



(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/543 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2017/059209

(22) Date de dépôt international :
18 avril 2017 (18.04.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1653383 15 avril 2016 (15.04.2016) FR

(71) Déposants : CHU MONTPELLIER [FR/FR]; 191, Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 MONTPELLIER CEDEX 5 (FR). ECOLE SUPERIEURE DE PHYSIQUE ET DE CHIMIE INDUSTRIELLES DE LA VILLE DE PARIS [FR/FR]; 10, rue Vauquelin, 75005 PARIS (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, 75016 PARIS (FR). UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER [FR/FR]; 163 rue Auguste Broussonnet, 34090 MONTPELLIER (FR). AXLR, SATT DU LANGUEDOC ROUSSILLON [FR/FR]; place Eugène Bataillon, 34095 MONTPELLIER (FR).

(72) Inventeurs : ALIX - PANABIERES, Catherine Michèle Marilou; 10 rue du compagnon blanc, 34830 CLAPIERS (FR). GRIFFITHS, Andrew David; 69 boulevard Saint-Michel, 75005 PARIS (FR). DOINEAU, Raphaël Clément Li-Ming; 4 rue Lacépède, 75005 PARIS (FR). NI-ZAK, Clément; 57 rue Oberkampf, 75011 PARIS (FR). NGHE, Philippe Chi-Thanh; 67 avenue de Paris, 94160 SAINT-MANDE (FR). BAUDRY, Jean-Marie Pierre; 31 rue Saint Ambroise, 75011 PARIS (FR). BRIENT-LITZLER, Elodie Michèle Christine; 30 avenue de Paris, 78000 VERSAILLES (FR). EYER, Klaus; 56 rue de Mouzaia, 75019 PARIS (FR). BIBETTE, Jérôme; 37 rue Henri Barbusse, 75005 PARIS (FR).

(74) Mandataires : COLOMBIE, Damien et al.; Cabinet LA-VOIX, 2, place d'Estienne d'Orves, 75441 PARIS CEDEX 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR DETECTING AND/OR CHARACTERISING TUMOUR CELLS AND ASSOCIATED APPARATUS

(54) Titre : PROCÉDÉ DE DÉTECTION ET/OU DE CARACTÉRISATION DE CELLULES TUMORALES ET APPAREIL ASSOCIÉ

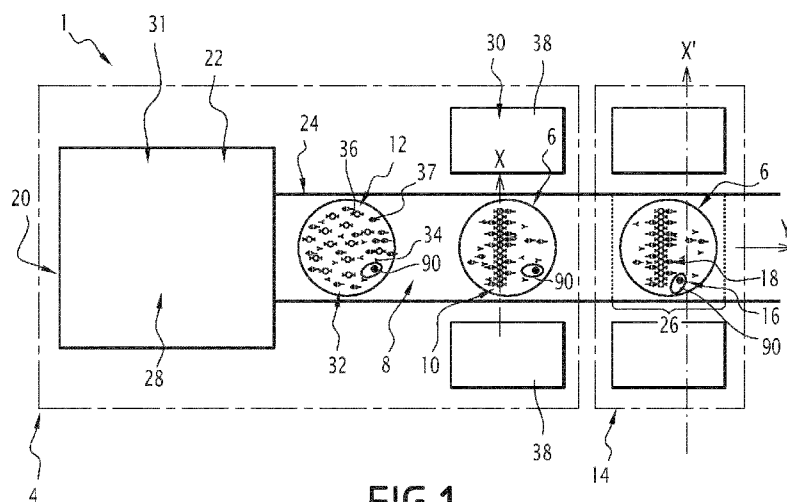


FIG.1

(57) Abstract : The present invention is in the field of biological diagnosis in oncology. The invention concerns an apparatus for detecting and/or characterising tumour cells by detection of one or more tumour-cell secretome elements, in particular one or more peptides or proteins and especially one or more tumour markers. The invention also relates to droplets for detecting and/or characterising tumour cells and the method of preparing same.

(57) Abrégé : La présente invention s'inscrit dans le domaine du diagnostic biologique en cancérologie. Elle a pour objet un procédé et un

[Suite sur la page suivante]





NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

Procédé de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales et appareil associé

La présente invention s'inscrit dans le domaine du diagnostic biologique en
5 cancérologie. Elle a pour objet un procédé et un appareil de détection et/ou de
caractérisation de cellules tumorales par détection d'un ou plusieurs éléments du
sécrétome de cellule tumorale, en particulier un ou plusieurs peptides ou protéines, et
notamment un ou plusieurs marqueurs tumoraux. L'invention concerne également des
10 gouttes de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales et leur procédé de
préparation.

L'article « *Challenges in circulating tumour cell research* » de la revue Nature
Reviews Cancer publié en septembre 2014, volume 14, p 623 à 6131, décrit différentes
technologies pour détecter des cellules tumorales circulantes.

Un procédé de détection de cellules tumorales circulantes communément désigné
15 par l'acronyme EPISPOT, pour l'anglais « Epithelial Immunospot », est connu de l'art
antérieur, notamment du document EP 1 506 407. Cette technique permet la détection de
cellules tumorales circulantes dans un échantillon biologique d'un patient atteint de cancer
solide, par détection de marqueurs tumoraux libérés par ces cellules. Elle met en œuvre
le dépôt de cellules sur une surface de culture solide, plus particulièrement des plaques
20 de 96 puits, à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits, un anticorps spécifique d'un marqueur
tumoral d'intérêt étant fixé sur cette surface de culture solide, suivi de la culture de ces
cellules, puis de l'élimination des cellules par lavage et de la détection du marqueur
tumoral d'intérêt par un anticorps spécifique marqué.

Cependant, la résolution obtenue par un tel procédé est limitée. En effet, dans un
25 même puits, les protéines détectées proviennent de différentes cellules. Il est difficile de
savoir quelle cellule a sécrété quoi. Le signal ne permet pas d'obtenir d'information sur
l'hétérogénéité cellulaire. En outre, il est difficile de récupérer les cellules pour analyser
leur génotype.

La présente invention vise à obtenir un procédé de détection plus précis et plus
30 fiable.

Le document WO 2009/011808 A1 décrit un procédé de détermination d'une
activité de fixation d'une protéine au sein d'une goutte.

La publication « Single-cell analysis and sorting using droplet-based
35 microfluidics », de Mazutis et al. publiée en ligne, le 4 avril 2013 dans la revue Nature
Protocols illustre ce principe.

Un hybridome de souris est encapsulé dans une goutte avec une bille recouverte d'anticorps anti-souris. L'hybridome sécrète des anticorps. Un anticorps secondaire couplé à un fluorophore permet de révéler la présence de l'anticorps sécrété. La distribution de l'anticorps secondaire est, en l'absence d'anticorps sécrété, homogène dans la goutte, mais elle se relocalise sur la bille en présence d'anticorps. Ce procédé est donc très sélectif pour déterminer l'activité d'une cellule particulière.

Par contre, un tel procédé présente divers inconvénients. Le procédé de compartimentation des cellules et des billes est aléatoire. Le nombre de billes dans les gouttes peut être estimé par une loi de distribution de Poisson. De même, le nombre de cellules au sein des gouttes peut être estimé par une loi de distribution de Poisson indépendante. Les concentrations initiales en billes et en gouttes sont ajustées pour avoir en moyenne une cellule et une bille par goutte. Seule une partie des gouttes présente donc un intérêt pour l'analyse réalisée.

Par ailleurs, la présence d'une bille unique de taille significative par goutte n'est pas favorable à la résolution de la méthode. En effet, les anticorps secondaires se répartissent sur toute la surface de la bille. La gamme dynamique du procédé est donc limitée par la surface externe disponible par bille.

Un but de l'invention est de fournir un procédé d'analyse plus fiable et plus sensible que les procédés existants permettant l'analyse du sécrétome de cellules vivantes, uniques ou sous forme d'un agrégat, pour détecter et/ou caractériser des cellules tumorales, et notamment les cellules tumorales uniques ou les agrégats de cellules tumorales.

A cet effet, l'invention a pour objet un procédé de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales comprenant:

- la fourniture d'une pluralité de gouttes contenues dans un fluide porteur, au moins une des gouttes comprenant au moins un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal, au moins certaines gouttes contenant une cellule susceptible de produire au moins un élément cible du sécrétome d'une cellule tumorale propre à se fixer sur l'agrégat ;

- la mesure d'au moins un paramètre physique caractéristique de la fixation d'un élément cible du sécrétome d'une cellule tumorale sur l'agrégat ; et

- la détection et/ou la caractérisation de cellules tumorales à partir de la mesure dudit au moins un paramètre physique.

Plus spécifiquement, le procédé de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales selon l'invention comprend :

- la fourniture d'une pluralité de gouttes contenues dans un fluide porteur, les gouttes comprenant une pluralité de particules propre à former un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal, au moins certaines gouttes contenant une cellule ;

- l'incubation de la pluralité de gouttes dans des conditions et pendant une durée suffisante pour que, dans les gouttes contenant une cellule, la cellule soit susceptible de produire au moins un élément cible du sécrétome d'une cellule tumorale, propre à se fixer sur l'agrégat ;

- la formation dans chaque goutte d'au moins un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal ;

- la mesure d'au moins un paramètre physique, chaque paramètre physique étant caractéristique de la fixation d'un élément cible distinct du sécrétome d'une cellule tumorale sur l'agrégat ; et

- la détection et/ou la caractérisation de cellules tumorales à partir de la mesure dudit au moins un paramètre physique.

Ladite cellule est une cellule unique ou un agrégat de cellules, notamment un agrégat soupçonné d'être un agrégat de cellules tumorales.

Les agrégats de cellules tumorales sont d'origine oligoclonale et résultent de l'adhésion, ou du regroupement, de plusieurs cellules tumorales primaires. Les agrégats de cellules tumorales peuvent contenir typiquement 2 à 15 cellules tumorales. Ils sont essentiellement constitués de cellules tumorales, mais peuvent aussi contenir d'autres types de cellules, telles que des leucocytes, des plaquettes, en nombre limité.

Le procédé selon l'invention concerne donc en particulier un procédé de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales uniques comprenant :

- la fourniture d'une pluralité de gouttes contenues dans un fluide porteur, au moins une des gouttes comprenant au moins un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal, au moins certaines gouttes contenant une cellule unique ;

- l'incubation des gouttes contenant une cellule unique dans des conditions et pendant une durée suffisante pour que la cellule unique soit susceptible de produire au moins un élément cible du sécrétome d'une cellule tumorale, propre à se fixer sur l'agrégat;

- la mesure d'au moins un paramètre physique, chaque paramètre physique étant caractéristique de la fixation d'un élément cible distinct du sécrétome d'une cellule tumorale sur l'agrégat ; et

- la détection et/ou la caractérisation de cellules tumorales uniques à partir de la mesure dudit au moins un paramètre physique.

Par « goutte contenant une cellule unique » on entend que la goutte comprend une seule cellule.

Par « goutte contenant une cellule tumorale unique » on entend que la goutte comprend une seule cellule qui est une cellule tumorale.

Au sens de l'invention, une cellule tumorale n'est pas une cellule créée par fusion artificielle d'une cellule tumorale avec une autre cellule, telle qu'un hybridome.

En particulier, le procédé est destiné à déterminer la présence de gouttes, voire à sélectionner des gouttes, comprenant une cellule unique dont le sécrétome comprend un élément cible particulier, cet élément cible étant une molécule du sécrétome d'une cellule tumorale, et en particulier un marqueur tumoral.

Le sécrétome d'une cellule est l'ensemble des éléments (molécules organiques ou inorganiques, telles que les protéines, peptides, glucides, lipides, ou acides nucléiques, ou encore vésicules) présents dans le milieu conditionné d'une cellule en culture. Le terme 'sécrétome' désigne dans un sens particulier la partie du protéome (c'est-à-dire l'ensemble des protéines et peptides exprimés par la cellule) qui est présente dans le milieu conditionné d'une cellule en culture.

Ces molécules, et en particulier protéines ou peptides sont :

- sécrétées (par la voie dite 'classique' impliquant le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, ou par des voies dites 'non classiques' telles que le transport actif à travers une protéine membranaire transporteur, ou la sécrétion via des endosomes de recyclage ou des vacuoles d'exocytose). C'est le cas par exemple de la protéine PSA (Prostate Specific Antigen), de la mammaglobine, de la kallikréine 3 humaine (hK3), de l'« human glandular kallikrein » (hK2), de la thyroglobuline, des protéines CA19-9, CA15-3, CA 125 (« CA » étant l'abréviation de « cancer antigen »), de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), de la Cathepsine D, de l'alphafoetoprotéine, de la protéine S100, du FGF-2 ou de l'EGF ;

- clivées dans leur domaine extracellulaire, lorsqu'il s'agit de protéines membranaires dont le domaine extracellulaire est clivé enzymatiquement et relâché dans le milieu extracellulaire (« shed protein » en anglais). Par exemple, les marqueurs HER2, EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) ou MUC 1 sont des protéines clivées ; ou

- relargués par la cellule. Les molécules relarguées sont par exemple des protéines non membranaires sécrétées par la cellule par des voies différentes des voies de sécrétion, par exemple par bourgeonnement, comme la protéine CK 19 (Cytokeratin 19).

Les exosomes font aussi partie du sécrétome des cellules tumorales. Il s'agit de vésicules constituées d'une membrane de bicouche lipidique entourant un petit cytosol. Le cytosol des exosomes peut comprendre des protéines, de l'ADN double brin, mais aussi de l'ARN (en particulier ARNm, miRNA). Les exosomes permettraient aux cellules tumorales de transférer des protéines et/ou des acides nucléiques oncogéniques pour moduler l'activité de cellules receveuses, jouant ainsi un rôle dans la tumorigénicité, la croissance tumorale, les processus métastatiques et la résistance aux médicaments.

Le procédé selon l'invention peut comprendre l'une ou plusieurs des caractéristiques suivantes, prises isolément ou suivant toutes combinaisons techniquement possibles :

i) les particules sont des particules magnétiques, avantageusement paramagnétiques, de préférence superparamagnétiques ;

ii) l'étape de fourniture des gouttes comprend :

- la dispersion des particules dans une masse de fluide destinée à former les gouttes, puis

- la dispersion de la masse de fluide sous forme de gouttes,

- la formation dans chaque goutte d'au moins un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal, l'agrégat de particules étant formé dans chaque goutte après la dispersion ;

iii) l'élément cible est un élément du sécrétome d'une cellule tumorale,

iv) l'élément cible est un peptide ou une protéine du sécrétome d'une cellule tumorale;

v) l'élément cible est un acide nucléique (ADN ou ARN), en particulier un miRNA d'une cellule tumorale;

vi) l'élément cible est un exosome d'une cellule tumorale;

vii) au moins certaines gouttes comprennent une entité productrice susceptible de produire l'élément cible, l'entité productrice étant une cellule tumorale unique ou un agrégat de cellules tumorales, et en particulier une cellule tumorale circulante (CTC) unique, une cellule tumorale disséminée (DTC) unique, ou un agrégat de CTCs ou DTCs;

viii) le procédé comprend avant l'étape de mesure, une étape d'orientation de l'axe principal de l'agrégat selon un axe de détection ;

ix) le procédé comprend de multiples étapes de mesure, avec une étape d'orientation de l'axe principal de l'agrégat selon un axe de détection différent pour chacune des mesures ;

x) le procédé comprend :

- 5 - la fourniture d'un dispositif comprenant un ensemble de mise en circulation de la goutte et une zone de détection ;
- le transport de la goutte vers la zone de détection, la mesure au sein de la goutte étant effectuée dans la zone de détection ;

xi) le procédé comprend :

- 10 - la fourniture d'un dispositif comprenant un ensemble de mise en circulation de la goutte et une pluralité de zones de classement, et un moyen de direction de la goutte ou d'une partie de la goutte sélectivement vers une zone de classement,

- la décision de classement de la goutte ou d'une partie de la goutte, la
- 15 décision consistant à choisir sélectivement une zone de classement parmi la pluralité des zones de classement,

 - le transport de la goutte, respectivement d'une partie de la goutte, vers la zone de classement de la goutte choisie lors de l'étape de décision ;

- xii) au moins une goutte comprend au moins un élément cible, au moins un
- 20 élément de capture apte à capturer l'élément cible et au moins une entité de signalisation apte à former un complexe avec l'élément cible, éventuellement capturé par l'élément de capture, le procédé comprenant la mesure d'un signal indiquant la relocalisation ou la concentration de ladite au moins une entité de signalisation sur l'agrégat ;

- xiii) au moins une goutte comprend au moins un élément cible, au moins une
- 25 première entité de signalisation apte à former un complexe avec l'élément cible et au moins une seconde entité de signalisation distincte apte à former un complexe avec l'élément cible, le procédé comprenant la mesure d'un signal indiquant la concentration de chacune des entités de signalisation relocalisées sur l'agrégat ;

- xiv) au moins une goutte comprend au moins un élément cible, au moins une
- 30 entité de signalisation apte à former un complexe avec l'élément cible et au moins une entité de quantification apte à former un complexe avec l'élément cible, le procédé comprenant :

- la mesure d'un signal représentatif de la concentration de l'entité de signalisation relocalisée sur l'agrégat,

- 35 - la mesure d'un signal représentatif de la concentration de l'entité de quantification relocalisée sur l'agrégat,

- la détermination de la constante de dissociation de l'élément cible avec l'entité de signalisation à partir du rapport du signal de l'entité de signalisation relocalisée sur le signal de l'entité de quantification relocalisée ;

xv) au moins une goutte comprend au moins deux entités de signalisation distinctes, chacune des deux entités de signalisation étant apte à former un complexe avec un élément cible distinct sur l'agrégat, le procédé comprenant la mesure d'un signal indiquant la concentration de chacune des entités de signalisation relocalisée ;

xvi) au moins certaines gouttes comprennent une entité productrice, l'entité productrice étant une cellule susceptible de produire un élément du sécrétome d'une cellule tumorale, chaque élément du sécrétome d'une cellule tumorale étant un élément cible distinct, la mesure du signal indiquant la concentration de chacune des entités de signalisation relocalisée permettant une quantification du ou des élément(s) du sécrétome ;

xvii) la mesure d'un paramètre physique est une mesure de radioactivité, de colorimétrie ou de fluorescence ;

xviii) au moins une des gouttes comprend une cellule apte à sécréter l'élément cible et le procédé comprend une étape d'incubation au cours de laquelle l'élément cible est sécrété dans la goutte par la cellule ;

xix) le procédé comprend une étape de mesure d'un paramètre physique, localement en un premier point situé à l'écart de l'agrégat dans au moins une des gouttes et du même paramètre physique, localement en un deuxième point au voisinage de l'agrégat dans la même goutte ;

xx) la dimension maximale des particules est inférieure à 50 % du diamètre de la goutte ;

xxi) la goutte contient au moins une entité de signalisation, et la mesure du paramètre physique dépend de la position de l'entité de signalisation au sein de la goutte ou par rapport à l'agrégat ;

xxii) l'entité productrice produit plusieurs éléments cibles choisis dans le groupe constitué par les éléments, et en particulier les protéines et peptides, du sécrétome d'une cellule tumorale;

xxiii) le procédé comporte une étape de détermination d'au moins une caractéristique de l'entité productrice ;

xxiv) l'étape de décision de classement a lieu après l'étape de mesure ;

xxv) la goutte contient des particules superparamagnétiques, la goutte ou la partie de la goutte est dirigée vers la zone de classement par un moyen de direction choisi

parmi un champ magnétique, un champ électrique, une diélectrophorèse, une électrocoalescence ou une onde acoustique de surface ;

xxvi) une partie de la goutte est extraite au moyen de la force magnétique, la partie extraite formant une goutte auxiliaire et contenant l'agrégat ;

5 xxvii) les particules sont fonctionnalisées avec un élément de capture propre à fixer l'élément cible et chaque goutte comprend une entité de signalisation propre à fixer l'élément cible ;

 xxviii) l'entité de signalisation est fluorescente, radioactive ou colorée ;

10 xxix) la mesure d'un paramètre physique est une mesure de chromométrie, de fluorescence ou de radioactivité ;

 xxx) la mesure du paramètre physique comprend la localisation d'un signal de fluorescence, de chromométrie ou de radioactivité au sein de la goutte ;

15 xxxi) la mesure du paramètre physique comprend la localisation d'un signal de fluorescence de chromométrie ou de radioactivité par rapport à l'agrégat, au sein de la goutte ;

 xxxii) la mesure du paramètre physique comprend la mesure de l'intensité d'un signal de fluorescence, de chromométrie ou de radioactivité au sein de la goutte, de préférence au niveau de l'agrégat ;

20 xxxiii) la mesure du paramètre physique comprend la variation au cours du temps de la localisation et/ou de l'intensité d'un signal de fluorescence, de chromométrie ou de radioactivité au sein de la goutte, de préférence au niveau de l'agrégat ;

25 xxxiv) chaque goutte comprend au moins deux entités de signalisation distinctes, chacune des deux entités de signalisation étant apte à former un complexe avec un élément cible distinct sur l'agrégat, chaque entité de signalisation étant fluorescente dans un canal de fluorescence distinct ;

 xxxv) la cellule est une cellule tumorale, en particulier une cellule tumorale unique ou un agrégat de cellules tumorales ;

30 xxxvi) la cellule, en particulier la cellule unique ou l'agrégat de cellules, est issue d'un fluide biologique et est choisie dans le groupe constitué par une cellule tumorale circulante et une cellule tumorale disséminée ;

 xxxvii) l'étape de mesure comporte la mesure dudit au moins un paramètre physique localement en une pluralité de points situés dans la goutte, l'étape de mesure comportant de préférence la détermination de l'intégrale des valeurs mesurées au sein de la goutte ;

35 xxxviii) l'étape de mesure est effectuée dans une chambre microfluidique sans circulation des gouttes ;

xxxix) le procédé comprend :

- la fourniture d'un dispositif comprenant un ensemble de mise en circulation de la goutte et une pluralité de zones de classement, et un moyen de direction de la goutte ou d'une partie de la goutte sélectivement vers une zone de classement,

- la décision de classement de la goutte ou d'une partie de la goutte, la décision consistant à choisir sélectivement une zone de classement parmi la pluralité des zones de classement,

- le transport de la goutte, respectivement d'une partie de la goutte, vers la zone de classement de la goutte choisie lors de l'étape de décision,

et éventuellement en outre la récolte de la goutte triée par transport vers la zone de classement, la lyse de la goutte triée et récoltée, puis la lyse de la goutte et la récolte de la cellule tumorale vivante contenue dans la goutte triée et lysée.

xl) au moins une goutte comprend au moins deux entités de signalisation distinctes, chacune des deux entités de signalisation étant apte à former un complexe avec un élément cible distinct sur l'agrégat, le procédé comprenant la mesure d'un signal indiquant la concentration de chacune des entités de signalisation relocalisées ;

xli) au moins certaines gouttes comprennent une cellule, unique ou sous forme d'un agrégat, susceptible de sécréter, cliver ou relarguer un ou plusieurs éléments du sécrétome de cellule tumorale, chaque élément du sécrétome de cellule tumorale étant un élément cible distinct, la mesure du signal indiquant la concentration de chacune des entités de signalisation relocalisées permettant une quantification du ou des éléments du sécrétome de cellule tumorale.

L'invention a également pour objet un appareil de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales, uniques ou sous forme d'un agrégat de cellules tumorales, comprenant :

- un ensemble de fourniture d'une pluralité de gouttes contenues dans un fluide porteur, au moins une des gouttes comprenant au moins un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal, au moins certaines gouttes contenant une cellule tumorale, unique ou sous forme d'un agrégat de cellules, susceptible de produire un élément cible propre à se fixer sur l'agrégat,

caractérisé en ce que l'appareil comprend un ensemble de mesure d'un paramètre physique caractéristique de la fixation d'un élément cible sur l'agrégat,

l'appareil comprenant éventuellement en outre:

- un ensemble de mise en circulation de la goutte,

- un ensemble de décision de classement de la goutte,
- un ensemble de tri de la goutte selon la décision de classement.

L'invention a également pour objet une goutte de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales, uniques ou sous forme d'un agrégat de cellules tumorales, comprenant une pluralité de particules propre à former un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal, et une cellule tumorale, unique ou sous forme d'un agrégat de cellules tumorales, et éventuellement au moins un élément cible du sécrétome de la cellule tumorale, unique sous forme d'un agrégat de cellules tumorales, propre à se fixer sur l'agrégat.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation de gouttes de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales, uniques ou sous forme d'un agrégat de cellules tumorales, comprenant :

- la dispersion, dans une masse de fluide destinée à former des gouttes, de particules propres à former un agrégat définissant un objet allongé selon un axe principal, et d'une pluralité de cellules, au moins certaines cellules étant des cellules tumorales susceptibles de produire un élément cible du sécrétome d'une cellule tumorale, puis
- la dispersion de la masse de fluide sous forme de gouttes, de sorte que chaque goutte comprenne une pluralité de particules et qu'au moins certaines gouttes comprennent, en outre, une cellule, unique ou sous forme d'un agrégat, et
- éventuellement la formation dans chaque goutte d'au moins un agrégat de particules définissant un objet allongé selon un axe principal, l'agrégat de particules étant formé dans chaque goutte après la dispersion.

L'invention, en particulier selon le mode 'cellule unique', sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, donnée uniquement à titre d'exemple, et faite en se référant aux dessins annexés, sur lesquels :

- la figure 1 est une représentation schématique des éléments principaux d'un premier appareil d'analyse selon l'invention,
- la figure 2 et la figure 3 sont des représentations schématiques d'une étape de procédé avec le premier appareil,
- les figures 4 à 7 sont des photographies d'une partie d'un deuxième appareil suivant l'invention lors de différentes étapes de procédé suivant l'invention,
- la figure 8 est une représentation schématique d'un troisième appareil selon l'invention,

- les figures 9 et 10 représentent des ensembles d'espacement de gouttes et de lecture,
 - les figures 11 et 12 représentent des dispositifs de générations de gouttes,
 - la figure 13 est une représentation schématique d'une goutte lors d'une
- 5 étape de mise en œuvre d'un procédé,
- les figures 14 à 26 illustrent des exemples d'application du procédé.

Premier appareil

10 Un premier appareil d'analyse 1 du contenu de gouttes et de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales, uniques ou sous forme d'un agrégat de cellules tumorales, suivant l'invention est représenté sur la figure 1.

L'appareil 1 comprend un ensemble de fourniture 4 d'une pluralité de gouttes 6 contenues dans un fluide porteur 8, au moins une partie des gouttes 6 comprenant au moins un agrégat 10 de particules 12 définissant un objet allongé selon un axe principal X.

15

Un objet allongé est un objet présentant une forme allongée. Une forme allongée présente selon l'axe principal, une longueur supérieure à sa longueur suivant une direction perpendiculaire à l'axe principale. Ainsi, une sphère n'est pas allongée. Par exemple, un objet oblong, un cône, une tige ou un ovoïde non sphérique présentent des formes allongées.

20

L'appareil 1 comprend, en outre, un ensemble de mesure 14 d'un paramètre physique dans la goutte.

L'ensemble de mesure 14 est, par exemple, propre à effectuer la mesure d'un paramètre physique, localement en un premier point 16 situé à l'écart de l'agrégat 10 dans au moins une des gouttes et du même paramètre physique localement en un

25

deuxième point 18 au voisinage de l'agrégat 10 dans la même goutte.

L'appareil 1 comporte également un dispositif 20 comprenant un ensemble de mise en circulation 22, un conduit de circulation 24 et une zone de détection 26.

L'ensemble de mise en circulation 22 est apte à faire circuler chaque goutte 6 dans le fluide porteur 8 dans le conduit 24 sous forme d'un train de gouttes successives.

30

L'ensemble de fourniture 4 comprend un ensemble de chargement 28 et un ensemble d'agrégation 30. L'ensemble de fourniture 4 comprend en outre un ensemble d'espacement 31.

L'ensemble de chargement 28 est apte à fournir une pluralité de gouttes initiales 32 comprenant une dispersion de particules 12, au moins une des gouttes initiales 32

35

comprenant en outre au moins un élément cible 37 du sécrétome d'une cellule tumorale 90.

L'ensemble d'espacement 31 est apte à espacer deux gouttes successives 6 du train de goutte, c'est-à-dire à augmenter la distance entre deux gouttes successives. Par exemple, l'ensemble d'espacement 31 comporte une entrée de fluide porteur 8. Des exemples d'ensemble d'espacements sont représentés sur les figures 9 et 10.

Le fluide porteur 8 est apte à séparer deux gouttes successives 6 du train de gouttes pour empêcher leur contact. En variante, la séparation des gouttes 6 est effectuée par un dispositif mécanique.

Le fluide formant la phase interne des gouttes 6 et le fluide porteur 8 sont sensiblement immiscibles. Par exemple, les gouttes 6 comprennent une phase interne aqueuse et le fluide porteur 8 est une phase organique ou huileuse.

Le fluide porteur 8 est avantageusement une huile fluorée.

Le fluide porteur 8 ou le fluide formant la phase interne des gouttes comprend avantageusement un tensio-actif apte à empêcher la fusion de deux gouttes 6 en contact, comme par exemple tel que décrit dans le brevet US 2010/0105112 ou encore le surfactant EA de la société RainDance Technologies.

Par « sensiblement immiscibles », on entend généralement que la solubilité du fluide formant les gouttes dans le fluide porteur 8, mesurée à 25°C et à pression ambiante, est inférieure à 1 %.

La taille des gouttes 6 est, par exemple, comprise entre 1 µm et 1000 µm. Le volume des gouttes 6 est compris avantageusement entre 0.1 picolitre et 1 microlitre.

Les gouttes 6 fournies sont sensiblement monodisperses. Ceci signifie que la polydispersité des gouttes 6 est inférieure à 5 %.

Dans l'exemple représenté, les gouttes 6 sont sphériques. En variante, les gouttes 6 sont de forme allongée selon l'axe de circulation Y du conduit 24. En variante, les gouttes 6 sont de forme de palet aplati selon un axe perpendiculaire à l'axe de circulation Y.

Composition des gouttes

Chaque goutte initiale 32 comprend un fluide de base, une dispersion de particules 12 solides dans le fluide de base et une pluralité d'entités de signalisation 34. En outre au moins une goutte initiale 32 comprend une cellule 90, de préférence une cellule tumorale unique ou un agrégat de cellules tumorales, et éventuellement au moins un élément cible 37 du sécrétome de cellule tumorale.

Comme indiqué ci-dessus, le volume d'une goutte 6 est compris avantageusement entre 0.1 picolitre et 1 microlitre. Le volume d'une cellule est d'environ 1 picolitre. Pour encapsuler une cellule unique ou un agrégat de cellule tumorale, on choisira avantageusement un volume de goutte compris entre 20 et 150 picolitres, par exemple de 20 à 50 picolitres, ou encore de 30 à 40 picolitres, notamment pour les cellules uniques, ou encore de 60 à 150 picolitres, ou encore de 80 à 120 picolitres, notamment pour les agrégats de cellules.

L'analyse des cellules uniques et des agrégats peut être fait simultanément ou séquentiellement. Pour l'analyse simultanée, on utilise avantageusement des volumes de gouttes adaptés pour pouvoir encapsuler les agrégats de cellules (par exemple de 60 à 150 picolitres, typiquement environ 100 pl). Pour l'analyse séquentielle, un système de séparation intégré (avec des techniques telles que décrites dans Sajeesh and Sen, Microfluidics and Nanofluidics 2014, 17, 1-52) peut être utilisé pour séparer cellules uniques et agrégats de cellules, suivi par une encapsulation séparée des cellules uniques d'une part, et des agrégats de cellules d'autre part. Alternativement, les cellules uniques et les agrégats de cellules sont encapsulés dans des gouttes de petit volumes (par exemple de 20 à 50 picolitres), et les agrégats de cellules sont triés, et du volume est ajouté aux gouttes contenant les agrégats de cellules dans un deuxième temps. La séparation des cellules uniques et agrégats de cellules peut aussi être faite préalablement à la mise en œuvre de l'invention, et les cellules uniques et agrégats de cellules sont alors analysés séquentiellement et séparément.

La goutte comprend initialement la cellule dans le fluide de base, typiquement un milieu adapté à la culture de cellules de mammifère (et en particulier de cellules humaines) tel que le DMEM ou RPMI, le fluide de base étant alors dépourvu d'éléments du sécrétome de la cellule. Les éléments du sécrétome s'accumulent au cours du temps, dans le fluide de base, par sécrétion, clivage ou relargage à partir de la cellule unique.

Le fluide de base est adapté pour qu'une cellule unique ou un agrégat de cellules dans la goutte soit susceptible de produire au moins un élément cible du sécrétome d'une cellule tumorale, propre à se fixer sur l'agrégat, en particulier lorsque la cellule unique est une cellule tumorale ou lorsque l'agrégat de cellules contient ou consiste en des cellules tumorales.

Par exemple, chaque cellule tumorale 90, unique ou sous forme d'un agrégat de cellules, encapsulée dans une goutte est apte à produire un élément cible 37. En particulier, les cellules tumorales 90 sécrètent, clivent ou relarguent des éléments du sécrétome tels que des protéines ou des peptides, en particulier des protéines ou des peptides marqueurs de la tumeur. Les cellules tumorales, uniques ou sous forme d'un

agrégat de cellules, sont notamment des cellules tumorales circulantes ou des cellules tumorales disséminées.

Les particules 12 sont destinées à former l'agrégat 10 de forme allongée. Par exemple, les particules 12 sont des particules superparamagnétiques qui acquièrent un moment magnétique à l'application d'un champ magnétique. Le superparamagnétisme est un comportement des matériaux ferromagnétiques ou ferrimagnétiques qui apparaît lorsqu'ils sont sous la forme de petits grains ou nanoparticules. Dans des grains de taille suffisamment petite, l'aimantation peut se renverser spontanément sous l'influence de la température. Le terme « particules magnétiques » dans le texte désigne des particules superparamagnétiques.

Les particules magnétiques 12 sont, par exemple, choisies parmi les particules fournies par la société Dynal (Life Technologies) ou Ademtech ou Miltenyi.

Les particules 12 sont par exemple nanométriques. Ainsi, leur dimension maximale est inférieure à 1 μm et est par exemple comprise entre 50 nm et 1000 nm. Les particules 12 sont avantageusement sensiblement monodisperses. Par exemple, la variation entre les dimensions maximales des particules 12 est strictement inférieure à 10 %. La taille et le nombre de particules 12 par gouttes 6 sont choisies pour former le nombre désiré d'agrégats. La dimension maximale des particules 12 est inférieure à 50 % du diamètre de la goutte 6.

La concentration de particules 12 permet une stabilité colloïdale.

La concentration de particules 12 par gouttes 6 est telle que les particules 12 occupent entre 0,1 % et 5 % du volume de la goutte 6, par exemple 1,7 %.

Dans un exemple, chaque goutte 6 de 33 picolitres contient en moyenne 500 particules 12 de 300 nm de diamètre.

Les particules 12 forment initialement une dispersion homogène dans les gouttes initiales 32. Elles sont réparties sensiblement uniformément dans le volume de la goutte initiale 32. Ainsi, la concentration en particules 12 est homogène sur l'ensemble de la goutte initiale 32.

Les particules 12 possèdent avantageusement une surface permettant le couplage de molécules biologiques, constituée d'un matériau de surface. Par exemple les particules 12 sont couvertes d'un polymère présentant des fonctions COOH ou NH₂.

Avantageusement, ce matériau de surface permet également de limiter l'agrégation spontanée des particules 12 dans la goutte.

De manière additionnelle, il peut avantageusement favoriser la stabilité de l'agrégat 10, par exemple, via des liaisons non spécifiques entre le matériau d'une bille et de sa voisine dans l'agrégat.

Les particules 12 sont avantageusement fonctionnalisées. Ceci signifie notamment que le matériau de surface des particules 12 comporte des éléments fonctionnels.

Dans l'exemple représenté, les éléments fonctionnels comportent un élément de capture 36. L'élément de capture 36 est, par exemple, apte à capturer l'élément cible 37. L'élément de capture 36 est apte à se lier indirectement à l'entité de signalisation 34 par l'intermédiaire de l'élément cible 37.

L'élément cible 37 secrété ou relargué par la cellule tumorale, unique ou sous forme d'un agrégat, ou bien clivé de la cellule tumorale, unique ou sous forme d'un agrégat, est reconnu à la fois par les éléments de capture 36 des particules 12 et par les entités de signalisation 34.

Lorsque l'élément cible 37 est une protéine, un peptide, un lipide, un glucide ou un exosome du sécrétome, les éléments de capture 36 sont avantageusement constitués par un anticorps polyclonal ou un anticorps monoclonal (en multiples copies) dirigés contre, ou spécifiques de l'élément cible 37.

Lorsque l'élément cible 37 est un acide nucléique cible, tel qu'un miRNA, du sécrétome, les éléments de capture 36 sont avantageusement constitués par un acide nucléique (en multiples copies) s'hybridant à l'acide nucléique cible, de préférence un acide nucléique comprenant ou constitué d'une séquence complémentaire à la séquence de l'acide nucléique cible. L'acide nucléique de capture est typiquement une séquence d'ADN, constituée par exemple de 10 à 200, 10 à 100, 10 à 50, ou 10 à 30 nucléotides.

Lorsque l'élément cible 37 est un exosome, les éléments de capture 36 sont avantageusement constitués par des anticorps dirigés contre une protéine présente dans la membrane, ou par des lipides ou stérols immobilisés sur une surface solide, par exemple des particules, comme décrit dans Kuhn et al. (Integr. Biol, 2012, 4, 1550-1555).

De la même manière, selon la nature de l'élément cible, les entités de signalisation 34 sont avantageusement constituées par (i) un anticorps polyclonal ou un anticorps monoclonal (en multiples copies) dirigés contre, ou spécifiques de l'élément cible 37, l'anticorps monoclonal ou polyclonal étant marqué de manière détectable, ou (ii) un acide nucléique de signalisation (en multiples copies) s'hybridant à l'acide nucléique cible, de préférence un acide nucléique comprenant ou constitué d'une séquence complémentaire à la séquence de l'acide nucléique cible, l'acide nucléique de signalisation étant marqué de manière détectable.

Le marqueur peut être typiquement un radioélément, un composé chromophore, un fluorophore, ou une enzyme couplée de manière directe ou indirecte à l'anticorps ou à l'acide nucléique.

La présence de ces éléments cibles 37 dans la goutte 6 permet la relocalisation des entités de signalisation 34 sur l'agrégat 10, comme cela sera décrit par la suite.

En revanche, lorsque la cellule unique n'est pas une cellule tumorale, lorsque l'agrégat de cellules ne contient pas de cellule tumorale, ou lorsque la cellule unique ou l'agrégat de cellules ne produit pas, ou pas en quantité suffisante, l'élément cible 37 du sécrétome de cellule tumorale, les entités de signalisation 34 ne se relocalisent pas sur l'agrégat 10.

La relocalisation des entités de signalisation 34 sur l'agrégat permet ainsi de détecter que la cellule, unique ou sous forme d'un agrégat, sécrète, clive ou relargue l'élément cible 37 et donc:

- de caractériser que la cellule est une cellule tumorale si l'élément cible est un marqueur spécifique des cellules tumorales ou d'un type de cellule tumorale, et/ou
- de caractériser que l'élément cible 37 fait partie du sécrétome de la cellule.

Lorsque plusieurs éléments cibles 37 distincts sont recherchés, des entités de signalisations différentes et des éléments de captures différents distincts sont associés. Leur relocalisation est détectée indépendamment par des entités de signalisations différentes et des éléments de captures différents, par exemple sur des canaux de fluorescence différents.

Chaque relocalisation d'une entité de signalisation 34 distinctes associées à un élément cible distinct permet de détecter que la cellule sécrète, clive ou relargue l'élément cible 37 associé.

L'ensemble d'agrégation 30 est apte à engendrer une agrégation des particules 12 selon un axe principal X.

L'ensemble d'agrégation 30 comporte, par exemple, deux aimants 38 situés de part et d'autre du conduit 24. Le champ magnétique est non parallèle à l'axe de circulation Y et avantageusement perpendiculaire à l'axe de circulation Y. L'ensemble d'agrégation 30 permet la formation d'un agrégat allongé dans chaque goutte 6.

Dans un mode de réalisation les aimants 38 sont permanents.

En variante, l'ensemble d'agrégation 30 comporte un aimant non-permanent.

En variante, l'ensemble d'agrégation 30 est apte à basculer d'un mode actif à un mode inactif afin de générer des agrégats 10 allongés dans certaines gouttes seulement.

Chaque agrégat 10 de particules 12 comporte par exemple une colonne orientée suivant un axe principal X. La hauteur de la colonne est avantageusement comprise entre 50 % et 100 % du diamètre de la goutte 6. Sa largeur est, par exemple, inférieure à 60 % de sa hauteur.

De plus, l'ensemble d'agrégation 30 est, par exemple, apte à orienter l'agrégat suivant un axe préférentiel. Dans l'exemple représenté, l'axe X de l'agrégat 12 est perpendiculaire à l'axe de circulation Y des gouttes 6 dans le conduit de circulation 24.

5 L'ensemble de mesure 14 comprend par exemple une ligne laser apte à mesurer de manière optique l'intensité de la fluorescence selon une ligne s'étendant selon un axe X' perpendiculaire ou incliné par rapport à l'axe de circulation Y.

L'ensemble de mesure 14 est apte à effectuer la mesure au sein de la goutte dans la zone de détection 26.

10 L'axe X' de la ligne laser est avantageusement parallèle à l'axe de l'agrégat X dans la zone de détection 26.

Lorsque le débit du fluide porteur 8 est constant, la mesure en fonction du temps du signal obtenu par la ligne laser correspond à un balayage spatial de la goutte 6 passant devant la ligne laser. Ceci permet de prendre successivement plusieurs points de mesure et en particulier au moins un premier point 16 de mesure situé à l'écart de 15 l'agrégat 10 et un deuxième point 18 de mesure situé plus proche de l'agrégat 10, au voisinage de l'agrégat 10.

En pratique, une pluralité de points de mesure successifs sont pris sur toute la dimension longitudinale de la goutte 6 lors de son passage progressif en regard de l'ensemble de mesure 14.

20 Dans l'exemple représenté sur les figures 1 à 3, l'entité de signalisation 34 est fluorescente.

Le conduit de circulation 24 est destiné à permettre la circulation des gouttes 6, 32 suivant l'axe de circulation Y dans un sens de circulation allant de l'ensemble de fourniture 4 vers l'ensemble de mesure 14.

25 Le conduit de circulation 24 présente avantageusement un diamètre intérieur inférieur ou égal à 1 mm.

Le conduit de circulation 24 est allongé selon l'axe de circulation Y. Le conduit de circulation 24 présente une section transversale intérieure de contour arrondi tel que circulaire ou elliptique, ou de contour polygonal tel que rectangulaire.

30 Le conduit de circulation 24 est par exemple défini dans un matériau translucide permettant la mesure de paramètres optiques par l'ensemble de mesure 14. En variante, le conduit de circulation 24 définit au moins une fenêtre de mesure transparente dans la zone de détection 26.

Les parois du conduit de circulation 24 sont étanches au fluide porteur 8.

Par exemple, le conduit de circulation 24 est défini dans un tube capillaire de dimension interne avantageusement inférieure à 1 mm. En variante, le conduit de circulation 24 est défini dans une puce microfluidique.

5 L'ensemble de mise en circulation des gouttes 22 est destiné à déplacer une à une les gouttes 6, 32 dans le conduit 24 dans le sens de circulation.

L'ensemble de mise en circulation 22 comprend par exemple un pousse-seringue permettant d'appliquer des débits contrôlés au fluide porteur 8. En variante l'ensemble de mise en circulation 22 comprend un contrôleur de pression.

10 **Procédé d'analyse avec le premier appareil**

Un premier procédé d'analyse suivant l'invention mis en œuvre dans le premier appareil 1 va maintenant être décrit.

Un appareil 1 tel que précédemment décrit est fourni. Des gouttes initiales 32 telles que décrites plus haut sont préparées dans un fluide porteur 8.

15 De préférence, les particules 12 sont dispersées de manière homogène dans chaque goutte initiale 32. Compte tenu de la faible taille des particules 12 individuelles par rapport aux gouttes initiales 32, chaque goutte initiale 32 contient un nombre élevé de particules individuelles 12 par exemple supérieur à 10. La probabilité d'obtenir une goutte initiale 32 dépourvue de particules 12 est très faible, voire nulle.

20 Certaines gouttes 6 comprennent une cellule tumorale unique 90 sécrétant, relargant ou clivant l'élément cible 37.

De préférence, les entités de signalisation 34 sont dispersées de manière homogène dans chaque goutte initiale 32.

25 Au sein de la goutte initiale 32, des liaisons se forment entre les éléments ayant des affinités particulières.

Dans un exemple, chaque élément cible 37 se lie à une entité de signalisation 34 et à un élément de capture 36. L'entité de signalisation 34 est ainsi relocalisée sur une particule 12.

Dans la suite, on entend par entités « relocalisées », les entités liées à l'agrégat 10.

30 Les gouttes initiales 32 sont mises en circulation conjointement avec le fluide porteur 8 dans le conduit 24 par l'ensemble de mise en circulation 22.

Au moins une goutte initiale 32 est conduite vers l'ensemble d'agrégation 30. Un agrégat 10 de particules 12 définissant un objet allongé selon un axe principal X est formé par l'ensemble d'agrégation 30 dans la goutte initiale 32.

De préférence, lorsque les particules 12 sont des particules magnétiques, elles s'alignent le long de l'axe principal X lors de leur passage en regard de chaque aimant 38 de l'ensemble d'agrégation 30.

La goutte 6 comprenant l'objet allongé est conduite vers la zone de détection 26.

5 Un paramètre physique est mesuré localement par l'ensemble de mesure 14 en au moins un premier point 16 dans au moins une des gouttes 6.

Dans une mise en œuvre particulière, un paramètre physique est mesuré localement par l'ensemble de mesure 14 en au moins un premier point 16 dans au moins une des gouttes 6 et le même paramètre physique est mesuré localement en au moins un

10 deuxième point 18 au voisinage de l'agrégat 10 dans la même goutte 6 par l'ensemble de mesure 14.

Mesure

La figure 2 représente à titre illustratif différentes mesures obtenues pour

15 différentes gouttes 6. Le graphique représente l'intensité de fluorescence mesurée par la ligne laser en fonction du temps.

L'intensité de fluorescence est mesurée dans une gamme de longueur d'onde caractéristique de l'entité de signalisation 34. Dans l'exemple, l'intensité de fluorescence est, en outre, mesurée dans une gamme de longueur d'onde caractéristique des

20 particules 12, les particules 12 étant fluorescentes. L'agrégat 10 est ainsi plus facilement repérable.

L'intensité de fluorescence 40 correspondant à la fluorescence de l'entité de signalisation 34 mesurée sur la ligne laser est présentée en pointillés sur la figure 2 pour

différentes gouttes 6.

L'intensité de fluorescence 41 correspondant à la fluorescence des particules 12 est présentée en traits pleins sur la figure 2 pour différentes gouttes 6.

25

L'étape de mesure comporte la détermination du paramètre physique localement en une pluralité de points situés dans la goutte. Elle comprend en outre avantageusement un cumul des valeurs mesurées en une pluralité de points, par exemple la détermination

30 de l'intégrale des valeurs mesurées au sein de la goutte 6.

La première goutte 42 représentée est une goutte 6 dans laquelle les différentes entités de signalisation 34 n'ont pas été relocalisées sur les particules 12. La répartition des entités de signalisation 34 est homogène au sein de la goutte 6. Un signal d'intensité de fluorescence sous forme d'un plateau 44 est mesuré.

La deuxième goutte 48 représentée est une goutte 6 dans laquelle une partie des entités de signalisation 34 a été relocalisé sur les particules 12. En effet, ces entités de

35

signalisation 34 sont liées à un élément cible 37 capturé par l'élément de capture 36. L'intensité de fluorescence au voisinage de l'agrégat 10 est donc plus importante que dans le reste de la goutte 6. Un signal d'intensité de fluorescence présentant un pic 50 en plus d'un plateau 52 est mesuré.

5 La hauteur du plateau 52 de la deuxième goutte 48 est plus faible que la hauteur du plateau 44 de la première goutte 42 car moins d'entités de signalisations 34 sont libres à l'écart de l'agrégat 10.

10 La troisième goutte 56 représentée est une goutte 6 dans laquelle une proportion plus importante des entités de signalisation 34 a été relocalisée sur l'agrégat. Un signal d'intensité de fluorescence présentant un pic 58 et un plateau 59. La hauteur du pic 58 mesurée est plus importante que la hauteur du pic 50 mesurée dans la deuxième goutte 48 car plus d'entités de signalisation 34 sont capturées par les particules 12 et sont donc situées au voisinage de l'agrégat 10.

15 La figure 3 illustre le choix des paramètres utiles pour estimer la concentration d'entités de signalisation 34 relocalisées.

20 Sur la figure 3 qui représente le signal S au cours du temps t, on voit trois gouttes contenant un (à gauche et à droite) ou deux agrégats (au centre) qui présentent un pic plus élevé de signal. Le paramètre utile peut-être le maximum du signal (indiqué Max) ou l'intégrale du signal par rapport à un seuil donné (Int).

Une première méthode consiste à estimer cette concentration par la valeur maximale du signal (Max) dans chaque goutte 6, c'est-à-dire la hauteur des pics de signal relocalisés sur l'agrégat.

25 Une seconde méthode, plus précise, consiste à calculer l'intégrale des signaux (Int) pour chaque goutte 6 au-delà d'un seuil fixé par l'utilisateur, comme représenté par exemple sur la figure 3. Cette méthode peut s'avérer plus intéressante pour limiter la dispersion du signal.

Ces deux méthodes de traitement du signal peuvent être effectuées en temps réel.

30 D'autres méthodes, par exemple combinant ces approches, pourraient être appliquées, par exemple pour mesurer à la fois l'entité de signalisation 34 relocalisée et non relocalisée.

L'invention permet, en outre, de mesurer la concentration de l'élément cible 37 dans la goutte 6.

Un cas simple pour ce faire est de se placer dans le cas où :

- l'élément de capture 36 est en quantité suffisante et d'affinité suffisante pour l'élément cible 37 pour capturer au moins plus de 90 % de l'élément cible sur l'agrégat, avantageusement la totalité ;

- la concentration de l'entité de signalisation 34 est supérieure à celle de l'élément cible 37 et la constante de dissociation K_d entre l'entité de signalisation 34 et l'élément cible 37 est inférieure à la concentration de l'élément cible 37, avantageusement d'un facteur supérieur à 10. Ceci est typiquement le cas quand on utilise des réactifs de dosage optimisés comme des anticorps monoclonaux de K_d subnanomolaires, et qu'on veut détecter des concentrations d'élément cible 37 supérieures au nanomolaire.

On entend par « nanomolaire » égal à 1 nanomole/L.

Dans ces conditions particulière, la présence de chaque élément cible 37 donne lieu à la formation d'un complexe élément de capture 36 - élément cible 37 - entité de signalisation 34. La concentration de l'élément cible 37 est donc proportionnelle au signal de l'entité de signalisation 34 relocalisé sur l'agrégat 10. D'autres conditions permettent de réaliser cette quantification et seront évidentes à l'homme de l'art en modifiant les concentrations et les affinités des éléments de capture 36, ou des entités de signalisation 34 pour l'élément cible 37.

Application : détection de cellule tumorale

Si l'élément cible est un marqueur spécifique du sécrétome d'une cellule tumorale, sa détection peut suffire à détecter les cellules tumorales, uniques ou sous forme d'un agrégat, encapsulées.

Si l'élément cible est un marqueur caractéristique du sécrétome d'une cellule tumorale, mais non spécifique des cellules tumorales, sa détection en combinaison avec un ou plusieurs autres éléments cibles constituant des marqueurs caractéristiques du sécrétome d'une cellule tumorale peut permettre de détecter que la cellule unique encapsulée est une cellule tumorale.

A la suite de l'étape de mesure, une information sur la nature tumorale de la cellule encapsulée dans la goutte, sous forme de cellule unique ou dans un agrégat de cellules, est obtenue.

Cette information permet de savoir quelles gouttes doivent être récupérées en aval pour d'autres mesures ou utilisations.

Le procédé permet ainsi de détecter des cellules tumorales isolées à partir d'un échantillon biologique comprenant des cellules hétérogènes. Les cellules non tumorales ou les cellules tumorales ne produisant pas l'élément cible sont repérées car leur goutte ne contient pas l'élément cible et les entités de signalisation n'auront pas été relocalisées.

Ce procédé permet ainsi d'effectuer une détection voire un comptage de cellules tumorales dans une population de cellules provenant d'un échantillon biologique.

Application : caractérisation de cellule tumorale

5 Si les cellules uniques encapsulées sont uniquement des cellules tumorales, la mesure de l'élément cible peut permettre d'obtenir des informations relatives à la production de l'élément cible par la cellule tumorale unique, par exemple à sa concentration.

10 Si l'agrégat de cellules encapsulées contient une ou des cellules tumorales, la mesure de l'élément cible peut permettre d'obtenir des informations relatives à la production de l'élément cible par l'agrégat de cellules, par exemple à sa concentration.

A la suite de l'étape de mesure, une information est obtenue sur une ou des caractéristiques de chaque cellule tumorale encapsulée dans la goutte, ou de chaque agrégat contenant une ou des cellules tumorales encapsulé(es) dans la goutte.

15 Cette information permet d'obtenir des informations sur l'hétérogénéité ou les propriétés des cellules tumorales.

Application : détection et caractérisation de cellule tumorale

20 Au cours de la mesure, on peut obtenir à la fois des informations sur la nature tumorale de la cellule et sur des caractéristiques de la cellule tumorale, par exemple en détectant l'élément cible et en mesurant sa concentration.

25 En outre, en détectant plusieurs éléments cibles, on peut obtenir un grand nombre d'informations simultanément. Par exemple certains éléments cibles sont des marqueurs tumoraux et d'autres éléments du sécrétome, tels que des protéines ou peptides, qui ne sont pas spécifiquement des marqueurs tumoraux.

A la suite de l'étape de mesure, une information sur des caractéristiques de chaque cellule tumorale encapsulée dans la goutte est obtenue.

Cette information permet d'obtenir des informations sur l'hétérogénéité des cellules tumorales et différents mécanismes.

30

Deuxième appareil

Les figures 4 à 7 illustrent une partie d'un deuxième appareil 60 suivant l'invention.

35 Ce deuxième appareil 60 diffère du premier appareil 1 en ce que le dispositif 20 comporte une chambre 62. La chambre 62 comporte une pluralité de passages de circulation 64 et une pluralité de plots de séparation 66.

D'autres chambres sont possibles. Dans une variante, des chambres ne comprennent pas de plots de séparation tels que décrits dans le document PCT/FR2009/051396.

La chambre 62 est destinée à stocker une pluralité de gouttes 6 dans un fluide porteur 8 pendant une étape d'agrégation ou une étape d'orientation et pendant l'étape de mesure.

L'ensemble de mesure du deuxième appareil 60 diffère de l'ensemble de mesure 14 du premier appareil 1 en ce qu'il est apte à mesurer le paramètre physique simultanément sur plusieurs gouttes 6 présentes dans la chambre 62.

La figure 4 présente la chambre 62 contenant des gouttes initiales 32 dans un fluide porteur 8. La dispersion des particules 12 magnétique est visible. La figure 5 présente la même chambre 62 après la formation des agrégats 10 dans les gouttes. Une pluralité d'agrégats allongés est formée dans chaque goutte 6. La figure 6 présente dans un même dispositif 60 une pluralité de gouttes 6 présentant des agrégats 10 allongés. La nature et la quantité de gouttes 6 ont été ajustées pour qu'un seul agrégat 10 allongé soit présent par goutte. La présence d'un unique agrégat 10 par goutte 6 facilite la mesure. La figure 7 présente la même chambre 62 après une étape d'orientation des agrégats selon un même axe de détection D.

Procédé d'analyse avec le deuxième appareil

Le procédé d'analyse suivant l'invention à partir de ce deuxième appareil 60 diffère du procédé précédemment décrit en ce que la mesure est effectuée sur la pluralité de gouttes 6 simultanément, par exemple par mesure dans toute la chambre 62 en même temps, et non par circulation des gouttes 6 devant un détecteur.

Un avantage de ce procédé est qu'il est possible de répéter la mesure du paramètre physique sur une même gouttelette au cours du temps, puisque les gouttes sont stationnaires, et de pouvoir ainsi déterminer la cinétique de sécrétion d'un élément du sécrétome.

Le procédé diffère également en ce qu'il comprend avant l'étape de mesure, une étape d'orientation de l'axe principal X de l'agrégat 10 selon un axe de détection D.

Avantageusement, on pourra multiplier les axes de détection, en appliquant des champs magnétiques d'orientation variable. Cette approche à l'avantage de permettre de discriminer l'agrégat 10 d'autres objets de la goutte non magnétiques, ou réduire les signaux parasites. Par exemple, le bruit de fond en fluorescence peut être réduit. Par exemple, la détection selon différents axes permet de distinguer une relocalisation de

l'entité de signalisation 34 sur un agrégat 10 d'une relocalisation de l'entité de signalisation 34 sur un autre objet de la goutte 6, par exemple sur une cellule.

Une implémentation de cette idée consiste à appliquer un champ magnétique B1 pour aligner l'axe principal X de l'agrégat 10 selon une première orientation D1, puis à
5 appliquer un champ magnétique B2 perpendiculaire à B1 pour aligner l'axe principal X de l'agrégat 10 selon une deuxième orientation D2 perpendiculaire à D1.

Troisième appareil

Un troisième appareil 70 suivant l'invention est représenté sur la figure 8. Ce
10 troisième appareil 70 diffère du premier appareil 1 en ce qu'il comporte en outre un ensemble de classement 72.

De plus, le troisième appareil 70 diffère du premier appareil 1 en ce que l'ensemble de chargement 28 comprend une zone d'entrée 74 de la phase interne et une zone d'entrée du fluide porteur 76 et une zone de jonction 78. L'ensemble de chargement
15 28 comprend en outre une zone d'incubation 79.

La zone d'entrée de la phase interne 74 comporte un premier conduit d'entrée 80, un deuxième conduit d'entrée 82 et un conduit de co-écoulement 84.

Le premier conduit d'entrée 80 est destiné à l'introduction de la première masse de fluide 86 destinée à former une partie de la phase interne des gouttes. Dans l'exemple, la
20 première masse de fluide interne comporte les particules 12 et une pluralité d'entités de signalisation 34.

Le deuxième conduit d'entrée 82 est destiné à l'entrée de la deuxième masse de fluide 88 destinée à former une partie de la phase interne des gouttes. Dans l'exemple, la deuxième masse de fluide interne comporte une suspension de cellules susceptible de
25 contenir des cellules tumorales productrices 90 de l'élément cible 37.

La concentration des cellules 90 dans la deuxième masse de fluide est avantageusement telle qu'une proportion importante de gouttes contiennent une cellule 90 seulement, par exemple plus de 10 % des gouttes contient une cellule 90.

Le conduit de co-écoulement 84 permet une répartition des deux masses de fluide
30 86, 88 destinée à former la phase interne.

La zone d'entrée du fluide porteur 76 est destinée à l'entrée du fluide porteur 8. Dans l'exemple représenté, le fluide porteur 8 entre par deux conduits d'entrées 92.

La zone de jonction 78 joint la zone d'entrée du fluide porteur 76 et la zone d'entrée de la phase interne 74. En particulier, la zone de jonction joint le conduit de co-écoulement 84 aux conduits d'entrées 92 du fluide porteur.
35

La zone de jonction 78 est apte à former les gouttes initiales 32. La zone de jonction 78 représentée ici est une jonction de focalisation hydrodynamique. Des exemples de jonctions de focalisation hydrodynamique sont illustrés sur les figures 11 et 12. En variante les gouttes initiales 32 sont formées dans une jonction T.

5 Les gouttes initiales 32 comprenant un mélange des deux masses de fluides 86, 88 sont formées. Les gouttes initiales 32 comprennent une dispersion de particules 12 et des entités de signalisation 34.

Au moins certaines gouttes initiales 32 comprennent en outre une cellule 90, unique ou sous forme d'un agrégat de cellules.

10 La zone d'incubation 79 est située en aval de la zone de jonction 78. La zone d'incubation est destinée à permettre la sécrétion de l'élément cible 37 par les cellules 90, uniques ou sous forme d'agrégats de cellules.

Avantageusement, la puce comprend un moyen d'apport ou d'échange d'oxygène dans la zone d'incubation 79.

15 En variante, l'incubation est effectuée hors du dispositif 20.

Le troisième appareil 70 diffère également en ce que le dispositif 20 comprend en outre une pluralité de zones de classement 94, 96 et un moyen de direction 98 de la goutte ou une partie de la goutte sélectivement vers une zone de classement 94, 96.

20 Les zones de classement 94, 96 sont situées en aval de la zone de détection 26. Le conduit 24 comporte une bifurcation 100 en deux conduits de sorties 102, 104. La première zone de classement 94 comporte le premier conduit de sortie 102 destiné à recevoir un premier groupe de gouttes 106. La deuxième zone de classement 96 comporte le deuxième conduit de sortie 104 destiné à recevoir un deuxième groupe de gouttes 108. En variante, le dispositif 20 comporte un nombre plus important de zones de
25 classement 94, 96 suivant le nombre de critères de tri.

Le moyen de direction 98 des gouttes sélectivement est par exemple apte à diriger une goutte 6 vers une zone de classement 94, 96 au moyen d'une force magnétique.

En variante les gouttes 6 sont dirigées au moyen d'électrodes.

30 Par exemple, les gouttes sont dirigées vers une zone de classement, par diélectrophorèse, par électrocoalescence avec un courant ou par des ondes acoustiques de surface (SAW).

Procédé d'analyse avec le troisième appareil

35 Le procédé d'analyse avec le troisième appareil 70 suivant l'invention va maintenant être décrit.

Un appareil 70 tel que précédemment décrit est fourni. Une suspension de particules 12 magnétiques et d'entités de signalisation 34 est préparée et injectée dans le premier conduit d'entrée 80.

Une suspension de cellules 90 susceptible de contenir des cellules tumorales est préparée et injectée dans le deuxième conduit d'entrée 82.

Un fluide porteur 8 est fourni et injecté dans les conduits d'entrées de fluide porteur 92.

Les fluides 86, 88 sont mis en mouvement au moyen des ensembles de mise en circulation 22. Les gouttes initiales 32 sont formées dans la zone de jonction 78.

Le procédé comporte, en outre, une étape d'incubation au cours de laquelle la cellule 90, unique ou sous forme d'un agrégat de cellules, compartimentée est susceptible de sécréter, cliver ou relarguer, l'élément cible 37 du sécrétome de cellule tumorale à analyser, par exemple la protéine ou peptide du sécrétome de cellule tumorale. L'incubation est ainsi réalisée dans des conditions et pendant une durée suffisante pour que la cellule 90, en particulier lorsqu'elle est sous forme de cellule unique, soit susceptible de produire au moins un élément cible 37 du sécrétome d'une cellule tumorale.

Typiquement, l'étape d'incubation dure 5 minutes à 32 heures, par exemple environ 1 à 24 heures, ou encore 2 à 9 heures, notamment pour l'analyse de cellules fraîchement récupérées d'un fluide biologique d'un patient. En variante, l'étape d'incubation dure 32 à 72 heures, par exemple environ 32 à 48 heures, par exemple environ 36 heures, notamment pour l'analyse de cellules décongelées.

L'incubation est en général réalisée à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, avec 5% de CO_2 . L'incubation est typiquement réalisée en présence d'un tampon ou milieu approprié.

Un avantage du procédé selon l'invention est que, par rapport au procédé d'analyse EPISPOT tel que décrit dans la demande de brevet EP 1 506 407, la durée de l'étape d'incubation peut être raccourcie du fait de la sensibilité du procédé selon l'invention. Du fait de l'accumulation des éléments du sécrétome dans le volume restreint de la goutte, à durée d'incubation équivalente, la concentration des éléments du sécrétome à détecter sera plus élevée dans le procédé selon l'invention comparativement au procédé EPISPOT. La mise en œuvre du procédé selon l'invention est donc plus rapide et plus sensible.

Les gouttes 6 comprennent avantageusement un milieu de culture permettant le maintien en vie des cellules 90 dans la goutte pendant trois jours ou plus. Il s'agit typiquement d'un milieu de culture de cellules mammifères, notamment de cellules humaines, avec ou sans sérum.

L'étape d'incubation est réalisée dans la zone d'incubation 79 du dispositif 20.

En variante, cette étape est réalisée hors du dispositif 20.

Les étapes de formation de l'agrégat 10 et de mesure sont les mêmes que pour le procédé d'analyse avec le premier appareil 1.

5 Le procédé diffère en ce que l'étape de mesure est suivie d'une étape d'analyse. L'étape d'analyse permet de déterminer à quel groupe 106, 108 appartient une goutte 6 suivant des critères prédéterminée et de générer une décision de classement par goutte 6 après l'étape de mesure.

10 Suivant la décision de classement, la goutte 6 est dirigée vers l'une des zones de classement 94, 96 par le moyen de direction 98.

Dans l'exemple représenté sur la figure 8, les gouttes 106 dans lequel le signal de forte intensité de fluorescence est localisé majoritairement au voisinage de l'agrégat 10 sont dirigées dans la première zone de classement 94. Les gouttes du premier groupe 106 correspondent par exemple aux troisièmes gouttes 56 de la figure 2.

15 Ces gouttes 106 contiennent par exemple les cellules tumorales 90, uniques ou sous formes d'agrégats de cellules tumorales, dont le sécrétome comprend l'élément cible 37. Les gouttes 106 sont éventuellement récupérées pour que leur contenu, et notamment la ou les cellules tumorales contenues, soit analysé par d'autres techniques, ou pour que les cellules tumorales 90, uniques ou sous formes d'agrégats de cellules tumorales, soient remises en culture.

20 Les gouttes 108 dans lequel un signal différent, notamment un signal sensiblement homogène sur la goutte 108, a été mesuré sont dirigées vers une autre zone de classement 96. Le deuxième groupe de gouttes 108 comporte par exemple des gouttes ne comprenant pas de cellule 90 et des gouttes contenant une cellule unique 90 ne produisant pas l'élément cible 37 du sécrétome de cellule tumorale en quantité ou en qualité suffisante.

30 Une fois les cellules tumorales 90 vivantes identifiées par leur sécrétome et triées, de nombreuses analyses ultérieures peuvent être réalisées, éventuellement après lyse des gouttes et ré-encapsulation des cellules tumorales 90 vivantes dans des gouttes, comme par exemple l'analyse du transcriptome (ARN messagers pour l'expression des gènes, et microARNs), du génome, de l'épigénome, ou du protéome (Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. Cancer Discov. 2016).

35 L'analyse du transcriptome, en particulier l'analyse des ARNm, des cellules tumorales (notamment des CTCs) peut révéler des informations très importantes sur la

sensibilité à un médicament et sa résistance. Par exemple, dans le cancer de la prostate métastatique et résistant à la castration, l'expression de l'ARNm ARV7, une forme tronquée du récepteur aux androgènes qui n'a plus de domaine de liaison à son ligand mais qui persiste actif, dans les CTCs pourrait prédire l'échec des thérapies anti-androgène (notamment des thérapies utilisant Enzalutamide et/ou abiraterone). Des patients dont les CTCs expriment cet ARNm ARV7 peuvent cependant rester sensibles aux taxanes et la détection de ce variant d'épissage ARV7 dans les CTCs pourrait devenir un marqueur de sélection d'un traitement approprié chez ces patients.

Les microARNs (miARNs) sont des régulateurs clés de l'expression des gènes et sont devenus de potentiels marqueurs diagnostiques et des cibles importantes pour les thérapies anti-cancéreuses. Grâce à une technique d'hybridation *in situ*, il est possible d'analyser d'importants miRNAs (par exemple miR-10b) à l'échelle de la cellule unique.

En ce qui concerne l'analyse du génome, des mutations au sein même de gènes codent pour des cibles thérapeutiques ou des protéines de signalisation en aval de cibles qui affectent l'efficacité de thérapies ciblées. A titre d'exemple, les mutations d'EGFR affectent les thérapies anti-EGFR dans le cancer du poumon, et les mutations KRAS – une protéine en aval d'EGFR – bloquent l'efficacité des thérapies anti-EGFR dans le cancer du colon. Récemment, l'analyse de centaines de CTCs obtenues à partir de patients avec un cancer colorectal a montré une forte hétérogénéité intra- et inter-patients pour la mutation KRAS. Les CTCs portant les gènes KRAS mutés échapperont à la thérapie anti-EGFR et leur détection précoce peut être importante pour guider le choix du traitement patient par patient.

Les cellules analysées dans les gouttes peuvent être décapsulées de l'émulsion. Une méthode appropriée pour décapsuler l'émulsion comprend l'ajout de 5 % v/v 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol (Sigma-Aldrich), suivi par une incubation d'une heure. Les phases sont séparées par centrifugation (par exemple 300 g, pendant 5 min), et les cellules sont collectées à l'interface des deux phases, aqueuse et fluorée.

Pour faciliter la collecte des cellules, la méthode peut comprendre l'introduction d'une troisième couche, d'une densité comprise entre celle de la phase aqueuse et de la phase fluorée (par exemple 1,10 g/ml), avant la centrifugation entre les deux phases. La troisième couche est généralement une solution aqueuse d'osmolarité adaptée pour le contact avec les cellules. Une solution adaptée est par exemple préparée par exemple dissolution de 27,6 g de Nycodenz (Progen) dans 100 ml d'une solution consistant en TrisHCl 5 mM, KCL 3 mM, CaNa2EDTA 0.3 mM, pH 7.5. Les cellules sont alors récoltées dans ladite troisième couche, positionnée à l'interface de la phase aqueuse et de la phase fluorée, évitant ainsi de prélever de la phase fluorée avec les cellules.

Avantages de l'invention

L'utilisation d'une dispersion de particules 12 de faibles tailles par rapport à la taille des gouttes assure une distribution homogène des particules 12 dans les gouttes 6, et donc la formation quasi certaine d'un agrégat 10 de taille significative dans chaque goutte 6.

Globalement, ce procédé permet de doser/quantifier un élément du sécrétome de cellule tumorale, tel qu'une protéine ou peptide du sécrétome de cellule tumorale dans la goutte contenant la cellule unique ou l'agrégat de cellules.

La formation d'un agrégat allongé 10 permet d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit et un intervalle dynamique plus important par rapport à l'essai décrit dans Mazutis et al. (Nat prot 2013) où une seule bille est encapsulée. En effet le signal généré par l'entité de signalisation 34 sera concentré sur une largeur plus petite que celle d'une sphère de surface égale. La hauteur du pic ainsi que présenté sur la Figure 2 sera donc plus élevée que dans le cas d'une seule bille pour un même nombre d'entité de signalisation 34 relocalisées.

Ce procédé est utilisable dans de nombreux procédés d'analyse biologique. Le procédé selon l'invention peut s'appliquer à de nombreux types d'éléments du sécrétome, notamment de protéines ou peptides du sécrétome.

Cette invention permet notamment d'analyser de manière très complète la biopsie liquide du cancer en temps réel par un phénotypage, une analyse du sécrétome et analyse moléculaire de cellules tumorales, uniques ou sous formes d'agrégats de cellules tumorales.

L'appareil selon l'invention peut être intégré comme une brique technologique dans des dispositifs plus complexes en particulier dans un dispositif de criblage à haut débit, dans un laboratoire sur puce, dans un dispositif de « point of care » dans des instruments de laboratoires, des robots, ou autres.

En outre, le procédé selon l'invention peut être intégré dans des protocoles complexes permettant le diagnostic, la découverte de médicaments, la découverte de cibles, l'évaluation d'un médicament.

De plus les systèmes microfluidiques selon l'invention et les procédés selon l'invention peuvent être combinés ou inclus dans d'autres types de composants micro fluidiques ou pour d'autres fonctions micro fluidiques connues dans l'état de l'art.

L'invention peut, en outre, être particulièrement utile en combinaison avec des méthodes optiques diverses, notamment des méthodes de détection optique.

Le procédé est applicable par exemple pour déterminer la présence d'un élément cible 37 dans le sécrétome, la concentration d'un élément cible 37 sécrété, relargué ou clivé, ce qui permet d'établir des caractéristiques de la cellule tumorale produisant l'élément cible 37 dans la goutte 6.

5 Le procédé permet de plus le tri, la capture et l'extraction des gouttes présentant des caractéristiques intéressantes, et notamment contenant une cellule tumorale unique ou un agrégat de cellules tumorales.

Dans un exemple, le procédé comprend la formation d'un sandwich, l'élément cible 37 étant d'une part lié à l'élément de capture 36 de la particule 12 et d'autre part à l'entité de signalisation 34, l'entité de signalisation 34 étant fluorescente.

Dans un exemple, l'élément de capture 36 est un anticorps, polyclonal ou monoclonal. Dans un exemple, l'entité de signalisation 34 est un anticorps, polyclonal ou monoclonal. Dans un exemple, l'élément cible 37 est un peptide ou une protéine du sécrétome.

15 Dans un exemple, l'élément de capture 36 est un acide nucléique, notamment une sonde d'ADN ou un aptamère. Dans un exemple, l'entité de signalisation 34 est un acide nucléique, notamment une sonde d'ADN. Dans un exemple, l'élément cible 37 est un acide nucléique du sécrétome, notamment un ADN double brin, ARNm ou miRNA.

Dans un exemple, l'élément de capture 36 est un anticorps polyclonal ou monoclonal ou nanocorps, ou un aptamère dirigé contre une protéine présente dans la membrane ou accrochée à la membrane, ou contre des lipides ou stérols. Dans un exemple, l'entité de signalisation 34 est un anticorps, polyclonal ou monoclonal. Dans un exemple, l'élément cible 37 est un exosome. Dans un autre exemple, plusieurs paires élément de capture 36 – élément cible 37 ou triplets élément de capture 36 – élément cible 37 – entité de signalisation 34 peuvent être analysé simultanément, pour détecter la présence de plusieurs éléments cibles 37 de nature différente.

Par exemple, tel que représentée dans la goutte sur la figure 13, une goutte comprend plusieurs éléments cibles 37a, 37b de nature différente et plusieurs entités de signalisations 34a, 34b chacune étant apte à former un complexe avec un des éléments cibles 37a, 37b. Certaines particules 12 de l'agrégat 10 comprennent un élément de capture 36a adapté à la capture d'un premier élément cible 37a, d'autres particules comprennent un autre élément de capture 36b adapté à la capture d'un deuxième élément cible 37b.

Dans certaines applications, l'agrégation des particules 12 est réversible.

35 Dans certains cas, la présence de l'élément cible 37 rend l'agrégation non réversible et consolide l'agrégat 10 lors de sa formation dans l'ensemble d'agrégation 30.

L'agrégat 10 pré-existe donc de manière stable uniquement dans les gouttes 6 contenant l'élément cible 37. Dans les gouttes ne contenant pas l'élément cible 37, la réversibilité de l'agrégation des particules 12 dissous l'agrégat 10 tant qu'il ne rentre pas dans la zone de lecture 26. Dans un régime choisi d'aimantation et de fluide, l'agrégat 10 ne peut se former et s'orienter qu'en présence de cette pré-agrégation, ce qui limite l'acquisition de pic selon la figure 2 aux gouttes contenant l'élément cible 37 par une autre méthode que via l'entité de signalisation 34.

La présente invention trouve en particulier application pour la détection et/ou la caractérisation de cellules tumorales isolées à partir de fluides biologiques. Chaque cellule peut relarguer, sécréter, ou cliver *in vitro* un certains nombres d'éléments du sécrétome de cellule tumorale, notamment un certains nombres de protéines ou peptides, dont un ou plusieurs marqueurs tumoraux permettant d'identifier une cellule tumorale. La présente invention permet également d'étudier ou caractériser le sécrétome de cellules, uniques ou sous forme d'un agrégat de cellules, qui auront, préalablement ou simultanément à leur caractérisation, été identifiées comme étant des cellules tumorales, en particulier par le procédé de détection de cellules tumorales selon l'invention.

Les cellules tumorales sont, par exemple, des cellules tumorales circulantes vivantes, ci-après désignées par le sigle 'CTCs', isolées du sang, ou des cellules tumorales disséminées vivantes, ci-après désignées par le sigle 'DTC', isolées à partir de la moelle osseuse, ou encore de cellules tumorales vivantes issues de n'importe quel autre liquide biologique, par exemple l'urine ou le liquide céphalo rachidien (LCR).

Les cellules tumorales métastatiques agressives, qui sont capables de donner des métastases à distance, font notamment partie des cellules auxquelles s'applique la présente invention. En particulier, les CTCs regroupées en agrégat dans la circulation sanguine pourraient avoir un potentiel métastatique beaucoup plus élevé que les CTCs isolées.

La présente invention a l'avantage de permettre une analyse de CTCs vivantes, et donc d'étudier la fonctionnalité de ces cellules, alors que les techniques de l'art antérieur impliquent l'isolation et la fixation des CTCs, avant analyse.

Les cellules tumorales peuvent être des cellules tumorales de cancer solide ou de cancer liquide (leucémie, lymphome).

Par exemple, les cellules tumorales sont isolées à partir de fluides biologiques de patients ayant un cancer solide, par exemple un cancer du sein, de la prostate, du colon, du rectum, de la thyroïde, de la peau, du foie, du testicule, de l'ovaire, etc.

Les cellules tumorales sont en particulier des cellules humaines ou animales, telles que des cellules de rongeur (par exemple de rat ou souris), de primate (par exemple de singe), de canin (par exemple de chien) ou félin (par exemple de chat).

Avantageusement les cellules auront été marquées préalablement à leur encapsulation. Les cellules peuvent en effet être pré-marquées, par exemple avec un ou des anticorps marqués (par exemple avec un fluorochrome) dirigés contre un ou des marqueurs tumoraux membranaires, pour identifier la nature tumorale de la cellule encapsulée, ou de l'agrégat de cellules encapsulé, par détection du signal émis par le ou les anticorps marqués au niveau de la cellule ou de l'agrégat de cellules. Cette détection peut être réalisée sur les gouttes en circulation comme en mode statique.

A titre d'exemples, le ou les éléments cibles sont des cytokératines comme CK19.

En variante, le ou les éléments cibles sont des marqueurs de tissu comme la mammaglobine (pour le sein), le 'prostate-specific antigen' (PSA) ou la kallikréine 3 humaine (hK3) (pour la prostate).

En variante, le ou les éléments cibles sont des marqueurs mésenchymateux comme l'« human glandular kallikrein » (hK2), Her2-neu, la thyroglobuline, CA19-9, CA15-3 ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine), CA-125, la Cathepsine D, l'alphafoetoprotéine, la protéine S100, le « fibroblast growth factor-2 » (FGF-2), l'« epithelial growth factor (EGF) », etc.

Dans un exemple, la cellule tumorale unique 90 est une cellule de tumeur de la prostate, et au moins un élément cible 37 est le PSA (prostate-specific antigen). Ce marqueur est spécifique du cancer de la prostate. L'élément de capture 36 greffé sur les particules 10 est un premier anticorps anti-PSA. L'élément de signalisation 34 est un second anticorps anti-PSA qui est marqué, notamment par un fluorochrome tel que Alexa 555. Ce marqueur est très spécifique des cancers de la prostate, sa présence permet à elle seule de caractériser les cellules comme des cellules tumorales provenant d'un cancer de la prostate.

Dans un autre exemple, plusieurs marqueurs sont détectés en combinaison pour caractériser les cellules tumorales. Par exemple, certains marqueurs ne sont pas spécifiques à un type de cancer mais la présence combinée de deux marqueurs différents permet d'identifier le type de cancer. Le choix de combinaisons de marqueurs appropriées pour identifier un type de cancer est à la portée de l'homme du métier.

Ainsi, le marqueur VEGF existe dans le sécrétome de nombreuses cellules tumorales. Cependant, sa présence avec d'autres marqueurs permet de caractériser un

cancer. De même, la présence du marqueur FGF2 seul ne suffit pas à elle seule à caractériser un cancer.

Dans l'exemple illustré sur la figure 13, il est ainsi possible d'analyser la présence de plusieurs types d'éléments cibles sécrétés. Chaque immunoessai de type sandwich
5 détecte un élément cible distinct 37a, 37b sécrété par la cellule tumorale unique 90.

La mesure de chaque signal de fluorescence permet donc d'avoir une information sur la nature ou le phénotype de la cellule. De préférence, les entités de signalisation 36 comprennent des fluorochromes. Un fluorochrome différent est de préférence associé à chaque partenaire de liaison spécifique d'un élément cible différent, et notamment d'un
10 marqueur tumoral différent.

Ainsi, dans ses modes de réalisation particulièrement avantageux, le procédé selon l'invention permet la détection des CTCs ou DTCs grâce à un procédé de type EPISPOT fluorescent multiparamétrique, qui utilise différents couples d'anticorps et différents fluorochromes. A titre d'exemple de fluorochromes, on peut citer Alexa488, pour
15 le vert, Alexa555 pour le rouge, Alexa350 pour le bleu, etc.

Le nombre d'éléments cibles 37 pouvant être analysés pour une cellule tumorale unique est choisi en amont de l'expérience, en choisissant les couples de particules fonctionnalisés avec des éléments de capture et d'entités de signalisation. Il est par exemple possible d'effectuer des mesures sur plus de neuf canaux de fluorescence
20 différents. Ceci permet, par exemple de faire plus de neuf mesures simultanées d'éléments du sécrétome d'une cellule tumorale unique.

Obtention des cellules tumorales

Selon des caractéristiques avantageuses de l'invention, le procédé de détection
25 comprend une étape préliminaire d'enrichissement des CTCs ou DTCs présentes dans l'échantillon biologique.

L'enrichissement des cellules de l'échantillon biologique peut être basé sur l'expression de marqueurs exprimés à la surface des cellules, la taille, la densité ou les charges électriques des cellules. Par exemple, les CTCs peuvent être isolées à partir du
30 sang par déplétion des leucocytes ou par filtration.

L'enrichissement des cellules de l'échantillon biologique peut par exemple consister soit en un tri positif des cellules, basé sur l'expression de protéines spécifiques membranaires des cellules épithéliales, comme par exemple, Epithelial Cell Adhesion Molecule ou EpCAM, soit sur un tri négatif des cellules basé sur l'expression de
35 marqueurs spécifiques sur la surface des cellules hématopoïétiques non voulues, comme à titre d'exemple CD45, CD4, CD8, CD19, CD56.

Les cellules peuvent être triées selon leur taille grâce à l'utilisation d'une membrane-filtre qui retiendra les cellules de grosse taille et laissera passer les cellules hématopoïétiques de taille inférieure. Les cellules peuvent être triées selon leur densité, par des centrifugations sur des gradients spécifiques.

5 Les cellules peuvent être triées selon leur charge électrique par diélectrophorèse car les CTCs/DTCs, présentent une charge différente de celles des cellules hématopoïétiques, par l'utilisation de la diélectrophorèse.

Toute autre méthode d'enrichissement permettant d'obtenir des cellules viables connue de l'homme du métier convient aux fins de l'invention. Il s'agira donc de méthode
10 ne mettant pas en œuvre de fixation ou de perméabilisation des CTCs/DTCs afin de conserver leur fonctionnalité (Alix-Panabières et Pantel, Expert Rev Mol Diagn. 2015;15(11):1411-7).

Les cellules obtenues après l'étape d'enrichissement peuvent être également
15 identifiées comme étant tumorales dans les gouttes. Selon un mode de réalisation, les cellules enrichies sont marquées avec un anticorps marqué (notamment par fluorescence) dirigé contre un ou des marqueurs de surface de cellule tumorale. Les cellules tumorales deviennent alors marquées, notamment par fluorescence, à leur membrane. A titre d'exemple, les cellules peuvent être marquées avec (1) un anticorps fluorescent anti-
20 EpCAM et/ou un anticorps fluorescent anti-E-Cadhérine pour détecter l'expression d'EpCAM et/ou d'E-Cadhérine à la surface des cellules afin d'identifier toute cellule épithéliale, et/ou (2) un anticorps fluorescent anti-PSMA (Prostate specific membrane antigen) afin d'identifier des cellules tumorales de la prostate, et/ou (3) un anticorps fluorescent anti-N-Cadhérine afin d'identifier des cellules mésenchymateuses qui auraient
25 subi une transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), et/ou (4) un anticorps anti-plastine 3 qui cible un nouveau marqueur, la plastine 3, qui n'est pas sous-exprimé lors de l'EMT et qui permet la détection des cellules tumorales épithéliales et mésenchymales, Cette étape qui précède l'encapsulation des cellules de l'échantillon et permet de déterminer le phénotype des CTCs ou DTCs.

30

La présente invention est particulièrement avantageuse car le nombre de gouttes n'est en théorie pas limité et peut atteindre en pratique, par exemple, jusqu'à 100 000 et même jusqu'à 1 000 000 gouttes. Il est ainsi possible d'avoir des gouttes ne comprenant pas de cellules ou des cellules non enrichies. Si la cellule encapsulée n'est pas tumorale,
35 le signal sera différent et la goutte pourra être écartée. Le système permet ainsi d'affiner

la purification. Il est donc adapté pour travailler à partir d'échantillons biologiques peu enrichis en CTCs.

Ceci est particulièrement avantageux pour détecter des cellules tumorales rares dans le sang, telles que les CTCs.

5

Exemples :

Des exemples de mise en œuvre du procédé vont maintenant être décrits.

Le protocole des exemples suivants comprend :

- la préparation de plusieurs solutions aqueuses, contenant les particules 12, l'entité de signalisation 34 et l'élément cible ou une cellule susceptible de le sécréter, le relarguer ou le cliver dans la goutte,
- l'injection des solutions aqueuses en entrée d'une puce de génération de gouttes,
- la génération de gouttes comprenant tous les réactifs de l'essai
- l'incubation de la solution contenant les gouttes,
- l'injection des gouttes dans un appareil selon l'invention (les exemples 1 et 2 correspondent respectivement au premier appareil 1 ou au deuxième appareil 60),
- la mesure des résultats de l'essai
- éventuellement un tri des gouttes en fonction de la mesure.

20

Exemple 1 : dispositif de génération de gouttes et de mesure des gouttes de type 1

La production des gouttes, autrement appelée compartimentation est réalisée après avoir mélangé une solution de réactifs et une solution d'échantillon sur puce.

Les solutions sont gardées sur la glace jusqu'à la compartimentation afin d'éviter toute dégradation des réactifs et échantillons.

La solution de réactifs est aspirée dans un réservoir connecté à une seringue Hamilton d'1 mL remplie d'huile minérale (Sigma Aldrich, #330760) juste avant le démarrage de la compartimentation.

Les échantillons à cribler sont mélangés à la solution de travail juste avant la compartimentation puis transférés dans une fiole en verre préalablement remplis d'huile fluorée (3M, NOVEC HFE-7500) et la fiole est maintenue à 4°C sur glace.

Des capillaires, avantageusement en PTFE de diamètre interne 0.3mm (vendu par Fischer, #11919445) permettent de relier la fiole et le réservoir de la solution de réactifs au dispositif de formation de gouttes.

35

Ces deux solutions sont injectées sur une puce de formation de gouttes qui permet de générer des gouttes comprenant un volume égal de chacune des deux solutions.

Le volume des gouttes est choisi par l'utilisateur à partir du débit de l'huile fluorée. Avantageusement le volume des gouttes est de 33 picolitres. L'huile fluorée est le fluide porteur 8. Elle constitue la phase continue de l'émulsion comprenant les gouttes.

Les solutions de réactifs d'essais et d'échantillons à cribler sont injectées dans la puce au même débit, avantageusement à 200 microlitres/heure pour chaque solution. Le débit est imposé par un système standard de pompe de seringue par exemple une pompe neMESYS de Cetoni ou par une pompe contrôlant la pression par exemple le système commercialisé par Fluigent.

Les gouttes sont générées à une jonction de focalisation hydrodynamique telle qu'illustrée sur les figures 11 et 12. La phase externe est ici une huile fluorée (3M, NOVEC HFE-7500) à laquelle a été ajouté deux % poids/volume de tensioactifs (par exemple un copolymère tribloc comprenant deux queues perfluoropolyether (PFPE) (de poids moléculaire environ ~6,000 g/mol) et une tête PEG (~600 g/mol).

La figure 11 et la figure 12 représentent des dispositifs de flow-focusing permettant de mélanger un flux contenant les billes magnétiques mélangées aux autres réactifs et un flux contenant les échantillons avant la formation de gouttes au niveau de la jonction de focalisation hydrodynamique située à droite. Sur la figure 11, les particules magnétiques mesurent 500 nm de diamètre et sur la figure 12 les particules magnétiques mesurent 200 nm de diamètre.

Une deuxième étape est l'étape de collection. Une fiole maintenue à 4° sous le champ magnétique, avantageusement généré par un aimant en anneau (Amazing magnet H250H-DM), permet la collection des gouttes. Un capillaire court permet de connecter la fiole à la puce. Dans l'idéal, le capillaire de sortie mesure moins de 20 cm, avantageusement 10 cm.

Les gouttes sont mises à incuber avantageusement à 37°C pendant 20 à 90 minutes et sous champs magnétique, le temps et la température d'incubation dépendant de l'analyse effectuée et du type d'entité productrice 90 et d'élément cible 37 étudiés.

A la suite de l'incubation, la fiole contenant l'émulsion est transférée à 4°C toujours maintenue sous champ magnétique.

Le premier type de dispositif est un dispositif suivant l'invention tel que décrit sur la Figure 1.

La fiole contenant les gouttes est connectée à une puce pour une réinjection, la fiole est d'une part connectée à la puce et d'autre part à un système de pression, une

pompe de pression ou une seringue et sa pompe, constituant l'ensemble de mise en circulation 22.

L'ensemble d'espacement 31 comprend deux entrées d'huiles connectées à la puce. Ces entrées sont destinées à injecter de l'huile avantageusement de l'huile fluorée permettant d'espacer les gouttes de l'émulsion telle qu'illustrée sur la figure 9.

Les débits de l'huile d'espacement sont avantageusement fixés chacun à 300 microlitres/heure ainsi que le débit de l'ensemble de mise en circulation est avantageusement fixé à 50 microlitres/heure et permettent d'ajuster le débit et la fréquence de réinjection de gouttes de façon à obtenir une fréquence comprise entre 250 et 1000 Hz.

Une paire d'aimants permanents 38 avantageusement fournie par K&J Magnetics, # BC 14-N52, est placée de part et d'autre de la puce autour du canal principal 24. Ces aimants 38 sont destinés à générer et à orienter les agrégats de billes pendant la réinjection des gouttes.

Un logiciel de contrôle de l'équipement, par exemple des lasers ou des photomultiplicateurs, est créé pour analyser et trier les gouttes. Le système de tri nécessite une carte FPGA pour réaliser une analyse en temps réel du signal.

La mesure est effectuée dans les gouttes une à une après leur passage dans l'ensemble d'espacement et ces gouttes peuvent être triées vers une sortie désirée après la zone de lecture illustrée sur la figure 10.

Lorsqu'un tri et une récupération sont désirés, les gouttes triées et les émulsions non triées sont recueillies sur glace et le contenu des gouttes est récupéré à partir de protocoles standards.

Exemple 2 : dispositif de mesure de gouttes de type 2 (deuxième appareil 60)

Le deuxième type de dispositif de mesure est une chambre de stockage des gouttes produite dans un plan à 2 dimensions. Cet exemple présente deux alternatives possibles pour réaliser de telles chambres.

La première est une chambre fabriquée par microfabrication classique en PDMS, comprenant avantageusement des piliers positionnés de manière régulière pour éviter l'effondrement de la chambre telle qu'illustrée sur les figures 4 à 7.

La seconde est une chambre en verre selon l'invention PCT/FR2009/051396. Avantageusement, cette approche permet de réaliser une incubation des gouttes sur de longues durées (>1H) sans déplacement des gouttes. Les gouttes peuvent donc être collectées directement dans une telle chambre après leur formation.

Dans un exemple, le dispositif de mesure est un dispositif de lecture à deux dimensions , par exemple dans une chambre en verre. Le champ magnétique est généré par une paire d'aimants permanents 38 avantageusement fournie par K&J Magnetics, # BY042 , placée de part et d'autre de la chambre de stockage. Ces aimants 38 sont destinés à générer et à orienter les agrégats de billes dans des gouttes stockées dans la chambre.

Le signal fluorescent de l'entité de signalisation 34 relocalisé sur la ligne de billes magnétiques est mesuré par microscopie en épifluorescence.

Exemple 3 : Quantification d'un marqueur tumoral dans un dispositif de mesure de type 1

Le but de cet exemple est de démontrer la quantification d'un marqueur tumoral.

Dans cet exemple, l'élément cible 37 est un marqueur tumoral et plus particulièrement un marqueur d'angiogénèse (le VEGF [vascular epithelial growth factor]) qui est déjà contenu dans la solution à cribler, cet exemple ne mettant pas en œuvre des cellules.

Dans cet exemple les gouttes mesurent 33 picolitres.

La préparation des gouttes comprend :

- la préparation de deux solutions aqueuses, appelées « solution de réactifs » contenant les particules 12, l'entité de signalisation 34 et « solution d'échantillon à cribler » contenant l'élément cible dans les exemples ci-dessous,
- l'injection des deux solutions aqueuses en entrée de la puce de génération de gouttes,
- la génération de gouttes comprenant un volume égale de chacune des deux solutions,
- la mesure des gouttes dans un dispositif de type 1.

La Solution de réactifs contient :

- des particules 12 qui sont ici des particules magnétiques colloïdales, comme des particules conjuguées avec la streptavidine (par exemple des particules Ademtech streptavidin plus), qui sont fonctionnalisées avec un élément de capture 36, par exemple un anticorps spécifique du VEGF conjugué à la biotine (par exemple l'anticorps Ref 500-P10GBt, Peprotech). D'autres méthodes d'immobilisation sont possibles et sont connues de l'homme du métier, comme l'utilisation de particules carboxyle et 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide (EDC), par exemple,

- une entité de signalisation 34 qui est ici un anticorps contre VEGF fonctionnalisé avec une molécule fluorescente, comme le bevacizumab (fourni par le CHU de Montpellier) qui est fonctionnalisé avec un N-Hydroxysuccinimide (NHS ester) de l'Alexa Fluor 647 ou similaire. D'autres combinaisons de fluorophores ou méthodes de fonctionnalisation sont possibles ; et

- un colorant permettant la détection des gouttes 6, par exemple la sulforhodamine B.

Ces réactifs sont dilués dans une solution appelée « solution de travail ». La solution de travail comprend :

- RPMI 1640 (Eurobio, Ref CM1RPM00-01),
- L-Glutamine 200mM/100X (Eurobio, Ref CSTGLU00): 1% final,
- Insulin-Transferin-Selenium (ITS) 100X (GIBCO, Ref 51300-044): 1% final,
- Sérum de veau foetal décomplémenté 10% (Eurobio, Ref CVFSVF00-01),
- EGF Human (Epidermal Growth Factor) – Miltneyi (Ref 130093564): 20 ng/mL final,
- bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) – Miltneyi (Ref 130097750): 10 ng/mL final,
- Antibiotiques (Penicilline G à 10 000 UI/500 mL + Gentamicine à 1 mg/500 mL),
- 25 mM de tampon HEPES à pH 7,4,
- 0,1% v/v Pluronic F-68 fourni par Life Technologies.

Les particules 12 colloïdales magnétiques sont traitées avant usage. Les particules 12 sont des particules fournies par Chemicell (ScreenMAG) ou Ademtech (Bio Adembeads) dans une solution de stockage. Avantageusement, la streptavidine (ou similaire) est déjà immobilisée sur les particules par les fournisseurs (comme les billes streptavidine plus de Ademtech). Elles sont retenues sur un support magnétique afin de supprimer la solution de stockage puis elles sont mises en suspension dans un excès de pluronic F-127 à 10% poids/poids (ThermoFisher), avantageusement 10x le volume initiale de particules, et incubées pendant quinze minutes dans un bain d'ultra-son à 4°C.

Après ce traitement, les particules 12 colloïdales magnétiques sont lavées deux fois dans du PBS et mises en suspension dans la solution de travail. Dans cette solution, la version biotinylée de la molécule de capture est ajoutée en excès pour 1 heure (température ambiante).

Avantageusement, les particules 12 sont lavées deux fois et mises en suspension dans la solution de travail.

Les réactifs fluorescents sont centrifugés pendant cinq minutes à au moins 12 000 g et à 4°C avant usage, afin de supprimer les traces d'agrégats de réactifs.

La solution d'échantillon à cribler comprend :

- un élément cible 37, ici VEGF, propre à être capturé par l'élément de capture 36 ; et
- la solution de travail.

La solution d'échantillon à cribler contient différentes concentrations de l'élément cible 37 (VEGF) (fournis par exemple par Genscript) dilués dans la solution du travail (cf ci-dessus).

Les concentrations de l'élément cible 37 (VEGF) dans la solution d'échantillon à cribler sont les suivantes : 0 nM, 5 nM, 20 nM ou 50 nM.

La solution de réactifs contient les réactifs suivants :

- 0.16 % p/v de particules magnétiques fonctionnalisées avec un élément de capture 36, ici un anticorps spécifique à VEGF décrit ci-dessus,
- 50 nM de l'entité de signalisation 34 appropriée, ici un autre anticorps spécifique à VEGF conjugué avec une molécule fluorescente,
- 1 µM de sulforhodamine B (pour le marquage des gouttes).

Cette solution est complétée de la solution du travail (cf ci-dessus).

Cela permet d'obtenir quatre émulsions différentes avec, respectivement 0 nM, 2,5 nM, 10 nM ou 25 nM d'élément cible 37 (VEGF).

Les gouttes sont ensuite analysées au moyen d'un dispositif de type 1 mesurant la fluorescence du fluorophore de l'entité de signalisation 34, comme le Alexafluor488 ou 647.

Exemple 4 : Quantification de deux marqueurs tumoraux simultanément dans un dispositif de mesure de type 1

Le but de cet exemple est de démontrer la quantification de deux entités de signalisation (deux marqueurs tumoraux) simultanément. Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 3 à la différence que deux éléments cibles 37 distincts sont mesurés simultanément. Les deux entités cibles sont les marqueurs tumoraux VEGF et CK19 [Cytokératine 19].

La Solution de réactifs contient :

- des particules 12 qui sont ici des particules magnétiques colloïdales, fonctionnalisées avec deux éléments de capture 36, ici des anticorps spécifiques de VEGF (Ref 500-P10GBt, Peprotech) et des anticorps spécifiques de CK19 (KS19.2 de

Progen) qui sont immobilisés sur les particules par une méthode appropriée, comme par le couple biotine-streptavidine,

- une première entité de signalisation 34 qui est ici un anticorps spécifique du VEGF marqué en fluorescence par un fluorophore approprié, comme une conjugaison de bevacizumab avec AlexaFluor647,

- une deuxième entité de signalisation 34 qui est ici un anticorps spécifique de CK19, comme le (KS19.1 de Progen), marqué en fluorescence par le fluorophore Alexa Fluor 488,

- un colorant permettant la détection des gouttes 6, tel que la sulforhodamine B,

Ces réactifs sont dilués dans une solution appelée solution de travail identique à celle utilisée dans l'exemple 2.

La solution d'échantillon à cribler comprend :

- un premier élément cible 37, ici VEGF, propre à être capturé par le premier l'élément de capture 36,

- un deuxième élément cible 37, ici CK19, propre à être capturé par le deuxième élément de capture 36,

- la solution de travail.

La solution d'échantillon à cribler contient différentes concentrations du premier élément cible 37 (VEGF), par exemple fournis par Genscript, et du deuxième élément cible 37 (CK19), par exemple fournis par MyBioSource) dilués la solution du travail (cf ci-dessus).

Les concentrations du premier élément cible 37 (VEGF) dans la solution d'échantillon à cribler sont les suivantes : 0 nM, 2,5 nM, 10 nM ou 25 nM. Les concentrations du deuxième élément cible 37 (CK19) dans la solution d'échantillon à cribler sont les suivantes : 0 nM, 2,5 nM, 10 nM ou 25 nM. Au total 16 combinaisons de concentrations des deux éléments cibles sont préparées.

Les gouttes sont analysées au moyen d'un dispositif de type 1 mesurant simultanément la fluorescence des fluorophores, comme l'AlexaFluor488 et 647, sur les deux entités de signalisation 34.

Exemple 5 : Quantification d'un marqueur tumoral sécrété à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif de mesure de type 1.

Le but de cet exemple est de démontrer la possibilité de détecter et quantifier un marqueur tumoral sécrété à l'échelle de la cellule unique. Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 3 à la différence que l'élément cible 37 (VEGF) est sécrété par une entité productrice 90 (une cellule) dans la goutte pendant une phase d'incubation. Les

cellules sont soit une lignée CTC de cancer du colon (CTC-MCC-41.4 obtenue au sein du laboratoire LCCRH), soit une population de cellules de patients atteints de cancer du colon enrichie en CTCs. Dans le deuxième cas, les CTCs sont enrichis avec le protocole des RosetteSep (procédure StemCell Technology) via une déplétion des leucocytes.

Le protocole d'enrichissement des CTCs par la technique des RosetteSep est la suivante :

- Transférer le sang (15 mL) du tube EDTA dans un falcon 50 de mL ;
 - Ajouter 20 µl de Rosette StemCell (Human circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment – Ref 15167) par mL de sang total ;
 - Mélanger et mettre à tourner lentement sur le MACS mix au minimum 20mn ;
 - Dans un falcon, déposer le volume adéquat de Ficoll (Milieu de séparation des lymphocytes) en fonction du volume de sang selon les recommandations du fournisseur ;
 - Diluer le sang au 1/2 avec du PBS 1x/2%SVF ;
 - Déposer la solution [sang+rosettes+PBS] délicatement à la surface du Ficoll et centrifuger 20 min à 1200g sans frein.
 - Récupérer toute la partie supérieure du Ficoll avec l'anneau cellulaire (où se trouvent les cellules tumorales circulantes) ;
 - Laver 2X avec du PBS/SVF 2% qsp 50ml.
- Le culot cellulaire obtenu contient les cellules tumorales circulantes et est prêt à être utilisé pour l'EPISPOT à cellule unique selon l'invention.

La solution d'échantillon à cribler contient des cellules mises en suspension dans la solution de travail décrite dans l'exemple 3. Avantageusement, la concentration de cellules par goutte est de 0,3 cellule par goutte. Une émulsion avec des gouttes de 33 picolitres, comme ici, contient, plus de $30 \cdot 10^6$ gouttes par millilitres. Pour avoir 0,3 cellule par goutte, il faut environ $18 \cdot 10^6$ cellules par millilitre dans la solution d'échantillon à cribler (qui est concentrée deux fois par rapport aux gouttes). Il convient de noter que la concentration en cellules dans la solution d'échantillon à cribler est deux fois plus importante que la concentration finale puisque les deux solutions aqueuses seront mixées dans une goutte avec un ratio 50/50.

Exemple 6: Quantification de deux marqueurs tumoraux simultanément secrété à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif de mesure de type 1.

Le but de cet exemple est de démontrer la possibilité de détecter et quantifier simultanément deux marqueurs tumoraux secrétés à l'échelle de la cellule unique. Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 5 à la différence que deux éléments cibles

37 distincts, sont mesurés simultanément. Les deux éléments cibles sont les marqueurs tumoraux VEGF et CK19, qui sont mesurés comme dans l'exemple 4.

Exemple 7 : Tri de cellules en fonction d'un marqueur tumoral sécrété.

5 Le but de cette expérience est de démontrer le criblage de cellules en fonction d'un marqueur tumoral sécrété. Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 5 à la différence que les gouttelettes avec un signal de fluorescence important correspondant à la fluorescence du fluorophore sur l'entité de signalisation 34 sont triées par « fluorescence activated dielectrophoresis » (FADS) tel que décrit dans Baret et al. (Lab
10 Chip 2009, **9**, 1850-1858). Les gouttes triées et recueillies sont brisées et les cellules sont récupérées tel que décrit dans Mazutis et al. (*Nat. Prot.* 2013, **8**, 870–891).

Exemple 8 : Tri de cellules en fonction de deux marqueurs tumoraux sécrétés.

15 Le but de cette expérience est de démontrer le criblage de cellules en fonction de deux marqueurs tumoraux sécrétés. Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 7 à la différence que deux éléments cibles 37 distincts, sont mesurés simultanément. Les deux éléments cibles 37 sont les marqueurs tumoraux VEGF et CK19, qui sont mesurés comme dans l'exemple 4. Les gouttelettes avec un signal de fluorescence important
20 correspondant à la fluorescence du fluorophore comme le Alexafluor488 sur la première entité de signalisation 34, et Alexafluor647 sur la deuxième entité de signalisation 34 sont triées par « fluorescence activated dielectrophoresis » (FADS) tel que décrit dans Baret et al. (Lab Chip 2009, **9**, 1850-1858). Les gouttes triées et recueillies sont brisées et les cellules sont récupérées tel que décrit dans Mazutis et al. (*Nat Prot* 2013).

25

Exemple 9 : Quantification d'un marqueur tumoral dans un dispositif de mesure de type 2 (deuxième appareil 60)

Le but de cet exemple est de démontrer la quantification d'un marqueur tumoral dans un dispositif de type 2, c'est-à-dire une chambre dans laquelle les gouttes sont
30 réparties en deux dimensions dans une couche unique. Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 3 à la différence que les gouttes mesurent 40 picolitres et sont analysées dans un dispositif de mesure de type 2. Une chambre de 38 µm de hauteur est créée entre deux lames de verre. Une entrée et une sortie sont réalisées dans la lame de verre supérieur et munis chacun de connecteur standard pour y connecter les capillaires
35 de connexion.

Exemple 10 : Quantification de deux marqueurs tumoraux simultanément dans un dispositif de mesure de type 2 (deuxième appareil 60)

Le but de cet exemple est de démontrer la quantification de deux entités de signalisation (deux marqueurs tumoraux) simultanément dans un dispositif de type 2, Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 4 à la différence que les gouttes mesurent 40 picolitres et sont analysées dans un dispositif de mesure de type 2, comme dans l'exemple 9.

Exemple 11: Mesure cinétique et quantitative d'un marqueur tumoral sécrété à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif de mesure de type 2 (deuxième appareil 60).

Le but de cet exemple est de démontrer la mesure cinétique et quantitative d'un marqueur tumoral sécrété à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif de type 2. Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 5 à la différence que les gouttes mesurent 40 picolitres et sont analysées dans un dispositif de mesure de type 2, comme dans l'exemple 9. En mesurant l'évolution, à l'échelle de la cellule unique, du signal fluorescent de l'entité de signalisation 34 relocalisé sur la ligne de billes magnétiques le taux de sécrétion de l'élément cible 37 (le marqueur tumoral VEGF) est déterminé.

Exemple 12 : Mesure cinétique et quantitative de deux marqueurs tumoraux simultanément sécrétés à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif de mesure de type 2 (deuxième appareil 60).

Le but de cet exemple est de démontrer la mesure cinétique et quantitative simultanément de deux marqueurs tumoraux sécrétés à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif de type 2, Cet exemple est similaire en tout point à l'exemple 6 à la différence que les gouttes mesurent 40 picolitres et sont analysées dans un dispositif de mesure de type 2, comme dans l'exemple 9 à la différence que deux éléments cibles 37 distincts, sont mesurés simultanément. Les deux entités cibles sont les marqueurs tumoraux VEGF et CK19, qui sont détectés comme dans l'exemple 10.

En mesurant l'évolution, à l'échelle de la cellule unique, les signaux fluorescents des deux entités de signalisation 34 relocalisés sur la ligne de billes magnétiques le taux de sécrétion des deux éléments cibles 37 (les marqueurs tumoraux VEGF et CK19) sont déterminés.

Exemples de mise en œuvre

La figure 14 illustre la quantification d'un marqueur tumoral dans un dispositif de type 1. Le graphique montre la valeur du pic d'intensité maximale obtenue pour le canal mesurant la fluorescence verte. Les gouttes comprennent des billes recouvertes avec un anticorps anti-PSA biotinylé. Les billes sont alignées pour former une colonne. Avec 25 nM de PSA, la fluorescence de l'anticorps secondaire anti-PSA est relocalisée sur la colonne de billes magnétiques, ce qui augmente la valeur du pic d'intensité ($n=200,000$). La barre d'erreurs montre la déviation standard. On effectue la même mesure pour des gouttes contenant des cellules LnCAP ayant été incubées pendant 1 heure à 37 °C dans les gouttes. Les LnCAP sont des cellules issues d'une lignée cellulaire épithéliale dérivée à partir d'un carcinome de prostate humaine.

La figure 15 illustre un tri de gouttes dans un dispositif de type 1. Ce graphique montre la possibilité de mesurer les cellules sécrétant la PSA dans un dispositif de type 1. Trois différentes populations de gouttes peuvent être distinguées en raison de leurs codes de gouttes différents (représenté selon l'axe des abscisses, correspondant à la fluorescence du marqueur Sulforhodamine B). De gauche à droite, on observe l'émulsion de cellules à trier, le contrôle positif et le contrôle négatif. Dans le canal de fluorescence représenté en ordonné, la relocalisation de l'anti-PSA sur la colonne de billes est illustrée. Les gouttes comprises dans le rectangle noir sont des gouttes positives pour la sécrétion de PSA et contenant une cellule.

La figure 16 illustre un tri de gouttes dans un dispositif de type 1. Ce graphique montre une fenêtre de sélection pour le tri de gouttes positive à l'EpCAM à partir d'une émulsion de gouttes contenant des cellules. Le chargement est d'environ 5%. Ceci montre une bonne corrélation entre la positivité EpCAM dans la fenêtre de sélection et le chargement en cellules. L'axe des ordonnées représente la valeur maximale mesurée au sein de la goutte (c'est-à-dire le pic correspondant à la cellule). L'axe des abscisses représente l'intégrale du signal sous le pic.

Les figures 17 à 20 illustrent un tri sur la base de deux critères dans un dispositif de type 1. La figure 17 représente une fenêtre de sélection « gate 5 » pour le tri des cellules positives à l'EpCAM. La figure 18 représente une fenêtre de sélection « gate 6 » pour des cellules sécrétant PSA. Pour être sélectionnés, les deux critères doivent être satisfaits, les gouttes sélectionnées correspondent aux gouttes dont les mesures sont dans les fenêtres « gate 5 » et « gate 6 ».

Les images des figures 19 et 20 représentent des gouttes triées avec succès selon deux critères : la sécrétion de PSA (figure 19), et l'expression d'EpCAM. (figure 20). Des

gouttes vides (contrôle négatif) ont également été triées pour faciliter le transfert des gouttes d'intérêts dans la chambre de visualisation. En partant d'une émulsion avec 0,2% de gouttes d'intérêt, il est obtenu un enrichissement à 20% de gouttes d'intérêt. En comptant les gouttes contrôle négatif conservées pour le transfert des gouttes on obtient un transfert des gouttes efficace à environ 99%.

Les figure 21 à 23 illustrent une quantification d'un marqueur tumoral dans un dispositif de type 2. Les figures 21 (en champ clair) et 22 (dans un canal de fluorescence) montrent la sécrétion de PSA par des cellules LNCAP. Ces cellules sont incubées pendant une heure dans les gouttes et la sécrétion de PSA aboutit à la relocalisation de la fluorescence sur l'agrégat de particules en colonne.

La figure 23 illustre une courbe de calibration pour la quantification du PSA obtenue à partir du tableau de gouttes. La courbe présente une forme généralement observée pour les expériences d'immunoessais sans lavage. Après une phase d'augmentation brusque (jusqu' à 60nM) dans laquelle la protéine se lie aux billes, on observe une diminution de la relocalisation de fluorescence due à la saturation sur les billes et une augmentation de la concentration de PSA libre. Les données sont présentées en moyenne et erreur –type de la moyenne (SEM).

Nous avons réalisé cette courbe de calibration à partir de la forme soluble de la protéine de PSA, à différente concentration avec deux anticorps respectifs. Les concentrations des réactifs, billes et agents de détection sont ajustées pour que la capacité de PSA soit à environ 70nM. Le système est très sensible aux concentrations les plus faibles en dessous de 70nM. Nous avons déterminé que la limite de blanc (correspondant au plus fort signal attendue dans une goutte vide) est de 1,047. Il faut comparer cette valeur à la valeur moyenne de 1,031 obtenue pour une concentration de 0nM. La limite de détection, c'est-à-dire la plus petite quantité distinguable du bruit de fond, est de 2,5 nM PSA, correspondant à seulement 60000 molécules. En incubant des cellules pendant une heure, on peut détecter toutes les cellules qui sécrètent plus de 16 molécules par secondes. En prolongeant le temps d'incubation à 2 heures, on peut diminuer cette limite aux cellules sécrétant 8 molécules par secondes, etc. Les taux de sécrétions rapportés dans la littérature pour d'autres molécules peuvent varier entre 10 et 10000 molécules par secondes selon le type cellulaire et la fraction sécrétée. Ceci montre que l'ordre de grandeur obtenu est satisfaisant.

En outre, la courbe de calibration montre une augmentation de signal à des concentrations plus élevées. Par exemple à environ 500nM de PSA le signal peut être significativement distingué du bruit de fond. Ceci est avantageux pour des

développements d'expérience car même les cellules avec de très haut taux de sécrétion peuvent être détectées.

Les figure 24 et 25 illustrent une quantification d'un marqueur tumoral dans un dispositif de type 2. Les figures 24 (en champ clair) et 25 (dans un canal de fluorescence) représente la sécrétion de la protéine CK19 par une cellule SK-BR-3. SK-BR3 est une lignée cellulaire provenant d'une tumeur d'un cancer du sein humain.

CK19 est habituellement une protéine intégrée dans la membrane cellulaire. Cependant, elle peut être détachée et se relocaliser sur l'agrégat allongé.

Une lignée cellulaire épithéliale dérivée à partir d'un carcinome de prostate humaine (LnCAP) est utilisée pour les expériences afin d'observer la sécrétion cellulaire de PSA.

Nous avons trouvé que la température est un facteur important puisque la sécrétion de protéine a seulement pu être observée autour des températures physiologiques et pas à des températures inférieure telle que 25°C. Aux températures inférieures, les signaux relocalisés sur les cellules et non sur les particules, montrant que la PSA était liée à la membrane ou qu'un phénomène similaire avait lieu.

Nous avons en outre utilisé la cellule de la lignée LnCAP pour déterminer le pourcentage de sécrétion de PSA de ces cellules. En considérant la littérature et des expériences précédentes, nous savons que toutes les cellules ne vont pas produire en permanence de la PSA. L'idée de cette expérience est de prélever le pourcentage de cellules qui sécrètent de la PSA au sein de la population de LnCAP. Cette expérience est effectuée à 37°C et les signaux de sécrétions sont mesurés à 0, 30 et 60 minutes.

Le tableau suivant représente les conditions et résultats de l'expérience sur la sécrétion de PSA en utilisant des cellules LnCAP comme modèle.

Temps d'incubation à 37°C (min)	0	30	60
Nombre de gouttes	5860	6352	5745
Nombre de cellules	53	57	52
Relocalisation de fluorescence sur l'agrégat allongé	0	16	27
Relocalisation de fluorescence sur les cellules	19	11	6
Pas de relocalisation trouvée	34	30	19
% de cellules sécrétant le marqueur	0	27.9	52.25
% d'anticorps relocalisé sur les cellules	36	19.2	11.6

A 0 minute, aucune relocalisation de fluorescence n'est trouvée au niveau de l'agrégat allongé. Cependant, nous avons remarqué que l'agent de détection était relocalisé sur la membrane de certaines cellules. Ce phénomène est sans doute lié aux conditions de culture et à une centrifugation à température ambiante. Nous avons fait le même constat pour les mesures à 30 minutes ou 60 minutes mais le nombre de cellules avec l'agent de détection relocalisé sur la membrane a diminué régulièrement tandis que le pourcentage de cellules sécrétant le marqueur augmente.

Ensuite, nous pouvons analyser le profil de sécrétion des cellules LnCAP encapsulée individuellement.

La figure 26 illustre la mesure de la cinétique d'un marqueur sécrété dans un dispositif de type 2 La figure 26 représente un profil de sécrétion de PSA pour des cellules LnCAP individuelles encapsulées dans des gouttes pendant une heure puis mesurées par intervalles de dix minutes.

Ici, nous montrons que le taux de sécrétion des cellules individuelles est varié, même si des distributions similaires ont été trouvées pour d'autres lignées cellulaires. Nous montrons également que la sécrétion suit plutôt une cinétique brusque qu'une libération régulière.

On observe que quelques cellules sécrètent plus de 800 molécules de PSA tandis que la majorité des cellules sécrète très peu de molécules de PSA (environ 10 molécules par cellules) ou aucune (ces cellules n'ont pas été représentées).

Pour simuler les détections de cellules tumorales circulantes (CTCs) dans le sang, nous avons mélangé des cellules LnCAP avec des cellules Jurkat. Les cellules Jurkat proviennent d'une lignée immortalisée de Lymphocyte T humain. Les deux lignées cellulaires ont été mises en culture dans un milieu RPMI avec 10% de FBS et encapsulée dans des gouttes. Ces expériences montrent qu'on est en effet capable de détecter de faibles quantités de cellules. Nous avons réalisé l'expérience pour différentes concentrations de LnCAP dans les cellules Jurkat. Pour la détection, nous avons utilisé la taille de la cellule avec un marqueur de fluorescence.

Le tableau suivant présente dans les résultats de l'expérience.

Taux de Dilution de LnCAP dans les Jurkat	Testé (correspondants au taux de dilution trouvé)	Nombre de LnCAP attendues	Nombre de LNCAP trouvées	Nombre total de cellules
0.0001	0.0001	3	4	30284
0.001	0.001	31	32	31612
0.001	0.0004	8	4	8184

0.001	0.001	2	2	1701
0.01	0.0093	45	42	4498
0.1	0.07	198	138	1975

L'étude préliminaire montre que le minimum de détection de LnCAP peut être de 0.0001.

5 Nous avons construit cette expérience pour détecter la PSA dans les gouttes et montrer que les cellules LnCAP sécrètent le PSA à un taux détectable. Les expériences montrent la sensibilité de détection dans des cellules mélangées artificiellement avec d'autres cellules.

REVENDICATIONS

1.- Procédé de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales (90), comprenant:

- 5 - la fourniture d'une pluralité de gouttes (6) contenues dans un fluide porteur (8), au moins une des gouttes (6) comprenant au moins un agrégat (10) de particules (12) définissant un objet allongé selon un axe principal (X), au moins certaines gouttes (6) contenant une cellule (90) susceptible de produire au moins un élément cible du sécrétome d'une cellule tumorale propre à se fixer sur l'agrégat ;
- 10 - la mesure d'au moins un paramètre physique caractéristique de la fixation d'un élément cible (37) du sécrétome d'une cellule tumorale sur l'agrégat (10) ; et
- la détection et/ou la caractérisation de cellules tumorales (90) à partir de la mesure dudit au moins un paramètre physique.

15 2.- Procédé selon la revendication 1, ledit procédé étant un procédé de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales uniques comprenant :

- la fourniture d'une pluralité de gouttes (6) contenues dans un fluide porteur (8), au moins une des gouttes (6) comprenant au moins un agrégat (10) de particules (12) définissant un objet allongé selon un axe principal (X), au moins certaines gouttes (6)
- 20 contenant une cellule unique (90) ;
- l'incubation des gouttes (6) contenant une cellule unique (90) dans des conditions et pendant une durée suffisante pour que la cellule unique (90) soit susceptible de produire au moins un élément cible (37) du sécrétome d'une cellule tumorale, propre à se fixer sur l'agrégat (10) ;
- 25 - la mesure d'au moins un paramètre physique, chaque paramètre physique étant caractéristique de la fixation d'un élément cible (37) distinct du sécrétome d'une cellule tumorale sur l'agrégat (10) ; et
- la détection et/ou la caractérisation de cellules tumorales uniques (90) à partir de la mesure dudit au moins un paramètre physique.

30

3. - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la cellule (90) est issue d'un fluide biologique et est choisie dans le groupe constitué par une cellule tumorale circulante (CTC) et une cellule tumorale disséminée (DTC).

35 4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'étape de mesure comporte la mesure dudit au moins un paramètre physique localement

en une pluralité de points situés dans la goutte (6), l'étape de mesure comportant de préférence la détermination de l'intégrale des valeurs mesurées au sein de la goutte (6).

5 5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'étape de mesure est effectuée dans une chambre microfluidique sans circulation des gouttes.

10 6.- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant :
- la fourniture d'un dispositif comprenant un ensemble de mise en circulation (22) de la goutte et une pluralité de zones de classement (94, 96), et un moyen de direction (98) de la goutte ou d'une partie de la goutte sélectivement vers une zone de classement (94, 96),
- la décision de classement de la goutte (6) ou d'une partie de la goutte, la décision consistant à choisir sélectivement une zone de classement parmi la pluralité des
15 zones de classement (94, 96),
- le transport de la goutte (6), respectivement d'une partie de la goutte, vers la zone de classement de la goutte (6) choisie lors de l'étape de décision.

20 7.- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel au moins une goutte comprend au moins deux entités de signalisation (34) distinctes, chacune des deux entités de signalisation (34) étant apte à former un complexe avec un élément cible distinct (37) sur l'agrégat (10), le procédé comprenant la mesure d'un signal indiquant la concentration de chacune des entités de signalisation (34) relocalisée.

25 8.- Procédé selon la revendication 7, dans lequel au moins certaines gouttes (6) comprennent une cellule tumorale susceptible de sécréter, cliver ou relarguer un ou plusieurs éléments du sécrétome de cellule tumorale, chaque éléments du sécrétome de cellule tumorale étant un élément cible distinct (37), la mesure du signal indiquant la concentration de chacune des entités de signalisation (34) relocalisées permettant une
30 quantification du ou des éléments du sécrétome de cellule tumorale.

9.- Appareil de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales (90) comprenant :
- un ensemble de fourniture d'une pluralité de gouttes (6) contenues dans un fluide
35 porteur (8), au moins une des gouttes (6) comprenant au moins un agrégat (10) de particules (12) définissant un objet allongé selon un axe principal (X), au moins certaines

gouttes (6) contenant une cellule (90) tumorale susceptible de produire un élément cible (37) propre à se fixer sur l'agrégat (10),

caractérisé en ce que l'appareil comprend un ensemble de mesure d'un paramètre physique caractéristique de la fixation d'un élément cible (37) sur l'agrégat (10),

5 l'appareil comprenant éventuellement, en outre:

- un ensemble mise en circulation de la goutte (22),
- un ensemble de décision de classement de la goutte,
- un ensemble de tri de la goutte selon la décision de classement.

10 10.- Goutte de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales (90), comprenant une pluralité de particules propre à former un agrégat (10) de particules (12) définissant un objet allongé selon un axe principal (X), et une cellule tumorale (90) et éventuellement au moins un élément cible (37) du sécrétome de la cellule tumorale (90) propre à se fixer sur l'agrégat (10).

15

11.- Procédé de préparation de gouttes (6) de détection et/ou de caractérisation de cellules tumorales comprenant :

20 - la dispersion, dans une masse de fluide (86) destinée à former des gouttes (6), de particules (12) propres à former un agrégat (10) définissant un objet allongé selon un axe principal (X), et d'une pluralité de cellules (90), au moins certaines cellules (90) étant des cellules tumorales susceptibles de produire un élément cible (37) du sécrétome d'une cellule tumorale, puis

25 - la dispersion de la masse de fluide (86) sous forme de gouttes (32), de sorte que chaque goutte comprenne une pluralité de particules (12) et qu'au moins certaines gouttes (6) comprennent, en outre, une cellule (90), et

- éventuellement la formation dans chaque goutte (6) d'au moins un agrégat (10) de particules (12) définissant un objet allongé selon un axe principal (X), l'agrégat (10) de particules (12) étant formé dans chaque goutte (6) après la dispersion.

1/14

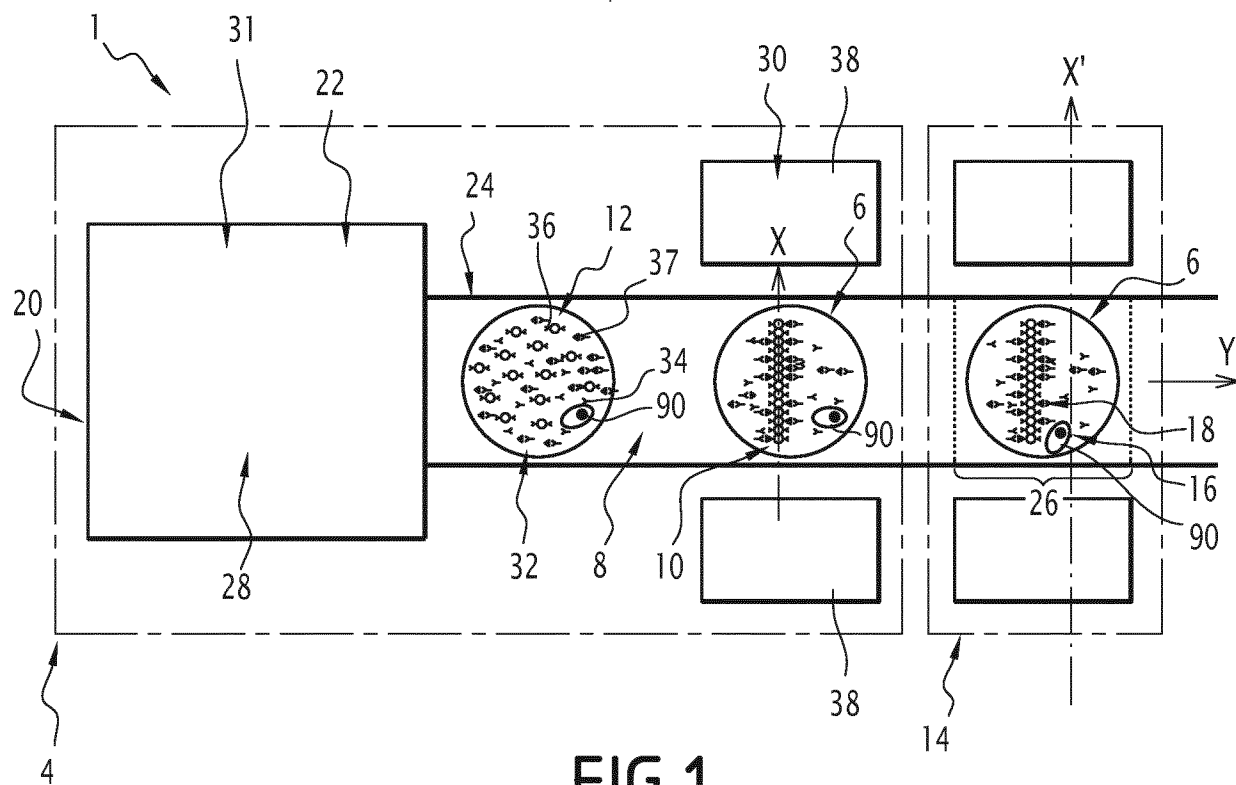


FIG.1

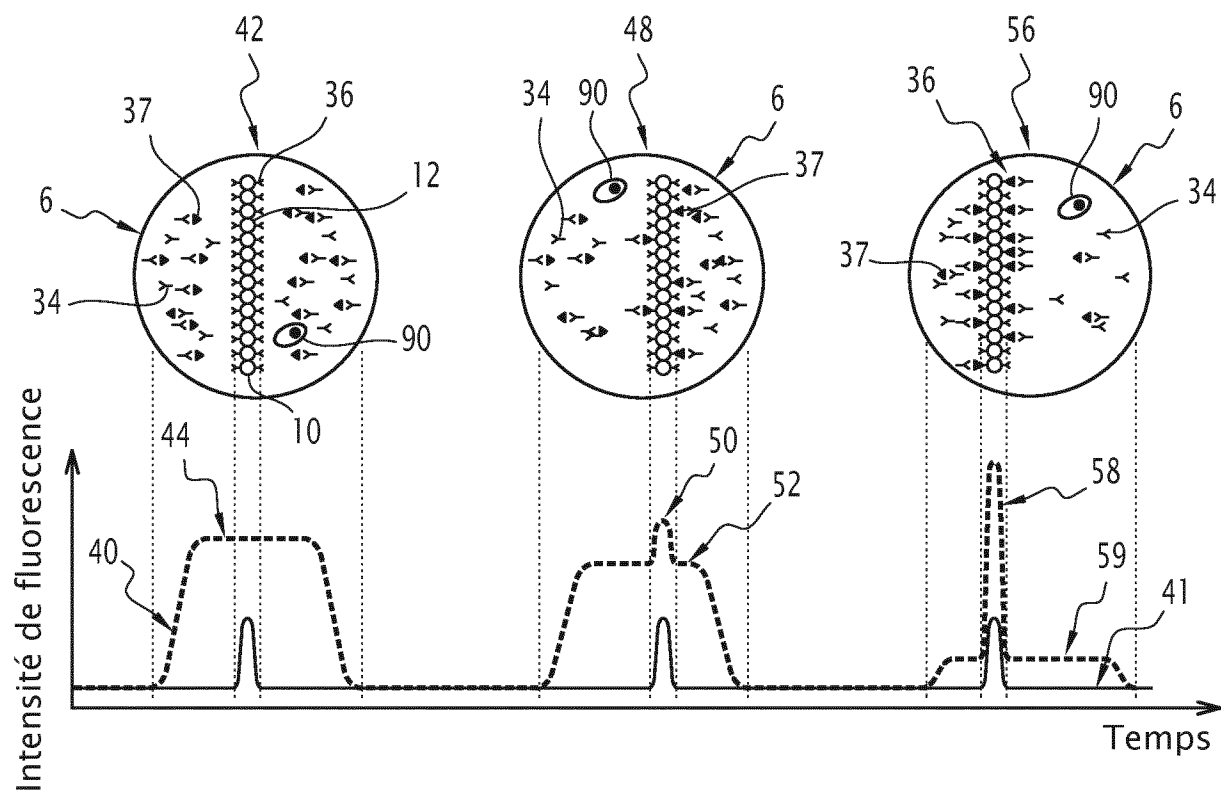


FIG.2

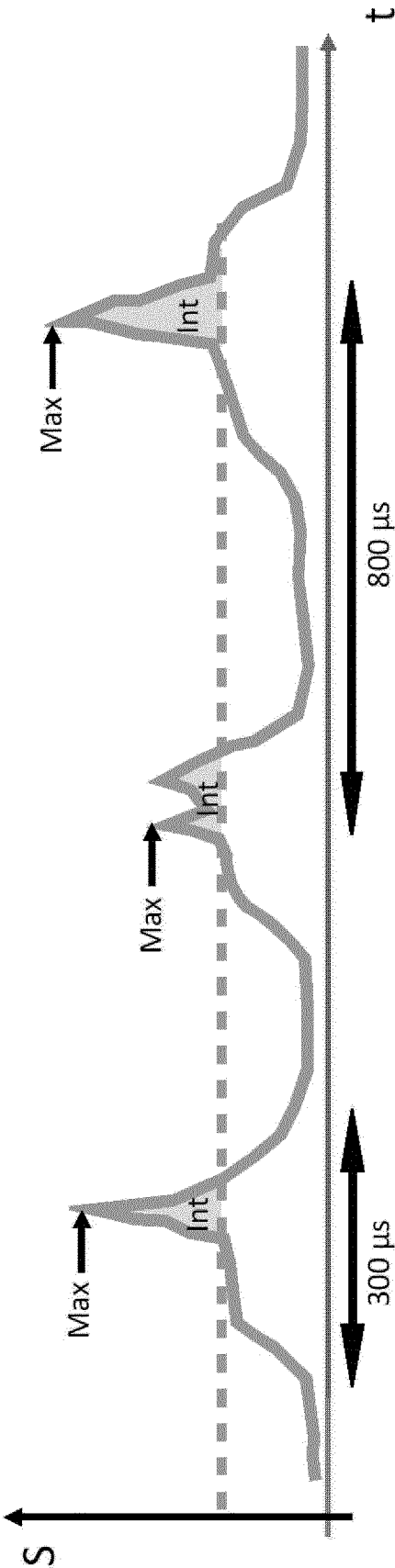


FIG.3

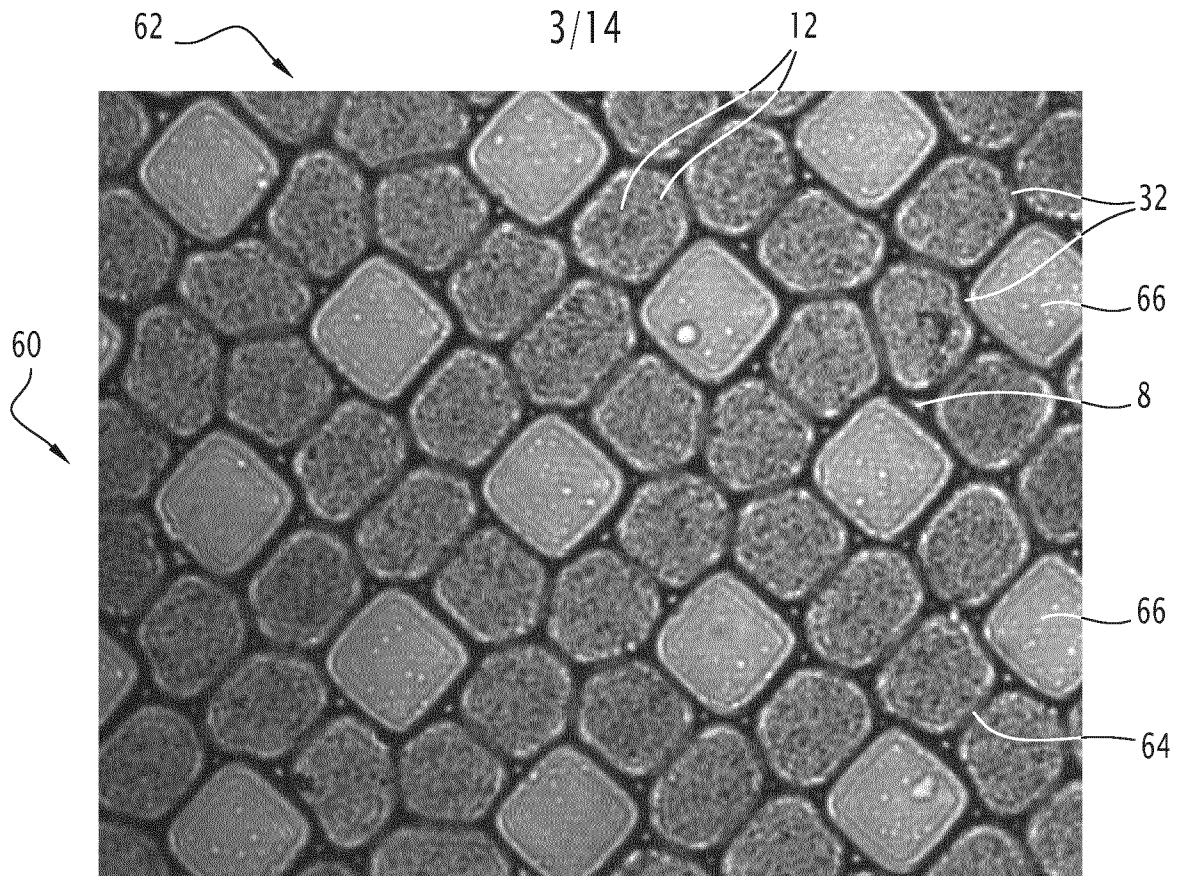


FIG.4

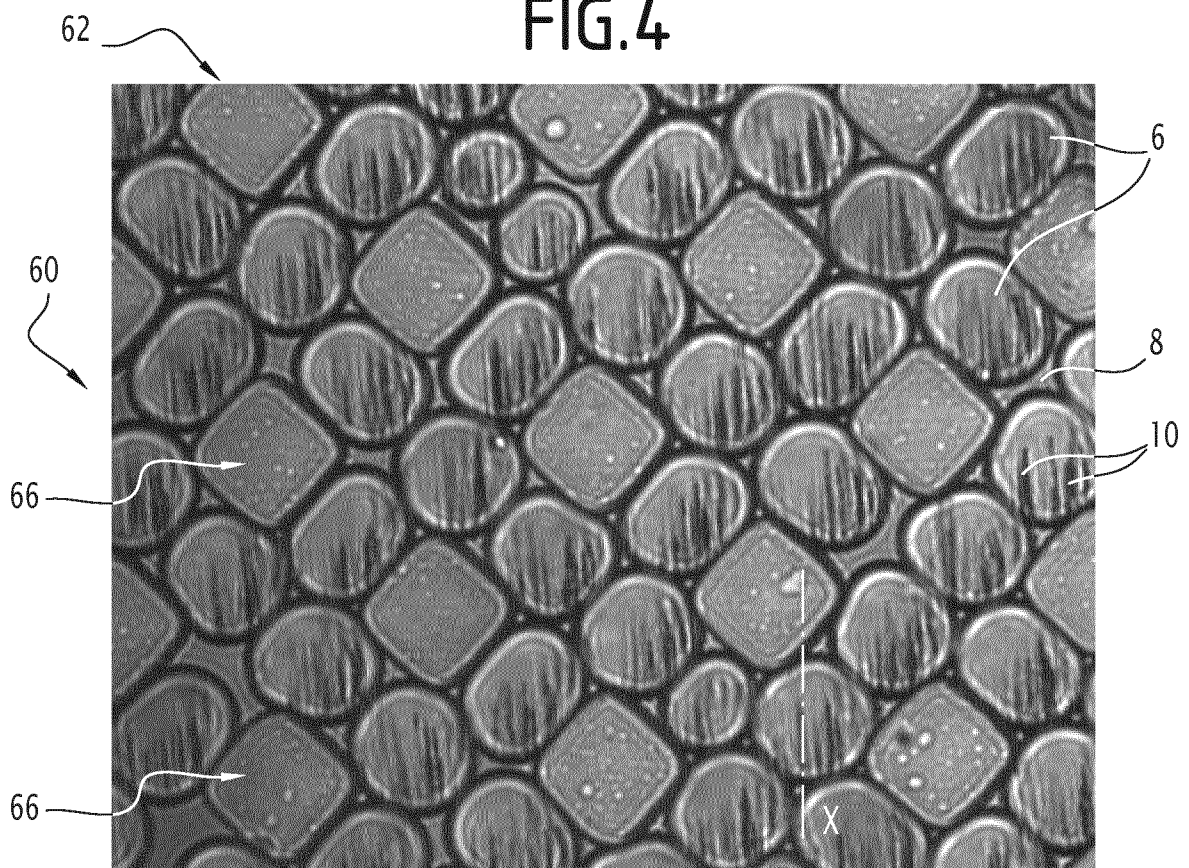


FIG.5

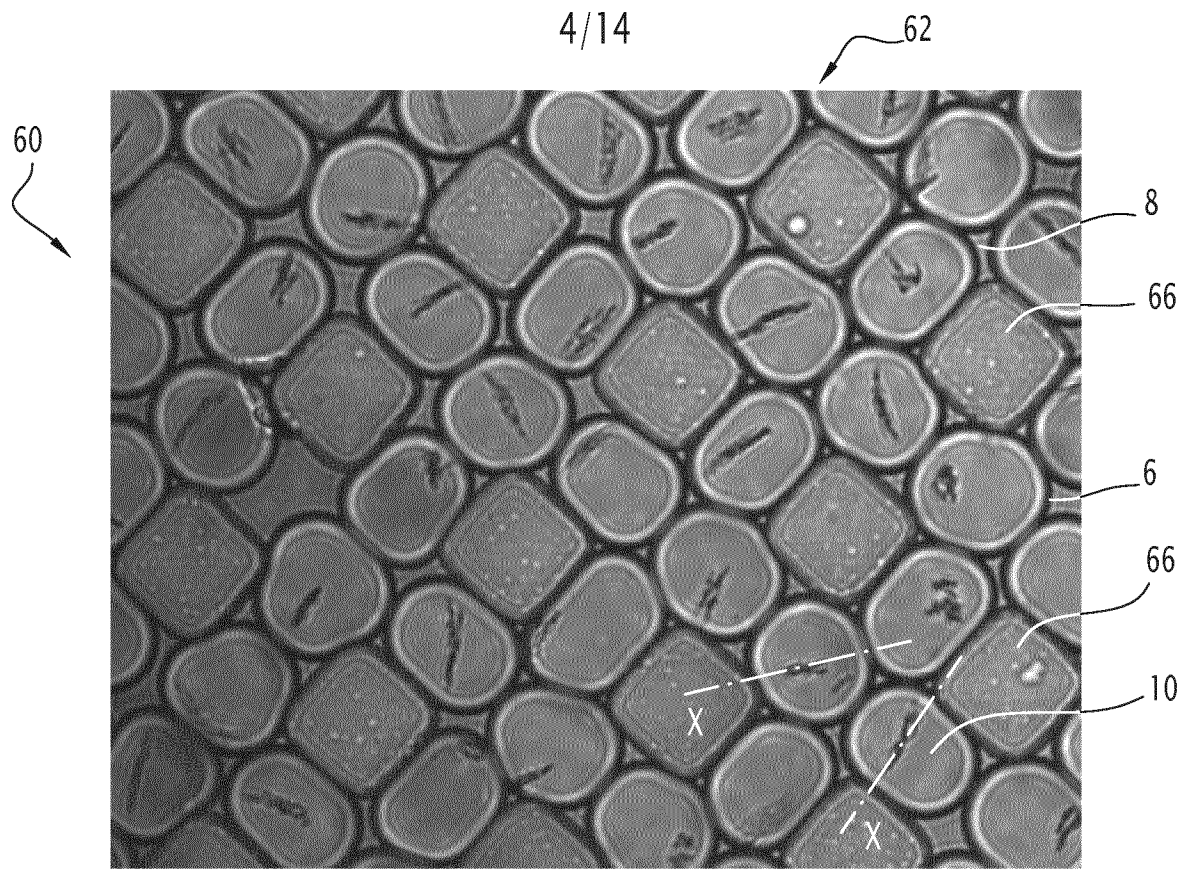


FIG.6

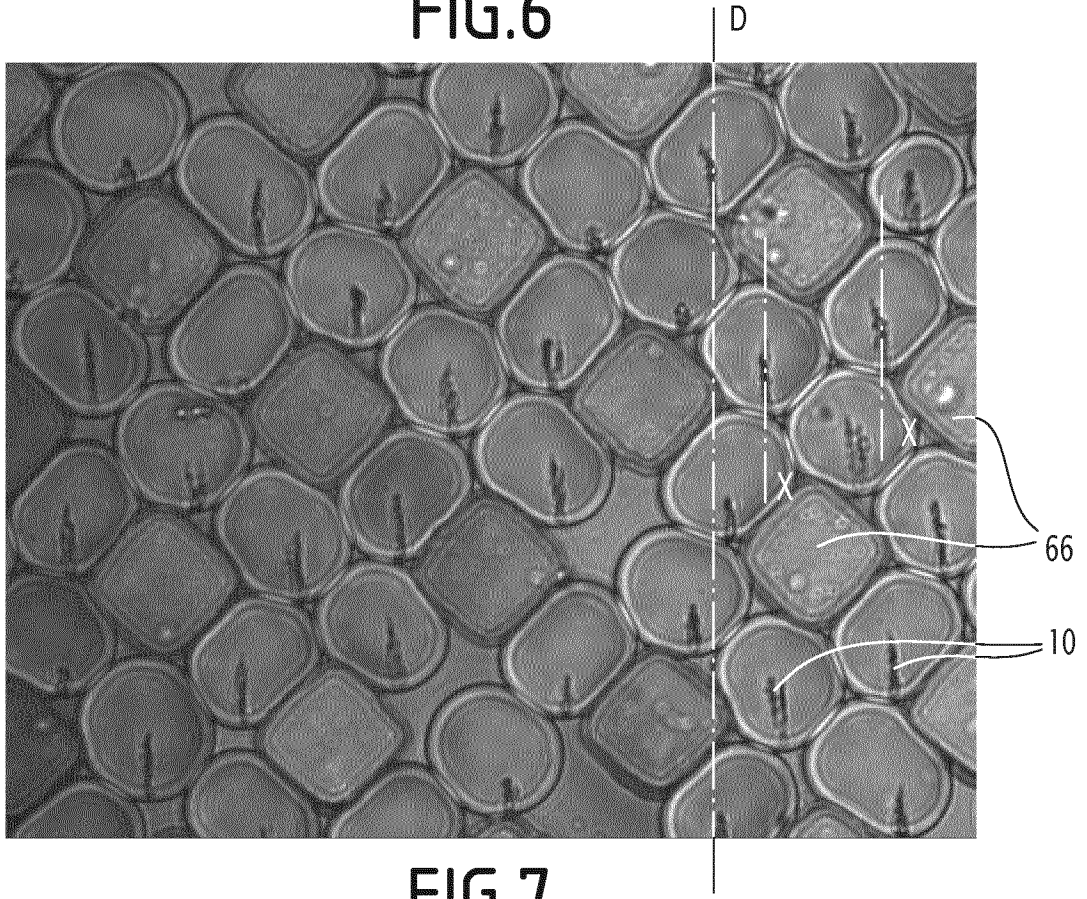


FIG.7

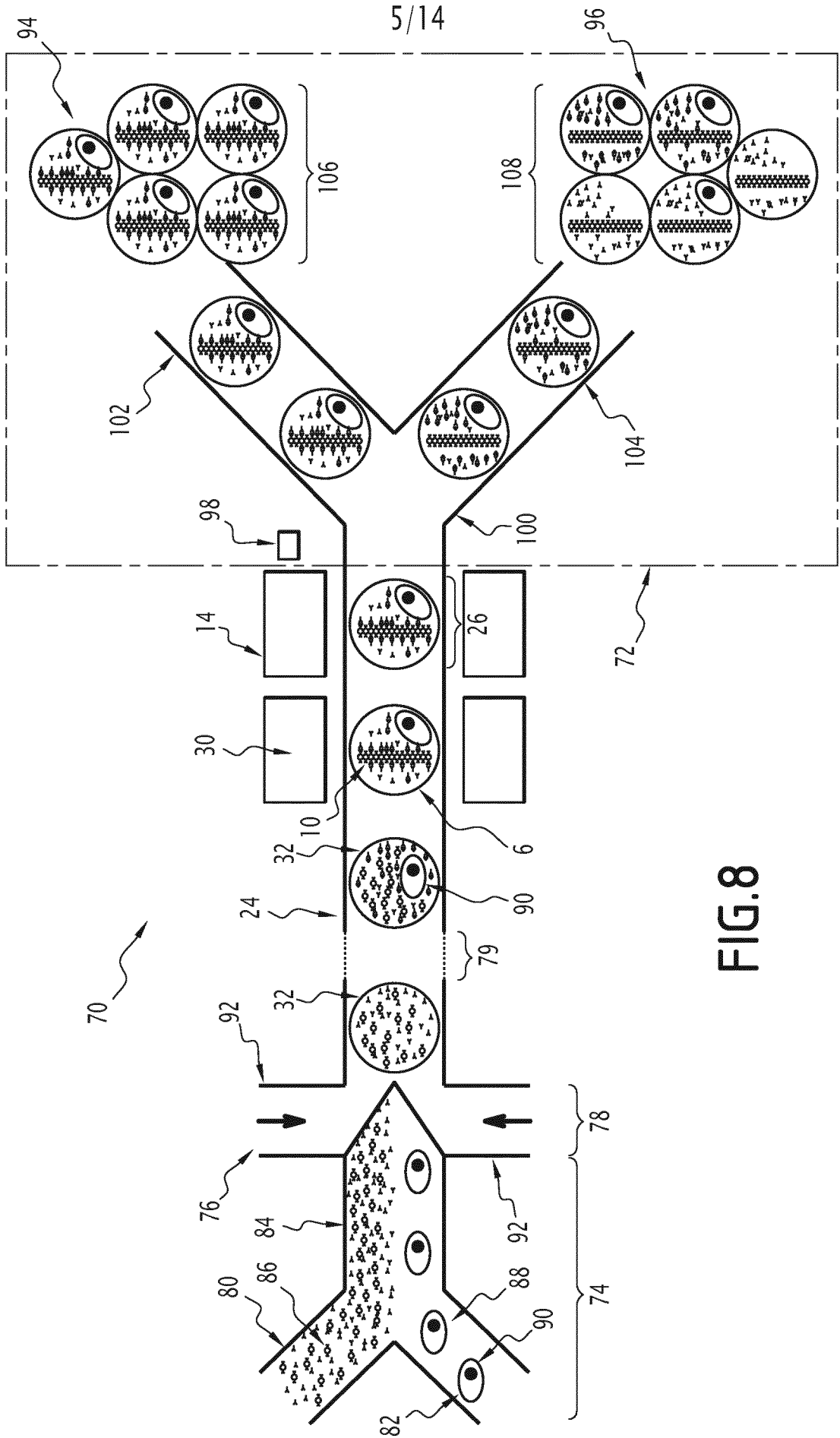


FIG.8

6/14

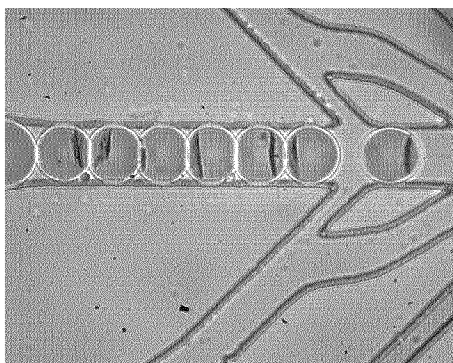


FIG.9

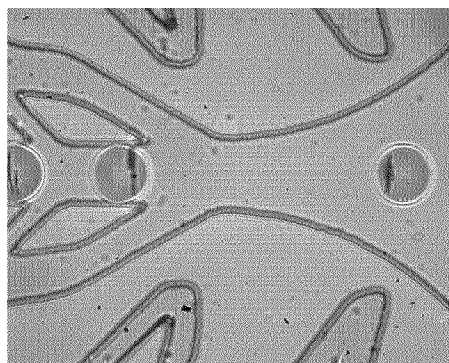


FIG.10

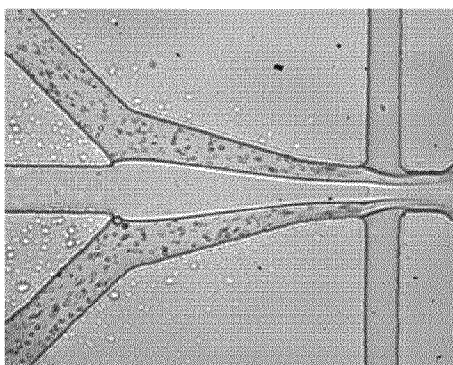


FIG.11

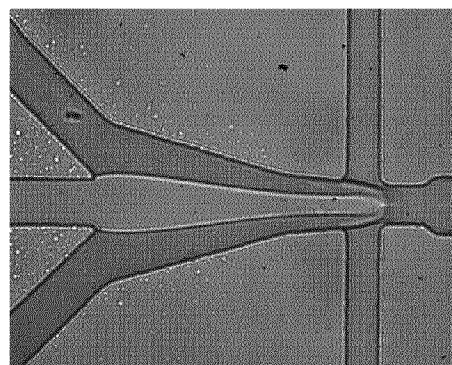


FIG.12

7/14

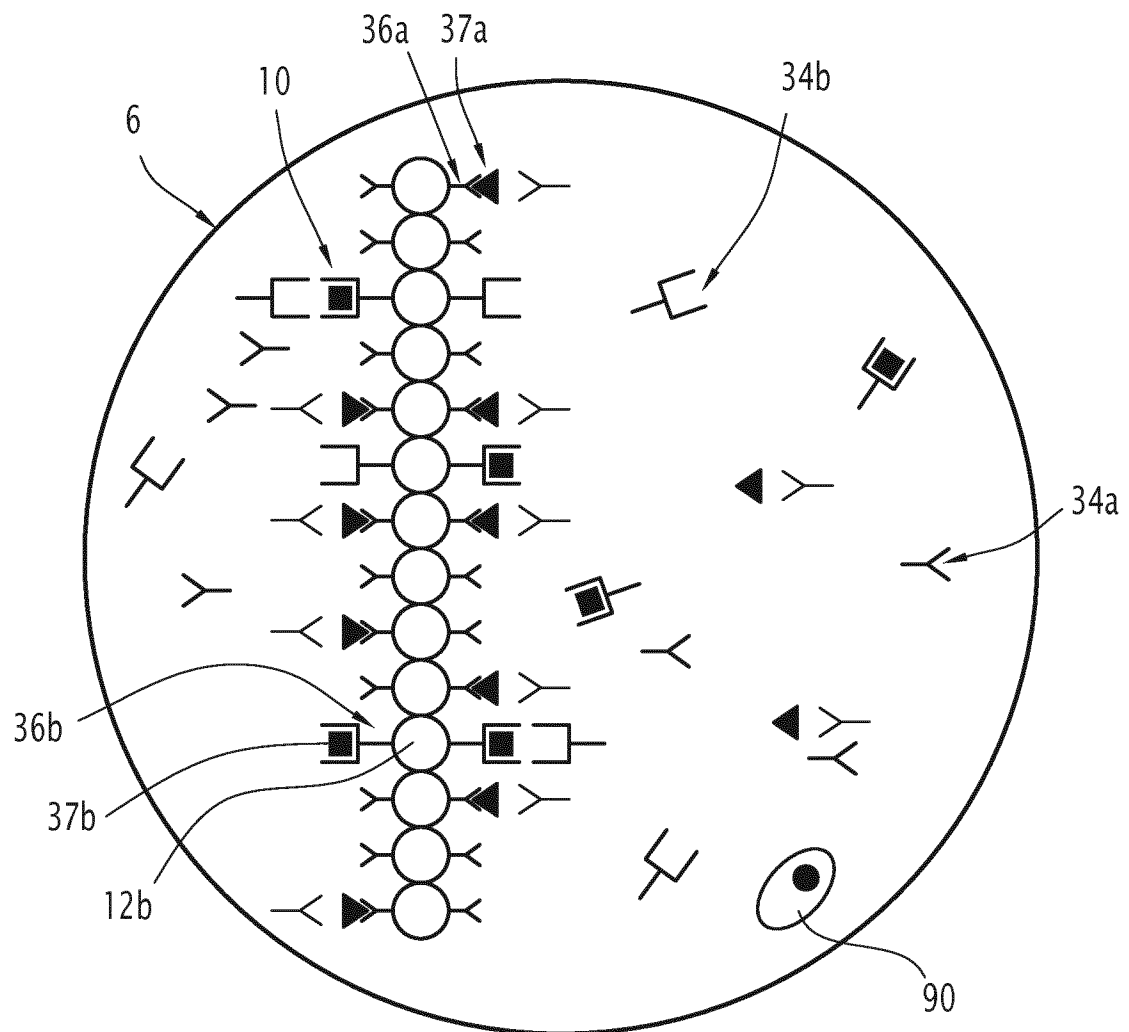


FIG.13

8/14

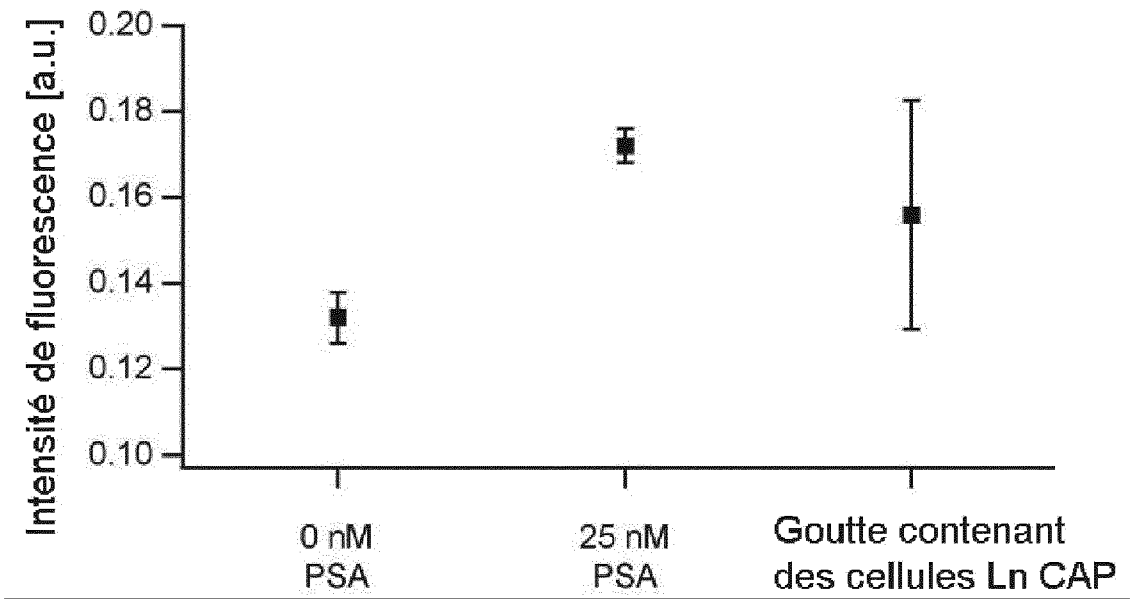


FIG.14

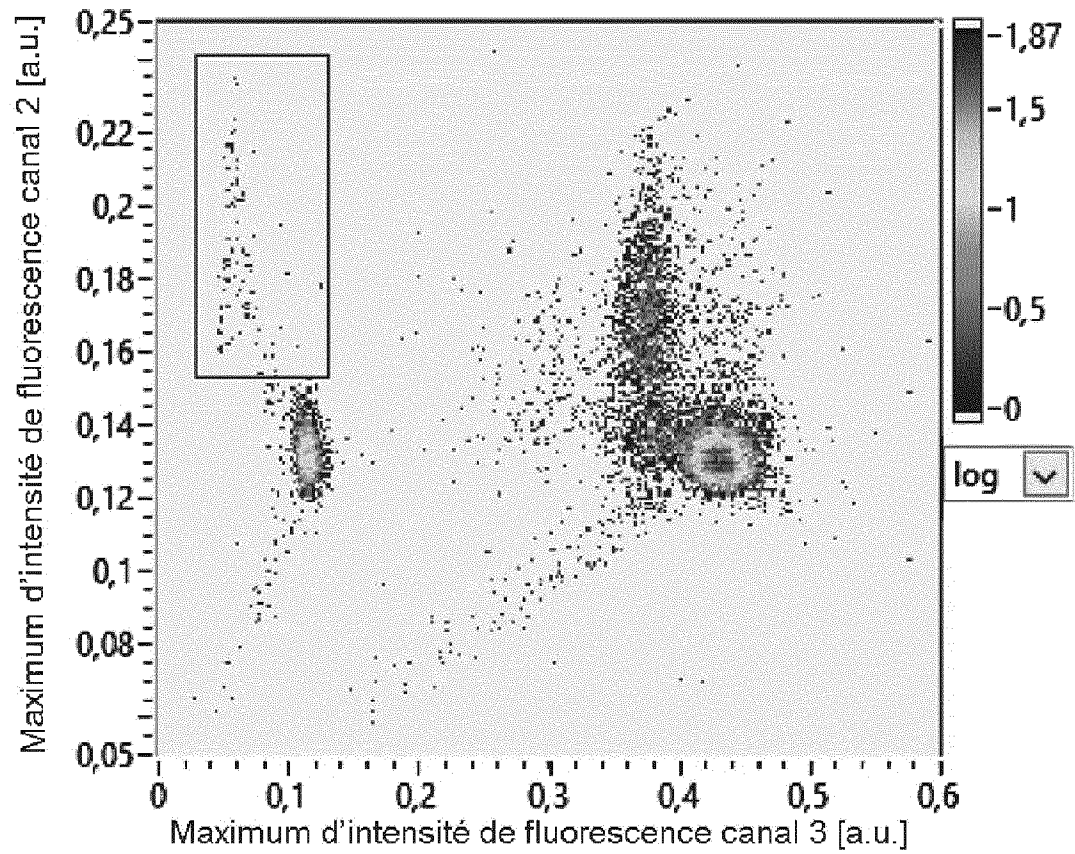


FIG.15

9/14

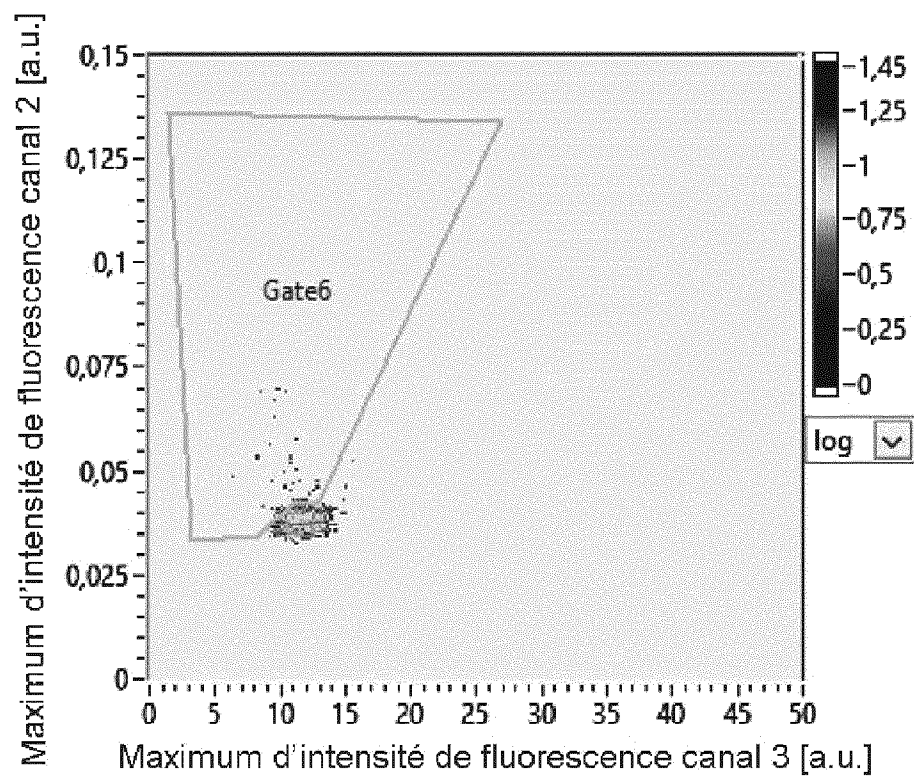


FIG.16

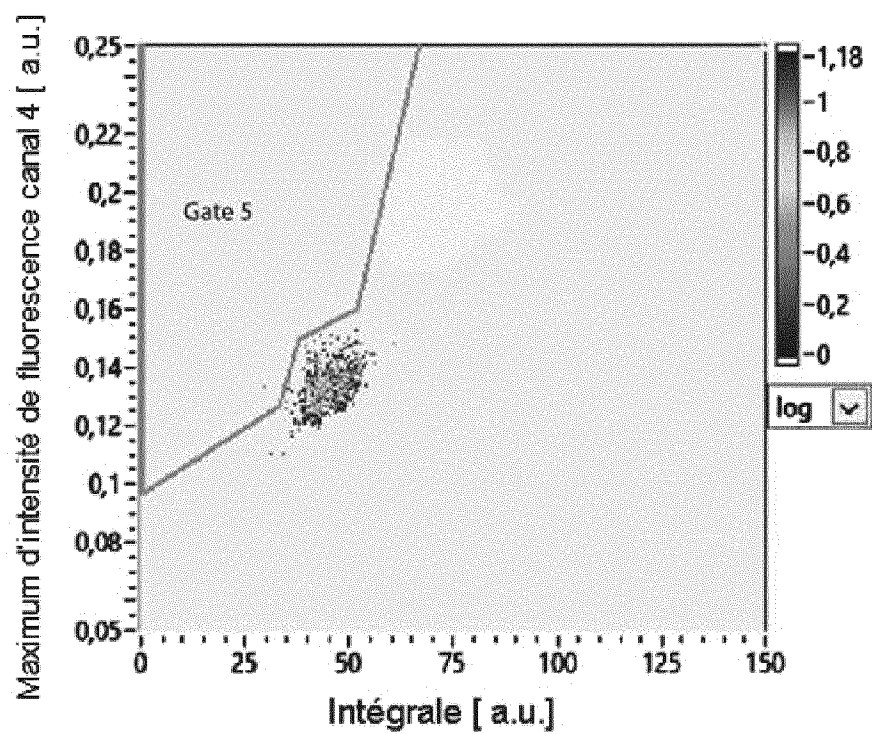


FIG.17

10/14

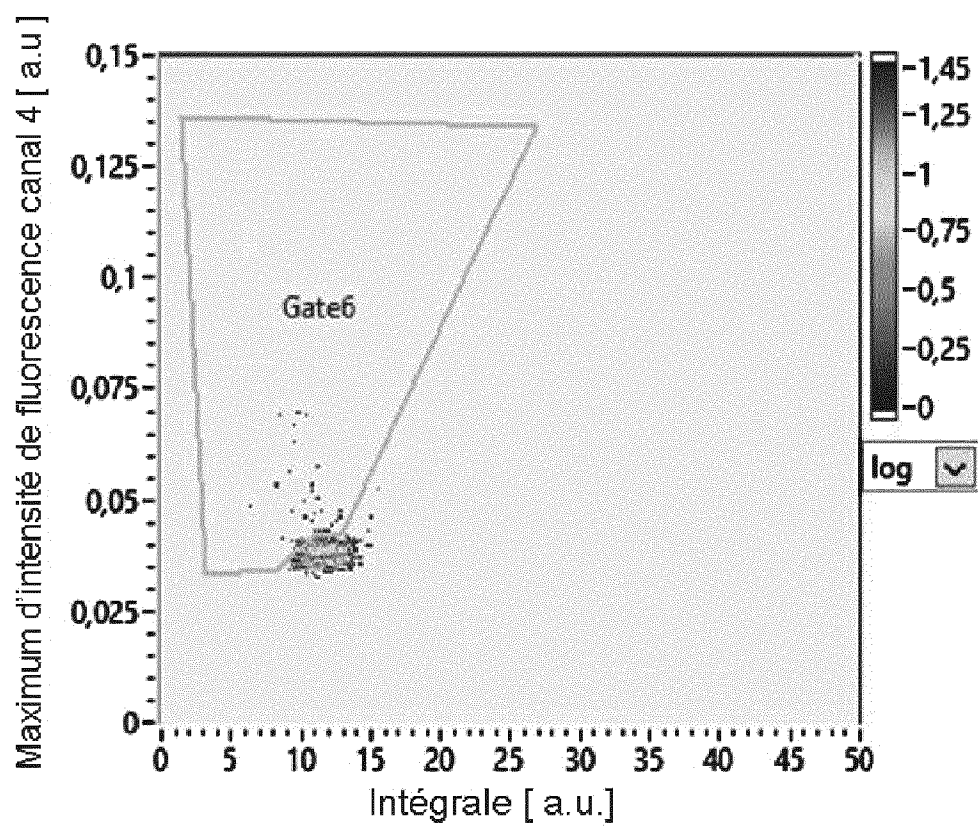


FIG.18

11/14

FIG.19

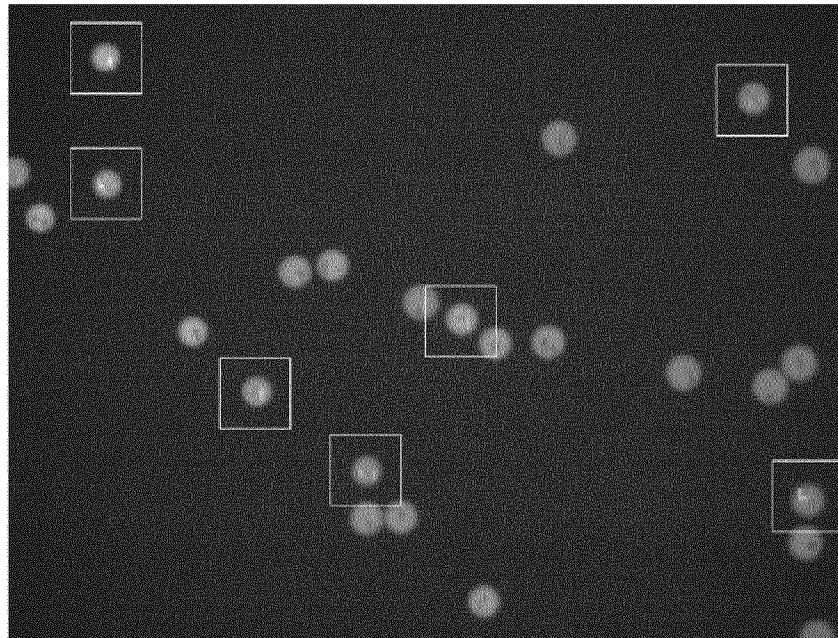
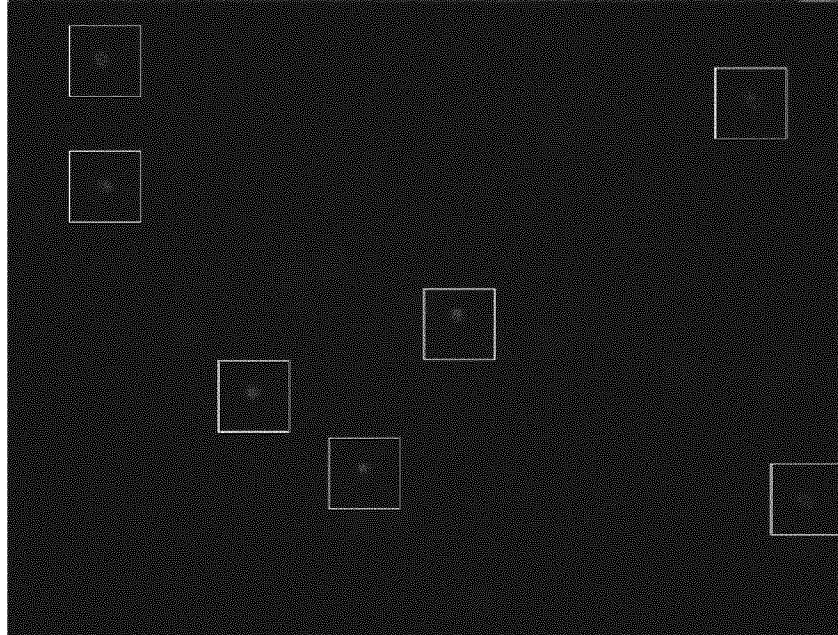


FIG.20



12/14

FIG.21

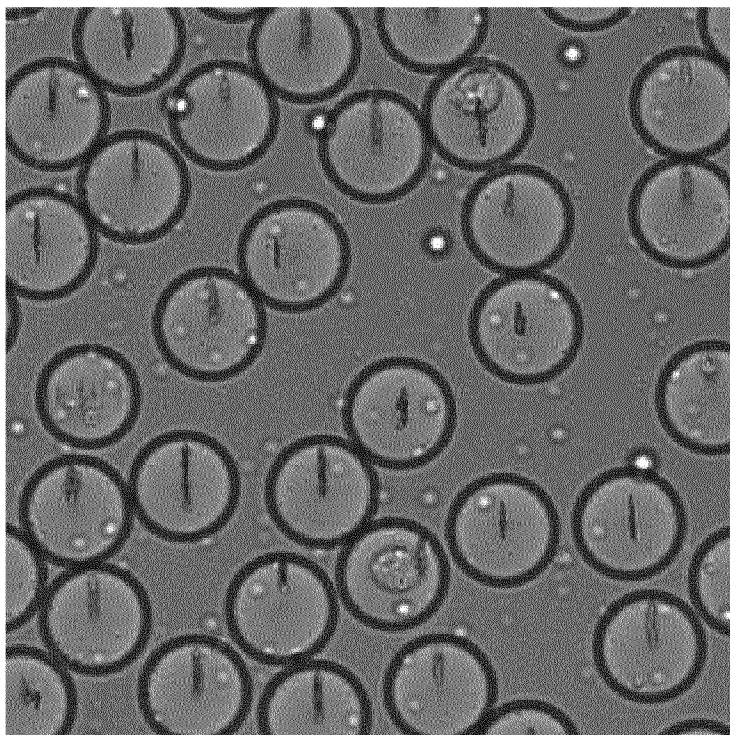
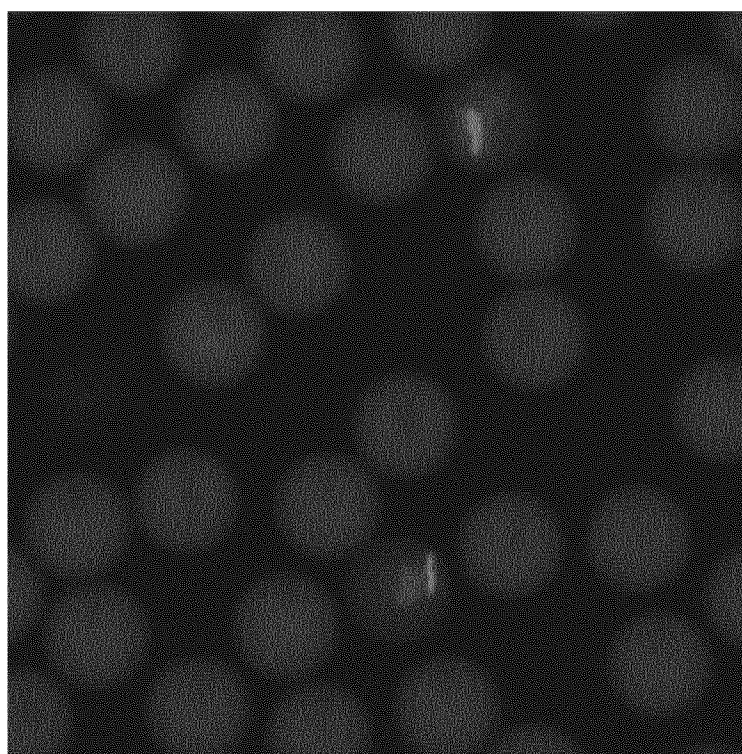


FIG.22



13/14

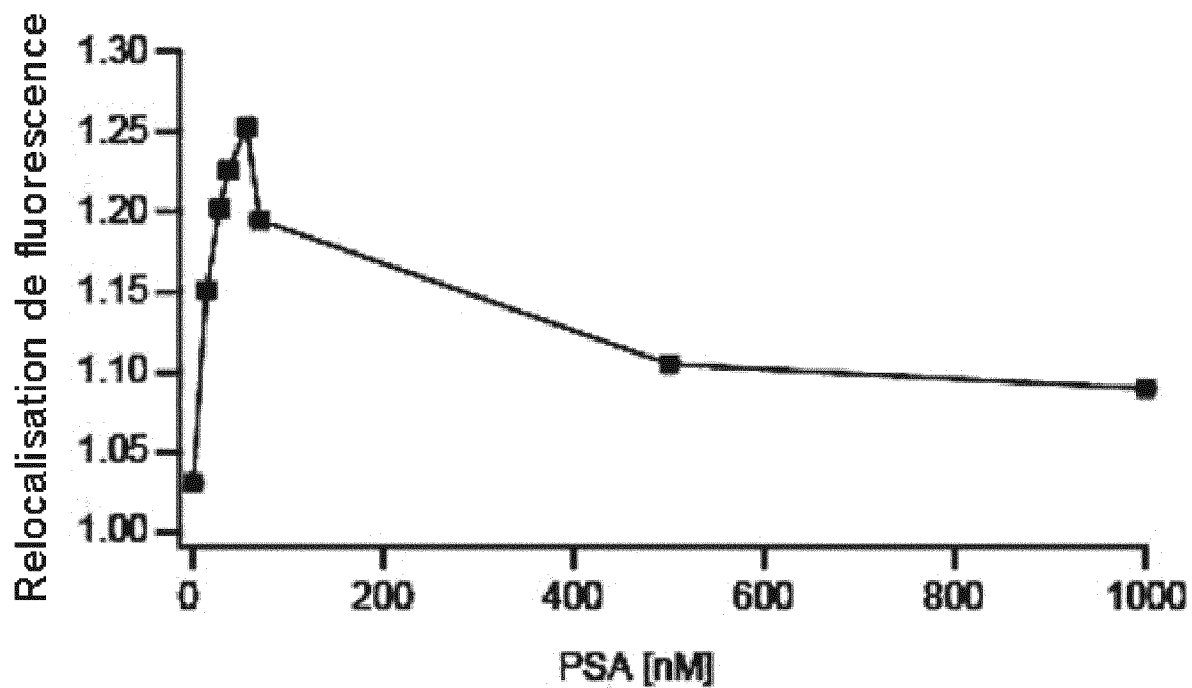


FIG.23

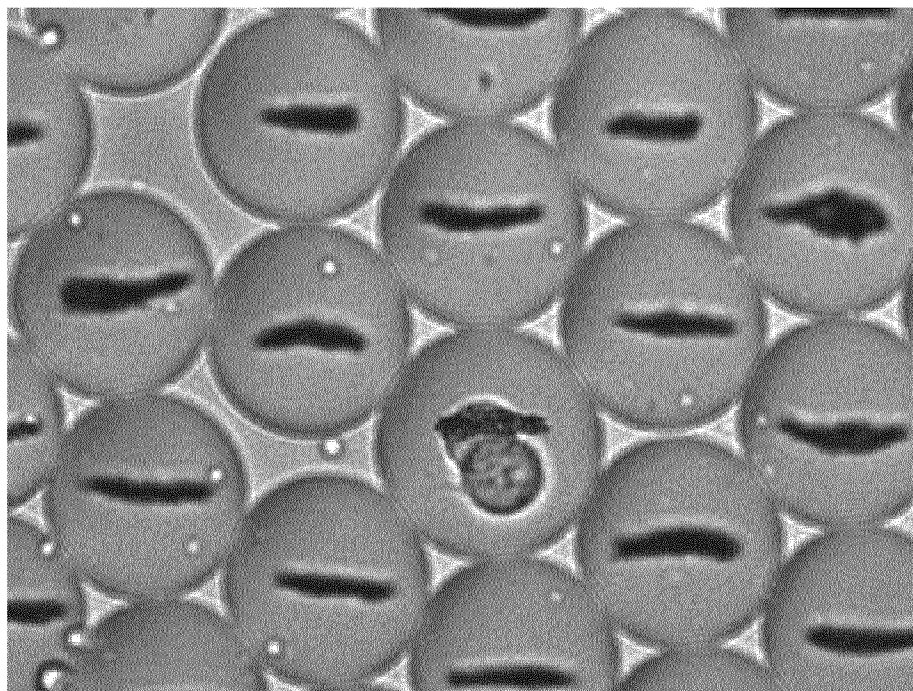


FIG.24

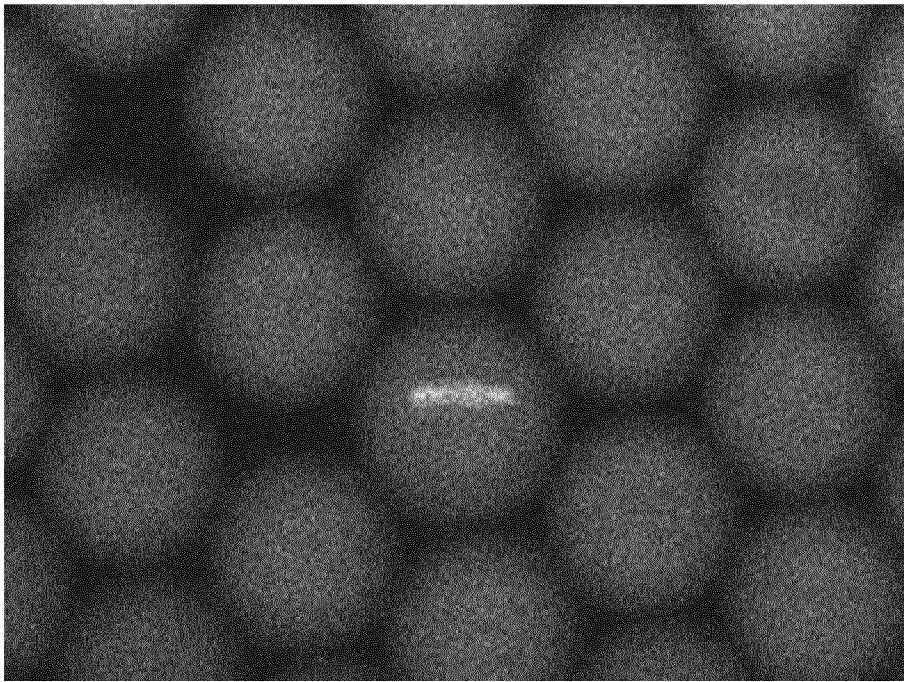


FIG.25

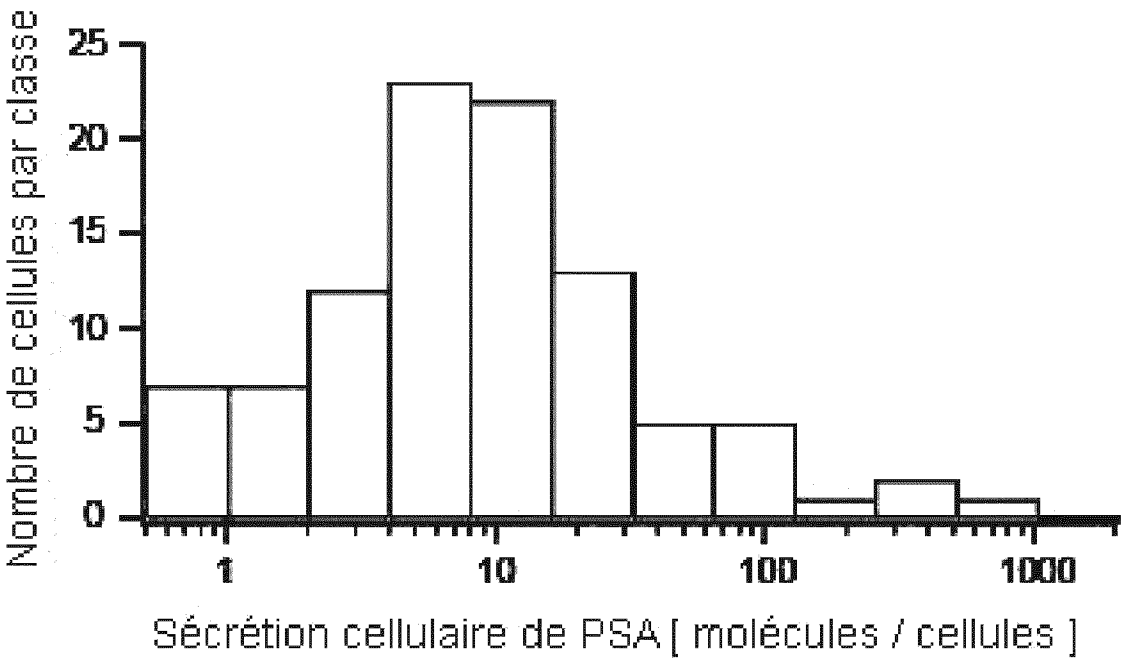


FIG.26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/059209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/543 B01L3/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/011808 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; WEITZ DAVID A [US]; GRIFFITHS ANDREW [FR]; KOEST) 22 January 2009 (2009-01-22) the whole document page 1, line 30 - page 4, line 12 page 8, lines 13-26 page 9, line 19 - page 10, line 28; claims 1-225 page 15 - page 18, line 6; examples 1-3 figures 1-18 ----- -/--	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 2017

Date of mailing of the international search report

13/06/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Boiangiu, Clara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/059209

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/041983 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; VIOVY JEAN-LOUIS [FR]; MALAQUIN LAURENT [U] 28 March 2013 (2013-03-28) the whole document figures 2, 4, 9; examples 2,3 claims 1-80 page 7, lines 16-31 page 8, lines 1-13 page 15, line 17 - page 16, line 29 page 19, line 16 - page 20, line 18 -----	1-11
Y	BRUNO TESTE ET AL: "A low cost and high throughput magnetic bead-based immuno-agglutination assay in confined droplets", LAB ON A CHIP, vol. 13, no. 12, 26 March 2013 (2013-03-26), pages 2344-2349, XP055202306, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c3lc50353d the whole document -----	1-11
Y	WO 2010/009365 A1 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC [US]; LINK DARREN [US]; HUTCHINSON BRAIN [U] 21 January 2010 (2010-01-21) the whole document -----	1-11
Y	WO 2012/045012 A2 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC [US]; SAMUELS MICHAEL [US]; LINK DARREN [US] 5 April 2012 (2012-04-05) the whole document figures 3-8 -----	1-11
Y	US 2006/078893 A1 (GRIFFITHS ANDREW [GB] ET AL) 13 April 2006 (2006-04-13) the whole document -----	1-11
Y	WO 2011/050070 A1 (UNIV VANDERBILT [US]; HASELTON FREDERICK R [US]; WRIGHT DAVID W [US];) 28 April 2011 (2011-04-28) the whole document -----	1-11
Y	WO 2005/049787 A2 (YEDA RES & DEV [IL]; YISSUM RES DEV CO [IL]; MEDICAL RES COUNCIL [GB];) 2 June 2005 (2005-06-02) the whole document -----	1-11
Y	WO 2007/133710 A2 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC [US]; LINK DARREN R [US]; WEINER MICHAEL [U] 22 November 2007 (2007-11-22) the whole document ----- -/--	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/059209

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RYAN TEWHEY ET AL: "Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 11, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 1025-1031, XP055103848, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1583 the whole document -----	1-11
Y	GRIFFITHS A D ET AL: "Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 22, no. 1, 2 January 2003 (2003-01-02), pages 24-35, XP002272486, ISSN: 0261-4189, DOI: 10.1093/EMBOJ/CDG014 the whole document -----	1-11
X,P	WO 2016/059182 A1 (ESPCI INNOV [FR]) 21 April 2016 (2016-04-21) the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/059209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009011808 A1	22-01-2009	US 2009068170 A1 US 2012015382 A1 WO 2009011808 A1	12-03-2009 19-01-2012 22-01-2009
WO 2013041983 A1	28-03-2013	CN 103930210 A EP 2758173 A1 US 2014342373 A1 WO 2013041983 A1	16-07-2014 30-07-2014 20-11-2014 28-03-2013
WO 2010009365 A1	21-01-2010	EP 2315629 A1 US 2010022414 A1 US 2017028365 A1 WO 2010009365 A1	04-05-2011 28-01-2010 02-02-2017 21-01-2010
WO 2012045012 A2	05-04-2012	EP 2622103 A2 US 2012122714 A1 WO 2012045012 A2	07-08-2013 17-05-2012 05-04-2012
US 2006078893 A1	13-04-2006	AU 2005293370 A1 CA 2582470 A1 EP 1812156 A1 EP 2556883 A1 JP 5509412 B2 JP 2008518884 A US 2006078893 A1 US 2007184489 A1 US 2009197772 A1 WO 2006040554 A1	20-04-2006 20-04-2006 01-08-2007 13-02-2013 04-06-2014 05-06-2008 13-04-2006 09-08-2007 06-08-2009 20-04-2006
WO 2011050070 A1	28-04-2011	US 2012276523 A1 WO 2011050070 A1	01-11-2012 28-04-2011
WO 2005049787 A2	02-06-2005	EP 1691792 A2 US 2007077572 A1 WO 2005049787 A2	23-08-2006 05-04-2007 02-06-2005
WO 2007133710 A2	22-11-2007	AT 540750 T EP 2021113 A2 EP 2047910 A2 EP 2481815 A1 EP 2530167 A1 EP 2530168 A1 EP 3031918 A1 JP 6023252 B2 JP 2010506136 A JP 2013015536 A JP 2015142586 A JP 2017006145 A US 2008003142 A1 US 2008014589 A1 US 2013090248 A1 US 2013183659 A1 US 2013210639 A1 WO 2007133710 A2 WO 2008063227 A2	15-01-2012 11-02-2009 15-04-2009 01-08-2012 05-12-2012 05-12-2012 15-06-2016 09-11-2016 25-02-2010 24-01-2013 06-08-2015 12-01-2017 03-01-2008 17-01-2008 11-04-2013 18-07-2013 15-08-2013 22-11-2007 29-05-2008
WO 2016059182 A1	21-04-2016	FR 3027396 A1 WO 2016059182 A1	22-04-2016 21-04-2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/059209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/059209

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N33/543 B01L3/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N B01L		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 2009/011808 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; WEITZ DAVID A [US]; GRIFFITHS ANDREW [FR]; KOEST) 22 janvier 2009 (2009-01-22) le document en entier page 1, ligne 30 - page 4, ligne 12 page 8, lignes 13-26 page 9, ligne 19 - page 10, ligne 28; revendications 1-225 page 15 - page 18, ligne 6; exemples 1-3 figures 1-18 ----- -/--	1-11
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
19 mai 2017		13/06/2017
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Boiangiu, Clara

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 2013/041983 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; VIOVY JEAN-LOUIS [FR]; MALAQUIN LAURENT []) 28 mars 2013 (2013-03-28) le document en entier figures 2, 4, 9; exemples 2,3 revendications 1-80 page 7, lignes 16-31 page 8, lignes 1-13 page 15, ligne 17 - page 16, ligne 29 page 19, ligne 16 - page 20, ligne 18 -----	1-11
Y	BRUNO TESTE ET AL: "A low cost and high throughput magnetic bead-based immuno-agglutination assay in confined droplets", LAB ON A CHIP, vol. 13, no. 12, 26 mars 2013 (2013-03-26) , pages 2344-2349, XP055202306, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c3lc50353d le document en entier -----	1-11
Y	WO 2010/009365 A1 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC [US]; LINK DARREN [US]; HUTCHINSON BRAIN [U] 21 janvier 2010 (2010-01-21) le document en entier -----	1-11
Y	WO 2012/045012 A2 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC [US]; SAMUELS MICHAEL [US]; LINK DARREN [US] 5 avril 2012 (2012-04-05) le document en entier figures 3-8 -----	1-11
Y	US 2006/078893 A1 (GRIFFITHS ANDREW [GB] ET AL) 13 avril 2006 (2006-04-13) le document en entier -----	1-11
Y	WO 2011/050070 A1 (UNIV VANDERBILT [US]; HASELTON FREDERICK R [US]; WRIGHT DAVID W [US];) 28 avril 2011 (2011-04-28) le document en entier -----	1-11
Y	WO 2005/049787 A2 (YEDA RES & DEV [IL]; YISSUM RES DEV CO [IL]; MEDICAL RES COUNCIL [GB];) 2 juin 2005 (2005-06-02) le document en entier -----	1-11
Y	WO 2007/133710 A2 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC [US]; LINK DARREN R [US]; WEINER MICHAEL [U] 22 novembre 2007 (2007-11-22) le document en entier ----- -/--	1-11

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	RYAN TEWHEY ET AL: "Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 11, 1 novembre 2009 (2009-11-01), pages 1025-1031, XP055103848, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1583 le document en entier -----	1-11
Y	GRIFFITHS A D ET AL: "Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 22, no. 1, 2 janvier 2003 (2003-01-02), pages 24-35, XP002272486, ISSN: 0261-4189, DOI: 10.1093/EMBOJ/CDG014 le document en entier -----	1-11
X,P	WO 2016/059182 A1 (ESPCI INNOV [FR]) 21 avril 2016 (2016-04-21) le document en entier -----	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/059209

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009011808	A1	22-01-2009	US 2009068170 A1	12-03-2009
			US 2012015382 A1	19-01-2012
			WO 2009011808 A1	22-01-2009
WO 2013041983	A1	28-03-2013	CN 103930210 A	16-07-2014
			EP 2758173 A1	30-07-2014
			US 2014342373 A1	20-11-2014
			WO 2013041983 A1	28-03-2013
WO 2010009365	A1	21-01-2010	EP 2315629 A1	04-05-2011
			US 2010022414 A1	28-01-2010
			US 2017028365 A1	02-02-2017
			WO 2010009365 A1	21-01-2010
WO 2012045012	A2	05-04-2012	EP 2622103 A2	07-08-2013
			US 2012122714 A1	17-05-2012
			WO 2012045012 A2	05-04-2012
US 2006078893	A1	13-04-2006	AU 2005293370 A1	20-04-2006
			CA 2582470 A1	20-04-2006
			EP 1812156 A1	01-08-2007
			EP 2556883 A1	13-02-2013
			JP 5509412 B2	04-06-2014
			JP 2008518884 A	05-06-2008
			US 2006078893 A1	13-04-2006
			US 2007184489 A1	09-08-2007
			US 2009197772 A1	06-08-2009
			WO 2006040554 A1	20-04-2006
WO 2011050070	A1	28-04-2011	US 2012276523 A1	01-11-2012
			WO 2011050070 A1	28-04-2011
WO 2005049787	A2	02-06-2005	EP 1691792 A2	23-08-2006
			US 2007077572 A1	05-04-2007
			WO 2005049787 A2	02-06-2005
WO 2007133710	A2	22-11-2007	AT 540750 T	15-01-2012
			EP 2021113 A2	11-02-2009
			EP 2047910 A2	15-04-2009
			EP 2481815 A1	01-08-2012
			EP 2530167 A1	05-12-2012
			EP 2530168 A1	05-12-2012
			EP 3031918 A1	15-06-2016
			JP 6023252 B2	09-11-2016
			JP 2010506136 A	25-02-2010
			JP 2013015536 A	24-01-2013
			JP 2015142586 A	06-08-2015
			JP 2017006145 A	12-01-2017
			US 2008003142 A1	03-01-2008
			US 2008014589 A1	17-01-2008
			US 2013090248 A1	11-04-2013
			US 2013183659 A1	18-07-2013
			US 2013210639 A1	15-08-2013
			WO 2007133710 A2	22-11-2007
			WO 2008063227 A2	29-05-2008
WO 2016059182	A1	21-04-2016	FR 3027396 A1	22-04-2016
			WO 2016059182 A1	21-04-2016

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/059209

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
