

Principes des microdamiers à ADN et applications potentielles en sciences vétérinaires

THOMAS A.*, CLOSSET R.*[“], BUREAU F.*, LEKEUX P.*

* Service de Physiologie, Département des Sciences fonctionnelles, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, Bât. B42, B-4000 Liège, Belgique

[“] Probiox SA, Tour de Pathologie, CHU, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Prof. P. Lekeux - Tél. : 0032(0)4/366.40.30 – Fax : 0032(0)4/366.29.35 – Email : pierre.lekeux@ulg.ac.be

RESUME : Le microdamier est un outil technologique miniaturisé potentiellement applicable à l'étude et l'analyse de multiples composés moléculaires, tels que des protéines, lipides, hydrates de carbone ou acides nucléiques. C'est avec les acides nucléiques que les microdamiers attirent, depuis une quinzaine d'années, l'attention de la communauté scientifique du fait de son immense potentiel en matière de recherche scientifique, de diagnostic clinique, et de développement de nouveaux médicaments. Seuls les microdamiers à ADN sont investigués dans cet article. Nés du mariage de la microélectronique, de la biochimie, de la biologie moléculaire, de l'informatique et de l'analyse d'image, les microdamiers permettent d'analyser simultanément plusieurs milliers d'informations génétiques différentes. Grâce à ce nouvel outil, il est possible en parallèle d'identifier, voire de doser, un nombre considérable de séquences d'acides nucléiques contenues dans un échantillon biologique (sang, biopsie, mais aussi eau, aliments...). Cet article propose, après s'être penché sur le mode de fonctionnement des microdamiers, d'en comprendre les critères de qualité ainsi que les avantages et inconvénients. Les deux parties suivantes sont consacrées à la place qu'occupent les microdamiers dans le recherche scientifique et dans l'établissement d'un diagnostic clinique. Enfin la dernière partie évalue les perspectives qu'offrent les microdamiers dans les sciences vétérinaires.

INTRODUCTION

La découverte en 1953 par Watson et Crick de la structure en double hélice de l'acide désoxyribonucléique (ADN) a révolutionné la biologie. Par la suite, Jacob et Monod (1964) étudient la régulation de gènes chez la bactérie *Escherichia coli* (modèle de laboratoire en biologie moléculaire). Ils montrent que le produit de l'expression génétique est l'acide ribonucléique (ARN) et baptisent « ARN messenger » le produit de l'expression génétique jouant le rôle de matrice pour la synthèse de protéines.

Des recherches menées par Arber et Linn (1969), puis celles de Nathans et Smith (1975) mettent en évidence l'existence d'enzymes, dites de restriction, capables de couper l'ADN en

divers sites spécifiques. La découverte de la ligase puis de la transcriptase reverse, qui synthétise de l'ADN à partir d'ARN sont des piliers de la génétique moléculaire actuelle. Ces enzymes permettront en effet, en 1972 à Jackson et collaborateurs, de construire un vecteur génétique. Grâce à cela, et pour la première fois, un gène étranger est introduit et exprimé dans une bactérie.

En 1977, Gilbert et Sanger conçoivent les techniques pour séquencer l'ADN (Maxam et Gilbert, 1977 ; Sanger *et al.*, 1977) et en 1980, Botstein et collaborateurs initient la cartographie des gènes grâce à l'utilisation des polymorphismes de longueur de fragments de restriction (RFLPs). Des différences génétiques parmi des individus sont alors mises en évidence :

c'est le polyallélisme génétique. En 1987, Mullis et Faloona conçoivent la réaction en chaîne de polymérisation (PCR), une technique d'amplification exponentielle de l'ADN permettant d'obtenir *in vitro* de très grandes quantités d'ADN à partir, théoriquement, d'une seule molécule d'ADN. En 1990, le projet de séquençage du génome humain est mis en place aux Etats-Unis sous l'impulsion de James Watson. Le but est de déchiffrer le patrimoine génétique humain. Alors que la communauté scientifique estimait la fin du séquençage du génome humain entre 2005 et 2010, la publication de celui-ci paraît dans la revue *Nature* en 2001 (The International Human Genome Mapping Consortium, 2001). Au début de l'année 2005, 1433 génomes viraux, 215 génomes pro-

caryotes et près de 20 génomes eucaryotes (parmi lesquels certains de nos animaux domestiques) sont entièrement décryptés.

Parallèlement les microdamiers sont des outils biotechnologiques qui ont commencé à être développés dans les années 90 (Nishizawa *et al.*, 1992 ; Zhu *et al.*, 1994). Cette technologie révolutionnaire est en passe de fournir une quantité de données exceptionnelles et de transformer profondément les sciences et technologies biomédicales. Au même titre que l'invention du microscope, fin du 18^e siècle, les microdamiers fournissent des informations entièrement nouvelles sur le fonctionnement cellulaire, en indiquant quasiment instantanément le niveau d'expression de tous les gènes d'une lignée cellulaire à un moment précis et dans une condition déterminée.

La technique des microdamiers est potentiellement applicable à l'étude et l'analyse de multiples composés moléculaires, qu'il s'agisse de protéines, lipides, hydrates de carbone ou encore d'acides nucléiques. Quelle que soit la nature de la molécule étudiée, le but des microdamiers est toujours de pouvoir l'identifier, voire la quantifier. Cela est permis par la fixation sur un support solide de sondes moléculaires spécifiques permettant la reconnaissance, dans l'échantillon étudié et l'échantillon de référence, des molécules voulues. Pour chaque zone de reconnaissance moléculaire effective, l'utilisateur perçoit un signal. En fonction des coordonnées de ce signal sur le support solide et donc de l'identité de la sonde mise en jeu, l'utilisateur peut déduire l'identité exacte, voire la quantité de molécule correspondante dans l'échantillon.

Dans le cadre de cette synthèse, l'étude se limitera aux microdamiers appliqués aux acides nucléiques. On trouve dans la littérature de très nombreuses publications concernant ces microdamiers. Les premières sont celles de Schena et collaborateurs (1995 ; 1996) et de Shalon et collaborateurs (1996).

Plusieurs terminologies sont utilisées dans la littérature pour décrire cette technologie, parmi lesquelles : biochip, DNA chip (puce à ADN), DNA micro array, gene array... Malgré l'existence de la marque déposée par Affymetrix, Genechip[®], il apparaît dans certains articles que l'appellation « gene chip(s) » est utilisée comme terminologie générale en référence à la technologie des microdamiers. On pourrait employer comme substituant le terme « genome chip », qui a pour lui l'avantage de mettre en évidence le fait que cette technologie ait le pouvoir d'examiner l'entière du génome sur un simple microdamier (Leming, 2002). Le terme de microdamier, sous-entendu à ADN, sera employé ici pour éviter toute confusion.

Les microdamiers sont l'aboutissement des méthodes d'hybridation employées au cours des dernières décennies pour l'identification et le dosage des acides nucléiques présents dans les échantillons biologiques, comme par exemple les *Southern blot* et *Northern blot*.

Concrètement, le microdamier est un damier microscopique sur lequel sont fixés des séquences d'acides nucléiques simple brin. Chaque séquence du damier est unique et spécifique d'un seul gène. Les séquences génétiques à analyser, issues d'un échantillon biologique, sont marquées et déposées sur le microdamier. Après l'hybridation (c'est-à-dire l'appariement de deux molécules d'acide nucléique par les liaisons hydrogènes et selon le principe de la complémentarité des bases) et après les étapes de lavage, le damier est scanné et une image informatique de celui-ci est acquise. La représentation des différentes espèces d'acides nucléiques dans l'échantillon est révélée par la quantité d'ADN complémentaire immobilisé et sa position sur le damier.

Le pionnier en la matière est la société Affymetrix qui, associée à BioMérieux (selon un accord passé en 1996) prévoit le développement de tests de diagnostic fondés sur la technique du GeneChip[®]. Ce test

microdamier à haute densité permet de typer génétiquement (génotypage) toutes les espèces de mycobactéries d'intérêt clinique, incluant les espèces du complexe de *M. tuberculosis* et les mycobactéries atypiques (Troesch *et al.*, 1999). C'est la révélation du potentiel clinique de cette technique. Depuis, de très nombreuses firmes se sont lancées dans l'aventure des microdamiers, avec des produits ayant leur propres caractéristiques (Venkatasubbarao, 2004).

Dans la famille des microdamiers on distingue deux grandes orientations : les microdamiers destinés à la recherche et ceux destinés au diagnostic médical. Les microdamiers destinés à la recherche sont surtout utilisés pour analyser le niveau d'expression de gènes et ainsi comprendre certains mécanismes moléculaires essentiels. Les éventuelles sur- ou sous-expressions géniques, qui constituent le profil d'expression génétique de l'individu, pourront par la suite être mises par exemple en relation avec un état pathologique et constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les microdamiers destinés au diagnostic médical servent non seulement à mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines séquences génétiques parmi des milliers d'autres (e.g. la présence de microorganismes ou la présence sur une portion de gène d'une mutation responsable d'une pathologie) mais aussi à mettre en évidence un profil particulier d'expression des gènes, en lien avec une pathologie. Les analyses à partir de microdamiers sont donc à la fois qualitatives et quantitatives.

Le but de cet article est de présenter une synthèse des données pratiques de la littérature concernant les microdamiers. Ainsi le principe de fonctionnement des microdamiers sera expliqué dans un premier chapitre. Dans le deuxième chapitre, il sera question de la validité des études utilisant les microdamiers. Le troisième chapitre consiste en un récapitulatif de leurs avantages et inconvénients par rapport aux techniques actuellement concurrentes. Les deux chapitres suivant traitent

tent de la place des microdamiers dans la recherche et le diagnostic clinique. Enfin le dernier chapitre illustre des exemples d'application des microdamiers dans le domaine des sciences vétérinaires.

PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES MICRODAMIERS

Les microdamiers s'utilisent en trois phases parallèles (figure 1). Premièrement, il s'agit de préparer le microdamier à proprement parler, c'est-à-dire la plaque et les sondes servant de support à l'étude. Ensuite l'échantillon biologique de départ doit être traité pour devenir utilisable dans le contexte d'une étude à microdamier. Enfin le microdamier peut être exploité et les données qui en ressortent pourront être utilisées.

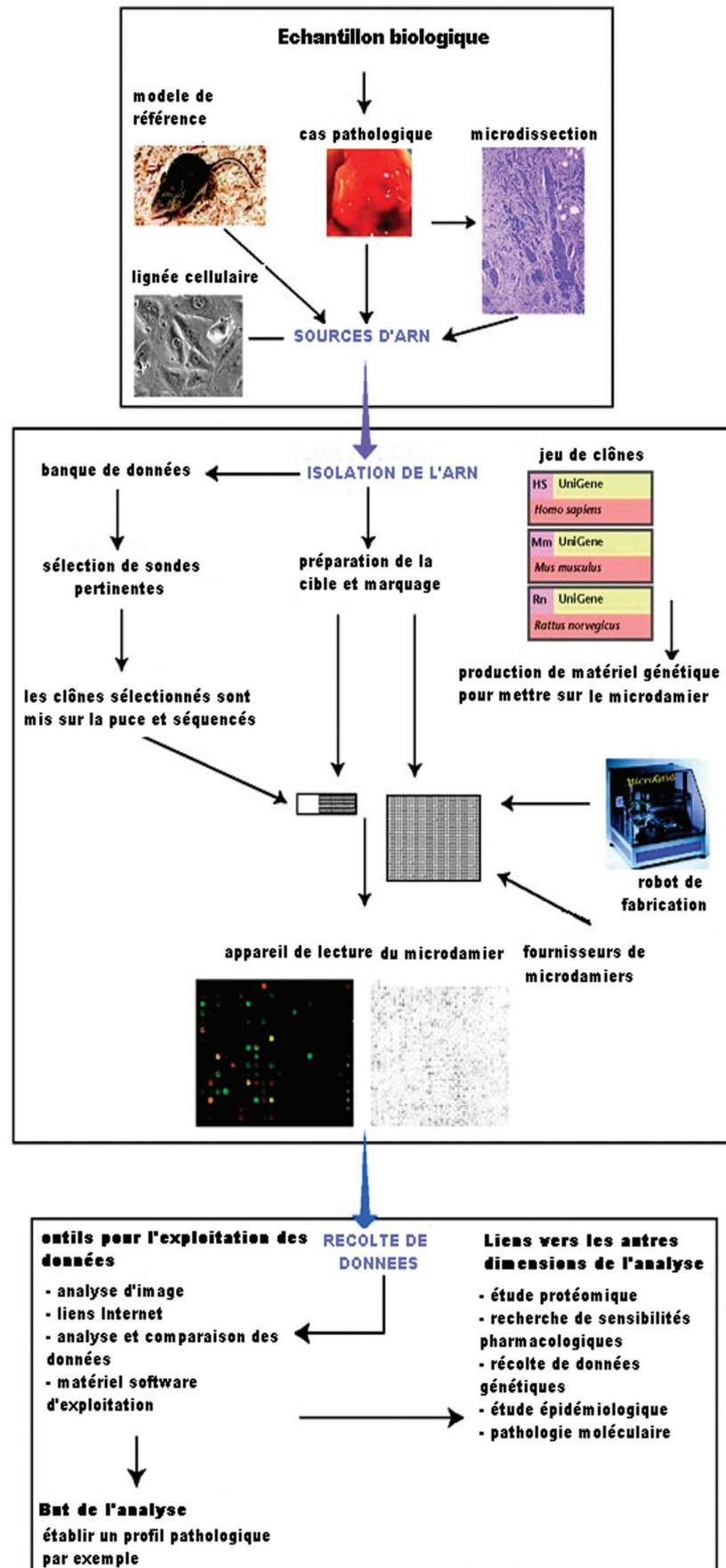
Préparation du microdamier

La préparation du microdamier se fait en deux étapes : l'investigateur doit choisir la plaque qui servira de support à l'expérience, mais il doit également choisir le type de sondes à y implanter c'est-à-dire les séquences adéquates et leur mode de synthèse.

Choix du support

Pour ce qui est du contenant, c'est-à-dire du support, les microdamiers classiques sont dits plans et constitués d'une surface de verre (ou d'autres substrats à base de nylon ou quartz) d'environ 1 cm² appelée « unité d'hybridation ». On peut y greffer jusqu'à 400.000 brins d'oligonucléotides (courts polymères d'acides nucléiques) polymères qui ont le rôle de sonde et qui sont des marqueurs génétiques. S'il s'agit d'un microdamier destiné au diagnostic, il se peut que pour chacun de ces marqueurs, toutes les possibilités de séquence sont représentées sur le microdamier, et qu'une seule d'entre elle ne soit rendue positive par l'échantillon à tester. Lorsqu'il s'agit de poser un diagnostic, le résultat

Figure 1: Schéma général du principe des microdamiers : de l'échantillon biologique à l'interprétation des résultats (modifié d'après Bowtell, 1999).



d'une étude à microdamier est donc surtout quantitatif. Par ailleurs, s'il s'agit d'un microdamier utilisé dans la recherche fondamentale, bien souvent chaque sonde a son utilité et une analyse quantitative devra être ajoutée à la simple observation du microdamier.

Il existe également des microdammers non plans, organisés en microtunnels ou en petites sphères (Venkatasubbarao, 2004). Cependant malgré le fait qu'ils utilisent un ratio surface/volume pour fonctionner, leur principe est le même que les microdammers plans classiques. De plus, leur morphologie étant encore très spécifique de la firme qui les produit, ils ne sont que cités ici.

L'utilisateur a également le choix entre différentes tailles de spots sur la plaque, les spots représentant les surfaces où les sondes sont implantées. On peut alors différencier les microdammers des macrodammers selon la taille des spots (Leming, 2002).

Les macrodammers (figure 2) ont des spots de 300 microns de diamètre voire plus et leur lecture se fait facilement au moyen de techniques de détection conventionnelles.

Les microdammers (figure 3) ont des diamètres de spot ne dépassant pas 200 microns. Leur révélation nécessite une robotique ainsi qu'un équipement d'imagerie spécifiques.

Synthèse des sondes

Pour rester en accord avec la nomenclature recommandée par Phimister (1999), il s'agit de ne pas confondre les termes « sonde » et « cible ». La sonde est identifiée parfaitement avant son utilisation, alors que la cible est une structure présente dans l'échantillon à tester.

En s'appuyant sur la nature de la sonde, on peut de nouveau différencier deux techniques principales au sein de l'appellation microdamier (Leming, 2002) :

- si les sondes sont constituées d'ADN complémentaire ou ADNc (ADN qui a été copié au départ d'ARN messager) de 500

à 5000 pb de long, alors elles sont immobilisées sur le microdamier grâce à un robot et elles seront exposées à un panel de cibles une par une ou simultanément dans un mélange. Cette technique est traditionnellement appelée « DNA microarray » dans la littérature anglo-saxonne ;

- si les sondes sont des oligonucléotides, leur synthèse peut se faire soit *in situ* soit en dehors du microdamier pour y être immobilisées ensuite. Ces sondes seront mises en contact avec un échantillon connu d'acide nucléique, et ce sont les séquences complémentaires qui seront alors identifiées (et quantifiées). Cette méthode est plutôt appelée « DNA chips » dans la littérature anglo-saxonne.

Le choix des sondes à utiliser est un élément crucial car il faut en effet sélectionner au niveau du génome ou du transcriptome des séquences qui serviront de support pour l'étude. Il faut donc que ces sondes soient adaptées au phénomène biologique étudié (voir la section validité du microdamier). En effet, en schématisant, une sonde trop longue renfermerait certainement des séquences qui permettraient l'hybridation d'ADN ne correspondant pas au transcrit recherché alors qu'une sonde trop courte serait trop sélective et ne donnerait pas lieu à toutes les hybridations voulues.

Il existe deux grandes méthodes de fabrication des sondes qui diffèrent selon leur lieu de synthèse: soit les sondes sont polymérisées directement sur le microdamier, il s'agit alors de la méthode « *in situ* » soit elles le sont en dehors mais seront alors implantées (ou « spottées ») ultérieurement sur le microdamier. Dans tous les cas, la conception des microdammers est réalisée par des robots de haute précision enfermés dans des enceintes hermétiques où la température et l'humidité relative sont standardisées.

Figure 2 : Macrodamier après révélation. L'ADN sur ce macrodamier avait été préalablement marqué par radioactivité. L'outil informatique utilisé ici –BZScan- permet la quantification de l'ADN (modifié d'après Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 2004).

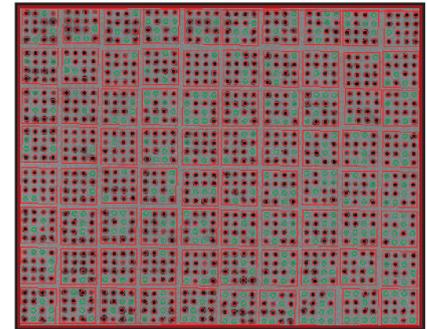
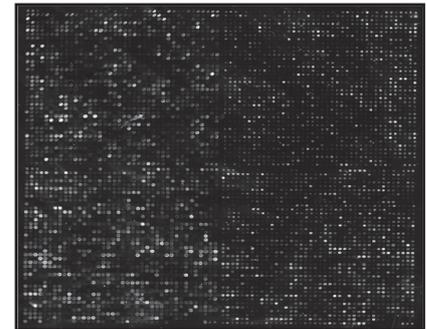


Figure 3 : Aspect d'un microdamier après révélation. Il s'agit du premier microdamier contenant l'entièreté du génome d'une levure. Ce microdamier reprend les 6116 gènes de la levure ainsi que 96 régions intergénomiques et de nombreux échantillons de contrôle (modifié d'après Brown, 1997).

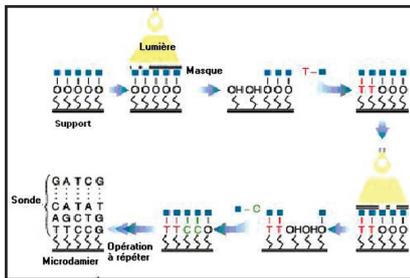


Sondes synthétisées *in situ*

Cette voie de fabrication est utilisée par certaines des plus grandes firmes comme Affymetrix, Febit, Xeotron et NimbleGen. Elles utilisent un principe commun mais en conférant chacune un avantage particulier à son produit.

- La synthèse *in situ* chez Affymetrix (figure 4) allie synthèse chimique sur support solide et photolithographie. Cette technique repose sur la protection ou l'exposition à la lumière, par un jeu de masques, de zones définies du microdamier, afin d'activer les groupements chimiques photosensibles désirés (c'est-à-dire les empilements de bases A, T, C, G, dans l'ordre choisi). Par conséquent, l'emplacement des différentes sondes sur le microdamier et l'enchaînement

Figure 4 : Synthèse de sondes *in situ* selon Affymetrix. Cette technique utilise une alternance de zones lumineuse ou sombres (grâce à la présence de masques) pour synthétiser les sondes sur la plaque rendue préalablement photosensible par des traitements adéquats (modifiée d'après Affymetrix, sans date b).



des bases qui les composent sont très précisément connus.

Les avantages de cette méthode sont les suivants :

- la longueur et non le nombre de son des conditionne le nombre d'étapes dans la fabrication du microdamier ce qui permet une très grande densité de sondes ;
- cette méthode est très reproductible et nécessite peu de réglages, et présente des avantages évidents pour le laboratoire dans un contexte de production intensive.

L'inconvénient majeur est la nécessité de masques et d'un système d'alignement de haute précision, ce qui se répercute sur le prix de fabrication. NimbleGen, Xeotron et Febit contournent ce problème en utilisant un masque virtuel (Venkatasubbarao, 2004). A chaque point du microdamier correspond un micro-miroir en aluminium qui reflète exactement la quantité de lumière voulue à l'endroit voulu. Cela permet à NimbleGen de produire des microdamiers à plus haute densité encore qu'Affymetrix. Xeotron s'oriente surtout vers la synthèse de sondes oligonucléotidiques très longues grâce à des micro-chambres de synthèse. Enfin Febit a pour avantage de commercialiser un système complet, allant de la polymérisation des sondes de ADN, la fabrication du microdamier, l'introduction d'échantillon, l'hybridation, la détection et l'analyse de données.

Sondes synthétisées à l'extérieur du microdamier

Le mode opératoire dépend principalement de la surface choisie comme substrat et de la nature des liaisons qui seront employées pour fixer les sondes. Les liaisons utilisées sont surtout des liaisons ioniques ou covalentes pour des oligonucléotides. Dans le cas de liaisons ioniques, c'est le groupement phosphorique de l'ADN, chargé négativement qui rentre en interaction avec un groupe aminé chargé positivement sur le substrat. Très souvent cette liaison est cependant rendue covalente par un traitement ultérieur thermique ou aux rayonnements ultraviolets.

En fonction des firmes, il existe donc différents moyens d'arriver à l'installation de ces sondes sur la plaque (e.g. pipette, *drop-touch*, méthode piézoélectrique...), de même qu'il existe différents types de sondes utilisées (e.g. oligonucléotides, cDNA...) (tableau I).

Traitement de l'échantillon

L'échantillon de départ est un échantillon biologique pouvant avoir de multiples origines, e.g. biopsies, cultures bactériennes, prélèvements divers. Dans cet échantillon, l'investigateur doit récupérer l'acide nucléique sur lequel il veut faire porter son analyse.

Dans le cadre d'un microdamier destiné au diagnostic d'une pathologie bactérienne par exemple, c'est l'ADN bactérien qui sera récupéré et soumis à l'analyse pour déterminer quel genre, voire quel sérotype bactérien, est concerné. Dans le cadre d'un microdamier destiné à contrôler le niveau d'expression de certaines gènes, c'est le pool des ARN messagers cellulaires qui sera exploité.

Analyse de l'ADN de l'échantillon : études du génome

Si l'ADN de l'échantillon doit être analysé, on doit s'assurer qu'il se trouve en quantité suffisante dans l'échantillon biologique pour pouvoir être directement exploité.

Si l'échantillon est déclaré « positif », c'est-à-dire s'il contient suffisamment d'ADN, on peut procéder directement à son analyse par le microdamier. Par contre, si cette condition n'est pas remplie, l'étape préalable consiste en une amplification du matériel génétique recherché par une méthode de PCR. Ce processus est nécessaire pour pouvoir disposer du matériel génétique en quantité suffisante en vue de sa détection ultérieure par le microdamier. C'est souvent le cas lors de microdamiers destinés aux diagnostics à partir d'échantillons biologiques bruts.

Après cette amplification éventuelle, l'ADN recueilli subit une transcription *in vitro* suivie d'une transcription inverse. Le but de ces polymérisations successives est d'obtenir de l'ADNc marqué. Ainsi l'ARN monocaténaire obtenu par la transcription *in vitro* va servir de matrice pour l'action d'enzymes transcriptase inverse et DNA polymérase. Ces manipulations permettent d'obtenir un mélange de molécules d'ADNc bicaténaires contenant les mêmes informations génétiques que dans la molécule d'ADN recueillie initialement dans l'échantillon. C'est au cours de la transcription inverse que sont incorporées à l'ADNc les molécules qui serviront à son marquage et donc à sa détection sur le microdamier.

Analyse de l'ARN de l'échantillon : étude de l'expression génique

La même démarche est appliquée, mais les opérations se font dans un ordre différent. Dans tous les cas, ce qui sera déposé à la surface du microdamier sera de l'ARN marqué. Selon le même principe que décrit précédemment, le pool d'ARN messenger initial est rétrotranscrit en un pool d'ADNc. Ensuite cet ADNc subit une transcription *in vitro* en ARN complémentaire ou ARNc (ARN qui a été copié à partir d'ADNc) au cours de laquelle les molécules de marquage seront incorporées. Pour les mêmes raisons que précédemment, si le taux d'ARN cellulaire récolté est insuffi-

Tableau I : Principales firmes impliquées dans la synthèse des microdamiers, leurs processus de fabrication et leurs principales orientations (modifié d'après Leming, 2002 ; Venkatasubbarao, 2004).

SOCIETE	NOM DU PRODUIT	MODE DE FABRICATION DU MICRODAMIER	MODE DE LECTURE	DESTINEE PRINCIPALE DU MICRODAMIER
Affymetrix, Inc. Santa Clara, California	GeneChip®	Synthèse <i>in situ</i> par photolithographie d'oligonucléotides de 20 à 25 paires de base sur un support silicone, condensés sur des microdamiers de 1,25 ou 5,25 cm ²	Fluorescence	- Profils d'expression génétique - Etudes de polymorphismes - Diagnostics
NimbleGen Systems Inc. Reykjavik, Iceland		Synthèse <i>in situ</i> utilisant la technologie MAS (Maskless Array Synthetiser) avec 786000 micro miroirs d'aluminium	Fluorescence	
Febit Mannheim, Germany	Geniom®		Procédé automatisé global, de la synthèse des sondes à l'exploitation des données	
Xeotron Houston, Texas	Xeochips®	Synthèse <i>in situ</i> combinée à la technologie des nano-chambres d'hybridation en 3D	Fluorescence	- Profil d'expression génétique - Identification de nouveaux gènes
Brax Cambridge, UK		Petits oligonucléotides synthétiques polymérisés en dehors du microdamier	Spectrométrie de masse	- Diagnostics - Profils d'expression génétique - Identification de nouveaux gènes
Gene Logic Inc. Columbia, Maryland	READS™			
Genometrix Inc. The Woodlands, Texas	Universal Arrays™			
Genset Paris, France				
Hyseq Inc. Sunnyvale, California	HyChip™	- 500 à 2000 échantillons d'AND implantés sur des microdamiers de 0,6 cm ² (HyGnostics) ou 18 cm ² (GeneDiscovery) - Oligonucléotides synthétiques implantés sur des microdamiers de verre de 1,15 cm ² (HyChip)	Radioactivité Fluorescence	- Profil d'expression génétique - Identification de nouveaux gènes - Séquençage de grande amplitude (gene Discovery Array) ou d'échantillons (HyChip) - Analyse de polymorphisme - Diagnostics (HyGnostic/Hychip)

Incyte Pharmaceuticals Inc. Palo Alto, California	GEM	Implantation des produits PCR par la méthode piézoélectrique ou synthèse <i>in situ</i> d'oligonucléotides	Fluorescence et radioactivité	- Profil d'expression génétique - Analyse de polymorphismes - Diagnostics
Molecular Dynamics Inc. Sunnyvale, California	Storm® FluorImager®	500 à 5000 molécules de cDNA implantées sur 10 cm ² d'un microdamier en verre	Fluorescence	- Profil d'expression génétique - Identification de nouveaux gènes
Nanogen San Diego, California	Semiconductor Microchip	Les oligonucléotides synthétiques sont capturés par des spots chargés électriquement. L'hybridation repose également sur des liaisons chargées électriquement	Fluorescence	- Diagnostic - Identification des petites séquences répétées en tandem
Protogene Laboratories Palo Alto, California		Synthèse <i>in situ</i> d'oligonucléotides. La fixation se fait par utilisation de surfaces à propriétés tensio-actives	Fluorescence	- Profil d'expression génétique - Analyse de polymorphismes
Sequenom Hambourg, Germany Et San Diego, California	MassArray SpectroChip		Spectrométrie de masse	- Identification de nouveaux gènes - Validation de gènes - Diagnostics - Cartographie
Synteni Inc. Fremont, California (racheté par Incyte Pharmaceuticals Inc.)	UniGEM™	500 à 5000 segments de cDNA implantés par une pointe sur un microdamier de 4 cm ²	Fluorescence	- Profil d'expression génétique - Identification de nouveaux gènes
The German Cancer Institute Heidelberg, Germany		Macrodamier utilisant des PNA. Synthèse <i>in situ</i> de sondes utilisant les technologies de f-moc ou t-moc	Fluorescence et spectrométrie de masse	- Profil d'expression génétique - Diagnostics

sant, on peut procéder à une PCR sur l'ADNc.

Marquage de l'échantillon

La nature des molécules utilisées pour le marquage de l'échantillon diffèrent selon le mode de lecture choisi pour l'exploitation du microdamier. Les principales techniques de marquages sont donc traitées dans la partie consacrée à la lecture des microdamiers.

Exploitation du microdamier

L'exploitation du microdamier se fait en deux temps. Premièrement, l'acide

nucléique préalablement traité et marqué est déposé sur le microdamier. Deuxièmement l'investigateur va procéder à la lecture du microdamier pour en déduire la nature, et, le cas échéant, le taux d'acide nucléique présent dans l'échantillon.

Hybridation moléculaire

La présence de l'acide nucléique cible dans l'échantillon est révélée par son hybridation avec la sonde qui lui est complémentaire sur le microdamier. Cette hybridation moléculaire (figures 5 et 6) ne se fait qu'au niveau des spots où les sondes préalablement fixées

présentent une séquence au moins partiellement complémentaire de celle de l'acide nucléique cible présent dans l'échantillon testé ou de référence. La nature de la sonde complémentaire est déduite de sa position sur l'unité d'hybridation, ce qui permet de conclure sur l'identité de l'acide nucléique hybridé.

Après avoir déposé l'échantillon sur le microdamier, une série de lavages est effectuée afin d'éliminer les fragments d'acide nucléique non hybridés.

Lecture du microdamier

Différentes méthodes sont à disposition des laboratoires aujourd'hui pour révéler et exploiter les données issues des microdamiers. Celles-ci diffèrent par leur principe, leur précision relative et leur coût.

Fluorescence, radioactivité et utilisation de logiciels

La fluorescence et la radioactivité sont les méthodes les plus souvent employées.

Les fluorescences utilisées sont fréquemment de type Cy3 et Cy5 dans les désoxy-Uridine Tri Phosphate (dUTP) (figure 7). En effet, leur incorporation est bonne lors de la transcription inverse. Les fluorescences Cy3 et Cy5 ont également une bonne stabilité pré-stimulation et une bonne détectabilité (Duggan *et al.*, 1999).

La même démarche peut être employée avec de la radioactivité. C'est alors le ³²P qui est utilisé dans les désoxy-Cytosine Tri Phosphate (dCTP). Cette technique a un meilleur seuil de détectabilité et permet soit de diminuer le taux d'ARN marqué à utiliser, soit d'utiliser une technique avec un bruit de fond plus important qu'avec la fluorescence. Cela suppose dans tous les cas un appareillage robotique spécifique ainsi que la présence sous jacente de l'informatique.

- Détection directe

La fluorescence est incorporée avant toute hybridation, par exemple lors de la transcription inverse effectuée à partir du pool d'ARN récolté de la cellule – ou tissu – à tester et de référence. Sur un même microdamier, ces deux échantillons sont analysés et le signal fluorescent sortant est étudié (figure 8). Le message d'abondance concernant la présence du transcrit est donc relatif au taux de transcrit dans la cellule de référence. Le fait que l'interprétation de ces microdamiers soit toujours relative à l'analyse d'échantillons répertoriés comme étant de référence peut être un frein à l'avancée des microdamiers. C'est pourquoi de nombreuses études mettent en

place des systèmes permettant des analyses quantitatives des résultats, ce qui permettrait de s'affranchir des comparaisons relatives.

La démarche est la même avec l'incorporation de radioactivité à la place de fluorescence, même si cela semble actuellement moins répandu.

- Détection indirecte

La fluorescence est alors ajoutée post-hybridation via des anticorps spécifiques de l'échantillon testé. Ces anticorps sont soit marqués par fluorescence eux même, soit servent de support de reconnaissance pour d'autres anticorps, spécifiques des premiers et marqués de la fluorescence voulue.

Que la détection soit directe ou indirecte, la plaque est balayée simultanément par des rayons de longueur d'onde permettant la mise en valeur des fluorescences employées. Enfin un traitement informatique permet de compiler les deux images obtenues en une seule à trois teintes généralement. L'équipement requis est conséquent, mais il s'agit d'une condition impérative afin de pouvoir honorer au maximum les capacités des microdamiers.

Par ailleurs le développement de l'informatique dans ce domaine se précisant, l'utilisateur a dorénavant la possibilité de comparer l'image qu'il a obtenue avec une banque d'images de référence. Ces banques de données

Figure 5 : Illustration du phénomène de l'hybridation moléculaire au niveau des sondes. Ce phénomène, qui est la clef de voûte de la technologie des microdamiers à ADN, est entièrement axé sur la complémentarité des bases nucléiques (modifié d'après Bouman *et al.*, 2002).

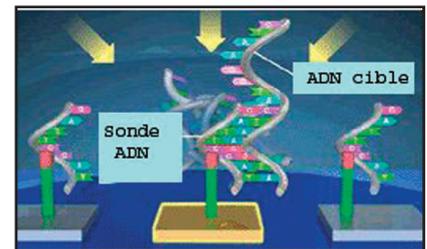
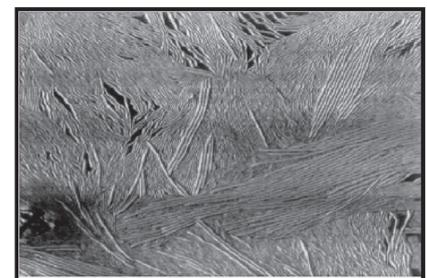


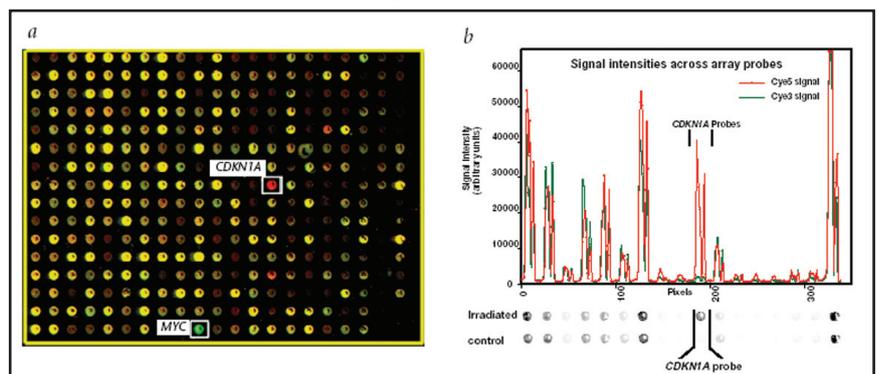
Figure 6 : Image au microscope électronique d'un microdamier à ADN après hybridation des sondes. La haute densité moléculaire favorise les interactions d'hybridation. La partie photographiée représente une portion de 2 micromètres (modifié d'après Duggan *et al.*, 1999).



permettent, par exemple, d'obtenir rapidement une interprétation précise des résultats obtenus tout en minimisant le risque d'erreur.

Un des obstacles à cette technique est actuellement son coût. Les différentes firmes tentent d'élaborer des systèmes robotiques ainsi que des logiciels visant à permettre un traitement systématisé des microdamiers et donc à terme de diminuer le prix des installations. La firme Febit est une des pionnières

Figure 7 : Images de quantification d'une hybridation à deux couleurs. a. Vue du microdamier. Les cibles ont été associées à des fluorescences verte et rouge. Les deux spots entourés correspondent à la différence optimale de couleur. b. En abscisse : intensité de la fluorescence selon un axe passant par le spot CDKN1A. Le profil d'intensité, comparativement aux sondes de contrôle, coïncide pour chaque sonde excepté CDKN1A (d'après Duggan *et al.*, 1999).



en la matière puisqu'elle propose un système complet de microdamiers qui prend en charge de la synthèse des sondes jusqu'à l'exploitation des résultats obtenus.

Lecture à l'œil nu

Cette méthode n'est applicable que dans le cas des outils type macrodamier (figure 2). Si l'aspect pratique de cette méthode est évident (immédiat et économique), l'utilisateur perd non seulement une partie de l'intérêt des damiers – suite à la restriction du nombre de sondes employées –, mais également renonce à une précision optimale.

La technique principale de lecture à l'œil nu utilise la biotine couplée à la streptavidine et soumise à la phosphatase alcaline comme marqueur sur les produits issus de l'amplification par PCR. On obtient alors des spots bleutés à l'endroit où les hybridations ont eu lieu (figure 9).

Ce type de macrodamier et de lecture tend à disparaître et est remplacé par des microdamiers pour lesquels l'informatique devient la norme.

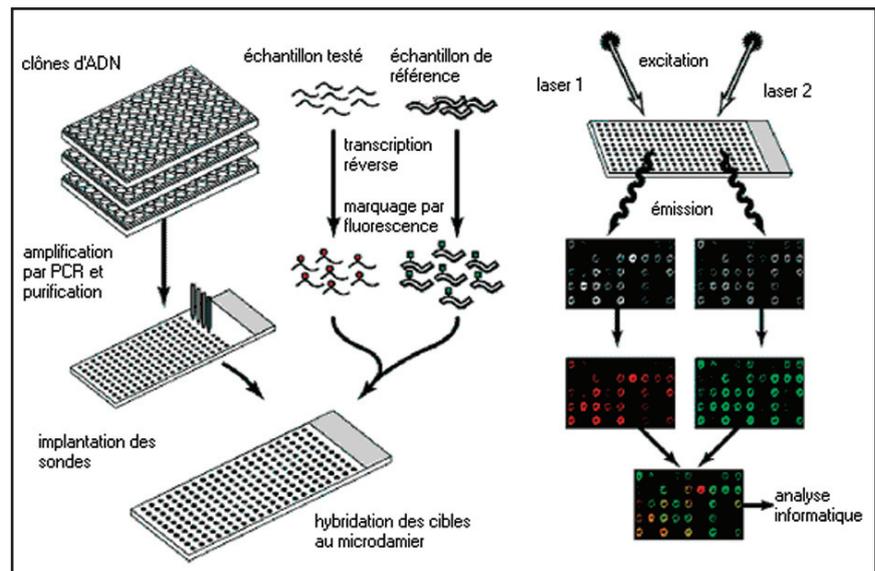
Il faut cependant préciser que si les damiers du type macrodamier sont les seuls à être lisibles à l'œil nu, ils ne sont cependant pas destinés à ce seul mode de lecture ; ils peuvent également bénéficier de méthodes informatiques.

Méthodes alternatives

Certaines méthodes alternatives sont en train de se développer pour palier au problème financier de la robotique et des logiciels. Des méthodes utilisant la précipitation à l'argent sont en cours d'élaboration. Celles-ci devraient permettre une lecture à l'œil nu avec une bonne précision selon le principe de la colorimétrie.

Le principe repose, lors de l'amplification moléculaire par PCR, sur l'association de l'ADN et de la biotine. Après l'hybridation, ces molécules marquées à la biotine sont reconnues par de la streptavidine conjuguée à de l'or. Cet or est le catalyseur d'une réaction qui aboutira

Figure 8 : Lecture des microdamiers à ADN par la fluorescence directe. L'image composite est obtenue après superposition des images issues de la révélation par les fluorescences simples, verte et rouge (modifié d'après Duggan et al., 1999).



à la formation d'un précipité d'argent (figures 10 et 11). Ainsi la localisation du grain d'argent renseigne sur les sondes du microdamier ayant trouvé une complémentarité dans l'échantillon testé. Il faudra tenir compte des éventuelles erreurs dues à la lecture ou à la déviation du rayon permettant la cristallisation.

Analyse d'images et extraction de données

L'extraction de données directement à partir des images obtenues présente de nombreuses difficultés et n'est pas exploitée. L'extraction de données se fait donc majoritairement à partir des signaux obtenus. Les données sont exploitées soit directement sous forme de ratio, soit après modélisation mathématique par des systèmes algorithmiques. Cependant, vu l'amplitude que prend cette branche dans le domaine des biotechnologies et la variabilité de méthodes, le problème posé reste celui de la normalisation et de la validation des différentes méthodes, afin d'obtenir des systèmes universels et reproductibles (voir la section validation des microdamiers). L'exploitation de données est surtout relative et qualitative mais rarement quantitative. En effet, on assiste à la création de banques de données regroupant non seulement des images

Figure 9 : Principe de la révélation colorimétrique des damiers à ADN. Après appariement des produits et un premier lavage, un conjugué formé de streptavidine (complémentaire de la biotine) couplé à une phosphatase alcaline va se fixer à la biotine. Enfin, après un dernier lavage, on ajoute le substrat de l'enzyme qui va former un précipité bleu/mauve là où cette dernière est présente. La position des spots révélés donne l'identité des sondes appariées (modifié d'après AdiaGene, 2003).

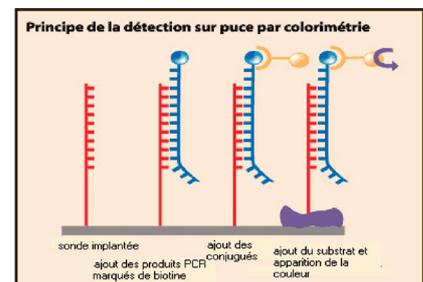


Figure 10 : Principe de la précipitation du grain d'argent catalysée par l'or porté sur la streptavidine (modifié d'après Unité de Recherche en Biologie Cellulaire, 2003).

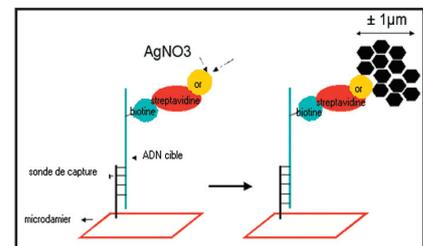
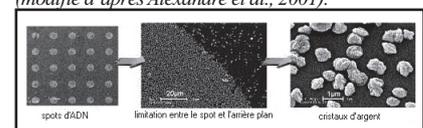


Figure 11 : Précipitation argentine selon le système commercial Silverquant, (vue au microscope électronique). L'image de gauche montre une vue globale de plusieurs spots, celle du milieu la limite d'un de ces spots, et celle de droite les grains d'argent précipités (modifié d'après Alexandre et al., 2001).



types de cellules de référence mais aussi proposant des associations de gènes (Array Prospector, 2004). Ainsi l'utilisateur peut savoir quels gènes auraient tendance à s'exprimer ensemble afin de faire les corrélations les plus pertinentes.

VALIDITÉ DES ÉTUDES À MICRODAMIERS

Devant la multitude de modèles proposés il est nécessaire de rappeler les points importants susceptibles de donner aux microdamiers toute leur crédibilité au sein de la communauté scientifique. Il faut rappeler que les microdamiers, comme toutes les autres méthodes d'analyses biochimiques, fournissent des données qui ne sont à exploiter qu'avec prudence. La crédibilité des études comportant des microdamiers repose non seulement sur la validité du microdamier employé mais aussi sur la validation de la méthode.

Critères de qualité des microdamiers

De nombreux critères sont à prendre en considération pour que le microdamier soit valide, c'est-à-dire pour qu'il soit susceptible de fournir des résultats précis et les moins biaisés possible.

Stabilité des sondes

La stabilité structurale de la sonde doit être vérifiée afin qu'elle ne soit pas dénaturée lors des différentes étapes du protocole, et notamment les différents lavages.

Densité des sondes

Sur le microdamier, pour une hybridation moléculaire efficace, il faut que les sondes soient les plus denses possible. Les méthodes de synthèse *in situ* sont celles qui donnent le maximum de densité, car l'étape limitante dans ce mode de synthèse n'est pas le nombre de sonde – contrairement aux techniques où la synthèse des sondes se fait en dehors du microdamier – mais bien leur longueur (voir la

section fabrication de microdamiers, synthèse *in situ*). Parmi les différentes firmes ayant opté pour ce principe, Affymétrie fait office de pionnier. Parallèlement, NimbleGen produit des microdamiers d'une densité encore supérieure. Xeotron est spécialiste dans les microdamiers aux sondes très longues et Febit commercialise un système complet couvrant la synthèse des sondes jusqu'à l'exploitation des microdamiers.

Hybridations non spécifiques et autofluorescence

Les hybridations non spécifiques peuvent être dues à des éléments souvent répétés dans la séquence, *e.g.* la présence de queue polyA. Les hybridations croisées sont généralement dues soit à la présence d'une séquence en commun sur deux gènes apparentés, soit à la présence en surnombre d'un type d'ADNc dans l'échantillon, ce qui accroît les probabilités d'une hybridation erronée. Ces phénomènes sont à éviter absolument car ils peuvent induire l'investigateur en erreur sur plusieurs points (Chuaqui *et al.*, 2002), dont le nombre de gènes réellement mesurés, l'activation ou non d'une voie biologique lors d'un état pathologique – puisque des gènes apparaîtront comme exprimés alors qu'ils ne le sont pas. Par ailleurs, ces phénomènes rendront la validation de la méthode plus difficile puisqu'on verra apparaître de grosses différences entre les résultats obtenus par les microdamiers et ceux obtenus par les autres méthodes de validation. Les hybridations non spécifiques de l'échantillon peuvent être évitées non seulement en choisissant des sondes significatives et pertinentes mais aussi en jouant sur le matériel utilisé dans le substrat. Aussi certaines firmes utilisent-elles des surfaces très hydrophobes pour éviter que l'échantillon ou la sonde ne viennent s'y fixer (Venkatasubbarao, 2004). D'autres emploient des substances qui permettent des lavages plus intensifs. Enfin il existe des substrats qui ont une autofluorescence plus faible que

les autres et limitent ainsi le bruit de fond.

Choix des sondes

Le choix des sondes est un élément crucial car c'est là que se joue une grande partie de la validité de l'étude. Il faut en effet sélectionner au niveau du génome ou du transcriptome des séquences qui serviront de support pour l'étude. Il faut donc qu'elle soit strictement significative de la partie étudiée. En effet, en schématisant, une sonde trop vaste renfermerait certainement des séquences qui permettraient l'hybridation d'ADNc ne correspondant pas au transcrit recherché alors qu'une sonde trop petite serait trop sélective et ne donnerait pas lieu à toutes les hybridations voulues. Cependant, une sonde courte a l'avantage d'être plus accessible à l'échantillon. A l'échelle du microdamier entier il faut en outre faire un choix de pool de sondes de façon à limiter au maximum les redondances pour augmenter le nombre de gènes testés. Il existe aujourd'hui des logiciels et des banques de données qui permettent de faire des choix de sondes pertinentes. On peut citer GenBank (National Center for Biotechnology Information, 2004) et sa section dbEST (National Center for Biotechnology Information, 2000) et surtout UniGen (National Center for Biotechnology Information, sans date).

Reproductibilité et sensibilité

La reproductibilité est particulièrement bonne si les firmes emploient des méthodes entièrement robotisées et systématisées, de la synthèse des sondes à l'exploitation des données. Pour augmenter la sensibilité des microdamiers, il convient de diminuer le bruit de fond. Pour cela, soit les firmes utilisent sous les microdamiers des réflecteurs métalliques en or ou aluminium pour orienter et concentrer au mieux le flux lumineux vers le réflecteur ou le système de lecture ; soit elles optent pour des matériaux qui ont un bruit de fond faible.

Pour ce qui est des sensibilités relatives des différentes méthodes, elles sont encore peu comparables entre elles car les méthodes et les logiciels employés sont encore trop variés.

Validation des études comportant des microdamiers

La validation des microdamiers repose sur deux questions importantes à savoir :

- les résultats obtenus sont-ils valides par rapport au système biologique étudié ? ;
- les résultats obtenus sont-ils spécifiques au phénomène que l'on souhaite étudier ?

La validation d'une étude utilisant un microdamier se fait en trois phases (Chuaqui *et al.*, 2002) : le contrôle expérimental de la qualité à chaque étape, ensuite la confirmation indépendante des données, et enfin il faut s'assurer de l'universalité des résultats. La validation est donc un problème qui dépasse largement l'échelle de la firme productrice des microdamiers.

Contrôle expérimental des expériences à microdamiers

Ce contrôle expérimental est très important car à chaque étape du protocole peut correspondre un artefact. Cependant certains facteurs affectent significativement l'exactitude des résultats.

Ainsi le fait de répéter les expériences permet d'éliminer une partie non négligeable des erreurs. Il faut intégrer dans ces répétitions les répliques de l'ARN. Pour évaluer le bruit de fond, on peut ajouter aux cibles de l'expérience des morceaux de chaque gène. Leur hybridation pourra donner lieu à de multiples mesures pour évaluer le bruit de fond. Cette mesure sera prise en compte dans l'interprétation des résultats. De même, le système permettant l'acquisition des images associées aux résultats participe souvent aux inexactitudes. En effet, de très nombreux logiciels existent allant de ceux vendus par les firmes productrices de microdamiers à ceux

téléchargeables gratuitement sur l'Internet.

D'autres facteurs sont également concernés mais sont secondaires et ont attiré le plus souvent au traitement des données. De plus, il est très difficile de choisir une méthode statistique d'analyse des résultats car aucune ne fait actuellement l'unanimité. Cela est d'autant plus délicat que c'est avec cette méthode statistique que devront être déterminées les valeurs à partir desquelles un niveau d'expression génétique sera considéré comme significativement modifié. Néanmoins il semble acquis que le traitement des données par des systèmes numériques permet d'éliminer une partie des artefacts dus à un taux d'expression de gènes trop bas par exemple. Enfin les méthodes d'analyse devront être capables d'intégrer l'ensemble des données afin d'en faire ressortir le profil type de l'état pathologique sous-jacent.

Comparaison avec les résultats de référence

Cette comparaison peut être faite de deux façons (Chuaqui *et al.*, 2002), i.e. par une analyse *in silico* ou par des analyses de laboratoire.

Le principe de l'analyse *in silico* est de comparer les résultats de l'expérience avec des résultats publiés dans la littérature ou dans les banques de données. Dans ce cas, aucune autre expérience n'est nécessaire car l'accord, même sur seulement quelques gènes étudiés de l'expérience, entre les résultats obtenus et ceux publiés préalablement suffit à valider l'étude et les éventuelles découvertes qu'elle contient. Cette méthode sera certainement plus employée quand les données seront toutes publiées selon un système standardisé du type *Minimal Information About a Microarray Experience* (MIAME).

Le principe de la validation basée sur un laboratoire indépendant est de vérifier les taux d'expression des gènes trouvés dans l'expérience avec des méthodes autres que les microdamiers, comme la PCR, la PCR en temps

réel, les *Northern Blot et Southern Blot*. Cependant chaque technique a ses limites et ses pièges qu'il faut prendre en compte. L'inconvénient de la validation *in silico* est qu'elle fait intervenir en parallèle différentes techniques d'analyse moléculaire ayant chacune leur sensibilité propre, ce qui fait que les correspondances entre ces techniques sont quelquefois fragiles. Par ailleurs, suite au jeu de gènes choisi par le laboratoire, les investigateurs redéfinissent les niveaux d'expression en se basant souvent sur les gènes avec les plus grands ratios d'expression. Mais en faisant cela, il se peut que des informations quantitatives venant des microdamiers soient perdus concernant les transcrits à faible variation d'expression. Dans l'avenir pour que cette technique soit conservée, il faudra affiner les bases de données quantitatives concernant les microdamiers et créer des tables capables de relier le taux d'ARN transcrit dans l'échantillon et le taux de protéines effectrices dans la cellule.

Universalité des résultats

Veiller à l'universalité des résultats signifie qu'il faut, après la validation précédente, déterminer si les données obtenues sont des éléments essentiels pour la description de l'état biologique étudié. Cette réponse est apportée par l'étude approfondie du jeu de gènes employés et toute une série d'expériences dans des conditions diverses.

Ainsi on pourra savoir si le modèle d'expression génétique observé est un modèle réellement spécifique de l'état pathologique étudié ou s'il s'agit d'un modèle plus général. Des corrélations entre les paramètres génétiques détectés et d'autres paramètres tels que l'âge du patient ou le stade de la maladie pourront être faites pour apporter un maximum d'informations. Les méthodes utilisées pour vérifier l'universalité des résultats sont spécifiques, avec chacune leurs limites et points faibles. La méthode la plus employée est le microdamier à tissu (TMA).

AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA TECHNOLOGIE DES MICRODAMIERS

Comme toute nouvelle technologie, les microdamiers présentent des avantages et des inconvénients. Ces avantages et ces inconvénients sont relatifs à la principale technique concurrente de celle des microdamiers : la technique PCR.

Avantages des microdamiers

Nombre de séquences nucléiques sur un seul microdamier

Les techniques classiques d'études génétiques telles les méthodes de PCR ne permettent, dans le meilleur des cas, de traiter une dizaine de gènes simultanément. C'est pourquoi la localisation d'un locus ou d'une mutation pouvait demander des mois voire des années d'investigations. Les microdamiers, et particulièrement les microdamiers à haute densité, permettent de tester simultanément des milliers de séquences nucléotidiques. Ainsi l'entièreté du génome d'un patient peut être visualisé avec un seul microdamier. De ce fait, les chercheurs peuvent prendre du recul face au génome, pour pouvoir plus efficacement se focaliser sur un groupe de gènes par la suite. Par là même, il est maintenant aisé de voir les associations d'expression pouvant exister entre différents gènes, chez l'individu sain comme l'individu malade.

L'analyse simultanée de plusieurs milliers de séquences génétiques permet d'obtenir avec un seul microdamier les réponses à plusieurs questions. Ces questions peuvent concerner par exemple le diagnostic clinique et le traitement adéquat de la pathologie associée. En particulier, il est prévu d'intégrer sur certains microdamiers de diagnostic clinique, des marqueurs de la résistance aux antibiotiques, dont les bases moléculaires se précisent peu à peu. Sur un même microdamier, le

clinicien pourra donc non seulement identifier le pathogène en cause mais aussi optimiser son traitement en utilisant l'antibiotique adéquat. Ainsi, outre la résistance à la rifampicine qui est bien connue, la résistance à l'isoniazide a été récemment associée à des mutations dans les gènes de la catalase-peroxidase (KatG), dans les promoteurs des gènes *inhA* et *ahpC*, et dans le gène de la protéine *kasA*. De même, la résistance à la pyrazinamide semble associée à des mutations du gène *pncA* et la résistance à l'éthambutol, au gène *emb* (anonyme, 1999).

Coût des analyses

Les microdamiers permettent de faire des analyses beaucoup moins coûteuses qu'avec les méthodes traditionnelles de type PCR. En effet, non seulement un microdamier permet d'analyser simultanément un grand nombre de séquences génétiques, mais en plus ces analyses sont rapides car il n'y a pas de temps de mise en culture ou d'incubation.

Cela est particulièrement appréciable par exemple si l'on se trouve dans les débuts d'une recherche ou d'un diagnostic, et donc dans une grande ignorance. Au lieu de tester à l'aveugle les gènes 10 par 10 par les méthodes classiques de type PCR, il revient certainement moins cher d'utiliser un microdamier permettant de tester en une seule opération l'entièreté des gènes soupçonnés, voire l'entièreté du génome.

C'est également le cas lorsqu'on est amené à faire des recherches identiques soit de haute envergure (*i.e.* un grand nombre de séquences étudiées par analyse) soit à haute fréquence (*i.e.* un analyse qui peut être simple mais répétée très souvent), comme c'est souvent le cas dans beaucoup d'analyses microbiologiques dans le domaine de l'agroalimentaire. Ainsi l'identification de chaque microorganisme recherché lors du contrôle des eaux potables nécessite une analyse spécifique. Un seul microdamier peut identifier, en une

seule fois, plusieurs dizaines de microorganismes. De plus les méthodes traditionnelles d'identification de certains procaryotes peuvent prendre jusqu'à trois semaines alors que le temps moyen d'une analyse à microdamier est de quatre à cinq heures. Les économies sur la totalité des contrôles deviennent alors très importantes. Actuellement avec les techniques classiques, une analyse microbiologique complète pour évaluer la qualité de l'eau potable en contrôle de routine (24 critères) coûte, au total, environ 3000 Euros. Les premières évaluations montrent que, une fois sur le marché, l'analyse par microdamier à ADN pourrait coûter 10 fois moins cher (anonyme, 1999).

Si par contre l'étude en question ne nécessite l'analyse simultanée que d'une dizaine de séquences nucléiques, alors les méthodes du type PCR seront plus rentables.

Précision et fiabilité

Les microdamiers ont prouvé qu'ils étaient capables d'une grande précision. S'ils sont correctement utilisés, une mutation ne touchant qu'un seul nucléotide peut être mise en évidence. Cette précision est primordiale en recherche fondamentale pour l'identification et la localisation de séquences mutées. En clinique, la précision des microdamiers est également sollicitée car par exemple le traitement d'une pathologie bactérienne peut être fonction du sérotype concerné. Or deux sérotypes d'une même bactérie peuvent être identiques à 95 %. On sait par exemple que dans 90 % des cas, la résistance du complexe *M. tuberculosis* à la rifampicine est conférée par des mutations très localisées, situées dans la région du gène codant pour une ARN-polymérase bactérienne, le gène *rpoB*.

Troesch et collaborateurs (1999) 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 du microdamier GeneChip®. Ces sondes, que les auteurs ont disposées sur le microdamier 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. Septante 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 comme telles. L'étude confirme également le pouvoir hautement résolutif du GeneChip®. 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.

Inconvénients des microdamiers

Approche peu quantitative

Les microdamiers sont théoriquement capables de fournir des résultats d'étude sous deux formes : qualitatifs et quantitatifs. Les résultats qualitatifs obtenus sont analysés comparativement aux résultats par exemple obtenus par ce même microdamier employé sur un tissu de référence. Mais les résultats microdamiers ne permettent pas d'obtenir des résultats quantitatifs de qualité. A l'heure actuelle, quand l'échantillon utilisé est marqué à l'aide de fluorescence, l'étude quantitative se fait le plus souvent en analysant le ratio des deux fluorescences ou en étudiant le profil d'intensité de chacune d'elle. Cela reste cependant fort subjectif et bien souvent, même si l'investigateur recueille des données chiffrées il ne pourra les interpréter que relativement aux informations existantes dans les bases de données. Il n'existe pas encore de tables ou de normes chiffrées aidant à la compréhension des études quantitatives à microdamier. C'est

pour cette raison que toute étude nécessitant une quantification précise ne fait pas appel aux microdamiers.

Sensibilité

Ce manque de sensibilité des microdamiers par rapport à la PCR se ressent surtout lors des confirmations des résultats par des laboratoires indépendants. Il ressort qu'en règle générale si la confirmation qualitative est facilement accordée, la confirmation quantitative l'est beaucoup moins. Les microdamiers semblent en effet moins sensibles que les méthodes alternatives de confirmation courantes (*i.e.* PCR, PCR en temps réel, *Northern* et *Southern Blot*). Ainsi, dans l'étude de Rajeevan et collaborateurs (2001) où une version modifiée de la PCR en temps réel était utilisée pour valider une étude utilisant des microdamiers, la validation n'a pu être obtenue pour les gènes dont le seuil d'expression était modifié de moins de quatre fois.

Manipulations préalables de l'échantillon

Les tests ne peuvent en effet être réalisés directement à partir de l'échantillon biologique que lorsque celui-ci est déclaré « positif », c'est-à-dire s'il contient suffisamment d'acide nucléique à analyser (ADN, ARN, ou suffisamment de microorganismes dénombrés au microscope le cas échéant). Si cela n'est pas le cas, l'échantillon est dit négatif et les méthodes génotypiques nécessitent au préalable, de réaliser une amplification du matériel génétique recherché, par culture ou par PCR.

Ces manipulations augmentent considérablement le temps nécessaire à l'obtention des résultats et de fait amoindrissent l'intérêt des microdamiers. De plus, il a été clairement montré que le fait d'amplifier le pool d'ARNm induisait un biais dans les taux relatifs des différents transcrits (Chuaqui *et al.*, 2002). Ce biais semble être lié, entre autre, aux nombres de cycles effectués et au primer utilisé. Cependant ce phénomène peut être utilisé au

profil des chercheurs pour biaiser volontairement le transcriptome et ainsi mettre en avant des gènes dont le taux d'expression en temps normal est trop bas pour être correctement étudiés par les microdamiers. Mais si l'on utilise la PCR à cette fin, la validation de l'étude comportant des microdamiers sera d'une difficulté accrue puisque aucune des méthodes utilisées pour la validation n'a de phase d'amplification.

Validité des études à microdamiers

La crédibilité des études comportant des microdamiers repose non seulement sur la qualité du microdamier employé mais aussi sur la validation de la méthode.

La qualité du microdamier est avérée s'il est construit avec pertinence (voir critères qualité du microdamier). Cela implique que les matériaux choisis résistent aux différentes étapes du protocole mais aussi réduisent le bruit de fond. Cela implique également que les sondes choisies soient significatives des séquences étudiées ou recherchées, ni trop vastes ni trop restrictives. La qualité du microdamier reste donc un problème qui concerne en majorité la firme productrice.

La validation de la méthode est un problème d'une autre envergure (voir section validation des microdamiers). Le but de cette validation est de s'assurer que non seulement les résultats sont valides par rapport au système biologique, mais aussi que ces résultats se rapportent réellement au phénomène étudié. La validation des microdamiers se fait en trois phases (Chuaqui *et al.*, 2002). Premièrement, la qualité du microdamier est contrôlée lors de l'expérience. En effet, à chaque étape du protocole ou à chaque composant du microdamier peut correspondre un artéfact.

Deuxièmement, les données doivent être confirmées par un laboratoire indépendant. Cette confirmation peut se faire *in silico*, c'est-à-dire par simple comparaison avec les données existantes dans la littérature ou dans les

banques de données, ou par des analyses reprenant l'échantillon de l'expérience mais utilisant d'autres méthodes comme la PCR, les techniques de *Northern* ou *Southern Blot*.

Troisièmement, les investigateurs doivent s'assurer de l'universalité des résultats. Cela signifie que l'on doit s'assurer que le modèle d'expression génétique dégagé est réellement propre à l'état pathologique étudié.

Appareillage de lecture

Ce point s'applique surtout aux techniques de microdamiers, les macrodamiers pouvant être exploitables à l'œil nu par simple colorimétrie (voir la section lecture du microdamier).

La lecture et donc l'interprétation du test nécessite une structure inhabituelle dans des laboratoires de routine. Il s'agit en effet d'une caisse noire équipée de laser émettant dans les longueurs d'ondes employées pour la fluorescence. Cette caisse doit elle-même être munie d'un système informatique qui permet le stockage et le traitement des images obtenues. C'est uniquement moyennant ces installations informatiques souvent largement suggérées par les firmes elles-mêmes que la précision et la fiabilité des microdamiers sont garanties (voir la section lecture du microdamier).

EXEMPLES D'UTILISATION DES MICRODAMIERS DANS LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Les microdamiers destinés à la recherche scientifique sont utilisés soit pour analyser le contenu du génome et en détecter une particularité comme une mutation, soit pour analyser le niveau d'expression des gènes et en tirer des informations sur le transcriptome et le protéome cellulaires.

Etude du génome

Les sondes utilisées sont alors issues du génome et sont des fragments d'ADN monocaténaire représentatifs de la portion génomique étudiée. Ce qui est déposé sur le microdamier pour y être

hybridé est le plus souvent de l'ADNc obtenu par manipulation du pool d'ADN récolté dans l'échantillon biologique. Dans ce cas, l'étude peut ne fournir que des résultats qualitatifs. La recherche génétique est bien sûr un des grands secteurs concernés par les microdamiers. De tels outils ont notamment été développés, grâce à l'extrême précision des microdamiers, pour identifier des mutations génétiques.

La recherche des mutations est un point crucial dans l'établissement de diagnostic et la recherche de résistance associée aux microorganismes pathogènes. En effet, certaines zones du génome des microorganismes sont fortement polymorphiques. Ces variations génétiques peuvent conditionner par l'exemple le genre du microorganisme ou certaines de ces propriétés comme sa résistance à certaines thérapeutiques. La mise au point dans le cadre de la recherche fondamentale de microdamiers spécifiques des agents pathogènes est très attendue par les cliniciens. En plus de la détection parmi plusieurs centaines de microorganismes de l'agent pathogène recherché, les cliniciens pourront adapter le traitement de leur patient en utilisant les substances thérapeutiques adéquates (e.g. antibiotiques et antirétroviraux).

Etude du transcriptome : ouverture de nouvelles pistes pharmacologiques

Les microdamiers, par l'étude et la quantification des pools d'ARN cellulaires, se révèlent être des outils remarquables pour analyser le fonctionnement des gènes par leur niveau d'expression dans certains tissus. Les microdamiers déterminent donc les gènes qui sont spécifiquement actifs ou inactifs dans un contexte pathologique donné.

Cette propriété est à la base de nombreuses applications dans les domaines biologique et médical comme la classification des pathologies, la compréhension des processus biologiques de base ou l'identification de cibles pour de nouveaux médicaments.

Analyse des niveaux d'expression des gènes

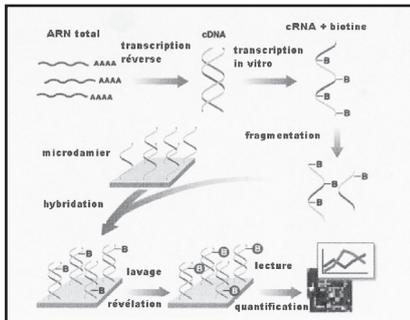
Les sondes utilisées dans le cadre de l'analyse du niveau d'expression des gènes sont des oligonucléotides créés pour être complémentaires aux molécules d'ARN récoltées dans l'échantillon biologique. Ce qui est déposé sur le microdamier pour y subir l'hybridation est de l'ARNc obtenu par transcription inverse suivie de transcription *in vitro* (figure 12). Le but étant de fournir des informations sur les niveaux d'expressions de gènes ciblés, l'étude devra donner des résultats quantifiables.

Les éventuelles sur- ou sous-expressions géniques détectées à cette occasion, qui constituent le profil d'expression génétique de l'individu, pourront par la suite être mises en relation avec un état pathologique ou constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Jusqu'à récemment, la comparaison des niveaux d'expression des gènes dans un tissu ou dans une cellule était limitée à l'étude de quelques gènes à la fois avec les techniques classiques de PCR. Avec les microdamiers, il est possible d'étudier simultanément l'activité de milliers de gènes.

Une vision globale de l'expression des gènes dans une cellule est souvent essentielle pour une compréhension générale de sa fonction. Par exemple, on estime qu'entre 0,2 à 10 % des 10000 à 20000 sortes d'ARN messenger dans une cellule de mammifère est exprimé différemment s'il s'agit par exemple d'une cellule cancéreuse ou saine (Affymetrix, sans date a). Mais cette vision relative serait impossible sans passer par une analyse de l'entièreté du génome. La technologie des microdamiers semble primordiale même quand le but final est de se focaliser sur quelques gènes. Le fait de surveiller en une fois de multiples gènes permet d'identifier une sorte de « signature » ou profil de la maladie. Les microdamiers permettent du même coup de suggérer des lieux d'actions très ciblés pour les thérapeutiques concernées.

La précision des microdamiers est une condition obligatoire dans ce

Figure 12 : Utilisation de microdamiers dans le contexte de l'analyse des gènes. L'ARN de l'échantillon biologique subit une transcription inverse suivie d'une transcription *in vitro* au cours de laquelle l'ARN obtenu sera marqué par la biotine, qui servira à la lecture du microdamier. Après lavage des brins non appariés, le microdamier est exploité qualitativement et quantitativement grâce à l'utilisation de l'informatique (modifié d'après Affymetrix, sans date a).



contexte puisqu'il semble que nombre de pathologies aient pour source soit des gènes très légèrement différents, soit des gènes corrects mais avec un niveau d'expression anormal. Pour ce qui est des gènes légèrement différents, les microdamiers peuvent couramment différencier des transcrits qui sont identiques jusqu'à 90 % et sont donc tout à fait adaptés à ces études. Par contre, pour ce qui est des gènes qui ont une expression anormale, la quantification des résultats est nécessaire. Or les résultats des études utilisant les microdamiers sont le plus souvent exploités qualitativement en relation avec les résultats stockés dans les banques de données ou avec les échantillon de référence utilisés lors des manipulations. L'exploitation quantitative des résultats fournis par les microdamiers se met en place mais n'est pas à la hauteur de l'exploitation qualitative des résultats d'étude.

En s'appuyant sur les propriétés de ces microdamiers, les chercheurs utilisent les sondes à ARN pour étudier la régulation de l'expression des gènes en association avec une grande variété de fonctions biologiques, e.g. le développement de l'individu, les systèmes de contrôle et l'étude des rythmes circadiens. De même, plusieurs études utilisent les microdamiers pour aborder d'une nouvelle façon les pathologies. L'aire d'application

des microdamiers est grandissante notamment dans les domaines de la recherche contre le cancer, où ils ont aidé les chercheurs à identifier de nouvelles classes de tumeurs et à créer des relations entre certains types de cancer et des altérations moléculaires.

Identification de nouvelles cibles thérapeutiques

La mise au point de nouveaux médicaments par une approche rationnelle passe par l'identification des gènes qui participent aux mécanismes moléculaires fondamentaux associés aux grandes pathologies. Or les microdamiers permettent justement de détecter quels sont les gènes spécifiquement activés ou inactivés dans les tissus malades. Les microdamiers sont donc d'une aide précieuse pour identifier les gènes étroitement associés aux processus physiopathologiques.

Ces gènes et les protéines qui leur correspondent sont autant de cibles thérapeutiques potentielles sur lesquelles les chercheurs de l'industrie pharmaceutique peuvent ensuite concentrer leur effort.

Identification des effets secondaires des thérapies

Les microdamiers permettent, parfois bien avant la réalisation des premiers essais cliniques, de déterminer qu'un produit pharmaceutique en cours de développement perturbe grandement l'activité de gènes essentiels à la bonne marche de la cellule ou l'intégrité d'une fonction physiologique essentielle. Dans ce cas, il est possible de prédire la nature des effets secondaires ou indésirables qui pourraient être associés à l'emploi de la molécule. Le principe actif peut alors immédiatement être revu pour éviter ses actions néfastes, avant même d'être arrivé à la fin du protocole d'élaboration du médicament. Les économies en terme de temps et d'essais cliniques peuvent donc être considérables. L'utilisation de microdamiers dans les protocoles d'élaboration des médicaments participe donc à la sécurité des utilisateurs.

Etude du métabolisme des principes actifs

Les microdamiers permettent de déterminer quels sont les gènes dont l'activité est modulée dans une cellule sous l'action d'un médicament. Il devient ainsi possible de faire l'inventaire des gènes dont le fonctionnement est influencé par un principe actif, et donc d'avoir une vision plus complète du mode d'action du principe actif. Mieux comprendre la panoplie des effets moléculaires générés par un médicament peut, là encore, déboucher sur de nouvelles pistes pharmacologiques, jusque là insoupçonnées.

Adaptation au profil de chaque patient

La vitesse à laquelle de nombreux médicaments sont dégradés dans l'organisme dépend d'un ensemble d'enzymes présents dans le foie (e.g. système des cytochromes P450). D'une personne à l'autre, on constate des variations génétiques ou encore des différences dans le niveau d'expression des gènes qui gouvernent la synthèse de ces enzymes hépatiques. Ceci pourrait expliquer les différences observées entre patients dans leur réponse individuelle aux médicaments. On a ainsi recensé plus d'une quinzaine de polymorphismes (variations génétiques) touchant les systèmes enzymatiques du foie. Des microdamiers ont été développés qui permettent de détecter ces polymorphismes et de quantifier le niveau d'expression des gènes. Grâce aux microdamiers, la connaissance de ces polymorphismes génétiques permettra de mieux ajuster le choix et les doses des traitements en fonction du profil génétique de chaque patient.

EXEMPLES D'UTILISATION DES MICRODAMIERS DANS LE DIAGNOSTIC CLINIQUE

Les microdamiers destinés au diagnostic servent à mettre en évidence la présence ou l'absence

de certaines séquences génétiques parmi des milliers. Cette analyse n'est actuellement que qualitative.

L'utilisation des microdamiers en clinique concerne à l'heure actuelle deux grandes activités : le diagnostic et le choix de traitement de première intention en microbiologie et en cancérologie. Néanmoins cette pratique est loin d'être systématisée et est encore fort liée aux activités de recherche.

Diagnostic et traitement des infections à mycobactéries

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

Dans différents travaux (Troesch *et al.*, 1999 ; Sougakoff *et al.*, 2004 ; Vernet *et al.*, 2004), deux des grandes questions du diagnostic biologique des infections à mycobactéries sont traitées simultanément en utilisant un même microdamier, GeneChip® : 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

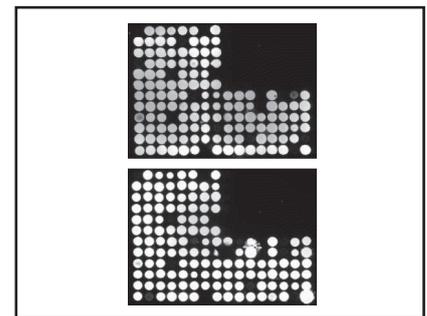
questions sont devenues cruciales pour la mise en oeuvre immédiate d'un traitement adapté.

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 de nombreuses bactéries dont les mycobactéries, et son analyse permet d'en retrouver la signature. Il faut insister sur le fait que l'intérêt principal des microdamiers comparativement à la traditionnelle PCR est, outre sa sensibilité, la capacité de tester simultanément des milliers de séquences génétiques. C'est grâce à cette propriété qu'il est maintenant possible de créer une base de données d'« empreintes digitales » de bactéries, comme *Listeria monocytogenes* (Call *et al.*, 2003) (figure 13) ou celles de la famille des mycobactéries.

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, la résistance à la rifampicine est conférée par des mutations très localisées, situées dans la région du gène codant pour une ARN-polymérase bactérienne, le gène *rpoB*.

Troesch et collaborateurs (1999) 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 du microdamier GeneChip®. Dans ce contexte, la précision et la fiabilité des microdamiers ont été sollicitées et les résultats ont confirmé l'efficacité de cette technologie (voir la section précision et fiabilité). Grâce à l'utilisation des microdamiers, non seulement les différentes souches de mycobactéries ont pu être identifiées

Figure 13 : Un microdamier utilisé pour l'identification de sérotypes de *Listeria monocytogenes* grâce à l'étude de la région génomique correspondant à l'ARN 16S. De l'ADN génomique a été extrait de deux sérotypes de *Listeria* et hybridé à deux microdamiers identiques. Chaque photographie représente la même partie d'un microdamier plus grand après une détection utilisant un signal d'amplification à la tyramide. Les spots visibles représentent des séquences présentes dans l'ADN échantillonné (et inversement les spots absents indiquent que les séquences concernées sont absentes de l'échantillon). Dans cet exemple, huit spots sont différents entre les deux échantillons. Les séquences correspondantes pourront dès lors servir de base pour caractériser les différents sérotypes (d'après Call *et al.*, 2003).



mais en plus les souches résistantes à la rifampicine ont toutes été différenciées comme telles. L'intérêt de l'utilisation clinique des microdamiers est donc que en une seule manipulation le praticien peut identifier clairement l'espèce de mycobactérie en cause et faire un choix antibiotique adapté en première intention grâce à la détection des résistances antibiotiques.

Ce qui est valable ici pour le diagnostic et la thérapie des pathologies liées à des bactéries pourrait également l'être pour le reste de la microbiologie, c'est-à-dire pour les pathologies engageant des virus ou des parasites.

Diagnostic et thérapie des cancer

L'utilisation de l'intelligence artificielle pour l'exploitation des données venant de l'utilisation des microdamiers a beaucoup retenu l'attention ces dernières années dans le domaine de la cancérologie car elle laisse entrevoir des possibilités de diagnostic automatisé dans un futur proche. Des études ont en effet été publiées prédisant le type de tumeur, son lien éventuel avec les récepteurs à œstrogène, et des pronostics par utilisation

d'algorithmes mathématiques (Greer et Khan, 2004).

Cela est possible grâce à l'établissement par les microdamiers de « signatures » génétiques caractéristiques de certains états cancéreux au niveau cellulaire. En effet, lors de dérèglements du cycle cellulaire de type cancer, le taux d'expression génétique varie pour 0,2 à 10 % des 10 000 à 20 000 sortes d'ARN messager contenu dans une cellule de mammifère (Affymetrix, sans date a).

En médecine humaine, les cancers les plus investigués dans ce sens sont ceux touchant la prostate, le colon, le sein et la peau. Dans ce dernier cas, Nambiar et collaborateurs (2004) publient une étude faisant le lien spécifiquement entre les microdamiers, la détection et l'identification de mélanomes. En effet, plusieurs événements spécifiques de la transcription et de l'expression génétique peuvent être corrélés avec différentes étapes de la maladie ou même avec la transformation du grain de beauté en mélanome. Cette approche a permis de faire un lien plus précis entre la sur-expression (ou la sous-expression) de certains gènes et la pathologie, ainsi que de faire une classification des différents types de tumeurs selon leurs caractéristiques fonctionnelles. Il faut cependant faire preuve de rigueur et de précision lors de manipulations et des interprétations car il existe de nombreux pièges dans l'utilisation des microdamiers qui pourraient amener à des conclusions erronées (voir la section critères qualité des microdamiers).

Autres exemples d'utilisation des microdamiers dans le cadre de la clinique

Si historiquement les microdamiers ont trouvé leurs premières applications dans les diagnostics de cancers et infections bactériennes, de nombreux autres microdamiers sont commercialisés pour étudier les réseaux de gènes impliqués dans différentes pathologies humaines, *i.e.* les maladies cardiovasculaires, les pathologies inflammatoires

et auto-immunes, les diabètes et différents types de pathologies liées au développement et à la régénération cellulaire.

Concernant les pathologies du système immunitaire, les microdamiers développés permettent la surveillance du profil d'expression de gènes correspondant aux molécules importantes du système immunitaire, comme les interleukines, certains récepteurs, ou des marqueurs de l'activation lymphocytaire. De nombreuses pathologies, comme l'asthme, sont étudiées sous cet angle. L'étude des diabètes se fait grâce à l'étude du profil d'expression des gènes responsables du métabolisme de composés endogènes et exogènes. Une régulation aberrante de ces gènes peut non seulement créer des maladies métaboliques mais encore affecter le pronostic de plusieurs autres pathologies, comme le cancer.

Les pathologies dues à des désordres du développement ou de la régénération cellulaire sont diagnostiquées par des microdamiers orientés sur les gènes responsables du développement et de la fonction de chaque type cellulaire. Certains microdamiers permettent d'examiner en parallèle les gènes caractéristiques par exemple de l'ostéogenèse et des cellules souches. Les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les cellules souches sont généralement les plus investiguées dans ce contexte.

D'autres microdamiers permettent de mettre en évidence les profils d'expression de gènes codant pour les ligands, les récepteurs, les modulateurs intracellulaires ou les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée et de la réponse au stress cellulaire.

EXEMPLES D'UTILISATION DES MICRODAMIERS EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Si la recherche concernant les microdamiers et ses applications associées

en sciences vétérinaires ont mis quelques années à se mettre en place, c'est un domaine qui est maintenant en pleine ébullition. En effet, toutes les propriétés des microdamiers évoquées précédemment ainsi que toutes les études réalisées jusque là sont autant de portes ouvertes pour les sciences vétérinaires.

Particularité des microdamiers appliqués aux sciences vétérinaires

Les études exploitant les microdamiers en médecine vétérinaire ont pour la plupart commencé avec des microdamiers conçus sur base du génome humain et initialement destinées à la médecine humaine.

Cependant, des études ont montré qu'il était possible, d'utiliser ce genre de matériel avec une fiabilité acceptable. Ainsi, Tsoi et collaborateurs (2003) expliquent l'utilisation de microdamiers humains à ADNc dans le cadre de l'identification et de la mesure de l'expression différentielle de gènes hépatiques du saumon d'Atlantique lors d'une infection à *Aeromonas salmonicida*.

Le microdamier employé est associé à du ADNc issu d'ARN isolé à partir de foies de saumons infectés et témoins. Sur les 4131 spots disponibles sur le microdamier Gene-Filter GF211, 241 montrèrent une hybridation dans le cas des saumons témoins. Parmi ces spots, quatre montrèrent une différence significative (plus de deux fois plus) d'expression selon qu'il s'agissait de saumons sains ou infectés. Ces gènes correspondaient à ceux de la translocase à ATP/ADP, à la pompe à Na⁺/K⁺, à l'acyloxyacyl hydrolase ainsi que d'autres molécules. Ces résultats ont été confirmés en réalisant une étude « classique » à la PCR sur les régions concernées du génome.

Un autre contexte qui a permis la validation des microdamiers issus de la médecine humaine est celui de l'étude des cancers de la chaîne mammaire chez la chienne. Sanots et collaborateurs (2003) ont expliqué comment et

avec quel matériel ils avaient évalué la pertinence de ce parallèle entre médecine humaine et vétérinaire. La déviation du matériel de médecine humaine semble dès lors tout à fait justifiée dans certains cas.

Depuis quelques années, les progrès de la bioinformatique ont permis à de nombreux chercheurs de se lancer dans la création de banques de données spécifiquement animales.

Coussens et Nobis (2002) expliquent comment l'informatique et le haut débit peuvent servir d'appui pour la création de ressources génétiques dans le cadre de l'étude de l'immunobiologie bovine. En effet, bien que très puissante dans la révélation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire chez les animaux de rente, le développement des microdamiers était restreint par le manque de gènes connus. Pour palier à ce problème chez le bovin, la PCR en temps réel et l'informatique haut débit ont été combinés pour créer des amplicons représentant 270 gènes bovins dont les orthologues dans les autres espèces (souvent homme et rongeur) étaient impliqués dans la réponse immunitaire. Pour ce faire, deux lots d'animaux ont été créés : ceux qui étaient « non stimulés » et ceux qui étaient stimulés par la concanavaline A (ConA). Les segments de gènes amplifiés ont été préparés avec de l'ADNc correspondant à l'ARN issu des cellules sanguines mononucléaires. Au total 276 gènes ont été ainsi amplifiés et codifiés. Ils sont repris dans la banque de données créée dans le but d'encourager à la dissémination de cette méthode de travail (Coussens et Nobis, 2002). Au début de l'année 2005, 1433 génomes viraux, 215 génomes procaryotes et près de 20 génomes eucaryotes dont ceux de certains de nos animaux domestiques sont entièrement décryptés. Beaucoup de banques de données relatives sont disponibles sur internet. L'énorme afflux de données généré par l'utilisation massive des microdamiers a nécessité la mise en place de systèmes de gestion et de comparai-

son de ces données (Gardiner-Garden et Littlejohn, 2001).

Au début de l'année 2005, 7 génomes de mammifères sont disponibles en plus de celui de l'homme : il s'agit du chien, de la vache, de la souris, du rat, du chat, du chimpanzé, du porc et du mouton (National Center for Biotechnology Information, 2005). Ces génomes ne tiennent pas encore compte des variabilités d'espèce (*e.g.* les différences entre un Blanc-Bleu-Belge et une Pie Noire Holstein). Pour autant ils sont déjà suffisants dans la plupart des cas et leur utilisation permet des études plus efficaces que l'utilisation de microdamiers humains. Parallèlement au génome, il existe des données concernant les transcriptomes (*i.e.* les séquences des ARNm) de ces mêmes animaux. Ces données peuvent elles aussi être utilisées dans le cadre d'étude à microdamiers où l'ARN de l'échantillon biologique est analysé (National Center for Biotechnology Information, sans date). On peut s'attendre, grâce aux avancées de l'informatique dans ce domaine et à la pression de la demande, à ce que durant les prochaines années la plupart des génomes et transcriptomes de nos animaux domestiques soient décodés. L'utilisation des microdamiers en sciences vétérinaires sera bien spécifique à ce domaine, et non plus une extrapolation des activités humaines.

Perspectives en recherche vétérinaire

Les microdamiers sont potentiellement utilisables pour la recherche fondamentale dans la compréhension de mécanismes moléculaires encore obscurs tels que les stress (qu'ils soient physiologiques, pathologiques ou environnementaux) ou certains processus immunologiques (*e.g.* la vaccination, l'infection). Les animaux les plus étudiés en immunologie sont les ruminants. Les bovins ont été particulièrement étudiés sur le plan immuno-endocrinologique lors de périodes d'homéostasie altérée au cours de différentes situations (*e.g.* stress, infection) (Tao *et al.*, 2004).

Sur les 167 séquences d'ADNc obtenues, Tao et collaborateurs ont classé celles qui correspondent effectivement à des gènes de fonctions endocrines ou inflammatoires. Ils expliquent ensuite comment ils ont construit et standardisé leur microdamier pour arriver à des résultats très clairs à la fois en immunologie (concernant les taux d'expression des molécules présentatrices d'antigène) et en endocrinologie (le seul gène concerné lors des situations étudiées est celui de la prolactine). Leur conclusion est axée sur les possibilités d'extension de ces méthodes à tous les ruminants ainsi qu'au porc grâce aux fortes homologies génétiques relevées entre ces espèces.

Des études sont également largement menées chez le porc qui est un animal amplement sujet au stress, notamment dû à une sélection excessive. Des expériences visent à établir comment réagit le système immunitaire d'un porc au cours d'une infection microbienne, d'une intoxication, ou lors du sevrage. La réponse du système immunitaire d'un animal face à un stress mobilise de nombreux gènes. Il est donc très intéressant, pour avoir une vision globale à cette réponse, de pouvoir étudier simultanément l'expression de l'ensemble des gènes impliqués. Un microdamier a été développé (Institut National de la Recherche Agronomique, 2002), permettant de visualiser l'expression de plus de 100 gènes du système immunitaire du porcelet. Avec cet outil, les chercheurs étudient les changements intervenant dans l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et peuvent obtenir un profil caractéristique du statut immunitaire de l'animal. De nombreuses applications peuvent découler de ces travaux de génomique, dans le domaine du bien-être animal et de la protection de la santé des animaux et des consommateurs. Par ailleurs, les chercheurs s'intéressent depuis de nombreuses années aux mycotoxines, substances produites par des champignons et susceptibles de contaminer l'alimentation animale et humaine à tous les stades de la chaîne

alimentaire. Outre un effet promoteur dans des processus cancéreux, certaines de ces mycotoxines peuvent altérer les fonctions immunitaires de l'homme et de l'animal à de très faibles concentrations. Si les effets immunodépresseurs des mycotoxines sont suspectés depuis longtemps, leur étude est très récente et très partielle. Le porc, par son alimentation riche en céréales, est une espèce exposée à de nombreuses mycotoxines. Les microdamiers permettent de caractériser dans leur globalité les altérations du système immunitaire provoquées par l'ingestion de ces toxines. En terme de valorisation, ce travail peut permettre de déterminer les doses de mycotoxines qui n'altèrent pas la réponse immunitaire de l'hôte. Ces valeurs pourraient être utilisées dans l'établissement des normes en alimentation animale et humaine.

Le sevrage est une période critique de l'élevage du porc, propice aux troubles digestifs et aux infections du fait de l'arrêt de la protection immunitaire apportée par le lait maternel. Il s'accompagne de modifications importantes de la morphologie ainsi que des propriétés physiologiques et digestives de l'intestin. Une inflammation de la muqueuse a été décrite et semble liée à l'expression de cytokines au niveau intestinal. Le microdamier permettra une analyse approfondie des modifications immunologiques provoquées par le sevrage. Il est par ailleurs possible que cette réponse immunitaire puisse être modulée par voie alimentaire (ingrédients particuliers, prébiotiques, probiotiques...), ce que les chercheurs peuvent vérifier en utilisant les microdamiers. Ce travail peut permettre de déterminer une signature d'expression des gènes, caractéristique d'un animal en bonne santé du point de vue immunologique et de tester différents aliments dans cette optique.

Perspectives cliniques

Les seules applications cliniques réelles à ce jour concernent les cancers de la chaîne mammaire chez la chienne.

La suite logique de l'étude de cas vétérinaires à l'aide de matériel humain a ici aussi amené à la création de microdamiers propres à l'espèce, c'est-à-dire utilisant le génome canin cloné et séquencé. La difficulté principale a dès lors été de valider ces microdamiers. De nombreux contrôles d'hybridation ont donc été menés selon différents modèles (Thomas *et al.*, 2003).

Une fois ces validations réalisées, il a fallu dégager les origines possibles de différents caractères des tumeurs observées (*in vivo* et *in vitro*). La première cause de comportement cancéreux est la présence d'une région génétique non ou mal balancée (c'est-à-dire non ou mal représentée dans le génome cellulaire). Celle-ci est totalement identifiable par l'utilisation des microdamiers canins évoquées plus haut (Thomas *et al.*, 2003).

Par ailleurs, une autre piste amenant au caractère cancéreux de la cellule est à chercher dans sa capacité à ré-entrer dans le cycle de multiplication. En effet, l'entrée en phase tumorale se caractérise plus par l'augmentation du nombre de cellules en division que par une augmentation de la rapidité de division. Or les entrées et sorties du cycle de multiplication des cellules sont contrôlées à différents niveaux par des complexes moléculaires (cyclines kinases et/ou facteurs de transcription associés comme les gènes Rb et p53). Avec les études de Bird et collaborateurs (2002), l'expression des gènes relatifs à ces différentes molécules a été décrite par des microdamiers utilisés dans des modèles comparés de cellules de lignée normale en reproduction, ou de cellules à caractère tumoral (tumeurs primaires ou secondaires) d'une part, et entre l'homme et le chien d'autre part.

Il ressort de cette étude complexe que certaines séquences géniques se retrouvent exprimées uniquement dans le cadre de cellules mammaires canines cancéreuses (et pas dans les fibroblastes canins normaux). Cela suggère donc que ces gènes, qui ont pu être dès lors clairement identifiés,

séquencés et localisés, ont un rôle important dans la dérégulation et la prolifération cellulaire dans le cancer mammaire chez le chien.

Mais une fois la tumeur établie, certains critères la différencient selon son agressivité. Parmi ces critères apportant une différence fonctionnelle aux tumeurs, la capacité de croissance, la capacité à se métastaser spontanément, la motilité, l'adhérence et la capacité à se vasculariser sont exacerbées.

Lors d'une approche comparée pour tenter de mettre en évidence les déterminants génétiques des métastases dans le cas des ostéosarcomes, Khanna et collaborateurs (2001) ont utilisé des microdamiers réalisés avec des gènes de rongeurs. Cette analyse a révélé que 59 gènes étaient exprimés différemment selon qu'il s'agissait de tumeurs moins agressives (type K12) ou plus agressives (type K7M2). Parmi eux, 11 sont impliqués dans la motilité, le squelette cellulaire, l'adhérence et le pouvoir d'angiogénèse, ce qui accrédite la base de la différence de comportement entre K12 et K7M2. Enfin l'utilisation des microdamiers a même permis d'isoler et identifier Erzin, qui est un gène qui n'avait jamais été décrit dans le cadre des ostéosarcomes. Grâce aux microdamiers, le gène Erzin a été quantifié comme étant trois fois plus exprimé dans les tumeurs K7M2 que dans K12. Erzin intervient dans la liaison de la cellule cible avec son cytosquelette et rentre donc en compte dans les fonctions de motilité, invasion et adhérence. Ces résultats ont été confirmés par des études de type *Northern* et *Southern Blot*.

Les microdamiers ont donc permis dans ce cas de mieux comprendre les mécanismes relatifs à l'agressivité d'une tumeur, et à se focaliser sur un gène en particulier, Erzin. Mais des études supplémentaires menées par la même équipe dans le cas de tumeurs primaires ou secondaires chez le chien ont mis en relation le taux d'expression de Erzin avec le stade de la tumeur et son origine. Ils ont ainsi mis en

évidence que Erzin était exprimé dans 81 % des ostéosarcomes, mais en plus il l'était de façon beaucoup plus intense dans le cadre de métastases pulmonaires (tumeurs secondaires de l'ostéosarcome) que dans les tumeurs dites primaires.

A la suite de cette étude, on comprend l'utilité des microdamiers dans la mise en œuvre de tests cliniques canins qui associeraient le diagnostic de métastases aux cibles génétiques déterminées. En effet, un microdamier utilisé dans ce contexte en clinique renseignerait sur la nature exacte de la tumeur en cause en établissant les sur et les sous expressions de certains gènes. Ce même microdamier permettrait ainsi la mise en place directe et immédiate d'un traitement adéquat car il prendrait en compte toutes les caractéristiques du cancer. Cette approche, caractéristique des études à microdamiers, est bien sûr potentiellement transposable à d'autres pathologies.

Perspectives en productions animales

Depuis toujours, une grande partie de l'action vétérinaire est tournée vers l'amélioration des cheptels en vue de la valorisation de certains caractères animaux (productivité, résistance...).

Or les microdamiers ont un pouvoir potentiel énorme en ce qui concerne l'étude et l'appréciation de tous les phénomènes du développement animal, de la reproduction et de la fertilité... En effet, grâce aux microdamiers, les chercheurs sont dans la capacité de faire un lien entre le profil génétique d'un animal ou d'une lignée et ses caractéristiques. Ces caractéristiques peuvent être favorables (*e.g.* augmentation de la masse musculaire, grande prolificité, résistance à certains pathogènes) ou défavorable (*e.g.* sensibilité accrue à certains parasites, dégénérescences articulaires). Dans ce contexte, les microdamiers peuvent également avoir une autre application : ils peuvent en effet être d'une grande utilité pour ce qui est de l'étude de l'héritabilité et de

l'additivité d'un caractère par exemple. Les microdamiers peuvent donc aider à mettre en place des stratégies de sélection ou de croisement des animaux.

Ainsi dans le domaine porcin par exemple, on a obtenu, après plusieurs générations de sélection, des truies avec des caractéristiques reproductives exacerbées. Pour comprendre l'origine de ces caractères, la méthode de la PCR différentielle a été associée à l'utilisation de microdamiers (Gladney *et al.*, 2004). Il en ressort qu'après de longues générations de sélection l'expression des gènes dans le follicule ovarien est différente selon que l'on considère une truie issue de cette sélection ou non. Ces variations représentent les variations alléliques employées consciemment ou non lors de la sélection, ainsi que des changements transcriptionnels dans différents gènes.

Il faut insister sur le fait que ces changements d'expression concernent non seulement des sur-expressions mais également des sous-expressions, voire un arrêt total d'utilisation du gène considéré. Tant dans un sens que dans l'autre, les changements dans les niveaux d'expression génétiques sont des renseignements précieux à prendre en compte.

Il apparaît dès lors évident que cette corrélation génétique/caractère voulu pourrait dans l'avenir être employée en sens inverse : partir de l'analyse génétique pour arriver à la constitution d'un cheptel.

Par ailleurs, il serait intéressant de pouvoir « épurer » les cheptels de certains profils génétiques dont on sait qu'ils sont en lien avec des faiblesses ou des pathologies (la scrapie du mouton par exemple). Ou encore il serait tentant de sélectionner des animaux sur leur résistance avérée à certaines pathologies. C'est le cas, par exemple, chez le poulet par rapport à la maladie de Mareck (Liu *et al.*, 2001).

Cette pathologie est due à la présence dans le poulet d'un herpes virus qui induit un cancer des cellules T. Parmi

les loci antérieurement étudiés, on sait que certains sont en lien avec un caractère de résistance à la maladie pour le poulet. Mais toute la difficulté se trouvait alors dans l'identification de ces loci et dans la création de marqueurs associés qui permettraient une mise en évidence rapide. Les microdamiers ont alors été utilisés pour visualiser les différences d'expression génique entre les poulets résistants et sensibles, ou encore dans les lymphocytes infectés par le virus.

Les microdamiers utilisés ont été au préalable validés par des méthodes de PCR. L'étude de ces poulets par les microdamiers (dont la majorité des séquences utilisées avaient leurs gènes orthologues dans l'espèce humaine) ont permis non seulement d'établir l'existence d'un nouveau groupe synténique, mais également d'identifier un des gènes dont l'expression différentielle est en lien avec la résistance génétique vis-à-vis de la maladie de Mareck.

Selon le même principe mais concernant les productions porcines, la sélection des porcs résistants au stress ou à d'autres pathologies pourrait être largement facilitée par la mise en place et l'utilisation de microdamiers dédiés à la sélection de porcs résistants.

Perspectives dans le domaine des denrées alimentaires d'origine animale

Analyses microbiologiques d'inspection sanitaire

Les applications des microdamiers sont larges également dans le domaine de contrôle de la qualité en milieu industriel. En effet, ils sont impliqués parallèlement aux méthodes d'analyses microbiologiques traditionnelles dans le contrôle de la qualité sanitaire des entreprises agro-alimentaires. Cependant, à l'heure actuelle les microdamiers sont surtout des outils permettant une analyse qualitative et non pas quantitative. Il ne s'agit donc pas d'un outil pour déterminer le taux de certaines bactéries mais pour déterminer la présence de bactéries pathogène-

nes ou de spores interdites. L'intérêt du microdamier dans ce cas est que sur un seul microdamier et en quelques heures tous les microorganismes pathogènes peuvent être testés, y compris ceux qui sont de culture difficile voire impossible.

Traçabilité alimentaire et détection des organismes génétiquement modifiés

Dans une chaîne de production agroalimentaire, les microdamiers sont des outils particulièrement efficaces pour reconnaître l'origine des espèces animales qui composent les produits alimentaires (traçabilité), mais également pour détecter et contrôler dans des semences des séquences provenant d'organismes génétiquement modifiés (OGM).

En ce qui concerne la traçabilité, il s'agit d'une puce qui est construite pour la détection de marqueurs spécifiques d'une espèce animale et plus précisément d'une lignée particulière. Cette traçabilité moléculaire est complémentaire de la traçabilité administrative (passeport de l'animal) et physique (signalement et boucles auriculaires). Elle est utilisée surtout dans la chaîne bovine et dans deux circonstances principalement : lors de la perte de plus de deux boucles auriculaires par un même animal, ou lors de contrôles poussés de traçabilité dans les processus d'abattage et de transformation de la viande. L'échantillon biologique est ainsi constitué par un prélèvement sur l'animal ou la carcasse. Le profil génétique obtenu par le microdamier sera comparé avec celui des follicules pileux gardés en réserve lors d'une boucle auriculaire ou avec celui des oreilles elles-même lors de l'abattage. En ce qui concerne la détection d'OGM, le principe reste le même. Ce sont des marqueurs spécifiques des zones génétiques modifiées qui sont mises en évidence. Les microdamiers serviraient à identifier et quantifier les OGM dans les matrices alimentaires.

CONCLUSIONS

Le microdamier est réellement une voie d'approche fascinante pour la recherche et la clinique. Il permet en effet à la fois d'identifier, classifier, comparer les signatures génétiques des différentes pathologies. Ainsi un simple microdamier autorise-t-il dans un premier temps de visualiser l'ensemble d'un génome en une seule fois, pour par la suite venir se focaliser sur un sous-ensemble de gènes particuliers, avec une fiabilité et une rapidité exemplaires.

Encore faut-il se donner les moyens de rendre le microdamier plus accessible à moyen terme. Pour cela, il faut non seulement cloner l'entièreté des génomes animaux nécessaires à l'expansion des microdamiers en sciences vétérinaires mais aussi normaliser et valider les différentes méthodes employant des microdamiers. Cependant cette validation doit être double car elle doit être faite non seulement sur le plan technique mais aussi relativement aux cas cliniques. Techniquement, il faudra standardiser la précision, la fidélité, la répétabilité et la reproductibilité des microdamiers, et ce dans chacun des contextes de son utilisation et pour chaque espèce étudiée. Cliniquement, il faudra également vérifier la validité des diagnostics et pronostics posés grâce aux microdamiers et développer des systèmes de tests simples d'utilisation et relativement peu coûteux qui garantiront l'utilisation en routine des microdamiers par les cliniciens.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les professeurs G. Daube, M. Georges et L. Grobet pour les échanges enrichissants qui ont eu lieu lors de l'élaboration de cet article. Ils remercient M. Leblond pour son assistance à la rédaction et le Dr S. Vandenput pour son aide précieuse lors des recherches bibliographiques.

PRINCIPLES OF DNA MICROARRAYS AND POTENTIAL APPLICATIONS IN VETERINARY SCIENCES

SUMMARY

Microarray technology is a miniaturized biotechnological tool with potential applications for study and analysis of multiple molecular compounds as proteins, lipids, carbohydrates or nucleic acids.

The nucleic acids microarray technology focuses interest of scientists for fifteen years because of its huge potential as regard to the scientific research, clinical diagnosis, and development of new drugs. Only DNA microarrays are investigated in this paper. Born from the conjunction of micro-electronics, biochemistry, molecular biology, and image processing, microarrays allow to analyse several thousands of genetic information simultaneously. Thanks to this new tool, it is possible in parallel to identify, to even proportion, a considerable number of nucleic acid sequences contained in a biological sample (blood, biopsy, water, food, etc). This article proposes, after having considered the operating mode of the microarrays, to understand their quality standards as well as their advantages and disadvantages. The two following parts are devoted to the place the microarrays occupy in scientific research and in the establishment of a clinical diagnosis. Finally the last part evaluates prospects the microarrays offer in veterinary sciences.

RÉFÉRENCES

- ADIAGENE Le multiplexage en haut débit grâce aux puces à ADN. [en ligne] (21/11/2003) Adresse URL : <http://www.adiagene.fr/html/pucesadn.htm#systeme> Consulté le 30/11/2004.
- AFFYMETRIX Gene chip arrays for gene expression analysis. [en ligne] (sans date a) Adresse URL : http://www.affymetrix.com/technology/ge_analysis/index.affx Consulté le 19/11/2004.
- AFFYMETRIX Array manufacturing. [en ligne] (sans date b) Adresse URL : <http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx> Consulté le 19/11/2004.
- ALEXANDRE I., HAMELS S., DUFOUR S., COLLET J., ZAMMATTEO N., DE LONGUEVILLE F., GALA J.L., REMACLE J. Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal. Biochem.*, 2001, 295, 1-8.
- ANONYME Puces à ADN : un nouvel outil technologique au service de la santé publique. [en ligne] (03/1999) Adresse URL : <http://www.gazettelabo.fr/2002archives/pratic/1999/36puces.htm> Consulté le 25/11/2004.
- ARBER W., LINN S. DNA modification and restriction. *Annu. Rev. Biochem.*, 1969, 38, 467-500.
- ARRAY PROSPECTOR A web resource of functional associations inferred from microarray expression data. [en ligne] (01/03/2004) Adresse URL : <http://www.bork.embl.de/ArrayProspector> Consulté le 10/12/2004.
- BIRD C.R., DEINNOCENTES P.A., LYNN K.A. Focused expression profiling of cyclin and cyclin-dependant kinase integration complex components and regulators in a spontaneous model of canine mammary cancer. [en ligne] (18/09/2002) Adresse URL : http://www.ivis.org/proceedings/keystone/2002/bird/chapter_frm.asp?LA=1 Consulté le 02/07/2005.
- BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, 32, 314-331.
- BOUMAN A., BOTERMANS E., CORBIJN M., DONKERS J., PRICKEARTS R., DE ROOIJ R. Clinical lab on a chip. [en ligne] (20/06/2002) Adresse URL : <http://students.chem.tue.nl/mdp12/> Consulté le 10/12/2004.
- BOWTELL D.D. Options available - from start to finish - for obtaining expression data by microarray. *Nat. Genet.*, 1999, 21 : Suppl 1, 25-32.
- BROWN O.P. The full yeast genome on a chip. [en ligne] (29/04/1997) Adresse URL : <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/yeastchip.html> Consulté le 03/12/2004.
- CALL D.R., BORUCKI M.K., LOGE F.J. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 53, 35-43.
- CHUAQUI R.F., GILLESPIE J.W., FLAIG M.J., HEWITT S.M., PHILLIPS J.L., KRIZMAN D.B., TANGREA M.A., AHAM M., LINEHAN W.M., KNEZEVIC V., EMMERT-BUCK M.R. Post analysis follow up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.*, 2002, 32 : Suppl, 509-514.
- COUSSENS P.M., NOBIS W. Bioinformatics and high throughput approach to create genomic resources for the study of bovine immunobiology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, 86, 229-244.
- DUGGAN D.J., BITTNER M., CHEN Y., MELTZER P., TRENT J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.*, 1999, 21, 10-14.
- GARDINER-GARDEN M., LITTLEJOHN T.G. A comparison of microarray databases. *Brief Bioinform.*, 2001, 2, 143-158.
- GLADNEY C.D., BERTANI G.R., JOHNSON R.K., POMP D. Evaluation of gene expression in pigs selected for enhanced reproduction using differential display PCR and human microarrays: I. Ovarian follicles. *J. Anim. Sci.*, 2004, 82, 17-31.
- GREER B.T., KHAN J. Diagnostic classification of cancer using DNA microarrays and artificial intelligence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, 1020, 49-66.
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (France) Une puce à ADN pour suivre la réponse immunitaire du porc. [en ligne] (25/09/2002) Adresse URL : <http://www.inra.fr/PRESSE/COMMUNIQUE/agenae/annexe3.htm> Consulté le 19/11/2004.
- INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (France) BZScan : results on various type of arrays. [en ligne] (22/03/2004) Adresse URL : http://tagc.univ-mrs.fr/bioinformatics/bzscan/bzscan_files/nylon_macro_vct_grd.png Consulté le 03/12/2004.
- JACKSON D.A., SYMONS R.H., BERG P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1972, 69, 2904-2909.

- JACOB F., MONOD J. Biochemical and genetic mechanisms of regulation in the bacterial cell. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 1499-1532.
- KHANNA C., HEWITT S., CASSADAY R., BOSE S., KHAN J., NGUYEN P., TREPPEL J., MELTZER P., HELMAN L. Identification of genetic determinants of metastasis in osteosarcoma: a comparative approach. In: Modiano J.F. (Ed.), *Genes, dogs, and cancer: Emerging concepts in molecular diagnosis and therapy*. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, 2001.
- LEMINGS. DNA microarray (Genome chip): monitoring the genome on a chip. [en ligne] (07/01/2002) Adresse URL: <http://www.genechips.com> Consulté le 03/12/2004.
- LIU H.C., CHENG H.H., TIRUNAGARU V., SOFER L., BURNSIDE J. A strategy to identify positional candidate genes conferring marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. *Anim. Genet.*, 2001, 32, 351-359.
- MAXAM A.M., GILBERT W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, 74, 560-564.
- MULLIS K.B., FALOONA F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 1987, 155, 335-350.
- NAMBIAR , MIRMHAMMADSADEGH A., BAR A., BARDENHEUER W., ROEDER G., HENGGE U.R. Applications of array technology: melanoma research and diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2004, 4, 549-557.
- NATHANS D., SMITH H.O. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.*, 1975, 44, 273-293.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION UniGene. Organised view of the transcriptome. [en ligne] (sans date) Adresse URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene> Consulté le 10/12/2004.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION Expressed sequence tags database. [en ligne] (11/07/2000) Adresse URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/> Consulté le 10/12/2004.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION Genbank overview. [en ligne] (20/09/2004) Adresse URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html> Consulté le 10/12/2004.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION WGS Sequences projects. [en ligne] (09/02/2005) Adresse URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/WGS/WGSprojectlist.cgi> Consulté le 11/02/2005.
- NISHIZAWA M., MATSUE T., UCHIDA I. Penicillin sensor based on a microarray electrode coated with pH-responsive polypyrrole. *Anal. Biochem.*, 1992, 64, 2642-2644.
- PHIMISTER B. Going global. *Nat. Genet.*, 1999, 21: Suppl, 1-60.
- RAJEEVAN M.S., VERNON S.D., TAYSAVANG N., UNGER R.D. Validation of array-based gene expression profiles by real time (kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagnosis*, 2001, 3, 26-31.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, 74, 5463-5467.
- SANOTS S.E.C., SIQUEIRA F., LUVIZZOTO M.C.R., ANDRADE A.L., EUGENIO F.R., GARCIA J.F. Hybridization of canine breast cancer RNA to human DNA arrays. [en ligne] (05/09/2003) Adresse URL: http://www.ivis.org/proceedings/Keystone/2003/crusco/chapter_frm.asp?LA=1 Consulté le 02/07/2005.
- SCHENA M., SHALON D., DAVIS R.W., BROWN P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270, 467-470
- SCHENA M., SHALON D., HELLER R., CHAI A., BROWN P.O., DAVIS R.W. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, 93, 10614-10619.
- SHALON D., SMITH S.J., BROWN P.O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.*, 1996, 6, 639-645.
- SOUGAKOFF W., RODRIGUE M., TRUFFOT-PERNOT C., RENARD M., DURIN N., SZPYTMA M., VACHON R., TROESH A., JARLIER V. Use of a high-density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, 10, 289-294.
- TAO W., MALLARD B., KARROW N., BRIDLE B. Construction and application of a bovine immune-endocrine cDNA microarray. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004, 101, 1-17.

- THE INTERNATIONAL HUMAN GENOME MAPPING CONSORTIUM A physical map of the human genome. *Nature*, 2001, 409, 934-941.
- THOMAS R., FIELGER H., OSTRANDER E.A., GALLIBERT F., CARTER N.P., BREEN M. Developpement and application of a canine cancer-gene microarray for CGH analysis of canine tumours. [en ligne] (05/09/2003) Adresse URL : http://www.ivis.org/proceedings/Keystone/2003/thomas/chapter_frm.asp?LA=1 Consulté le 02/07/2005.
- TROESCH A., NGUYEN H., MIYADA C.G., DESVARENNE S., GINGERAS T.R., KAPLAN P.M., CROS P., MABILAT C. Mycobacterium species identification and rifampicin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, 49-55.
- TSOI S.C., CALE J.M., BIRD I.M., EWART V., BROWN L.L., DOUGLASS. Use of human cDNA microarrays for identification of differentially expressed genes in Atlantic salmon liver during *Aeromonas salmonicida* infection. *Mar. Biotechnol.*, 2003, 5, 545-554.
- UNITÉ DE RECHERCHE EN BIOLOGIE CELLULAIRE. Faculté Universitaire Notre-Dame de la Paix, Namur Cellular and molecular biology. DNA microarray. [en ligne] (05/08/2003) Adresse URL : <http://www.fundp.ac.be/urbc/dnarray/dnarray.html> Consulté le 02/12/2004.
- VENKATASUBBARAO S. Microarrays : status and prospects. *Trends Biotechnol.*, 2004, 22, 630-637.
- VERNET G., JAY C., RODRIGUES M., TROESCH A. Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. *J. Appl. Microbiol.*, 2004, 96, 59-68.
- WATSON J.D., CRICK F.H. The structure of DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, 18, 123-131.
- ZHU J., TIAN C., WU W., WU J., KHANG H., LU D., ZHANG G. Fabrication and characterization of glucose sensors based on a microarray H₂O₂ electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 1994, 9, 295-300.