

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

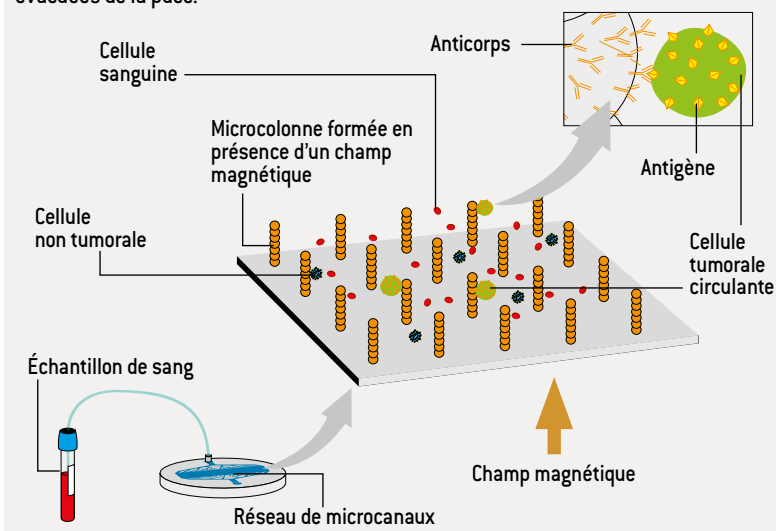
Depuis plusieurs années, la microfluidique a montré tout son potentiel dans la détection des cellules tumorales circulantes, en particulier grâce à des puces capables de trier les événements rares que représentent de telles cellules au sein de la multitude d'éléments non spécifiques que sont les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes 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 (voir la figure 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

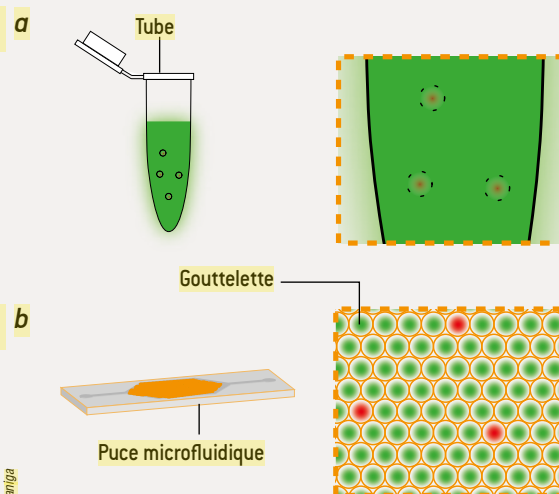
LE SYSTÈME MICROFLUIDIQUE EPHESIA

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



puce microfluidique grande comme une carte de crédit.

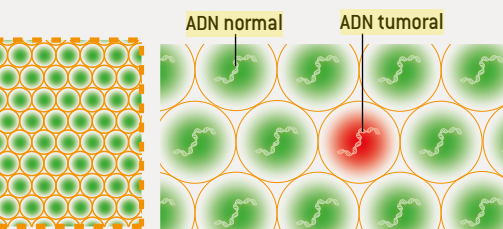
La microfluidique s'est aussi imposée comme une technologie de choix pour l'analyse de l'ADN tumoral circulant. Il s'agit, comme avec les cellules, d'analyser quelques rares fragments d'ADN tumoral dans un océan d'ADN normal issu de cellules saines. Pour cela, des millions de gouttelettes d'eau de quelques picolitres (10^{-12} litre) sont créées dans de l'huile, chacune d'elles ne contenant qu'une seule molécule d'ADN – c'est un point clé (voir la figure ci-dessus).

L'ADN contenu dans chaque gouttelette est alors amplifié par PCR (réaction en chaîne par polymérase), 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 l'appellation de microfluidique « digitale » (à deux solutions).

0 ou 1 molécule par gouttelette selon la distribution statistique de Poisson. Cette 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.



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, comme ce serait le cas dans une analyse classique. Ils deviennent détectables. Il est alors possible de 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.

développe. Elle peut donc caractériser la présence d'une tumeur primitive.

Dans ces conditions, comment tirer parti de ces deux biomarqueurs pour le diagnostic des cancers ? Pour le comprendre, replaçons-nous dans le contexte de la prise en charge médicale actuelle. Face à une anomalie de l'examen clinique, les médecins réalisent un ou plusieurs examens de radiologie, par exemple un scanner. Si une anomalie radiologique est jugée évocatrice d'un cancer, une biopsie diagnostique est entreprise : on prélève un fragment de la masse suspecte à l'aide d'une aiguille spéciale, voire par une opération chirurgicale.

Les biopsies sont des examens de routine, mais présentent de nombreux inconvénients : coûteuses pour le système de santé, éventuellement douloureuses, elles entraînent dans de très rares cas des complications graves, par exemple des saignements liés au passage de l'aiguille de ponction. Les biopsies demandent par ailleurs du personnel médical entraîné et doivent parfois être faites à l'hôpital. Dans ce contexte, on pourrait imaginer de les remplacer par la recherche de cellules tumorales circulantes ou des mutations génétiques caractéristiques d'un cancer dans l'ADN circulant, sur simple prise de sang. En cas de détection de mutations caractéristiques d'un cancer du pancréas, par exemple, il ne serait plus nécessaire de réaliser la biopsie d'une masse pancréatique suspecte pour poser le diagnostic.

Peu d'études ont été réalisées dans ce sens sur les cellules tumorales circulantes, et la plupart sont revenues négatives. Une exception, cependant, a été observée par l'équipe de Paul Hofman au CHU de Nice, à l'automne 2014. Ces chercheurs ont utilisé une technique de filtration du sang qui permet de ne retenir que les plus grosses cellules, dont font partie les cellules tumorales circulantes – une technique différente de celles précédemment utilisées, qui reposaient sur des propriétés biologiques (expression de protéines membranaires). Résultat : dans le sang de 5 patients parmi 245 personnes présentant le risque de développer un cancer du poumon, des cellules tumorales circulantes ont été détectées un à quatre ans avant l'apparition d'une masse tumorale visible au scanner. Les patients ont été opérés et ne montraient aucun signe de récurrence un an après. Ce résultat, s'il est confirmé de manière indépendante, permettrait d'utiliser la détection

de cellules tumorales pour dépister une tumeur initiale chez des patients dont le risque est avéré. Fin 2015, Paul Hofman a lancé une nouvelle étude avec la même technique, 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 deux types de cancers, l'un de l'ovaire, puis l'autre 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.

Les cellules tumorales circulantes : un intérêt pronostique majeur

Pour une utilisation dans la population générale, sans antécédent de cancer, ce type d'application diagnostique nécessite des techniques de détection extrêmement sensibles – pour ne pas rassurer faussement un patient vraiment porteur d'un cancer (faux négatif) – et spécifiques – pour ne pas diagnostiquer un cancer chez un sujet en réalité indemne (faux positif). 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 :