LES ÉVOLUTIONS EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

G. PIVERT

CHU Cochin, AP-HP, Paris, France

THÉRANOSTIQUE

L'approche combinée thérapeutique et diagnostique permet d'envisager un traitement adapté au patient en développant conjointement test et médicament avec une grande efficacité et un minimum de toxicité pour les patients. Roche, après avoir travaillé sur le cancer du sein (stratégie de prescription de l'Herceptin en fonction du taux de récepteurs Her, test diagnostic de Ventana), a conclu un accord avec la société Dxs, société fondée en 2001 par Astra Zeneca, récemment rachetée par Qiagen et spécialisée dans les biomarqueurs prédictifs. Cet accord comprend la distribution des tests Therascreen sur les cancers colorectaux et les cancers du poumon.

Cancer colorectal

Dans le domaine du cancer colorectal, la détection des mutations de l'oncogène K-RAS permet d'orienter la prescription de médicaments anticancéreux. Le Vectibix est un anticorps monoclonal qui inhibe la fixation de ligands sur les récepteurs epidermal growth factor receptor (EGFR). Or, dans 40% des cas de cancers colorectaux, le gène KRAS muté rend inefficace les inhibiteurs de EGFR tels le Vectibix. La recherche des mutations de cet oncogène est donc recommandée préalablement aux traitements de chimiothérapie des cancers colorectaux (American Society of Clinical Oncology et National Cancer Institute).

La trousse Therascreen (Dxs diagnostics) portant sur sept mutations de l'oncogène KRAS sera bientôt proposé sur Light Cycler 480 avec un logiciel d'interprétation dans le cadre du marquage CE-IVD. La technique par PCR quantitative avec des sondes spécifiques Scorpions offrirait de meilleures limites de détection et une meilleure

sensibilité que le séquençage bidirectionnel. La difficulté technique de ces tests provient de l'échantillon de départ, des biopsies, dont la composition est hétérogène avec un mélange de tissus normaux et cancéreux. La technique de PCR quantitative Therascreen permettrait de repérer des mutations lors de ratio cellules mutantes sur cellules normales de un sur 100.

Cancers du poumon

Dans le domaine des cancers du poumon, la détection des 29 mutations du gène *EGFR* aide les médecins à prescrire des médicaments dans le cadre de ce cancer ; l'efficacité d'une classe de médicament, les inhibiteurs de tyrosine kinase, est reliée à ces mutations.

Autres approches de théranostique

D'autres approches de théranostique sont envisagées sur le cancer de la peau et sur l'hépatite C. Concernant le cancer de la peau, l'objectif est de sélectionner les patients présentant une protéine mutée en vue de leur prescrire un médicament spécifique en cours de développement. Sur l'hépatite C, l'objectif est de sélectionner les patients qui peuvent bénéficier d'un traitement plus court, quatre mois au lieu de six à 12 mois, avec la même efficacité thérapeutique.

CONSOLIDATION EXTRACTION AMPLIFICATION

La liaison sur le même appareil de ces deux fonctions fait appel à des avancées en microfluidiques, en capteur optique et en technologie micro-array. De nombreuses sociétés s'orientent vers un format compact destiné en partie à de la biologie délocalisée. Ces appareils sont fondés sur des consommables intégrés à base de technologie microfluidique dans lesquels s'enchainent toutes les étapes nécessaires à la réalisation des analyses. La route ouverte par Cepheid est suivie par Focus (appareil 3M pour des applications en virologie et BK en 40 minutes), Iquum (destiné aux cabinets de médecins), Nanosphere (peut-être commercialisé en Europe dans un an).

Cepheid

Il existe plusieurs tailles de stations associées à un et quatre canaux. Un modèle à 48 canaux, l'Infinity 48, est présenté avec un bras robotisé permettant le transfert des cartouches réactionnelles des stations de chargement vers celles de process, puis vers la station déchet. Cet appareil est disponible 24h/24 pour des tests en urgence. Le panel de test disponible comprend un test de détection des SARM en 66'.

Focus

Focus (www.focusdx.com) développe avec 3 M l'appareil Simplexa où les différents réactifs sont enfermés dans les différentes chambres d'un rotor; les réactifs progressent de chambres en chambres sous l'effet de la force centrifuge.

Iquum

L'appareil portable Liat est basé sur un consommable-tube dans lequel figurent tous les réactifs pour extraction en billes et amplification en PCR temps réel ; ce tube reste clos pendant tout le process permettant d'éviter les contaminations croisées, les risques biologiques et de préserver l'intégrité de l'échantillon. Des tests de VIH 1, CMV, grippe sont réalisés en moins d'une heure.

Handylab

D'autres appareils sont toujours développés au format « laboratoire » : ainsi le Jaguar de la société Handylab est un système intégré destiné à des tests rapides de diagnostic infectieux. Le système incorpore la préparation de l'échantillon, l'extraction d'acides nucléiques, l'amplification dans un consommable de microfluidique et la détection. Il peut réaliser 24 PCR en temps réel en deux heures. Des trousses d'extraction ADN ou ARN sont disponibles.

Nanosphere

Il est à noter que Nanosphere propose avec l'appareil Verigene 1 un instrument permettant la réalisation d'analyses moléculaires sans PCR avec des oligonucléotides couplés à des particules d'or (www.nanosphere.us). Un test de mutation du facteur V est proposé : la mutation du facteur V rend celui-ci résistant au clivage par la protéine C, entraînant une augmentation du taux de facteur V et donc un risque de thrombophilie.

Infections nosocomiales

Des trousses pour quantifier le SARM (*Streptococcus aureus* résistant à la méthycilline) en PCR en temps réel apparaissent : kit Roche Light Cycler 2.0 en août 2009 ; Nuclisens Easy Q MRSA de Biomérieux.

Charges virales

Le plus large menu de tests de quantification d'ARN par RT PCR en vue de mesure de charges virales est proposé par Abbott avec neuf tests ; la station d'extraction m2000 dispose d'un nouveau logiciel ouvert, la version 3.0.

Grippe A H1N1

Le groupe Life technology (Invitrogen et Applied Biosystems) propose une détection comprenant l'isolement d'ARN et une RT-PCR.

SÉOUENCAGE

Depuis quelques années, le séquençage des acides nucléiques évolue de façon majeure avec l'apparition d'une seconde génération de séquenceurs dits « à haut débit ». L'offre est constituée des appareils Genome Sequencer (Roche, évoqué lors d'un précédent numéro), Solid (Applied Biosystem), Genome Analyzer (Illumina). Ce dernier était présenté sur le congrès.

Le Genome Analyzer II est un séquenceur à haut débit (1 à 2GB par jour) dont la

méthode est fondée sur un séquençage par synthèse avec une chimie par nucléotides terminateurs marqués à un fluorophore et se compose des phases suivantes:

- préparation de l'échantillon (six heures);
- génération des « clusters » ou copies d'un même fragment d'ADN par une station de clusters : les échantillons multiplexés sont amplifiés dans chaque canal de la station en cinq heures ;
- chargement du séquenceur par des cellules et lecture par analyse d'image en temps réel (un jour).

Cette méthode, outre les forts débits de séquençage, offre un strict séquençage base à base à partir de faibles quantités d'échantillon (100 ng) (www.illumina.com).

Concernant les séquenceurs de première génération, Applied Biosystems propose une nouvelle station de séquençage par électrophorèse capillaire, le 3500 Dx, commercialisé en 2009. Cette solution complète (appareil, réactif, logiciel, service) est la concrétisation de la fusion entre Applied et Invitrogen dans le groupe Life Technologie Corporation et est marquée CE IVD (www.lifetechnologies.com).

SYSTÈMES À BIOPUCES

Certaines phases du traitement des biopuces (lavage, séchage) peuvent être affectées par la présence de l'ozone de l'air qui dégrade certains marqueurs fluorescents. Des caissons à faible teneur en ozone sont présentés : le Nozone WS workspace (www.scigene. com), le modèle Biotray commercialisé par Innopsys.

Les biopuces Nimblegen permettent, grâce à une haute densité de sondes d'oligonucléotides, d'étudier les variations génomiques et épigénomiques. Roche Nimblegen et 454 Life Sciences travaillent sur des puces de reséquençage ; le résequençage de gènes ou de régions génomiques d'intérêt est une étape clé dans la détection de mutations associées à des maladies complexes comme le cancer, l'asthme, les maladies cardiaques (www.nimblegen.com).

L'appareil Infinity (société Autogenomics, commercialisé en France par Bühlmann) est basé sur des biopuces à micro-réseau sur lesquels l'ADN cible des patients est hybridé puis révélé par des signaux de fluorescence lus grâce à un microscope muni de deux lasers. Un large éventail de trousses est proposé sur :

- les maladies génétiques (hémostase avec le génotypage des gènes du facteur V Leiden, du facteur II);
- pharmacogénétique (une biopuce permet de détecter dix mutations génétiques du gène 2C19 codant pour le cytochrome P450 qui est impliqué dans le métabolisme et l'élimination de 5 à 10% des médicaments courants);
- maladies infectieuses (génotypage HPV, virus des voies respiratoires);
- cancer (KRAS, (5-FU, TAMX3) (www.buhlmannlabs.fr, www.auto-genomics.com)

Une application de cytogénétique portant sur la détection des cinq aneuploïdies les plus fréquentes (nombre anormal des chromosomes 13,18, 21, X et Y) est proposée par Perkin Elmer: des sondes à base de BAC (chromosomes artificiels bactériens, longueur 170 000 bases) sont immobilisées sur des billes Luminex puis hybridées avec des échantillons de patients et des échantillons de référence. La comparaison entre les deux permet d'affirmer les gains ou pertes au niveau de chaque chromosome. Un panel de 83 sondes est utilisé dans le panel constitutionnel: cinq pour chacun des chromosomes 13, 18, 21, X et Y, quatre à huit pour chacun des neuf locus, six pour contrôles autosomaux). Cette technique offrirait plusieurs avantages : pas de phase de mise en culture par rapport aux techniques cytogénétiques actuelles, forte productivité grâce au format microplaques. Cette technique est en cours de validation en France.

Sur la détection du ganglion sentinelle pendant la chirurgie du cancer du sein, un test de biologie moléculaire, proposé par Véridex (groupe Johnson, www.veridex.com) et réalisé en 35 minutes en peropératoire, permet d'affirmer si des micrométastases sont présentes dans les ganglions lymphatiques. Une étude montre une valeur prédictive négative supérieure à celle de la technique histologique.

COMBINAISON AMPLIFICATION PCR ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Dans le domaine de l'infectieux, Abbott a racheté en 2008 une société spécialisée dans la détection des germes pathogènes dans des secteurs variés tels que la défense, les entreprises pharmaceutiques, la santé publique. Cette société, Ibis Biosciences, propose une plateforme, le Plexid dont l'intérêt majeur est de pouvoir disposer de l'identification d'agents infectieux en quelques heures, sans le processus de culture préalable, pour tout type d'échantillon. Différents type de renseignements sont fournis sur l'agent infectieux : identité, génotype, virulence, résistance.

La méthode est fondée sur une combinaison d'amplification PCR et de spectrométrie de masse ESI TOF. Le processus complet prend six heures avec des phases d'extraction et amplification non incluses dans l'appareil.

Dans une première étape, des amorces d'amplification propres à un large groupe de bactéries encadrent la région

informative propre à chaque type de bactérie ; les amplicons obtenus après amplification sont introduits dans un spectromètre de masse basé sur la technique ESI TOF. L'ionisation de l'échantillon se déroule par « electrospray ionisation » (ESI) qui conserve intacts les brins d'ADN. Chaque base nucléotidique étant connue par son rapport masse/charge, il est possible de déduire la composition en bases de l'amplicon à partir du signal généré par ce dernier. Cette composition en bases permet de différencier les germes et de les caractériser grâce à la comparaison avec une base de données interne.

À ce stade, plusieurs stratégies d'amplification PCR sont proposées :

- une amplification universelle des gènes 16S ou 23S en vue d'une identification large;
- une amplification de gènes hautement conservés permettant de différencier les virus;
- une amplification ciblée en vue de caractériser le génotypage et les mécanismes de virulence et de résistance au traitement.

La station permettra de recevoir jusqu'à 15 plaques de 96 puits avec accès à l'urgence et sera marquée CE en décembre 2009.Les trousses associées sont proposées par type de pathologie : panel « grippe » en décembre 2009, panel « viral » au premier trimestre 2010, puis BCA pour identification large et antibiogramme au second trimestre 2010. L'objectif de cette plate-forme dont le prix serait de l'ordre de 500 00€ n'est donc pas de faire du diagnostic de bactériologie de routine mais plutôt d'offrir une réponse performante et rapide sur certains syndromes (par exemple, syndrome méningé, syndrome digestif, syndrome sepsis).

CONCLUSION

On constate que le secteur de la biologie moléculaire propose des outils toujours à la pointe de l'innovation ; ceux-ci trouvent leur place soit pour développer des nouvelles stratégies diagnostiques, soit pour remplacer ou compléter des approches existantes en les rendant plus rapides et/ou plus fiables.

BIOLOGIE DÉLOCALISÉE : OBLIGATIONS, BESOINS ET DÉVELOPPEMENT. TROUVER LE BON COMPROMIS

K. Bourdé-Vacher

Ingénieur biomédical, CHU de Grenoble, Grenoble, France

À l'instar des autres pays européens, la France voit depuis quelques années un développement des analyses réalisées au chevet du patient (ADBD : analyse de biologie délocalisée). Ces besoins multiplies d'aide à la décision thérapeutique immédiate peuvent s'expliquer par une prise en charge des patients plus personnalisée donc plus rapide, le tout piloté par la tarification à l'activité. Si les besoins changent, les obligations qui s'imposent à la biologie délocalisée se durcissent avec la norme NF EN ISO 22870 qui reprend elle-même des obli-

gations de la norme NF EN ISO 15189 et qui rendent plus délicat la réalisation de ces analyses délocalisées dans un contexte d'unité de soins.

OBLIGATIONS ET BESOINS

Répondre aux obligations de la norme NF EN ISO 22870, amène les cliniciens et les biologistes à se reposer les questions de base : est-ce vraiment nécessaire ? Comment pourrions-nous répondre au sein du laboratoire ? Quel outil analytique peut répondre aux besoins du clinicien dans le respect des mes obliga-

tions en biologie médicale (traçabilité, suivi...)? Quels sont les moyens dont je dispose pour réaliser ce dosage dans les bonnes conditions? Quels sont les moyens dont je dispose en biologie pour suivre ce nouveau paramètre ou équipement en délocalisé?

Bien souvent le clinicien ne voit pas l'intérêt de tout ce qui est mis en place par le biologiste pour la réalisation de ce dosage : trop de contrôles qualité, trop de règles d'entretien de l'équipement, trop de traçabilité, trop de formations...