



par Bertrand JORDAN

médecine/sciences 2001 ; 17 : 893-6

Puces à ADN : les brevets contre le progrès ?

Encore les brevets...

Les brevets – surtout lorsqu'ils touchent au vivant – n'ont pas bonne presse : la plupart de nos concitoyens sont choqués lorsqu'ils découvrent qu'il est possible, en toute légalité, de breveter la séquence d'un gène humain, à partir du moment où celle-ci était jusque-là inconnue et où une hypothèse sur la fonction de la protéine correspondante est émise. Mais, avacent leurs défenseurs, ces brevets sont indispensables pour faire avancer la recherche : les investissements considérables que consentent les industriels pour leurs investigations ne peuvent être justifiés que s'ils gardent, pour un temps limité, un droit exclusif sur l'application commerciale de leurs découvertes. Ces arguments ne sont pas sans valeur, et le système des brevets n'est sûrement pas aussi noir que le disent certains de ses détracteurs. Pourtant, il dérape parfois de manière évidente, et en vient à inhiber tant la recherche que le jeu normal du marché. C'est, me semble-t-il, ce qui se passe actuellement dans le domaine très à la mode des puces à ADN. L'exemple est intéressant, car il montre comment cette institution peut devenir contre-productive, et cela d'un strict point de vue économique, sans faire intervenir le moindre jugement éthique.

Un peu d'histoire

Les « puces à ADN » sont aujourd'hui à la pointe de l'actualité : *macroarrays*,

microarrays, puces à oligonucléotides, ces systèmes constituent un des espoirs de la génomique. Ils permettent en effet d'analyser sur des milliers de gènes l'effet d'un changement d'état physiologique, d'une infection ou d'un médicament. De fait, ils constituent à ce jour la seule méthode capable d'apporter une information de type fonctionnel à un rythme comparable à celui de l'obtention des séquences d'ADN. Ces puces sont à la mode depuis deux ou trois années, depuis qu'elles sont employées de manière relativement massive, et que les analystes financiers puis la grande presse ont découvert leur existence. En fait, elles remontent à la fin des années quatre-vingt, avec les « filtres à haute densité » popularisés par l'équipe de Hans Lehrach (qui travaillait alors aux laboratoires de l'*Imperial Cancer Research Fund*, à Londres, Royaume-Uni). Ces membranes de Nylon mesurant 22 par 22 cm et portant 9216 clones d'ADN (plasmides ou cosmides) [1, 2] permettaient déjà d'accéder aux banques d'ADN (qui étaient alors une ressource rare) d'une manière très efficace. Rappelons que le procédé courant à l'époque comportait l'étalement de bactéries sur des dizaines de filtres disposés dans autant de boîtes de Pétri, suivi d'un laborieux traitement (fixation, hybridation, lavage, exposition...), le tout pour (peut-être) récupérer deux ou trois clones « positifs » avant de recommencer toute l'opération lors du prochain cribla-

ge... Dès cette époque, l'idée d'utiliser ce format pour analyser simultanément le niveau d'expression de milliers de gènes était dans l'air [3], mais les premiers résultats devaient attendre le début des années 1990 [4].

À la même époque, l'ingénieur Edwin Southern – immortel inventeur du *Southern blot* qui, par analogie, a donné son nom au *Northern blot* puis au *Western blot* – faisait une communication au deuxième colloque *Genome Mapping and Sequencing* tenu à *Cold Spring Harbor* (New York, USA) en mai 1989 [5, 6], dans laquelle il décrivait la fabrication de réseaux d'oligonucléotides fixés sur lame de verre, et montrait les premiers résultats obtenus lorsqu'on les hybridait avec des segments d'ADN. À l'époque l'accent était sur le séquençage plus que sur la mesure d'expression : l'on espérait que le « séquençage par hybridation » allait bientôt détrôner la méthode de Sanger, espoir qui devait être déçu par la suite [7].

Pendant ce temps là, Steve Fodor, alors inconnu de la communauté des biologistes, tentait vainement de mettre au point un procédé de synthèse des protéines sur un support solide à l'aide de réactions photochimiques. Ce travail n'ayant pas abouti, il se reconvertissait dans la synthèse d'ADN, et parvenait bientôt à développer une technique permettant de synthétiser *in situ* des oligonucléotides sur une lame de verre, comme l'avait fait Southern auparavant. Sa méthode était différente : elle gou-

vernait les réactions par des illuminations successives de différentes régions de la lame assurant ainsi l'activation de réactifs photosensibles. Cela autorisait la synthèse de nombreux oligonucléotides différents sur la même lame grâce à l'emploi de masques aux dimensions précises [8]. Notons que le rendement de synthèse est modeste, ce qui limite la longueur de ces segments à une vingtaine de bases. Cette méthode, proche à beaucoup d'égards de celles employées pour la fabrication des microprocesseurs qui font vivre nos ordinateurs, allait bénéficier pleinement des connaissances accumulées et de l'infrastructure mise en place par l'industrie de la microélectronique. Elle débouchait rapidement sur des « puces à oligonucléotides » comportant, dans une surface de l'ordre du centimètre carré, plusieurs dizaines de milliers de plots portant chacun quelques millions d'exemplaires d'un oligonucléotide de séquence définie à l'avance. Ces puces étaient au départ conçues pour effectuer un « quasi-séquençage », en fait une détection de mutation sur des gènes déjà connus: la puce « p53 », par exemple, comporte un ensemble de séquences correspondant aux exons de ce gène et permet, par la simple hybridation d'un produit de PCR obtenu à partir du sang d'un malade et marqué par fluorescence, de savoir si l'on est en présence de la séquence « standard », ou s'il existe des mutations, et lesquelles. Le procédé serait un peu plus tard adapté à la mesure d'expression.

Le début des mesures d'expression à grande échelle

Durant la première moitié des années 1990, plusieurs équipes allaient progressivement mettre au point la mesure d'expression simultanée de milliers de gènes. Elles utilisaient essentiellement des produits de PCR provenant de clones d'ADNc, déposés sur des membranes de nylon et hybridés avec des échantillons radioactifs [9-11]. Les premiers résultats de l'équipe de Patrick Brown à Stanford (CA, USA) [12], avec des ADN fixés sur des lames de verre et un marquage par fluorescence, consti-

tuaient, eux, le début d'une approche se prêtant mieux à la miniaturisation, et plus attrayante pour les industriels ou les cliniciens du fait de l'élimination de la radioactivité.

En 1996, l'entreprise *Affymetrix* fondée par Steve Fodor revendiquait, avec des résultats assez convaincants, la possibilité pour ses puces à oligonucléotides d'effectuer également des mesures d'expression [13], et en faisait bientôt son principal cheval de bataille. Parallèlement, une *start-up*, *Synteni*, fondée par un collaborateur de Patrick Brown, l'initiateur des réseaux d'ADNc sur lame de verre, proposait des services de mesure d'expression effectués sur ses *microarrays* comportant 5000 puis bientôt 10000 gènes. Les laboratoires et les industriels prenaient progressivement conscience de la puissance de ces techniques, les fabricants de robots et de systèmes optiques proposaient des appareils adaptés, bref, le mouvement était lancé. Après une période où il se publia beaucoup plus d'articles de revue sur les nouvelles méthodes d'expression que de résultats effectifs [14], les vrais travaux commençaient à apparaître; il est clair aujourd'hui que cette approche, lorsqu'elle est bien menée, est très efficace et génératrice de résultats importants en recherche fondamentale et appliquée.

Un foisonnement de méthodes et d'initiatives

En cette année 2001, les méthodologies mises en oeuvre sont très variées. Les *macroarrays*, membranes de plusieurs dizaines de centimètres carrés employées avec des sondes radioactives, gardent une bonne part de marché même si ce format est moins « tendance » que les systèmes miniaturisés; d'ailleurs les fabricants qui les commercialisent ont un curieux penchant à les baptiser *microarrays**. Les véritables *microarrays*,

* Pour éviter d'être moi aussi accusé de jouer sur les mots, je dirai qu'au dessus de 1 mm d'écartement entre les centres des plots (100 plots au cm² ou moins) on est en présence d'un *macroarray*; au-dessous de 500 µm (au moins 400 plots au cm²), d'un *microarray*. Entre les deux il y a effectivement ambiguïté.

préparés sur lame de verre à partir de clones d'ADNc avec révélation fluorescente, sont largement employés, vendus prêts à l'emploi par plusieurs firmes ou réalisés en interne par les laboratoires qui se sont équipées des robots *ad hoc*** . Les *oligo-chips* d'*Affymetrix* existent en de nombreuses versions (homme, souris, drosophile, rat...) permettant à chaque fois l'analyse du niveau d'expression d'une dizaine de milliers de gènes et, malgré leur prix élevé (plus de mille euros l'unité), se vendent apparemment bien. De nouvelles techniques apparaissent, notamment des *microarrays* portant des oligonucléotides de grande taille (60 à 80 nucléotides, au lieu des 25 qui constituent la limite du procédé photochimique d'*Affymetrix*) qui promettent une compacité bien meilleure*** ainsi que des mesures probablement plus fiables [15, 16]. Des approches plus « exotiques » se développent, puces actives de *Nanogen* ou systèmes totalement intégrés comme le *Geniom DNA processor* de *FeBIT* (<http://www.febit.com>), un appareil qui assure à la fois la fabrication du réseau, son hybridation avec l'échantillon et la lecture du résultat... Bref, un sain bouillonnement d'idées et d'initiatives comme peut en produire une économie de marché où toute bonne idée trouve à se financer et peut prendre une part de marché, pour autant qu'elle apporte un plus en regard de la technologie existante.

Un terrain miné

En fait, la situation est loin d'être aussi saine. Elle risque même d'être bloquée par des arguments juridiques qui cachent mal la volonté d'une entreprise de se réserver à tout prix ce marché prometteur, estimé à trois milliards de dollars pour l'année 2004. Cela manifeste aussi l'absurdité d'un système dans lequel les

** On peut aussi réaliser des *microarrays* sur nylon, et c'est même une modalité particulièrement efficace du point de vue de la sensibilité [18].

*** Dans ce cas il suffit d'un ou deux oligonucléotides pour mesurer le niveau d'expression d'un gène, au lieu de trente à quarante pour les 20-mères d'*Affymetrix*. Un *array* de 40 000 plots peut donc suivre 20 à 40 000 gènes.

brevets sont à la fois tout puissants et accordés avec une légèreté confondante.

On sait que toute *start-up* qui se respecte doit, pour boucler avec succès son tour de table et convaincre les « capitaux-risqueurs » de parier sur son avenir, détenir de la « propriété industrielle », autrement dit des brevets accordés, ou tout au moins déposés, qui lui assurent une certaine exclusivité sur un procédé ou un marché. L'entreprise *Affymetrix*, dès sa fondation, a joué ce jeu à fond et détient actuellement, aux États-Unis, plus de cent brevets. Ces derniers, que l'on peut consulter sur le site de l'Office Fédéral des Brevets (<http://www.uspto.gov/patft/index.html>), couvrent un champ très large, bien trop large en fait. A en croire *Affymetrix*, ils lui assurent l'exclusivité de tout réseau d'ADN comportant plus de 400 éléments au centimètre carré – autant dire, tous les *microarrays* existants*. Ces brevets, qui font bien sûr l'objet de contestations, sont le support d'attaques d'*Affymetrix* envers des entreprises accusées de les avoir enfreints. C'est ainsi qu'un procès est en cours depuis plusieurs années entre *Affymetrix* et *Incyle*, qui a racheté *Synteni* et repris à son compte les mesures d'expression à façon et, depuis peu, la vente directe de *microarrays*. Un autre procès, cette fois à l'initiative de la firme britannique *Oxford Gene Technology*, qui exploite les procédés de Southern, semble actuellement tourner à l'avantage d'*Affymetrix*. Il faut dire que cette entreprise, dont la capitalisation boursière représente aujourd'hui plus de deux milliards de dollars, a les moyens de payer de nombreux avocats, et détient un pouvoir d'intimidation considérable...

Pouvoir d'intimidation qui vient de pousser *Operon*, une filiale de *Quiagen*, à retirer ses *microarrays* du marché américain. Cette société, une de celles justement qui développe la voie intéressante que représentent les *microarrays* à base d'oligonucléotides longs,

prenait déjà soin de ne commercialiser que des réseaux peu denses, comportant moins de 400 éléments par cm^2 , afin justement d'éviter d'encourager les foudres d'*Affymetrix***.

Or une nouvelle interprétation des brevets suggère qu'ils pourraient couvrir aussi tout *array* comportant plus de 60 éléments par cm^2 (une densité de *microarray* très moyen) : moyennant quoi *Operon* a décidé de cesser toute vente aux États-Unis [17].

On en arrive là à une situation ubuesque, où une société qui a certes développé un procédé très intéressant, mais n'a inventé ni les réseaux d'ADN ni la mesure d'expression à grande échelle, est apparemment en mesure de bloquer le système. Appuyée sur sa puissance financière et sur des brevets accordés de façon bien légère, elle semble capable d'empêcher le développement de procédés qui pourraient s'avérer plus efficaces que le sien. Les investissements nécessaires pour mettre au point, puis amener sur le marché de nouveaux types de puces à ADN sont importants, et les industriels (ou « capital-risqueurs ») hésiteront à les engager si la commercialisation de leurs produits est à la merci d'un concurrent puissant, pourvu d'un large assortiment de brevets et assisté d'avocats agressifs. Tout cela rappelle naturellement l'histoire de la PCR et des brevets détenus par Roche – qui ont ralenti pour un temps les exploitations commerciales de ce procédé, sans pourtant avoir de conséquences dramatiques pour la recherche: le brevet acquis par Roche n'empêchait pas l'emploi de la PCR dans les laboratoires académiques, et l'entreprise a su assez rapidement accorder des licences – certes onéreuses – plutôt que de bloquer le marché. Dans le cas des puces à ADN, c'est la mise au point de nouveaux procédés qui nécessite un marché ouvert, afin que les firmes y affectent les moyens nécessaires: elle peut donc être considérablement ralentie ou même stoppée dans une telle conjoncture.

** On pourrait penser que cela fait d'*Operon* un concurrent peu dangereux, face aux centaines de milliers d'oligonucléotides par cm^2 que propose *Affymetrix*. Mais il faut quarante 20-mères à *Affymetrix* là où un seul 70-mère suffit à *Operon*: le combat n'est donc pas si inégal...

* Aux dernières nouvelles, ce serait même tout réseau dépassant la densité de 60 plots par centimètre carré, donc même les filtres à haute densité, qui existaient pourtant à l'époque où Fodor était encore (au sens figuré) en culottes courtes...

La biotech malade des brevets

Cette situation est symptomatique d'une dérive actuelle de la biotechnologie, secteur où les brevets prennent une importance démesurée et où l'existence d'un peu de propriété industrielle (aussi fragiles que soient les revendications de brevets souvent encore en cours d'examen) compte souvent plus que la solidité scientifique du projet ou que la compétence des acteurs de la nouvelle entreprise. Dérive qui prend toute son ampleur aux États-Unis, où une importante population d'avocats pousse aux procès tous azimuts tandis que certains juges rendent des décisions aberrantes (comme ces trois milliards de dollars accordés récemment à un fumeur contre la firme *Phillip Morris*), décisions qui encouragent d'autres procès tout aussi déraisonnables. Elle montre aussi les risques d'abus de position dominante dans un secteur en plein développement. Certes, le procédé *Affymetrix* est efficace, l'entreprise a été la première à proposer à la vente des puces prêtes à l'emploi permettant la mesure d'expression pour des milliers de gènes, et son potentiel d'évolution vers une miniaturisation accrue reste important. Faut-il pour autant la laisser libre d'étouffer le développement d'autres approches ?

A cet égard un programme lancé depuis la fin de l'année dernière par le ministère français de la Recherche pose, à la réflexion, quelques questions. Au départ, les intentions sont excellentes: puisque la technologie d'*Affymetrix* représente – personne ne le conteste – une des voies majeures pour l'analyse du transcriptome, le Ministère souhaite qu'elle soit sérieusement testée en France et finance l'installation des machines correspondantes dans deux centres, à Strasbourg et à Paris. Comme le débit de ces systèmes est important, il importe de permettre à d'autres équipes françaises de les utiliser, ce qui pose le problème du prix des puces: même après le rabais « académique » consenti par *Affymetrix*, il reste très élevé, près de 1 000 euros par puce (à usage unique). Le ministère de la Recherche réserve donc des crédits à cet effet et procède à un appel d'offres

afin que les meilleurs projets se voient subventionner le coût des puces à hauteur de 75 % du tarif académique, les 25 % restant à la charge du laboratoire. Encore une fois, tout cela découle des meilleures intentions; mais cela revient tout de même à subventionner, avec l'argent public, l'entreprise *Affymetrix* afin de rendre ses produits plus attractifs pour nos laboratoires... Il est possible que cela assure à la firme une clientèle qui, ayant goûté à sa version de la technologie, aura tendance (à moins que les résultats ne soient catastrophiques) à poursuivre dans cette voie. Qu'en pensent les laboratoires, comme le LETI du CEA, qui tentent de mettre au point des puces de deuxième génération et vont avoir à affronter *Affymetrix* sur le marché (et peut-être devant les tribunaux) ?

Les chances d'une évolution positive

Il faut espérer que les concurrents d'*Affymetrix* ne se décourageront pas et poursuivront la mise au point et la commercialisation de nouveaux systèmes susceptibles d'apporter un plus aux laboratoires ou aux services hospitaliers. Heureusement, certains d'entre eux disposent à la fois de ressources importantes, du fait de leur dimension, et d'une technologie originale. *Corning*, le géant du verre (capitalisation boursière : 20 milliards de dollars), a mis au point un ingénieux procédé d'impression de *microarrays* qui lui permet de produire dix réseaux de 10 000 plots par minute; *Motorola*, firme connue dans le secteur de la microélectronique (35 milliards) s'appuie, elle, sur un procédé original de puce à oligonucléotides. D'autres challengers, comme *Agilent* (ex-*Hewlett-Packard*), *Incyte* ou même *Clontech*, ne sont dépourvus ni d'approches originales ni de moyens.

Il serait bon aussi que les offices de brevets cessent d'accepter des revendications exagérément larges et – balayons devant notre porte – que les brevets européens et français soient sérieusement examinés de ce point de vue. Tout le monde (ou presque...) aurait à gagner à un libre développement de ces méthodes qui jouent un rôle si important en génomique... ■

RÉFÉRENCES

1. Monaco AP, Nizetic D, Craig A, *et al.* Human genome linking with cosmids and yeast artificial chromosomes. *Genome mapping and sequencing Meeting*. New York-Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 90.
2. Craig AG, Nizetic D, Hoheisel JD, Zehner G, Lehrach H. Ordering of cosmid clones covering the herpes simplex virus type I (HSV-I) genome: a test case for fingerprinting by hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 2653-60.
3. Lennon GG, Lehrach H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* 1991; 7: 314-7.
4. Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehner G, Lehrach H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* 1992; 3: 609-61.
5. Southern EM, Maskos U. Synthesis of oligonucleotides tethered to a glass surface: applications in the analysis of nucleic acid sequences. *Genome mapping and sequencing Meeting*. New York-Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 136.
6. Southern EM, Maskos U, Elder JK. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* 1992; 13: 1008-17.
7. Jordan BR. Chroniques Génomiques. Génomique: les méandres de la technologie. *Med Sci* 2001; 17: 290-3.
8. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially ad-

dressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991; 251: 767-73.

9. Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldit M, Bernard K, Naquet P, Jordan BR. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 1995; 29: 207-15.
10. Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y, Sakaki Y. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. *Gene* 1995; 156: 207-13.
11. Pietu G, Alibert O, Guichard V, *et al.* Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Res* 1996; 6: 492-503.
12. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
13. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, *et al.* Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996; 4: 1675-80.
14. The chipping forecast. *Nat Genet* 1999; 21 (suppl 1).
15. Jordan BR. Chroniques génomiques. Jusqu'où iront les puces ? *Med Sci* 2000; 16: 950-63.
16. Lee P, Hudson TJ. La puce ADN en médecine et en Science. *Med Sci* 2000; 16: 43-9.
17. Jones MM. Operon discontinues sale of arrays in North America due to concerns about Affy patents. *BioArray News* 2001; 1: 1-9.
18. Bertucci F, Bernard K, Loriod B, *et al.* Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements: performance of Nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1715-22.

Bertrand Jordan

Marseille-Génopole, Case 901, Parc de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France.

TIRÉS À PART

B. Jordan.