

### Criblage de mutations

La recherche de mutations est une application dérivée du séquençage par hybridation puisqu'il s'agit en quelque sorte d'un re-séquençage. Chaque position de la séquence est sondée par une colonne de plusieurs UH. Toutes les positions sont interrogées et les sondes localisées dans deux colonnes voisines se chevauchent sur toutes les positions sauf une (*tiling arrays*, figure 5).

Les puces ADN sont parfaitement adaptées à l'analyse de l'ADN mitochondrial car chaque individu ne porte qu'une seule espèce moléculaire. La recherche de mutation s'effectue par comparaison de l'échantillon testé à un échantillon

de référence, et bénéficie de toute la sensibilité de la technique de double marquage fluorescent. Ainsi, M. Chee *et al.* [24] ont appliqué cette procédure avec succès aux 16 569 pb de l'ADN mitochondrial humain, avec une puce de très haute densité, comptant plus de 140 000 UH de 35 µm de côté, greffées de 15 mères synthétisés *in situ* (figure 6).

La caractérisation par la puce ADN de mutations présentes à l'état hétérozygote dans l'ADN génomique est délicate dans le cas de mutations ponctuelles et s'avère particulièrement difficile en présence de micro-délétions, par exemple dans l'exon 11 de *BRCA1* [25]. Dans ce cas, le recours est une puce spécialisée (*mutation arrays* [26]) qui ne sonde que les positions connues pour porter des mutations.

## Les applications futures

Les réalisations que nous avons présentées sont révélatrices des immenses potentialités des puces ADN et de l'avenir promis à cette technologie, comparable à celui de la PCR. Pour terminer cette présentation des puces ADN, nous tenterons de décrire de nouvelles applications susceptibles d'être développées prochainement.

Dans le domaine de la génétique humaine, un progrès majeur sera la mise au point d'une puce de polymorphismes. Ce projet, évoqué par E. Lander [27], consiste à rechercher systématiquement les polymorphismes de substitution de base, qui se présentent chaque 100 à 500 pb. Cette information conduirait à la construction de puces comprenant des sous-ensembles de taille variable de polymorphismes adaptés à une application donnée. Celles-ci sont multiples. On peut citer :

- Les études sur la diversité génétique et l'histoire des migrations des populations humaines.

- L'établissement de cartes génétiques plus fines avec, pour chaque région chromosomique représentée, des densités de marqueurs adaptées aux taux de recombinaison.

- La recherche accélérée dans les maladies d'origine génétique des locus morbides par analyse de liaison couvrant l'ensemble du génome.

- L'encadrement rapide d'une région morbide héritée par commune descendance chez deux apparentés éloignés (*genome mismatch scanning*, [28]).

- Les études d'association et la recherche de facteurs de risque d'origine génique.

La mise au point d'une puce contenant des étiquettes non polymorphes mais régulièrement espacées est un objectif plus immédiat. Une telle puce remplacerait sans doute avantageusement la plupart des applications fondées sur l'hybridation *in situ* (FISH) : caryotype, recherche de délétions, amplifications, réarrangements, *comparative genome scanning* [29], etc.

Dans l'industrie pharmaceutique, la puce trouvera une place de choix aussi bien au niveau de la recherche qu'au niveau du développement des médicaments. La connaissance du spectre d'action d'un médicament sur les cibles cellulaires et les modèles animaux nous informeront sur les mécanismes d'action moléculaires et donc permettront de définir correctement le potentiel thérapeutique réel des molécules, potentiel aujourd'hui aussi souvent surestimé que sous-estimé. Ces analyses par des puces ADN permettront par exemple d'identifier rapidement les effets secondaires éventuels, qui parfois ne sont visibles qu'au cours des phases tardives du développement du pro-

duit. Le développement clinique, qui est la phase la plus longue et la plus coûteuse, bénéficiera amplement des possibilités variées de la puce ADN : définition des doses, effet des polymorphismes présents dans la population sur la réponse au médicament, détermination des effets secondaires, etc. A plus long terme, le développement de la génomique précisera les étapes-clés des processus pathologiques et désignera de nouvelles cibles de criblage de molécules.

Les applications de diagnostic clinique, fondées sur les réalisations déjà obtenues [25, 26, 30], vont sans doute faire s'envoler le marché par leur introduction massive à l'hôpital : diagnostic des maladies génétiques, cytogénétique *in silicio*, suivi de traitement des infections, etc. La puce ADN est amenée à jouer un rôle d'interface privilégié au cours du diagnostic, du pronostic et du suivi thérapeutique. Une adaptation optimale du traitement découlera, par exemple, d'une classification plus élaborée des tumeurs en oncologie, ou de la recherche de variants particuliers dans une population virale (VIH, [30]), et dans tous les cas d'une connaissance de la constitution génétique du patient.

## Conclusions

Le marché des puces ADN est dominé par nos collègues d'outre-

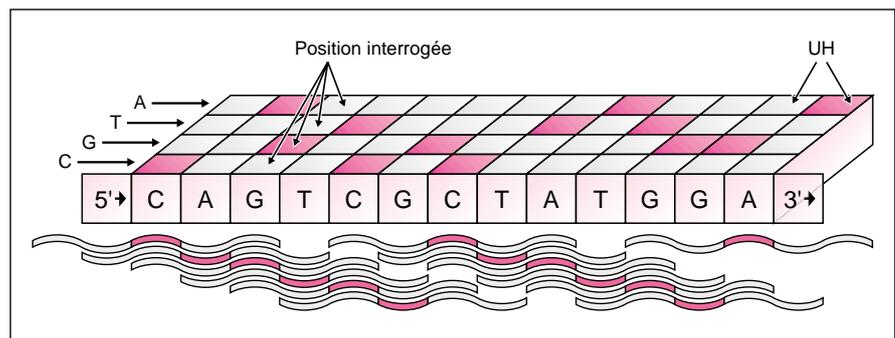


Figure 5. **Principe de l'interrogation par sondes chevauchantes.** Chaque position de la séquence est interrogée par une colonne d'UH. Une de ces UH (colorée en rouge) correspond à la séquence de référence. Leur lecture ordonnée reconstitue la séquence, écrite au dessous de la puce. Les autres UH (colorées en gris) présentent une variation, une substitution de base dans l'exemple, positionnée au centre de la sonde. D'une colonne à la suivante, les sondes se chevauchent et sont décalées d'une position comme indiqué en bas de la figure (la partie colorée en rouge indique la position variée testée dans la colonne correspondante).

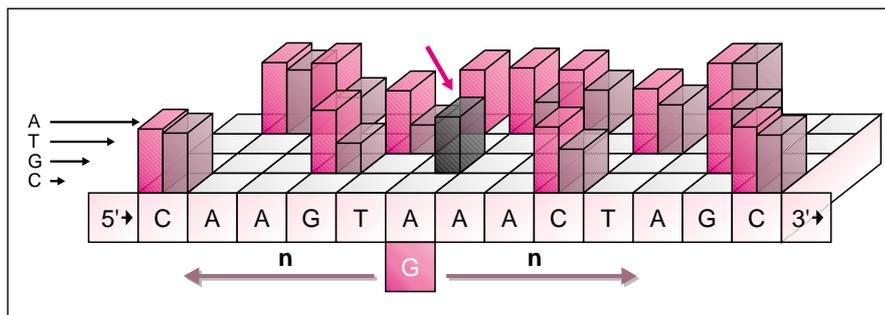


Figure 6. **Localisation et caractérisation d'une mutation.** Le signal du test (en noir) est comparé au signal de référence (en rouge). Ces signaux sont acquis sur deux puces différentes ou en même temps sur une seule et même puce, si les cibles sont marquées différemment. La mutation est caractérisée par un gain de signal (indiqué par la flèche rouge). De part et d'autre de cette position, et sur environ une longueur de sonde ( $n$ ), l'on observe une chute du signal du test, due à la présence de la mutation, qui permet de repérer immédiatement la position de la mutation.

Atlantique, Affymetrix et Synteni, qui se sont engagés résolument dans un modèle de puces qui leur est propre. Mais le champ est ouvert à de nombreux acteurs inventifs qui se sont lancés dans la course et essaient de développer des solutions alternatives concernant certains segments de la technologie, par exemple la détection et le traitement du signal. C'est sans doute là que se feront dans l'avenir les progrès décisifs, conduisant à une puce « farcie » d'électronique et capable de suivre en temps réel le déroulement de toutes les étapes de l'hybridation afin de fournir en bout de chaîne, après analyse matérielle et logicielle, des valeurs très précises de concentration de cibles. L'intégration des nanotechnologies sera un progrès majeur vers l'incorporation sur la puce des étapes de préparation et de marquage des cibles. Enfin, la mise au point de puces préparatives ouvre l'avenir à des combinaisons beaucoup plus sophistiquées du type *lab on a chip*. A l'heure où les nécessités du séquençage en masse des génomes avaient orienté la biologie vers le développement des grands équipements, sur le modèle de la physique des particules, voilà que la solution est apportée par un outil tenant dans la paume de la main. *Small is powerful!* ■

m/s n° 11, vol. 13, novembre 97

## RÉFÉRENCES

- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis – microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10614-9.
- Derisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen YD, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet* 1996; 14: 457-60.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
- Lockhart DJ, Dong HL, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang CW, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotech* 1996; 14: 1675-80.
- Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2150-5.
- Southern EM, Case-Green SC, Elder JK, Johnson M, Mir KU, Wang L, Williams JC. Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 1368-73.
- Maskos U, Southern EM. A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 4663-9.
- Shchepinov MS, Casegreen SC, Southern EM. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1155-61.
- Mcgall G, Labadie J, Brock P, Wallraff G, Nguyen T, Hinsberg W. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13555-60.
- Schena M. Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays* 1996; 18: 427-31.
- Livshits MA, Mirzabekov AD. Theoretical analysis of the kinetics of DNA hybridization with gel-immobilized oligonucleotides. *Biophys J* 1996; 71: 2795-801.
- Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, Kirillov E, Kreindlin E, Ivanov I, Parinov S, Guschin D, Drobishev A, Dubiley S, Mirzabekov A. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4913-8.
- Sosnowski RG, Tu E, Butler WF, Oconnell JP, Heller MJ. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1119-23.
- Livache T, Roget A, Dejean E, Barthet C, Bidan G, Teoule R. Preparation of a DNA matrix *via* an electrochemically directed copolymerisation of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 2915-21.
- Gotoh M, Hasegawa Y, Shinohara Y, Shimizu M, Tosu M. A new approach to determine the effect of mismatches on kinetic parameters in DNA hybridization using an optical biosensor. *DNA Res* 1995; 2: 285-93.
- Eggers M, Hogan M, Reich RK, Lamture J, Ehrlich D, Hollis M, Kosicki B, Powdrill T, Beattie K, Smith S, *et al*. A microchip for quantitative detection of molecules utilizing luminescent and radioisotope reporter groups. *Biotechniques* 1994; 17: 516-25.
- Lamture JB, Beattie KL, Burke BE, Eggers MD, Ehrlich DJ, Fowler R, Hollis MA, Kosicki BB, Reich RK, Smith SR, *et al*. Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 2121-5.
- Beattie K, Eggers M, Shumaker J, Hogan M, Varma R, Lamture J, Hollis M, Ehrlich D, Rathman D. Genosensor technology. *Clin Chem* 1993; 39: 719-22.
- Hinfray Jérôme. Les puces à ADN. *Biofutur* 1997; 166: 1-15.
- Stimpson DI, Hoiyer JV, Hsieh WT, Jou C, Gordon J, Theriault T, Gamble R, Baldeschiwiler JD. Real-time detection of DNA hybridization and melting on oligonucleotide arrays by using optical wave guides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6379-83.

## RÉFÉRENCES

21. Stimpson DI, Gordon J. The utility of optical waveguide DNA array hybridization and melting for rapid resolution of mismatches and for detection of minor mutant components in the presence of a majority of wild type sequence – statistical model and supporting data. *Genet Anal Tech Appl* 1996; 13: 73-80.

22. Mirzabekov AD. DNA sequencing by hybridization – a megasequencing method and a diagnostic tool? *Trends Biotechnol* 1994; 12: 27-32.

23. Chetverin AB, Kramer FR. Oligonucleotide arrays: new concepts and possibilities. *Biotechnology* 1994; 12: 1093-9.

24. Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, Winkler J, Lockhart DJ, Morris MS, Fodor SPA. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 1996; 274: 610-4.

25. Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SPA, Collins FS. Detection of heterozygous mutations in *brca1* using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genet* 1996; 14: 441-7.

26. Cronin MT, Fucini RV, Kim SM, Masino RS, Wespi RM, Miyada CG. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat* 1996; 7: 244-55.

27. Pennisi E. Chipping away at the human genome. *Science* 1996; 272: 1737.

28. Brown PO. Genome scanning methods. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 366-73.

29. Trent JM, Bittner MH, Zhang J, Wiltshire R, Ray M, Su Y, Gracia E, Meltzer P, Derisi J, Penland L, Brown P. Use of microgenomic technology for analysis of alterations in DNA copy number and gene expression in malignant melanoma. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 33-40.

30. Kozal MJ, Shah N, Shen NP, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell ER, Chee M, Gingeras TR. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Med* 1996; 2: 753-9.

## Remerciements

Les auteurs remercient vivement M. G. Marguerie (directeur délégué CEA.DSV) pour les discussions et les contacts multiples qui les ont stimulés au cours de ce projet.

## Michel Bellis

Chargé de recherche au Cnrs. ERS 155, CRBM du Cnrs (Montpellier). En détachement à Sanofi.

## Pierre Casellas

Directeur du service d'immuno-pharmacologie. Sanofi Recherche, 371, rue du professeur Joseph-Blayac, 34184 Montpellier Cedex 04, France.

## Summary

### DNA chip : a bench multi-reactor

DNA chip is a revolutionary technology dedicated to large scale study of complex DNA or RNA samples. This review presents the physical principles of these devices and the technical solutions developed by the main industrial actors of the field. We describe also some applications of the DNA chips: search for mutations in genetic diseases, quantification of gene expression, sequencing by hybridization and development of new therapeutic drugs.

## TIRÉS À PART

P. Casellas.

## INVASION MÉTASTATIQUE TUMORALE

8 h 30 Accueil des participants - Introduction de Jacques PICARD

8 h 45 Claude GRISCELLI (Directeur général de l'Inserm) Introduction

9 h 00 Dominique STEHELIN (Cnrs, Institut Pasteur - Lille) Similitudes entre les mécanismes de néoangiogenèse et d'invasion tumorales

9 h 30 Jean-Paul THIERY (Cnrs, Institut Curie - Paris) Rôle des facteurs de croissance dans la dissémination métastatique

10 h 00 Jean-Marie BLANCHARD (Cnrs, IGM - Montpellier) Contrôle du cycle cellulaire et progression tumorale

### 10 h 30 Pause-café

11 h 00 Marc MAREEL (Hôpital Université - Gand) E-cadhérine et  $\alpha$ -caténine dans l'invasion cancéreuse

11 h 30 Daniel LOUWARD (Cnrs, Institut Curie - Paris) Rôle de l'ezrine dans la motilité des cellules épithéliales normales et tumorales

12 h 00 Jean FEUNTEUN (Cnrs, Institut Gustave-Roussy - Villejuif) Prédilection génétique au cancer du sein et de l'ovaire

### 12 h 30 Déjeuner

14 h 30 Henri ROCHEFORT (Inserm, Montpellier) Influence des œstrogènes et de la cathepsine D dans l'invasion métastatique des cancers du sein

15 h 00 Paul BASSET (Cnrs, IGBMC - Strasbourg) Les protéases extracellulaires d'origine stromale : contribution à la progression cancéreuse et perspectives thérapeutiques

15 h 30 Marie-France POUPON (Cnrs, Institut Curie - Paris) Effet de mutations de la protéine p53 sur la stabilité génomique et le potentiel métastatique dans une lignée humaine de cancer du côlon

### 16 h 00 Pause-café

16 h 15 Jean BÉNARD (Institut Gustave-Roussy - Paris) Les facteurs oncogéniques de la dissémination métastatique du neuroblastome

16 h 35 Hugues de THÉ (Cnrs, Institut Hôpital Saint-Louis - Paris) La leucémie promyélocytaire, un modèle thérapeutique ciblé sur l'oncogène

17 h 00 Patricia PATERLINI (Inserm - Paris) Implications cliniques de la dissémination spontanée et iatrogène de cellules tumorales chez les patients avec cancer primitif du foie

### 17 h 30 Table ronde