

LABORATOIRE SUR PUCE ET CANCÉROLOGIE

Apparue il y a une vingtaine d'années, la microfluidique était initialement définie comme l'étude et la manipulation de fluides dans des canaux de dimensions micrométriques. Ce champ interdisciplinaire allie les micro et nanotechnologies à la physique, la chimie et la biologie. L'un de ses objectifs est de développer des « laboratoires sur puce » : des systèmes de la taille d'une carte de crédit intégrant l'ensemble des opérations d'analyse habituellement réalisées en laboratoire (séparation, identification, quantification...).

La microfluidique a d'ores et déjà montré tout son potentiel dans la détection des cellules tumorales circulantes, en particulier grâce à des puces capables de trier les événements rares que représentent de telles cellules au sein de la multitude d'éléments non spécifiques que sont les cellules du sang. Il est possible à la fois de structurer les systèmes microfluidiques jusqu'à des dimensions nanométriques et de tirer parti des écoulements particuliers à l'échelle micrométrique pour trier les cellules en

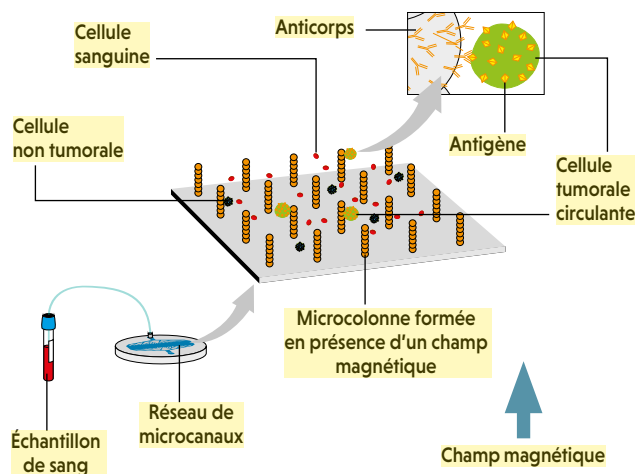
fonction de leur taille ou grâce à des antigènes présents à leur surface. Ainsi, grâce au dispositif microfluidique Ephesia (ci-dessous), développé dans les années 2000 et validé cliniquement par l'équipe de Jean-Louis Viovy à l'institut Curie et à l'IPGG, il est possible de capturer très efficacement les cellules tumorales contenues dans le sang de patients atteints de cancers métastatiques. On recherche ensuite sur ces cellules des anomalies génétiques prédictives de l'efficacité des traitements. L'ensemble de ces étapes est réalisé dans une puce microfluidique grande comme une carte de crédit. La microfluidique s'est aussi imposée pour l'analyse de l'ADN tumoral circulant. Il s'agit, comme avec les cellules, d'analyser quelques rares fragments d'ADN tumoral dans un océan d'ADN normal. Pour cela, des millions de gouttelettes d'eau de quelques picolitres (10^{-12} litre) sont créées dans de l'huile, de façon à ce que chacune d'elles ne contienne qu'une seule molécule d'ADN. L'ADN de chaque gouttelette est alors amplifié par PCR, une technique de

biologie moléculaire qui duplique en grand nombre une séquence d'ADN. Ainsi amplifié, l'ADN devient détectable. Cet ADN est soit normal soit muté, résultat que l'on peut « coder » en 0 ou 1, d'où le nom de microfluidique « digitale » (à deux solutions).

Avec cette approche, des événements rares tels que la présence d'ADN tumoral circulant ne sont plus dilués dans le bruit de fond de l'ADN normal : ils deviennent détectables. On peut alors réaliser dans ces gouttelettes toutes les étapes classiques de l'analyse de mutations. Par ce processus de digitalisation, l'équipe de Pierre Laurent-Puig, de l'unité Inserm UMR-S775 et de l'hôpital européen Georges-Pompidou, a démontré en 2013 qu'une seule copie mutée du gène *KRAS* (impliqué dans le cancer du côlon) était détectable parmi 200 000 copies non mutées du même gène. Ainsi, la microfluidique de gouttes combine les avantages de la digitalisation, de la miniaturisation et du haut débit pour l'analyse de l'ADN tumoral circulant.

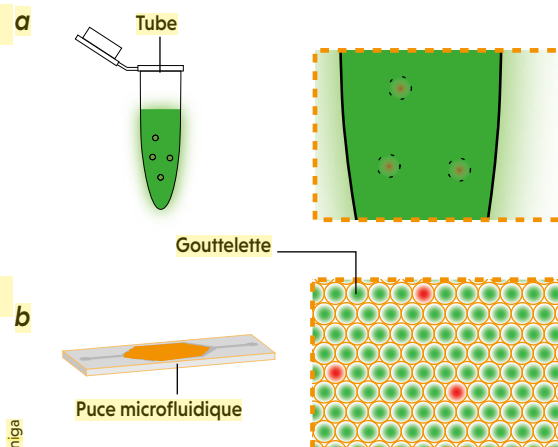
LE SYSTÈME MICROFLUIDIQUE EPHESIA

Le nom donné à cette technologie vient du temple d'Artémis à Éphèse, dont les colonnes ont été la proie de nombreuses destructions suivies de reconstructions. Dans ce dispositif, des microbilles magnétiques (*en orange*) portent un anticorps spécifique dirigé contre une protéine de surface propre aux cellules tumorales circulantes (antigène). Elles sont injectées dans des microcanaux dont le fond est tapissé de points d'encre magnétique. Soumises à un champ magnétique, elles forment spontanément des microcolonnes à partir de ces points d'encre magnétique (destructibles et reconstructibles à l'envi sous l'action de ce champ magnétique, comme celles du temple d'Artémis). Les différentes cellules injectées dans la puce microfluidique se « cognent » aux colonnes. Les cellules tumorales circulantes (*en vert*) sont capturées grâce à l'interaction des anticorps et de l'antigène tumoral, alors que les autres cellules sanguines (*en rouge et en bleu*) sont évacuées de la puce.



LA PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES

Jusqu'à présent, pour analyser les mutations de molécules d'ADN d'un échantillon, celles-ci sont mélangées dans un même tube, qu'elles soient mutées ou normales (a). L'amplification par PCR (réaction en chaîne par polymérase) préalable à la détection garde les mêmes proportions entre ADN muté et ADN normal. Le signal de l'ADN muté est alors noyé dans celui des ADN sains. Dans l'approche microfluidique (b), chaque molécule d'ADN est encapsulée dans une gouttelette. Pour ce faire, après avoir extrait et quantifié l'ADN présent dans le sang du patient, on le dilue de telle façon qu'on encapsule 0 ou 1 molécule par gouttelette selon la distribution statistique de Poisson. Cette



développer un cancer du poumon, des cellules tumorales circulantes ont été détectées avant l'apparition d'une masse tumorale visible au scanner. Les patients ont été opérés et n'ont pas récidivé dans l'année suivant l'opération. Ce résultat demandant à être confirmé, la même équipe a lancé une nouvelle étude, le projet *Air*, cette fois-ci sur 600 personnes à risque. Les résultats sont attendus pour 2019.

L'utilisation diagnostique de l'ADN tumoral circulant semble encore plus prometteuse. Un cas anecdotique, mais illustratif a été rapporté en 2013 par une équipe du Cancer Research UK Cambridge Institute: une patiente traitée successivement pour un cancer de l'ovaire, puis du côlon, avait, des années après, plusieurs métastases. L'analyse de l'ADN tumoral circulant a permis de retrouver des mutations génétiques similaires à celles du cancer de l'ovaire, alors que les mutations du cancer du côlon, différentes, étaient absentes. Cette signature a guidé le choix thérapeutique vers les chimiothérapies les plus actives sur les métastases d'origine ovarienne. On voit ici que cette approche dite de biopsie liquide, où la prise de sang remplace la biopsie classique des masses tumorales, serait utile chez les patients ayant un antécédent de cancer susceptible de récidiver.

Pour une utilisation dans la population générale, sans antécédent de cancer, ce type d'application diagnostique nécessite des techniques de détection extrêmement sensibles, pour éviter les faux négatifs, et spécifiques, pour empêcher les faux positifs. De telles sensibilités et spécificités ne sont pas encore atteintes, mais pourraient l'être dans les années à venir avec les améliorations continues des techniques de séquençage.

La donne est assez différente s'agissant du pronostic. Plus il y a de cellules tumorales circulantes, plus un cancer semble devoir évoluer rapidement et être à l'origine de rechutes et de nouvelles métastases. Les cellules tumorales circulantes constituent de ce fait un biomarqueur pronostique majeur en cancérologie. Toutefois, le niveau de preuve soutenant cette validité pronostique varie selon le nombre d'études réalisées et donc selon le type de cancer: actuellement, la certitude est indiscutable dans les cancers métastatiques du sein et de la prostate, intermédiaire dans les cancers métastatiques du côlon et pulmonaires, et faible dans les cancers plus rares.

Plus intéressant encore, les variations précoces du nombre de cellules tumorales circulantes au cours d'une chimiothérapie renseignent sur l'évolution des patients atteints de cancers du sein, de la prostate ou du côlon, au stade métastatique. Pour ces cancers, moins il y a de cellules tumorales

circulantes avant le début d'un traitement, plus l'évolution spontanée du cancer est lente; en outre, plus le niveau de cellules tumorales circulantes baisse en cours de traitement, plus celui-ci est efficace.

On distingue ainsi quatre types de patients, par ordre de gravité croissant: ceux dont le niveau de cellules tumorales est bas (indétectable) et le demeure durant la chimiothérapie, ce qui correspond à la meilleure situation; les patients dont le niveau de cellules tumorales circulantes est haut initialement, mais diminue en cours de chimiothérapie, indice que celle-ci est efficace; les patients dont le niveau de cellules tumorales circulantes est bas initialement, mais augmente pendant le traitement, situation peu favorable; et enfin, les patients dont le niveau de cellules tumorales circulantes est haut avant traitement et le reste malgré la chimiothérapie. Dans ces deux derniers groupes, la chimiothérapie entreprise se révèle souvent un échec, le cancer augmentant de volume statistiquement plus vite que dans les deux premiers groupes de patients.

DANS L'ATTENTE DES RÉSULTATS

Ces observations faites et reproduites, il reste à en démontrer l'utilité clinique: l'adaptation du type de traitement à la quantité de cellules tumorales circulantes permet-elle d'améliorer la prise en charge et le devenir des patients? C'est l'enjeu de plusieurs essais cliniques. Le premier, SWOG 0500, mené par le South-West Oncology Group américain, a été un échec retentissant: la prise en compte des variations en cours de traitement du nombre de cellules tumorales circulantes n'a pas permis d'améliorer le devenir des patientes traitées pour un cancer du sein métastatique. Les résultats d'autres essais sont donc vivement attendus: il s'agit de CirCe01 et STIC CTC, conduits en France par notre équipe à l'institut Curie, et de DETECT III, mené dans plusieurs villes d'Allemagne. Les résultats de ces trois essais seront rapportés dans les deux ans qui viennent.

L'impact pronostique de l'ADN tumoral circulant est un peu plus complexe à appréhender. En l'absence de masse tumorale visible, par exemple après qu'un cancer du sein a été opéré, sa détection signalerait la persistance de cellules cancéreuses résiduelles dans l'organisme, dont certaines meurent et libèrent de l'ADN. Cette «maladie résiduelle» serait alors susceptible de mener à une rechute ultérieure sous forme de métastases. Dans ce contexte, l'ADN tumoral circulant serait un facteur pronostique très fort. Malheureusement, les techniques actuelles ne sont pas encore assez sensibles pour être appliquées en routine; il faut en effet détecter les débris d'ADN largués par quelques

encapsulation se fait grâce à une puce microfluidique dédiée qui permet de former des gouttelettes d'eau dans l'huile. Après amplification par PCR, chaque gouttelette contient donc un grand nombre de copies soit d'ADN normal, soit d'ADN muté. Cette technique est dite digitale, car les gouttelettes n'ont finalement que deux types de fluorescence possible, correspondant au statut muté ou non de la molécule d'ADN initialement introduite dans la gouttelette.

Toutes les molécules d'ADN sont amplifiées ensemble.

Chaque gouttelette contient une molécule d'ADN, qui est amplifiée séparément.

ADN normal ADN tumoral

