

Les **biotechnologies en santé**

Tome 1

Introduction aux biotechnologies en santé

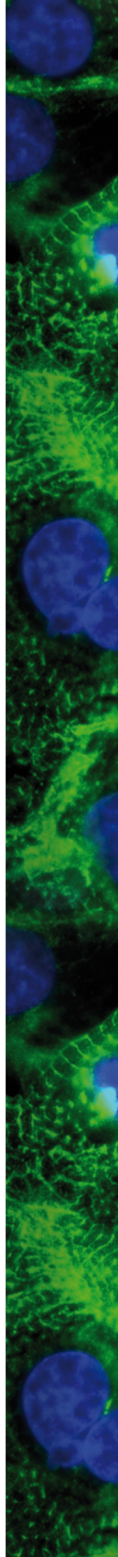
Sandrine Bourgoïn-Voillard

Walid Rachidi

Michel Seve



Lavoisier
TEC & DOC



9

- L'automatisation
- La miniaturisation
- Jusqu'où l'imagerie peut-elle aller ?
- Vers une biologie à grande échelle ?
- De l'analyse médicale à la médecine personnalisée

Les techniques innovantes d'analyse en biotechnologie

Coordonnateurs : S. BOURGOIN-VOILLARD, J. BRETON
K. ARAFAH, S. BOURGOIN-VOILLARD, J. BRETON, P. BULET, F. DE FRAIPONT, C. DURMORT, J. FAURÉ, P. FAURE, X. FONROSE, A. KARAGEORGIS, C. PISON, J. RENDU, M. SEVE

Tout l'enjeu des analyses des molécules des organismes vivants (ADN, ARN, protéines, métabolites...) dans le domaine de la biotechnologie est de connaître leurs structures, leurs fonctions, leurs interactions, leurs assemblages et leurs modifications pour comprendre, prédire ou mimer le fonctionnement du vivant. Depuis le siècle dernier, de nombreuses techniques, utilisées encore aujourd'hui, ont été développées pour répondre à cette demande. C'est le cas, par exemple, pour les tests immunologiques (ELISA, immunohistochimie) ou les analyses en microbiologie. De nombreux progrès ont également été réalisés en biologie moléculaire, domaine dans lequel la méthode de séquençage de Sanger (découverte récompensée par l'attribution du prix Nobel de chimie en 1980 à Frederick Sanger) a révolutionné nos connaissances par le séquençage des gènes jusqu'à permettre le séquençage d'un génome humain entier en 2003 (*voir* Chapitre 8 et encadré 10.1). Depuis, l'innovation dans le domaine de l'analyse en santé, basée sur les techniques de biotechnologie, ne cesse d'évoluer. Les enjeux de cette évolution sont multiples. Afin de proposer des tests d'analyses plus fiables, plus reproductibles et plus rapides, l'automatisation, apparue ces dernières décennies dans de nombreux laboratoires (laboratoires d'analyse médicale, industries, laboratoires de recherche), est un domaine en perpétuelle évolution. La possibilité de disposer d'outils plus compacts, jusqu'à être portatifs, voire implantables, mais aussi réaliser l'analyse de nombreux échantillons en même temps (multiplexage) avec des quantités de plus en plus faibles sont aussi des enjeux primordiaux en biotechnologie. Plusieurs solutions ont d'ores et déjà été proposées pour répondre aux besoins de miniaturisation, comme les différents types de biopuces (ex. : biopuces à protéines, à ADN, à cellules), et ne cessent d'évoluer au fur

à mesure des années, pour acquérir plus de sensibilité et permettre une analyse avec un plus grand multiplexage. L'étude du fonctionnement du vivant passe également par l'utilisation de techniques et d'approches basées sur l'imagerie. Initiée par la mise au point de la microscopie ou de la radiographie pour visualiser des cellules ou des organes (*voir* Chapitre 8), elle permet maintenant d'obtenir des résolutions de plus en plus élevées, mais aussi des informations structurelles de plus en plus précises et complètes sur l'anatomie des organes ou sur les processus physiologiques, biologiques et/ou métaboliques d'un organisme, et ce, en utilisant des processus moins invasifs. Parmi les techniques, qui permettent ou ont permis d'innover en imagerie, nous pouvons citer des techniques d'imagerie *in vivo* qui balayent les rayonnements ionisants (comme les rayons X) ou non ionisants, l'imagerie nucléaire, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie par fluorescence ou bioluminescence, mais aussi des techniques de microscopie optiques ou électroniques ultra résolutive et une imagerie basée sur l'analyse par spectrométrie de masse des tissus. Enfin, une meilleure compréhension du fonctionnement du vivant dans son ensemble passe, aujourd'hui, par des études à grande échelle des données biologiques, études essentielles pour obtenir des informations de plus en plus poussées et décrire de façon complète les systèmes biologiques. Les études à grande échelle font appel à diverses méthodes dans les domaines de la protéomique, la génomique, l'épigénomique, la métabolomique, mais aussi pour étudier l'interactome et le microbiote. Alors que les approches de génomique permettent maintenant de séquencer rapidement, avec des coûts de plus en plus faibles, un génome entier grâce aux méthodes de séquençage nouvelle génération (NGS), de nombreux progrès

doivent encore être faits pour obtenir des informations complètes sur les polymorphismes, l'épigénome, mais aussi le protéome, l'interactome et le microbiote. Un des challenges qui motive cet engouement pour l'analyse à grande échelle est lié au concept de la biologie des systèmes (*voir* Chapitre 2). Ce concept vise à comprendre le fonctionnement complet d'un organisme en intégrant des données expérimentales issues d'études à grande échelle interdisciplinaires (biologiques, cliniques et environnementales) à la modélisation ou la simulation, et ce, afin de prédire ou de mimer le fonctionnement du vivant en réponse à des conditions définies. Le but de ces analyses ne s'arrête pas à l'approche systémique, mais vise aussi à découvrir de nouveaux biomarqueurs, car trop peu de biomarqueurs sont actuellement connus et validés dans un nombre trop faible de pathologies (par exemple seulement une douzaine de protéines dans le cancer). Cette recherche de nouveaux biomarqueurs est maintenant devenue incontournable dans le domaine de la médecine, et tente de répondre aux attentes de la médecine 4P, prédictive, personnalisée, préventive et participative. Le challenge de cette nouvelle médecine est de pouvoir adapter les traitements selon les caractéristiques du patient et de son environnement, afin d'améliorer l'efficacité des traitements et minimiser les effets indésirables.

Alors que le chapitre 8 décrivait les techniques de bases utilisées dans les laboratoires de biotechnologie, ce chapitre est dédié aux innovations qui entreront ou qui entrent déjà pour certaines dans l'activité régulière des laboratoires de biotechnologie et qui répondent aux enjeux mentionnés ci-dessus. Parmi ces techniques innovantes, nous traiterons des techniques attachées à l'automatisation et à la miniaturisation de plus en plus poussées, mais aussi des méthodes innovantes d'imagerie. Nous aborderons également les méthodes de biologie à grande échelle (protéomique, génomique, épigénomique et métabolomique), avant de traiter le concept de la médecine 4P qui devrait se substituer dans le futur à des approches plus classiques.

L'automatisation

L'automatisation des analyses, que ce soit dans les laboratoires de biologie médicale, dans l'industrie ou dans les laboratoires de recherche, s'est développée pour répondre à plusieurs besoins. Elle a tout d'abord permis d'analyser de plus en plus d'échantillons dans un laps de temps de plus en plus restreint. Elle a donc participé à l'obtention de résultats de plus en plus rapides. L'utilisation de ces appareils a également été porteuse d'améliorations en termes de standardisation et de

fiabilité par rapport à la plupart des méthodes manuelles. Concernant des aspects moins techniques, l'automatisation est associée à une réduction des coûts (notamment de personnel) et contribue à une exposition moindre des utilisateurs aux risques liés à la manipulation d'échantillons biologiques. En dehors des aspects financiers, les critères de choix techniques sont très nombreux. Parmi ces derniers, nous pouvons citer de façon non exhaustive : la cadence de travail (ex. : nombre de tubes par heure), le catalogue d'analyses (nombre de paramètres), le volume de la prise d'essai, la possibilité d'introduire un tube en cours de série pour des analyses urgentes, la possibilité d'effectuer des dilutions, des calibrations ou des contrôles de qualité de manière automatique, la traçabilité de l'échantillon, les logiciels associés (par exemple, des systèmes d'expertise en ligne ou d'aide à la validation des résultats) ou la modularité, c'est-à-dire la possibilité de coupler l'automate à d'autres appareils (pré-analytiques ou analytiques).

L'automatisation : un processus déjà ancien, de nouveaux champs d'application

Les appareils sur le marché sont très variés et adaptés aussi bien aux méthodes biochimiques que d'immunologie, de biologie moléculaire, d'hématologie ou de microbiologie. Historiquement, les premiers appareils sont apparus dans les laboratoires d'analyse à la fin des années 1960 (ex. : SMA12, Technikon). Versatiles, ils permettaient d'analyser une douzaine de paramètres de base (glycémie, ionogramme,...) et reposaient essentiellement sur des approches colorimétriques. Ces automates sont, désormais, utilisés dans tous les champs de l'analyse, y compris dans des domaines jusqu'à récemment très manuels tels que l'anatomopathologie ou la bactériologie.

Afin d'illustrer quelques innovations récentes, trois exemples sont développés ci-dessous :

(i) Des améliorations notables ont bien évidemment été apportées dans le domaine de l'automatique, de l'électronique, de la connectique ou de l'informatique. Ces champs dépassant le secteur des biotechnologies, nous nous attarderons seulement sur un exemple d'innovation concernant les réactions biologiques mises en œuvre dans ces machines. Nous pouvons par exemple citer l'application des travaux de Jean-Marie Lehn (prix Nobel de chimie 1987) à la conception de nouveaux tests d'immunoanalyse utilisés par l'automate KRYPTOR (Cezanne / Brahms / Thermo). La technologie dénommée *Time Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE) utilise deux anticorps dirigés contre l'antigène à détecter, par exemple un marqueur tumoral (Mathis,

1993). L'un est porteur d'un groupement donneur (cryptate d'euporium ou de terbium) qui ne transférera son énergie vers l'accepteur du second anticorps qu'en cas de présence de l'analyte. La spécificité des résultats est obtenue d'une part par la longueur d'onde d'émission enregistrée, et d'autre part *via* la stabilité du signal durant quelques microsecondes. Ceci permet, en effectuant une mesure en temps résolu, d'éviter les signaux non spécifiques émis dans un laps de temps plus court.

(ii) Un exemple de paramètre qui passe progressivement d'une analyse manuelle à une méthode plus automatisée est la mesure de sang occulte dans les selles (Guittet *et al.*, 2011). Cette dernière est utilisée pour le dépistage des cancers colorectaux. Au moment de l'écriture de ce livre, la méthode reconnue en France pour le dépistage de masse consiste pour la personne dépistée à déposer des échantillons de selles sur un support contenant de la résine de gaïac. Le dispositif est ensuite envoyé à un laboratoire. Si l'échantillon contient du sang, l'activité peroxydasique de l'hème est détectée, après dépôt manuel de peroxyde d'hydrogène, par l'apparition d'une coloration bleue (composé phénolique de la résine converti en orthoquinone). Bien qu'ayant démontré son intérêt à l'occasion d'études randomisées sur de grandes populations, les performances de ce test purement qualitatif restent malgré tout à améliorer, notamment en termes de sensibilité et de valeur prédictive positive. Cette amélioration semble possible *via* l'utilisation d'automates d'immunoanalyses capables de mesurer l'hémoglobine dans les selles. En plus de l'automatisation, le caractère quantitatif de l'analyse autoriserait la fixation de valeurs seuils et donc de pouvoir estimer, selon le *cut-off* choisi, des paramètres capitaux dans le domaine du dépistage de masse : taux de positivité, valeur prédictive positive, sensibilité, spécificité.

(iii) Depuis la fin des années 2000 et le début des années 2010, le secteur qui a sans doute progressé de

la façon la plus spectaculaire côté automatisation est la bactériologie (Novak *et al.*, 2013). Quelques automates d'identification, de détermination d'antibiogrammes, de biologie moléculaire ou d'hémoculture étaient déjà sur le marché. Une étape supplémentaire a été franchie très récemment avec l'arrivée pour les plus grosses structures de l'identification de bactéries par spectrométrie de masse (*voir* chapitre 8), ainsi que celle des appareils d'ensemencement. Étape manuelle par excellence, ces gestes passent donc eux aussi progressivement à l'automatisation (**figure 9-1**). Les machines peuvent ensemencer les boîtes de façon standardisée, selon plusieurs schémas et à partir de pratiquement tous les types de prélèvements (et donc contenants) possibles. Sont également arrivés sur le marché des incubateurs de grande capacité permettant un chargement et un déchargement automatique des boîtes. Ces systèmes peuvent être équipés de caméras permettant de repérer pratiquement en temps réel les boîtes avec ou sans croissance de micro-organismes. Cette automatisation progressive de tous les postes de microbiologie permet désormais d'imaginer une automatisation quasi-complète de cette activité, évolution encore difficilement imaginable dans les années 2000.

Du laboratoire automatisé au laboratoire sur puce en biologie médicale

Automatisation totale

Le secteur des analyses de biologie médicale connaît à l'heure actuelle une évolution très rapide où s'entremêlent progrès technologiques, multiplication des paramètres biologiques, contraintes réglementaires, contraintes économiques et recherche d'une qualité de plus en plus poussée (Ceppa *et al.*, 2008). L'une des



Figure 9-1 L'ensemencement en bactériologie fait partie des gestes récemment automatisés dans les laboratoires d'analyse traitant de nombreux échantillons. (Crédit photo : bioMérieux)

conséquences, particulièrement flagrante en France ces dernières années, est le regroupement des laboratoires de biologie médicale qui mettent en commun leurs outils au sein de vastes plateformes techniques (**figure 9-2**). Pour accompagner cette mutation, depuis le milieu des années 2000, le processus d'automatisation s'est donc à nouveau accéléré pour arriver désormais, dans des structures de plus en plus nombreuses, à la notion d'automatisation totale du laboratoire (*total laboratory automation* ou *full laboratory automation*).

Comme décrit précédemment, une même machine ou une même plateforme est désormais capable d'analyser un vaste panel de paramètres très hétérogènes. Selon les besoins du laboratoire, une solution souvent choisie est de juxtaposer des modules permettant, par exemple, de coupler dosages biochimiques et immunologiques. Cette concentration d'une diversité de plus en plus importante de paramètres sur un nombre de plus en plus restreint de machines est désignée par le terme de *consolidation*.

L'analyse en elle-même n'est cependant pas la phase la plus chronophage ni la plus sujette aux erreurs de manipulations. Les industries du diagnostic *in vitro* proposent donc désormais des systèmes dits intégrés qui automatisent et relient entre elles les phases pré-analytique, analytique et post-analytique. En plus des mesures biologiques, des automates sont donc désormais développés pour trier, centrifuger, déboucher, diviser en aliquotes, reboucher et archiver les échantillons. Cette évolution nécessite bien entendu des systèmes de convoyage assurant le transport des échantillons sur toute cette chaîne analytique. Le transport en amont du laboratoire est lui-même parfois automatisé dans certaines structures de soins de grandes tailles, avec l'installation de systèmes pneumatiques assurant le transfert direct des échantillons du site de prélèvement vers le site d'analyse.

Cette « industrialisation » des analyses est accompagnée de systèmes informatiques de plus en plus complets pour permettre de gérer, outre la coordination des machines, les prescriptions, la traçabilité, la qualité et la transmission des résultats. L'informatique se doit également désormais d'offrir une aide à la validation et à l'interprétation des données.

Y a-t-il un avenir pour les automates de taille intermédiaire ?

À côté de ces nouvelles « usines » à analyses, persistent sur le marché un nombre important d'automates de tailles, de cadences et de catalogues d'analyses intermédiaires, souvent basés sur une seule technologie. Ces machines sont encore utilisées par des laboratoires traitant relativement peu de dossiers quotidiennement. Dans la plupart des pays développés, compte tenu des regroupements précédemment évoqués, on ne peut que s'inquiéter pour ce type de marché. Les sociétés qui souhaitent continuer à développer des instruments de cette gamme doivent s'adapter en suivant, par exemple, l'une ou plusieurs des stratégies suivantes :

- viser des pays dans lesquels l'industrialisation des analyses médicales n'est pas encore enclenchée ;
- placer dans le catalogue d'analyses de l'automate des biomarqueurs innovants, pertinents cliniquement et à haute valeur ajoutée, rendus difficilement accessibles aux autres sociétés *via* la propriété industrielle ou une méthode de mesure non compatible avec les automates déjà sur le marché ;
- viser des marchés autres que les laboratoires d'analyse médicale nécessitant un catalogue et un débit moins importants : laboratoires de recherche académique, analyses en milieu industriel, diagnostic vétérinaire, recherche clinique,...

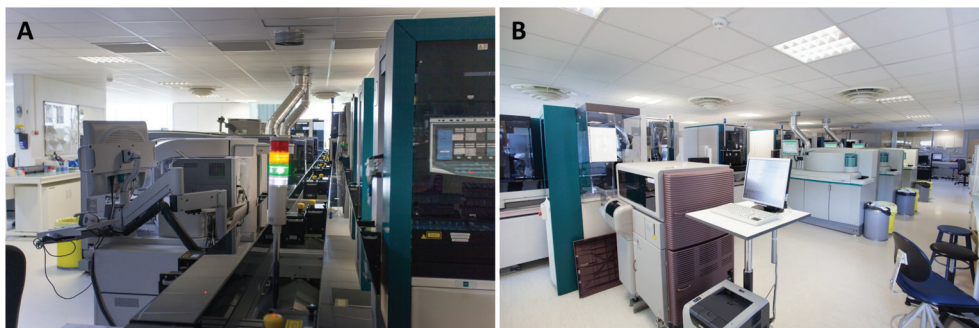


Figure 9-2 Les plateformes techniques des laboratoires de biologie médicale sont de plus en plus automatisées, les chaînes intégrant désormais également les phases pré-analytiques. A) Vue centrale de la chaîne principale de la plateforme technique du CHU de Grenoble. B) Vue latérale de la chaîne principale de la plateforme technique du CHU de Grenoble. (Crédit photo : CHU Grenoble)

— mettre en place des partenariats avec d'autres sociétés du diagnostic *in vitro* pour inclure ces « petits » automates dans le processus d'automatisation complète du laboratoire.

Automates et instruments de biologie délocalisée

En parallèle à cette tendance d'industrialisation des analyses de biologie médicale, se développe de plus en plus le secteur de la biologie délocalisée. Également appelée « *Point Of Care Testing* » (POCT) par les Anglo-Saxons, cette expression désigne toutes les analyses effectuées en dehors du laboratoire de biologie médicale. Cela regroupe des applications et des utilisateurs extrêmement variés. Nous pouvons tout d'abord citer les analyses effectuées par le patient lui-même (autotests), la mesure de la glycémie étant l'exemple le plus classique. Il faut ensuite citer les analyses effectuées par le médecin (*doctor tests*) ou par tout autre professionnel de santé dans un contexte non hospitalier : cabinet médical ou infirmier, dans une pharmacie, chez le patient ou dans une ambulance. Les lecteurs de glycémie fournissent à nouveau un exemple ici, tout comme celui des tests immunochromatographiques pour détecter les angines liées au streptocoque A. Enfin, la biologie délocalisée concerne également les analyses effectuées dans un environnement hospitalier, pratiquement au lit du patient. Les soignants peuvent ainsi avoir un accès rapide à des données biologiques leur permettant de prendre rapidement une décision thérapeutique.

Les secteurs de la biologie concernés par le POCT sont en pleine extension : paramètres de biochimie de base, maladies infectieuses, hémostase, marqueurs cardiaques... À l'opposé des gros automates mentionnés précédemment se développent donc de petits

instruments, faciles à utiliser, transportables et qui, eux aussi et selon les applications médicales, offrent un panel d'analyses possibles de plus en plus varié. Toujours dans un souci de maîtrise de qualité des résultats et d'interprétation des données, ces objets sont également de plus en plus connectés, ce qui permet par exemple :

- pour les autotests : de transmettre les paramètres biologiques mesurés aux médecins ;
- pour les tests employés dans les services hospitaliers : de laisser les analyses sous le contrôle du biologiste médical. Cela garantit notamment que les exigences de qualité et de contrôle des tests délocalisés soient équivalentes à celles demandées dans le laboratoire d'analyses.

L'automatisation concerne donc désormais un panel d'analyses et de phases pré-analytiques extrêmement diversifié, y compris dans des domaines autrefois considérés comme très pointus tels que la biologie moléculaire (**figure 9-3**). Les outils disponibles vont d'appareils très simples permettant de réaliser une analyse ponctuelle dans le cadre de la biologie délocalisée à des machines de grande cadence permettant de traiter plusieurs milliers d'échantillons par jour.

Automates dans le domaine de la recherche

L'automatisation est également intégrée dans les laboratoires de recherche qui traitent de la biologie structurale, la biologie moléculaire ou la biochimie. Leurs applications sont nombreuses, comme, par exemple, la manipulation de nano-gouttes pour le criblage des conditions de cristallisation des protéines, la transformation bactérienne, le repiquage de colonies



Figure 9-3 Du *point of care testing* aux automates à haute cadence de travail, y compris dans le domaine de la biologie moléculaire (crédit photo : Cepheid). Les systèmes de petite taille (à gauche) permettent de réaliser des analyses ponctuelles, à la demande, y compris en dehors des laboratoires d'analyse médicale (exemple : détection du streptocoque B chez les femmes enceintes dans les maternités). Les automates présentés à droite sont quant à eux utilisés dans les laboratoires ayant de nombreux échantillons à analyser.

bactériennes, le clonage de gènes, la PCR, la purification de plasmides et de fragments de PCR. Il existe également des applications dans la purification en parallèle de protéines à petite échelle, le criblage de détergents pour la solubilisation de protéines membranaires ou encore le criblage de petite molécule sur des tests biochimiques ou cellulaires spécifiques (identification de molécules outils pour la recherche, et dans certains cas, de *hits* à vocation médicale comme le fait l'industrie pharmaceutique).

Ainsi, de plus en plus de laboratoires académiques utilisent l'automatisation dans leur recherche. Nous citerons ici quelques exemples de manière non exhaustive. Par exemple, le laboratoire EMBL (Grenoble) utilise des automates pour obtenir des informations sur la structure des protéines après purification, concentration et cristallisation de celles-ci¹. Cette approche automatisée pour la cristallisation est nommée *étude de cristallisation à haut débit*. D'autres laboratoires utilisent cette cristallisation à haut débit dans d'autres conditions, comme l'IBS/ISBG (Grenoble) pour la cristallisation des protéines sous atmosphère contrôlée permettant l'analyse sous conditions d'anaérobiose². L'automatisation dans le domaine de l'ingénierie des protéines permet aussi d'analyser des dizaines de milliers de constructions de gènes, et ce, pour des constructions solubles dont les protéines cibles sont difficiles à identifier par les approches classiques de bioinformatique et de clones PCR. Cette approche est proposée, par exemple, par la plateforme ESPRIT³ (EMBL, Grenoble), qui peut envisager jusqu'à l'analyse de 30 000 clones individuels en parallèle pour une expérience. L'automatisation peut être utilisée pour le criblage automatisé de collections de molécules. C'est le cas à l'IRTSV (Grenoble)⁴ qui utilise l'automatisation, plus précisément le criblage robotique dans les outils d'imagerie quantitative et qualitative (ou HCS pour *High Content Screening*), pour la découverte de nouveaux composés bioactifs, mais aussi pour leur validation et leur caractérisation grâce à un phénotype cellulaire poussé. D'autres procédés de biologie moléculaire peuvent faire appel à l'automatisation pour faire des analyses à haut débit. Par exemple, la plateforme IBS/ISBG (Grenoble)⁵ permet des analyses à haut débit pour le clonage de gènes, la mutagenèse dirigée, le

test d'expression et de purification des protéines exprimées dans *E. coli*, la préparation automatisée de plasmides, le criblage de détergents pour la solubilisation et la purification de protéines membranaires ou l'échange de détergents sur protéines membranaires solubilisées.

La miniaturisation

Pourquoi miniaturiser ? Un premier élément de réponse est fourni par le paragraphe précédent : un besoin d'outils compacts, voire portatifs pour la biologie délocalisée est de plus en plus exprimé par les utilisateurs. La miniaturisation procure également des avantages lorsque l'on cherche à utiliser moins d'échantillons biologiques. Cela permet, par exemple, de pratiquer la mesure de plusieurs paramètres biologiques à partir d'un seul prélèvement sanguin, mais le gain est encore plus intéressant pour les échantillons d'accès difficile, prélevés de façon souvent invasive et n'apportant qu'une petite quantité de matériel. Les biopsies tumorales sont une bonne illustration. La miniaturisation permet, ensuite, d'utiliser moins de réactifs. Des approches telles que la microfluidique ou l'électromouillage autorisent, désormais, l'exploitation de volumes de l'ordre du nanolitre, ce qui peut s'avérer économiquement intéressant lorsque l'on connaît le coût de certains de ces réactifs, dans le domaine de la biologie moléculaire, par exemple. Enfin, la miniaturisation peut favoriser le multiplexage des analyses.

Nous décrirons dans un premier temps les outils qui peuvent être rassemblés sous la dénomination de « systèmes d'analyses compacts » avant d'aborder ceux correspondant à la définition des biopuces.

Systemes d'analyse compacts

Dans cette partie, les systèmes d'analyse compacts désignent des outils portatifs ou petits automates utilisés dans les laboratoires d'analyses médicales, mais surtout compatibles avec la notion de biologie délocalisée décrite plus haut. De petite taille, simples d'utilisation (y compris pour des non-biologistes), ils présentent un niveau d'intégration permettant le moins de manipulations possibles et diminuent ainsi les risques d'erreur et de contamination. Le développement de cette tendance est depuis récemment à l'origine de l'entrée de nouveaux acteurs, issus notamment de la microélectronique, dans le domaine du diagnostic *in vitro*. Ces avancées technologiques sont également fortement liées aux progrès de la microfluidique, ensemble des sciences et des technologies qui permet d'étudier et de maîtriser la mécanique des fluides à l'échelle du micromètre.

1. http://www.embl.fr/services/ht_crystallisation/index.html

2. <http://www.isbg.fr/cristallisation-des-protéines/>

3. http://www.embl.fr/services/ht_expression/esprit/index.html

4. <http://www.dsv.cea.fr/instituts/institut-de-recherches-en-technologies-et-sciences-pour-le-vivant-irtsv/unites/biologie-a-grande-echelle-bge/equipe-gen-chem/plateforme-de-criblage-pour-des-molécules-bioactives-cmba/criblage-automatise-de-collections-de-molécules>

5. <http://www.isbg.fr/preparation-d-echantillons/robiomol/>



Figure 9-4 Les paramètres mesurables en biologie délocalisée sont de plus en plus nombreux.

Ici, un dispositif pour analyser l'INR (*International Normalized Ratio*) chez les patients atteints de troubles de la coagulation. (Crédit photo : Roche Diagnostics)

Afin de donner quelques exemples d'applications, nous pouvons ici mentionner les outils portatifs permettant désormais de délocaliser les immunoanalyses pour mesurer sur le terrain des marqueurs tels que la troponine dans le cas de suspicion d'infarctus du myocarde. Dans le domaine de l'hémostase, les lecteurs d'INR (*International Normalized Ratio*) ouvrent maintenant la possibilité à certains patients sous anticoagulants de faire eux-mêmes cette mesure indispensable au suivi du traitement (**figure 9-4**).

Les analyses les plus complexes n'échappent pas à cette tendance. Dans le domaine de la biologie moléculaire, certains outils compacts sont désormais capables de rassembler les étapes d'extraction des acides nucléiques, d'amplification par PCR (ou technique proche), puis de quantification, de contrôle et de rendu des résultats (*voir* Chapitre 8). Par exemple, le système GeneXpert (Cepheid) est évalué pour une utilisation directement dans les services de maternité dans le cadre de la détection du streptocoque B, germe potentiellement dangereux pour les nouveau-nés. Lorsque cette miniaturisation de plusieurs étapes d'un protocole sur un support unique est poussée à l'extrême, on parle de « laboratoire sur puce » ou « *Lab On Chip* » (LOC).

La PCR est l'une des techniques pour lesquelles le plus de prototypes de laboratoires sur puces sont développés, avec comme application la plus souvent retrouvée la détection de pathogènes au sein d'échantillons cliniques (Ahmad *et al.*, 2012), alimentaires ou environnementaux. La plupart des systèmes ne comprennent que l'étape d'amplification et de détection, mais de plus en plus d'équipes se penchent sur l'étape amont particulièrement critique : l'extraction des acides nucléiques. Outre leur taille, les principaux atouts des laboratoires de PCR sur puces sont les très faibles volumes d'échantillons et de réactifs (de l'ordre de quelques nanolitres parfois), ainsi qu'une rapidité d'analyse bien supérieure aux outils classiques puisque la durée d'un cycle peut descendre en dessous des 10 secondes. Des performances telles que la limite de détection ou la reproductibilité n'arrivent cependant pas toujours au niveau des outils classiques, notamment de la PCR quantitative. Pour améliorer tous ces paramètres, de nombreuses alternatives sont testées telles que (i) remplacer le mode de détection par fluorescence par l'électrochimie qui permettrait une miniaturisation encore plus poussée ou (ii) passer de la PCR aux techniques d'amplification isothermes (ex. : *Loop-Mediated Isothermal Amplification* [LAMP] ou *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* [NASBA]). Ces approches seraient, en effet, encore plus intéressantes à miniaturiser que la PCR, car techniquement plus simples et encore plus rapides (moins de changements de températures), mais également plus sensibles et moins sujettes aux problèmes liés à la présence d'inhibiteurs chimiques.

Ces laboratoires sur puces ne se limitent pas au domaine de la biologie moléculaire. De nombreux outils d'analyse cellulaire faisant appel à ce principe sont par exemple en cours de développement. L'une des illustrations est l'apparition sur le marché de nombreux outils compacts destinés, souvent après une phase d'immuno-capture, à réaliser les comptages de lymphocytes T CD4 pour la surveillance des patients touchés par le VIH (Glynn *et al.*, 2013).

Biopuces

Dans ce chapitre, le terme « biopuces » (ou *microarrays*) désignera des outils d'analyse, de détection ou d'identification constitués d'un assemblage de récepteurs biologiques sur un support solide, plan, de surface limitée et permettant la plupart du temps l'obtention simultanée de multiples résultats. Derrière cette définition se trouve un ensemble très hétérogène de dispositifs en termes de technologie, d'application ou de multiplexage. Quelques notions communes à la plupart des biopuces peuvent tout de même être dégagées.

Notions générales

Quelques éléments de vocabulaire sont partagés par une majorité de biopuces. Le terme « sonde » désigne ainsi le récepteur, biologique la plupart du temps, immobilisé sur le support solide. Cette sonde peut être un oligonucléotide, un peptide, une protéine ou un autre type de biomolécule. Dans certains cas, elle peut aussi être constituée d'un élément purement chimique ou à l'inverse de capteurs plus complexes comme une ou plusieurs cellules. Le terme « cible » se rapporte quant à lui au ligand (l'élément à détecter) qui s'associe à la sonde (**figure 9-5**). Plus le nombre de sondes différentes (et donc de paramètres analysables) est conséquent, plus la biopuce gagne en « complexité ». Les biopuces ne permettent parfois d'étudier que quelques paramètres (par exemple une dizaine), on parlera alors de systèmes « basse complexité ». L'expression « haute complexité » est donc logiquement utilisée pour les outils qui permettent parfois de cribler plusieurs dizaines de milliers de cibles différentes. Le descripteur complexité ne doit pas être confondu avec la « densité » qui reflète le nombre de sondes greffées par unité de surface.

Ces sondes, par exemple des oligonucléotides, peuvent être synthétisées puis déposées sur le support miniaturisé. Afin de pouvoir attribuer à une zone très précise de la puce (un « *spot* » ou « *plot* ») un paramètre donné, les sondes doivent le plus souvent être adressées très finement par l'intermédiaire d'automates appelés robots de dépôts, *spotters* ou *microarrayers*. Ces machines comportent des buses qui peuvent déposer la solution de sondes en entrant directement en contact avec le support. D'autres appareils projettent quelques nanolitres de solution de sondes sur la puce par l'intermédiaire d'un élément piézoélectrique qui contracte la buse, ce mécanisme se rapprochant de celui des

imprimantes à jet d'encre. La rétention des sondes sur leur support peut être assurée par différentes approches. L'une des plus pratiquées est l'établissement d'une liaison covalente entre la surface et le biorécepteur déposé. Mais d'autres possibilités existent, nous pouvons d'une façon non exhaustive citer une fixation par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques (en exploitant par exemple les charges négatives de l'ADN) ou l'adsorption des biomolécules au sein d'un gel recouvrant la surface du microsysteme. Notons également que les sondes peuvent être fabriquées directement sur le support, l'expression de « synthèse *in situ* » est alors employée. Cette stratégie est utilisée par certains fabricants de biopuces ADN haute complexité. La photolithographie exploite un système de micro-masques capables de laisser ou non les différentes positions de la puce exposées à un rayonnement lumineux. Lorsqu'un oligonucléotide au sein d'un spot est exposé au rayonnement, sa position 3' qui était occupée par un groupement chimique photolabile bloquant la synthèse se voit déprotégée. Un nouveau nucléotide, lui-même porteur du groupement photolabile bloquant, va pouvoir ainsi être greffé. Cette opération est répétée autant de fois que nécessaire jusqu'à obtenir toutes les séquences nucléiques désirées sur l'ensemble de la puce. À noter que certains fabricants ont développé des variantes en reproduisant ces cycles de protection/déprotection par l'intermédiaire de micro-miroirs (au lieu de masques) ou par électrochimie.

L'association sonde/cible doit être détectée, voire quantifiée. La modalité la plus souvent mise en œuvre consiste à marquer la cible ou un compétiteur associé à cette dernière. Le mode de marquage le plus fréquent est la fluorescence avec des molécules telles que la cyanine Cy3 ou la cyanine Cy5. La lecture et la quantification du niveau de fluorescence de chaque spot est la plupart du temps pratiquée à l'aide d'un scanner à biopuces.

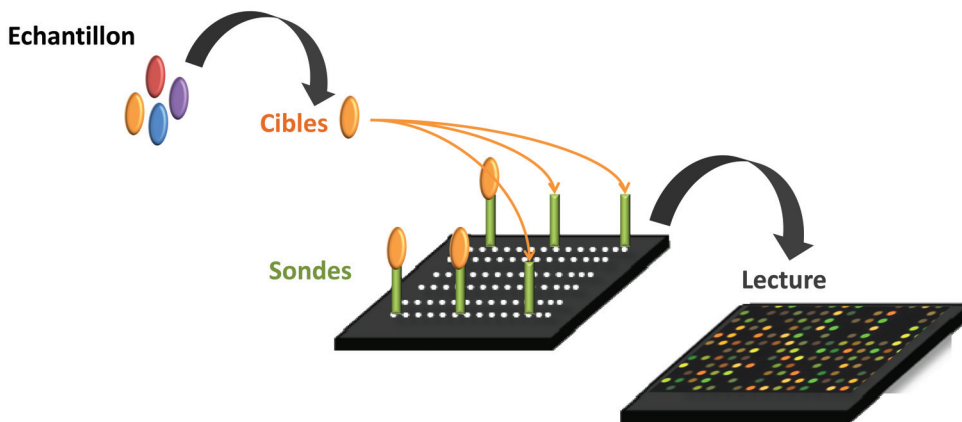


Figure 9-5 Le principe général des biopuces.

Les marqueurs enzymatiques ou radioactifs sont moins fréquents, les traceurs électrochimiques tels que le ferrocène semblant plus prometteurs, notamment en termes de coûts. Certaines méthodes électrochimiques permettent aussi une détection sans marquage préalable de la cible (*label free*), l'interaction biorécepteur-ligand étant par elle-même suffisante pour engendrer un signal mesurable. Parmi les autres méthodes de détection sans marquage, nous pouvons citer les *microcantilevers* ou la résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmonic Resonance*, SPR). Les premiers sont des systèmes de détection mécaniques qui peuvent être décrits comme de fines lamelles flexibles sur lesquelles les sondes sont fixées. La déflexion de ces lamelles sous l'effet de l'interaction sonde-cible est suffisante pour générer un signal. Quant à la SPR, nous pouvons la décrire d'une façon simplifiée comme un système de balance optique. L'interaction produit une modification détectable des propriétés optiques de la puce. À noter qu'une variante appelée « imagerie SPR » facilite le multiplexage en permettant un suivi simultané de plusieurs interactions sur une même puce. Les méthodes sans marquage telles que la SPR permettent souvent une détection en temps réel, ce qui donne accès à des données cinétiques qui peuvent par exemple être appliquées aux études fines d'interactions antigènes-anticorps ou à l'étude de la croissance bactérienne.

Enfin, une autre caractéristique partagée par de nombreuses biopuces est la nécessité de faire appel à des outils bioinformatiques. Le travail *in silico* peut être indispensable dès la conception du microsystème pour, par exemple, déterminer les séquences nucléiques des sondes à immobiliser. La bioinformatique est également utilisée pour le contrôle qualité des données et surtout pour l'interprétation des résultats qui peut consister à étudier l'expression de plusieurs milliers de gènes au sein de nombreux échantillons.

Afin d'établir un catalogue relativement succinct des différents types de biopuces, nous suivons une classification selon la nature biologique de la sonde.

Puces à acides nucléiques

Les « puces à ADN » sont certainement les plus connues des biopuces. Dès le début des années 1990 (Drmanac *et al.*, 1993), des systèmes basse complexité sont mis au point avec déjà de potentielles applications cliniques telles que le typage HLA. La possibilité d'aller vers la haute complexité, le haut débit, est également déjà dans les esprits, notamment pour développer de nouvelles approches de séquençage à exploiter dans le cadre du *Human Genome Project*. Mises à part quelques exceptions telles que les puces destinées à étudier les interactions ADN-protéines, la majorité de ces microsystèmes repose sur l'hybridation de cibles avec des sondes

immobilisées sur le support. Derrière ce principe simple, on retrouve cependant un panel de puces et d'applications très différentes. L'appellation « puces à ADN » est d'ailleurs trompeuse, car ces outils permettent parfois d'étudier d'autres acides nucléiques, telles que les ARN messagers pour les puces de transcriptomique. Ces dernières permettent d'étudier l'expression de multiples gènes au sein de cellules, de tissus ou d'organismes *via* la détection et la quantification relative de leurs transcrits. Les principales étapes du protocole (**figure 9-6**) consistent tout d'abord à extraire les ARNm du matériel biologique étudié puis à pratiquer une transcription inverse et à marquer les ADN complémentaires obtenus avec un fluorophore. L'une des stratégies les plus employées consiste à comparer l'expression de gènes au sein de deux sources biologiques différentes comme, par exemple, un tissu tumoral et son équivalent non cancéreux. Les ADNc issus de ces deux sources sont marqués avec deux fluorophores différents : par exemple le Cy3 qui émet dans le vert pour le tissu cancéreux et le Cy5 qui émet dans le rouge pour le tissu contrôle. Les deux populations de cibles sont ensuite mélangées en proportions équivalentes, puis hybridées sur les sondes. La surexpression d'un transcrit dans l'échantillon tumoral se traduira ainsi par l'apparition d'une fluorescence verte au niveau des spots concernés. Ces systèmes de transcriptomique ont sans aucun doute été les plus utilisés des biopuces ADN dans les laboratoires de recherche ces dernières années. Quelques applications cliniques sont également apparues telles que l'utilisation du profil d'expression de gènes comme outil de pronostic des cancers mammaires.

Les biopuces à ADN ont également des applications dans le domaine de la génomique. Très souvent après une étape de PCR et de marquage des amplicons avec un fluorophore, les cibles ainsi obtenues sont hybridées sur des sondes qui permettent de mettre en évidence, par exemple, des mutations ou des polymorphismes du génome. Ces systèmes permettent donc de faire du reséquençage, y compris pour des variants très localisés tels que des mutations ponctuelles ou des *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP). Parmi les applications possibles, nous pouvons citer la détermination de polymorphismes génétiques impliqués dans la réponse aux médicaments (pharmacogénomique) ou le génotypage HLA, même si ce dernier n'est pas effectué en routine à l'aide de *microarrays*. D'autres puces permettent de mettre en évidence des altérations du génome de plus grande taille, de quelques kilobases à plusieurs mégabases telles que des pertes ou des gains de matériel chromosomique. Ces biopuces d'hybridation génomique comparative (*CGH arrays*) utilisent comme sondes des fragments de grande taille (cosmides ou produits de clonage dans des baculovirus, par exemple) sur lesquels vont s'hybrider les cibles.

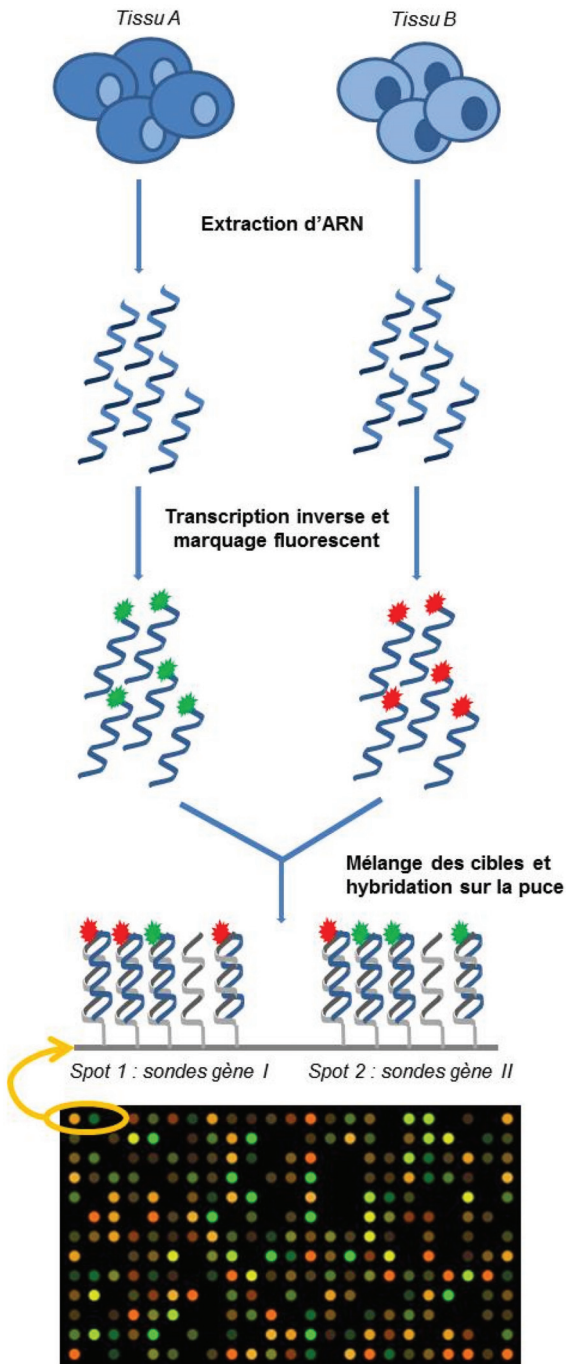


Figure 9-6 Les différentes étapes d'un protocole d'utilisation de puces transcriptomiques.

Un marquage par deux fluorophores différents de l'ADN issu de l'échantillon à étudier et de celui d'un échantillon référence est utilisé, sur le même principe que pour la transcriptomique. Parmi les applications en clinique, nous pouvons citer l'exploitation de ces puces comme aide au diagnostic de maladies constitutionnelles, par

exemple celles liées à des retards mentaux dont l'origine ne serait pas détectée par les outils de cytogénétique classiques (caryotype, FISH). Notons que de nombreux autres formats de puces à ADN existent, ils permettent, par exemple, d'étudier la méthylation de l'ADN, les variants d'épissage ou encore l'expression des microARN.

Puces à protéines

Moins connues et plus délicates à développer que les puces à acides nucléiques, les puces à protéines n'en demeurent pas moins intéressantes en raison de leurs applications existantes et futures. Le premier challenge technique est de produire les nombreuses protéines ou les nombreux peptides différents à immobiliser sur le microsystème, ceux-ci étant plus complexes à obtenir que des acides nucléiques. Certaines équipes pratiquent une extraction des protéines à partir de cellules et de tissus et déposent ce mélange complexe sur plusieurs plots, la détection d'une protéine spécifique dans chacun de ces plots étant assurée par l'utilisation d'un anticorps marqué. La stratégie la plus souvent pratiquée est cependant de produire des protéines recombinantes ou de synthétiser des peptides ensuite fixés sur le support. Enfin, dans certains cas, il est aussi fait appel à la production *in situ* : synthèse *in situ* de peptides ou productions de protéines localisées en déposant l'ADN codant et un lysat de réticulocytes qui assurera la transcription et la traduction de la protéine, celle-ci sera ensuite retenue *via* son étiquette. L'immobilisation des protéines-sondes sur la puce est, elle aussi, problématique. Pour interagir correctement avec sa cible et générer un signal détectable, la protéine doit présenter une conformation, une orientation et parfois une fonctionnalité préservées. Ceci n'est pas toujours compatible avec la rigidité ou la versatilité de la fixation. Celle-ci peut se faire *via* des liaisons covalentes, les plus associées aux défauts cités ci-dessus, mais également par affinité *via* des aptamères, un anticorps ou une interaction streptavidine-biotine. Enfin, il est également possible de retenir les sondes sur la surface par adsorption au sein d'un gel ou d'une membrane. Les modes de détection évoqués dans les généralités peuvent tous être exploités, il faut cependant noter que, contrairement aux puces à acides nucléiques, les cibles ne peuvent ici pas être amplifiées. Il n'existe en effet pas d'équivalent de la PCR pour les protéines que l'on souhaiterait, par exemple détecter au sein d'un échantillon complexe.

Deux catégories d'application sont classiquement discernées pour les puces à protéines (**figure 9-7**) : la détection, voire le dosage de paramètres biologiques (puces dites analytiques) ou l'étude de la fonctionnalité des protéines. Dans le premier cas, les développeurs s'orientent par exemple vers des « microELISA » à visée diagnostique aux formats très variés : puces de basse

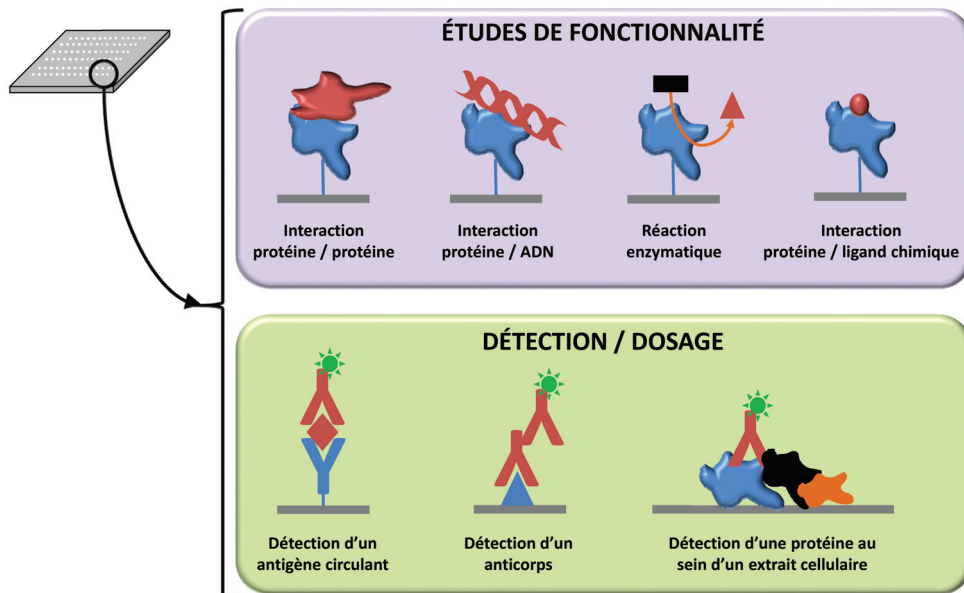


Figure 9-7 Les différentes utilisations des puces à protéines. Le symbole vert représente le traceur permettant la détection (par fluorescence, chimioluminescence,...).

ou de moyenne complexité permettant de doser avec une plus grande sensibilité et une plus grande rapidité plusieurs paramètres simultanément. Dans le second champ applicatif, il s'agit d'étudier des interactions (protéine-protéine, protéine-ADN) ou des activités enzymatiques, le multiplexage apporté par les puces étant par exemple intéressant pour le criblage de candidats médicaments agissant sur les protéines étudiées.

Puces à cellules

À l'image des puces à acides nucléiques et des puces à protéines, les puces à cellules forment un groupe de dispositifs hétérogène. Les formats sont effectivement très variés puisqu'ils vont de microsystèmes pour lesquels chaque plot d'analyse est formé d'une cellule unique jusqu'à ceux mettant en œuvre de la culture cellulaire tridimensionnelle sur puce, tentant ainsi de reconstituer des structures tissulaires sur micro-supports. Dans le cas de l'étude de cellules uniques, nous pouvons évoquer l'exemple des puces exploitant le *micropatterning* : des protéines d'adhésion cellulaire telles que la fibronectine ou la laminine sont déposées de façon matricielle, les dépôts ayant une forme précise (motif) et reproductible. Sur chaque plot va se fixer une seule cellule qui adopte une morphologie dictée par la forme du motif. Au final est obtenue une série de plusieurs milliers de cellules uniques, ordonnées et morphologiquement identiques. Une autre approche est d'essayer de mimer certaines structures tissulaires en réalisant de la culture cellulaire en 3 dimensions. Cela

peut être obtenu en incluant les cellules au sein d'hydrogels, de matrices artificielles ou naturelles (ex. : collagène). Des structures proches d'acini de canaux galactophores mammaires ont ainsi déjà été obtenues. Une autre solution imaginée est de cultiver les cellules sur des supports microstructurés reproduisant par exemple les microvillosités intestinales.

L'une des principales difficultés pour élaborer ces microsystèmes est de pouvoir manipuler les cellules avec suffisamment de finesse pour les placer à l'endroit voulu sur le support. Outre la fonctionnalisation biochimique de plots répartis à des endroits bien déterminés sur la surface (ex. : protéines d'adhésion, anticorps), nous pouvons évoquer des méthodes physiques qui doivent être les moins délétères possibles pour ce matériau vivant que sont les cellules : champs électriques, pinces optiques ou utilisation de la microfluidique.

Les puces à cellules peuvent être exploitées pour répondre à des questions de recherche fondamentale sur l'architecture cellulaire ou le mécanisme de fonctionnement de certains éléments cellulaires comme les canaux ioniques (systèmes de *patch clamp* miniaturisés). Avec une vision plus appliquée, le grand nombre de cellules ou d'îlots cellulaires immobilisés sur ces systèmes permet de les utiliser par exemple comme outils de criblage dans le secteur pharmaceutique.

Puces à tissus

Les puces à tissus sont parfois désignées par l'acronyme TMA (*Tissue MicroArrays*). Elles sont utilisées

dans le secteur des analyses en anatomopathologie. Pour rappel, la préparation d'une analyse histologique classique peut être décrite en 5 phases : (i) fixation des tissus (biopsie, fragment d'une pièce d'exérèse), (ii) inclusion du fragment dans un milieu tel que la paraffine, (iii) passage du bloc de paraffine au microtome pour obtenir des coupes de quelques micromètres d'épaisseur ensuite positionnées sur une lame de microscope, (iv) coloration et/ou marquage en immunohistochimie et (v) montage de la lame et acquisition des données. Dans le cas des puces à tissus, des carottes de tissus sont prélevées dans les blocs de paraffine puis « repiquées » dans un nouveau bloc. Dans ce dernier pourront être introduites des carottes issues de plusieurs tissus différents avant passage au microtome et réalisation des étapes (iv) et (v). Sur une seule lame de microscope pourront ainsi être analysées des dizaines de tissus différents. Cette analyse simultanée de plusieurs échantillons permet bien entendu un gain de temps mais peut s'accompagner de quelques inconvénients. Le plus cité est celui du manque de représentativité de la carotte qui peut ne pas avoir été prélevée dans une zone du tissu informative sur le plan diagnostique ou pronostique.

Puces à sucres

Moins répandues que les puces à ADN, à protéines ou à cellules, les puces à sucres (*glycoarrays*) font tout de même l'objet de nombreux développements. Les sondes sont ici des monosaccharides, des oligosaccharides ou parfois des glycolipides ou glycoprotéines. Les sondes telles que les oligosaccharides sont plus complexes à obtenir que les oligonucléotides

pour lesquels les méthodes de synthèse automatisées sont plus facilement accessibles. La détection d'une interaction entre ces sondes et leur(s) ligand(s) se fait la plupart du temps par fluorescence, des variantes exploitant la SPR ou un couplage à la spectrométrie de masse peuvent être retrouvées dans la littérature. Les applications existantes ou potentielles sont nombreuses puisque les sucres ou les biomolécules contenant des motifs glycosidiques jouent un rôle important dans la reconnaissance cellulaire, l'adhésion des cellules et les relations hôte-pathogène. Nous pouvons par exemple citer l'exemple de puces à sucres testées pour améliorer le typage des virus.

Conclusion

Bien que non exhaustif, ce catalogue de biopuces illustre bien l'hétérogénéité des systèmes regroupés sous cette appellation. Un résumé des différentes approches et de leur degré de maturité est présenté dans le **tableau 9-I**.

De nombreux ouvrages peuvent donner aux lecteurs une vision plus étendue des micro- et nanotechnologies appliquées à la biologie et à la santé (Lahmani *et al.*, 2007). Les applications déjà effectives ou potentielles sont nombreuses en recherche fondamentale ou encore dans le diagnostic et dans le criblage de candidats médicaments. Les puces de transcriptomique ont ainsi permis ces dernières années d'accumuler de nombreuses découvertes concernant la régulation de nos gènes. Les nouveaux concepts de culture cellulaire 3D miniaturisés sont également très prometteurs. Comme

Tableau 9-I Les grandes familles de biopuces : principales utilisations et tendances.

Grandes catégories de biopuces	Exemples d'utilisation	Niveau de maturité / évolution
Puces à acides nucléiques	Transcriptomique (ARNm), miARN, génomique, épigénomique	En déclin (concurrence des techniques de séquençage haut débit)
Puces à protéines	Études de fonctionnalité des protéines, interactomique, immunodosages	Catégorie très diversifiée. Développement croissant d'immunoessais miniaturisés
Puces à cellules	Recherche fondamentale en biologie cellulaire, criblage pharmaceutique	Regain d'intérêt avec le développement de systèmes de culture 3D miniaturisés
Puces à tissus	Parallélisation des analyses histologiques. Utilisation en recherche	Développement rapide dans les années 2000. Des difficultés liées notamment au pré-analytique freinent une utilisation en analyse de routine
Puces à sucres	Utilisation pour étudier par exemple les déterminants biochimiques des interactions cellule-cellule	Utilisation surtout en recherche fondamentale

tous les outils innovants, les biopuces sont cependant confrontées à de nombreuses barrières qui expliquent des résultats moins spectaculaires que prévu notamment pour une utilisation dans le secteur du diagnostic clinique. Ces freins sont de plusieurs natures :

- techniques : complexité, manque de fiabilité lorsque les outils sont confrontés à de « vrais » échantillons biologiques ;
- cliniques : démonstration d'une véritable valeur ajoutée pour le patient face aux tests déjà existants ;
- économiques : coûts par rapport aux tests déjà existants.

À cela s'ajoute l'arrivée sur le marché d'autres techniques haut débit, le meilleur exemple étant apporté par les nombreuses méthodes de séquençage de deuxième et troisième générations qui vont probablement supplanter dans les années à venir certaines catégories de puces à ADN pour les études de génomique, de transcriptomique ou d'épigénomique (Shendure, 2008) (*voir infra*, Séquençage nouvelle génération).

Jusqu'où l'imagerie peut-elle aller ?

L'imagerie médicale est devenue un outil incontournable dans l'étude de nombreuses pathologies telles que le cancer ou les maladies neurodégénératives. Bien que plusieurs outils d'imagerie soient actuellement disponibles (IRM, microscopie,...), les innovations dans ce domaine ne cessent d'évoluer. Ce chapitre vise à décrire quelques-unes de ces techniques d'imagerie innovantes développées ces dernières années. Nous commencerons par décrire les approches utilisées pour l'imagerie *in vivo* avant de se focaliser sur les techniques de pointe émergentes permettant de réaliser des images de

tissus en 2D ou 3D *ex vivo*, la microscopie corrélative ou super-résolutive et l'imagerie par spectrométrie de masse (IMS).

Imagerie *in vivo*

Le développement des outils d'imagerie *in vivo*, qu'ils soient utilisés en médecine humaine ou adaptés au petit animal dans le cas de la recherche préclinique, a permis de grandes avancées en médecine, mais également en chirurgie pour le développement de nouvelles techniques thérapeutiques. L'imagerie *in vivo* met en œuvre des processus non invasifs, exception faite des traceurs injectés dans la circulation sanguine, basés sur l'utilisation de rayons électromagnétiques (**figure 9-8**). Alors que certains outils permettent d'obtenir des informations structurelles sur l'anatomie des organes, d'autres permettent l'obtention d'informations concernant les processus physiologiques et/ou métaboliques d'un organisme.

Chaque système d'imagerie présente des avantages et des limites. Les rayonnements électromagnétiques utilisés diffèrent selon la méthode et sont répartis sur l'ensemble du spectre électromagnétique, allant des rayons gamma (utilisés en imagerie nucléaire PET et SPECT) aux ondes radio associées à un champ magnétique dans le cas de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), en passant par les rayons X (utilisés pour la radiographie et le scanner), l'imagerie photonique (utilisée pour la fluorescence et la bioluminescence) et les ultrasons (utilisés en échographie) (Ntziachristos *et al.*, 2005 ; Pysz *et al.*, 2010). Selon la méthode utilisée, la sensibilité et la résolution seront différentes ce qui permettra selon le cas de choisir la plus adaptée voire d'associer plusieurs méthodes entre elles. Ces techniques sont décrites ci-après avant de comparer leurs avantages et inconvénients selon les applications.

En plus de sa place en clinique humaine, l'imagerie *in vivo* présente un intérêt majeur dans la recherche

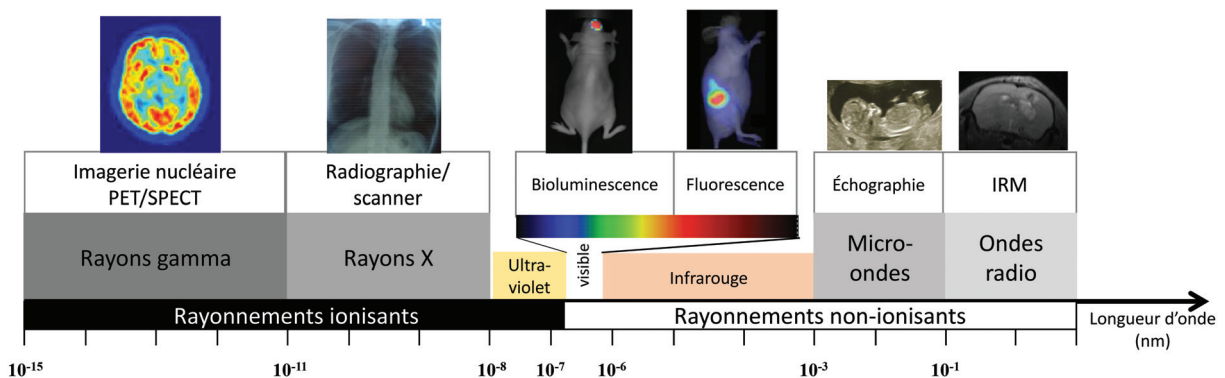


Figure 9-8 Les différentes modalités d'imagerie *in vivo* selon le spectre électromagnétique.