

**OFFRE
DURÉE
LIBRE**

2 FORMULES / AU CHOIX

BULLETIN D'ABONNEMENT

Pour la Science – Service abonnements – 19 rue de l'Industrie – BP 90053 – 67402 Illkirch Cedex – email : pourlascience@abopress.fr

PAG180999DP

PPV6E50

Partie réservée au service abonnement. Ne rien inscrire



➤ normal qui, comme dans le cas de la protéine CTLA-4, contribue à modérer une réponse immunitaire. Cependant, certaines cellules cancéreuses détournent la fonction des protéines PD-1 : des molécules à leur surface trompent les protéines PD-1 des lymphocytes T, déclenchant ainsi trop tôt l'autodestruction des cellules. Chaque lymphocyte T qui attaque la tumeur reçoit un signal pour se suicider !

Aujourd'hui, six sociétés ont développé des anticorps qui empêchent diverses tumeurs d'utiliser la voie PD-1 pour induire le suicide des lymphocytes T. Dans des essais récents, ces molécules ont octroyé à plus de 30 % des patients, atteints de mélanomes avancés, de longues périodes de rémission, parfois de plusieurs années. Plusieurs collègues et confrères ont utilisé ces agents anti-PD-1 chez des patients présentant un certain type de cancer du poumon. Plus de 20 % des participants ont obtenu une régression durable.

Annoncés en 2012, les résultats sur le cancer du poumon ont marqué un tournant en immunothérapie. Les médecins sceptiques, qui n'y voyaient qu'une stratégie applicable à certaines tumeurs spécifiques particulièrement sensibles aux traitements immunitaires, ne peuvent plus ignorer cette méthode. Aujourd'hui, elle est efficace pour un éventail plus large de cancers et devrait bientôt rejoindre la panoplie des traitements classiques, aux côtés de la chimiothérapie et de la radiothérapie.

Certes, comme beaucoup de traitements anticancéreux, ces deux immunothérapies ont des effets secondaires. Les médicaments anti-CTLA-4, par exemple, déclenchent parfois des réactions inflammatoires sur la peau et dans le gros intestin, lorsque les cellules immunitaires libèrent un excès de médiateurs chimiques inflammatoires. On traite les éruptions cutanées et les crampes et diarrhées avec des stéroïdes immunosuppresseurs tels que la prednisone.

De même, les patients qui reçoivent la thérapie bloquant PD-1 sont sujets à des inflammations, en particulier des reins, des poumons et du foie, mais elles sont moins fréquentes et moins sévères qu'avec les traitements anti-CTLA-4. Heureusement, l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires ne semble pas affecter l'efficacité de ces traitements sur les tumeurs.

L'inflammation peut conduire à des problèmes plus graves. Les chercheurs ont longtemps craint que la stimulation du système immunitaire entraîne une réaction auto-immune incontrôlable contre toujours plus de tissus normaux. Toutefois, ces effets secondaires inflammatoires semblent temporaires et, une fois traités, ne réapparaissent plus.

La question qui nous occupe désormais concerne l'utilisation d'une combinaison des anticorps contre PD-1 et CTLA-4. Ces deux types d'anticorps stimulant la réponse immunitaire

contre les tumeurs *via* des voies différentes, il est légitime de penser à leur combinaison. En 2007, des expériences sur des animaux de laboratoire ayant développé un cancer du côlon et un mélanome ont montré que deux traitements associés sont plus efficaces qu'un seul. Aussi, en 2010, mon groupe, avec Mario Sznol, à l'université Yale, a mené une étude chez 53 patients atteints d'un mélanome métastatique sur l'innocuité de l'utilisation conjointe de l'ipilimumab et du nivolumab, un médicament anti-PD-1.

AVIS DE TEMPÊTE THÉRAPEUTIQUE

Les résultats, que nous avons présentés en 2013, étaient saisissants. Chez plus de 50 % des patients traités, les tumeurs avaient diminué de plus de la moitié de leur taille initiale. Ces réponses sont radicalement différentes de celles obtenues avec chaque agent seul. Les effets secondaires étaient aussi plus communs, et également contrôlables avec des corticoïdes.

Ce ne sont que des résultats préliminaires obtenus sur un petit nombre de patients, qui nécessitent d'être reproduits à plus grande échelle, mais nous menons actuellement une étude étendue de la combinaison des blocages par l'ipilimumab et le nivolumab chez plus de 900 patients atteints d'un mélanome. Les résultats préliminaires de cette vaste étude, publiés en 2015, ont confirmé l'efficacité du traitement combiné par rapport à une monothérapie. Ces premiers résultats ont conduit à l'approbation de la combinaison aux États-Unis et en Europe, mais nous attendons encore les données sur la survie à long terme des patients de l'étude.

D'autres groupes étudient cette immunothérapie combinée pour traiter le cancer du poumon, du rein, de l'estomac, du sein, des voies aérodigestives supérieures et du pancréas. L'association de cette stratégie avec des attaques directes contre les tumeurs, par chimiothérapie ou radiothérapie, pourrait aussi être plus efficace si les cellules cancéreuses meurent d'une façon qui déclenche la réponse immunitaire innée.

On créerait une «tempête» thérapeutique parfaite pour tuer les cellules cancéreuses et doper la reconnaissance des débris par le système immunitaire. Une telle combinaison devrait aussi permettre aux lymphocytes T de se forger une mémoire des cellules cancéreuses rencontrées et, à l'avenir, de maintenir une vigilance accrue contre l'apparition d'éventuelles tumeurs longtemps après l'arrêt du traitement. Reste à savoir si ce type d'immunothérapie pourrait ou devrait être combiné à d'autres en développement – tels les vaccins contre le cancer – afin d'obtenir des résultats encore meilleurs. Les rémissions à long terme, voire les guérisons, sont en tout cas désormais des issues envisageables. ■

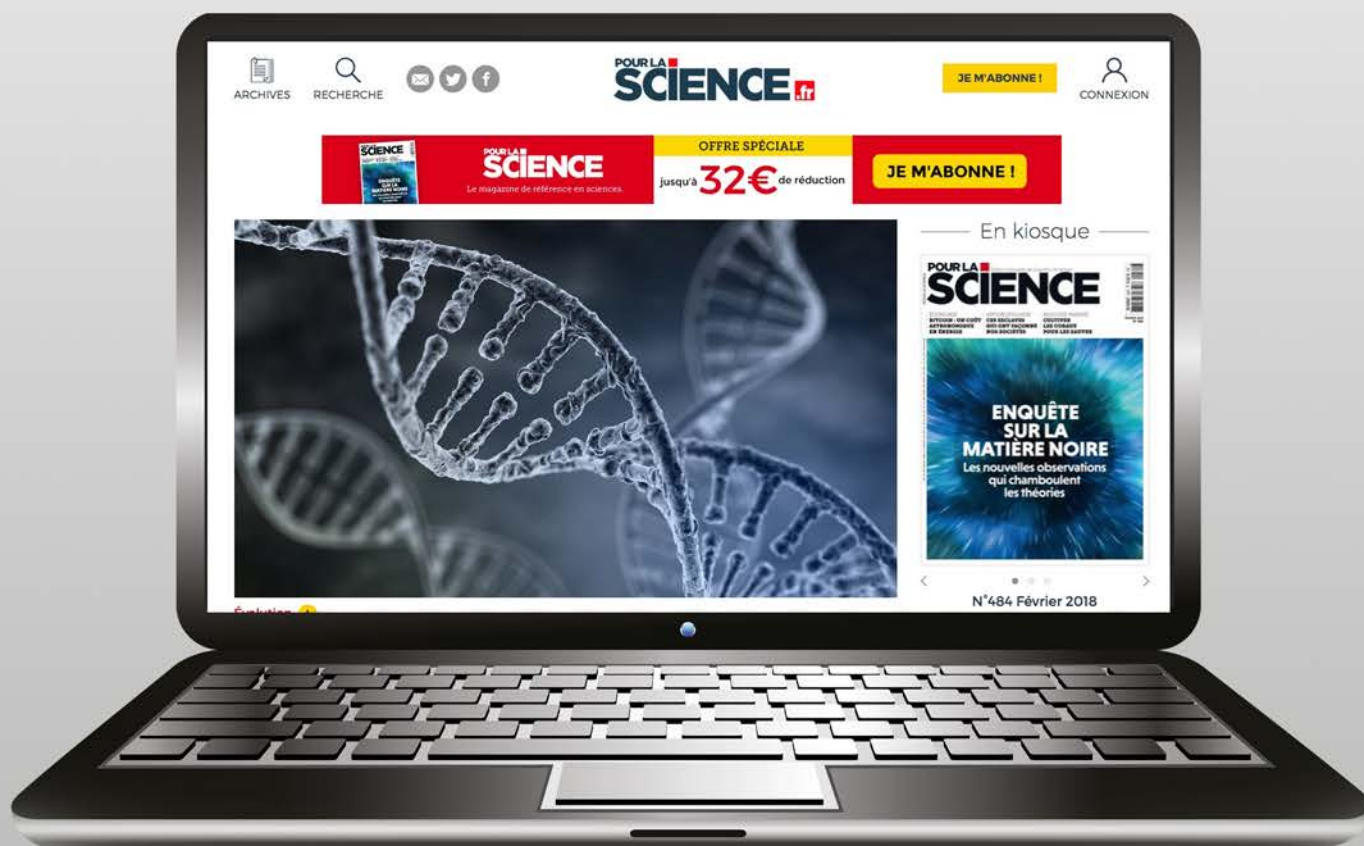
BIBLIOGRAPHIE

J. LARKIN ET AL., Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma, *The New England Journal of Medicine*, vol. 373, pp. 23-34, 2015

J. WOLCHOK ET AL., Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma, *The New England Journal of Medicine*, vol. 369, pp. 122-133, 2013.

R. SCHREIBER ET AL., Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer immunosuppression and promotion, *Science*, vol. 331, pp. 1565-1570, 2011.

Découvrez le nouveau site de **POUR LA** Édition française de Scientific American **SCIENCE**



- ◀ Un site plus lisible
- ◀ Un meilleur moteur de recherche
- ◀ Un site plus rapide
- ◀ Un site mieux sécurisé

Connectez-vous sur
www.pourlascience.fr

EMANUELA ROMANO



« Pour une meilleure efficacité, l'avenir de l'immunothérapie passera par son association avec d'autres thérapies »

Quels sont les principaux axes de recherche en immunothérapie ?

Emanuela Romano : Plusieurs voies sont explorées pour activer le système immunitaire aux différentes étapes de son intervention dans le déclenchement d'une réponse antitumorale efficace (voir *Pas de plan de paix pour le cancer*, par K. Weintraub, page 62). Ces étapes sont la cible des immunothérapies en développement, en essai clinique ou approuvées aux États-Unis et en Europe dans le traitement spécifique de diverses tumeurs solides ou liquides.

En particulier, l'étude des points de contrôle immunitaires a permis de définir de nouvelles cibles pour réguler le système immunitaire et induire une réponse antitumorale. Ces cibles sont des molécules à la surface des lymphocytes T, les cellules qui reconnaissent et détruisent les agents pathogènes ou les cellules tumorales. Elles modulent l'activité de

BIO EXPRESS

2003
Docteurat de médecine,
à l'université Sapienza, à Rome.

2011
Médecin-chercheuse
à l'hôpital universitaire
de Lausanne
et au centre Ludwig
de recherche
sur le cancer.

2015
Directrice médicale
du Centre
d'immunothérapie
de l'institut Curie,
à Paris.

ces cellules. Certaines, comme les protéines CTLA-4 ou PD-1, mais aussi d'autres telles que VISTA ou TIGIT, empêchent le système immunitaire de s'emballer et de détruire des tissus sains. D'autres, au contraire, telles les protéines OX40 et GITR, stimulent les lymphocytes T. L'idée est de concevoir, d'un côté, des anticorps qui bloquent l'action des points de contrôle inhibiteurs et, de l'autre, des molécules qui renforcent celle des points de contrôle activateurs.

Toujours dans l'idée de lever les verrous du système immunitaire, une autre stratégie à l'étude vise à bloquer des enzymes impliquées dans ce verrouillage, telle IDO, dont l'inhibition s'est révélée efficace pour empêcher les cellules tumorales d'échapper à la réponse immunitaire.

D'autres recherches se focalisent sur les modalités de l'immunothérapie : une immunothérapie sera-t-elle plus efficace associée à une chimiothérapie ? À une radiothérapie ? À d'autres immunothérapies ? De même,

faut-il plutôt donner une immunothérapie de façon systémique, dans tout l'organisme par le sang, ou cibler une seule lésion par injection afin d'obtenir une réponse locale, qui deviendra systémique ensuite *via* la circulation des lymphocytes T dans le sang? L'approche ciblée est notamment celle que l'on essaye de développer en utilisant des vaccins antitumoraux ou des virus oncolytiques.

L'immunothérapie par voie vaccinale est-elle utilisée ?

Emanuela Romano : Oui, depuis 2010, le sipuleucel-T est autorisé aux États-Unis dans le traitement de certains cancers de la prostate résistants à l'hormonothérapie. Un vaccin est aussi en essai clinique de phase III sur un mélanome en association avec le pembrolizumab, un anti-PD-1. Mais il s'agit toujours de traiter des patients à un stade avancé, métastatique, de la maladie. On ne peut pas encore dire si de tels vaccins protégeront un jour d'une récurrence après l'ablation d'une tumeur.

On a toutefois compris pourquoi les vaccins conçus il y a dix à quinze ans ne marchaient pas. On n'utilisait qu'un seul antigène, et les vaccins n'étaient alors pas assez puissants. Le système immunitaire se mettait à tolérer les cellules tumorales porteuses de l'antigène. Aujourd'hui, on a compris qu'il faut ajouter des adjuvants pour déclencher une réponse immunitaire efficace. De nouveaux adjuvants immunologiques sont aujourd'hui à l'étude.

Laisse-t-on de côté les premières voies envisagées, celles qui visent à activer le système immunitaire de façon non spécifique, *via* des cytokines ?

Emanuela Romano : L'interleukine 2, une des cytokines utilisées, est très efficace, surtout contre le cancer du rein et le mélanome, mais on l'utilise peu, en effet, à cause de la toxicité du traitement. Celle-ci est gérable, mais nécessite une équipe soignante dédiée.

Les thérapies cellulaires à base de lymphocytes T modifiés sont les plus récentes. Sont-elles prometteuses ?

Emanuela Romano : Oui, certainement. Plusieurs stratégies visent à ajouter à la surface des lymphocytes T du patient des protéines qui les aideront à reconnaître les tumeurs (voir *Des OGM tueurs de tumeurs*, par A. Posey, page 56). Mais, là aussi, le traitement nécessite des équipes spécialisées et une logistique de haute qualité, car la prise en charge de la toxicité est complexe. Avec l'immunothérapie, on joue avec le

feu. C'est une arme à double tranchant. L'idée est de déclencher une réponse de l'hôte contre la tumeur, mais la tumeur fait partie de l'hôte. Et des cellules saines portent parfois les mêmes antigènes. La réponse immunitaire activée risque donc de les atteindre, surtout si elle est puissante. On prend ce risque car, le plus souvent, la tumeur est une maladie agressive.

Arrive-t-on à cibler une tumeur, pour limiter la toxicité du traitement ?

Emanuela Romano : Non, pas encore suffisamment, car les antigènes exprimés uniquement dans les cellules tumorales sont quasi inexistantes. Pour pallier le

pistes, mais non validées, comme la protéine PD-L1, qui se lie à PD-1.

Dans un essai récent sur des patients atteints d'un cancer du poumon avancé et traités en première ligne avec du pembrolizumab, on s'est aperçu que, chez certains dont plus de 50% des cellules tumorales exprimaient PD-L1, la réponse au traitement était très bonne. Mais regarder l'expression de cette protéine est insuffisant, car des patients dont la tumeur ne l'exprimait pas ont également bien répondu.

Un autre facteur limitant est l'hétérogénéité de la tumeur: les cellules tumorales sont loin d'être toutes identiques. La solu-

« L'immunothérapie est une arme à double tranchant : on déclenche une réponse de l'hôte contre la tumeur, mais la tumeur fait partie de l'hôte »

manque de sélectivité des thérapies cellulaires, on développe des sortes d'interrupteurs qui éteindraient la réponse immunitaire en cas d'effets secondaires trop importants. Mais c'est encore exploratoire.

On essaye aussi de trouver de nouvelles cibles plus spécifiques des tumeurs, mais on a souvent de mauvaises surprises. Un lymphocyte modifié pour reconnaître un antigène que l'on croyait spécifique de la tumeur peut, par malchance, interagir avec une molécule normale de l'hôte et déclencher des complications. Une approche à l'étude pour limiter la toxicité du traitement consiste à réserver les thérapies cellulaires à des patients dont la maladie est peu disséminée. Cela permettrait d'éviter de déclencher une inflammation systémique trop importante.

Vous dites que l'on essaye de tester les associations de thérapies. Peut-on espérer une médecine propre à chaque patient ?

Emanuela Romano : On n'a pas encore assez de biomarqueurs des tumeurs – de signatures moléculaires spécifiques de telle caractéristique tumorale – pour différencier les patients. On a bien des

tion viendra, je pense, d'une approche combinatoire: la recherche de PD-L1, mais aussi de marqueurs d'autres points de contrôle ou de l'expression de certains gènes d'inflammation. En effet, des signatures de l'inflammation nous informent que l'hôte a déjà produit une réponse immunitaire contre le cancer, ce qui suggère qu'il répondra bien aux immunothérapies.

L'approche combinatoire sera aussi l'avenir de l'immunothérapie. Dans quelques cas où la tumeur est infiltrée de cellules immunitaires activables (mélanome, certains types de cancer du poumon et de la vessie...), une immunothérapie peut suffire. Mais pour une tumeur avec faible infiltrat immunitaire (cancers du sein et de l'ovaire, par exemple), il faudra lui adjoindre une chimiothérapie, radiothérapie ou autre. Nous avons lancé une étude clinique dans ce sens sur le cancer du col de l'utérus.

Et nous suivrons cette piste au sein du nouveau centre d'immunothérapie des cancers de l'institut Curie, récemment inauguré. ■

**PROPOS RECUEILLIS PAR
MARIE-NEIGE CORDONNIER**



On ne doit pas oublier
que derrière chaque cancer
se cache un être humain.

A close-up, artistic photograph of a human face, focusing on the nose and cheek area. The skin is light-toned, and the texture of the skin and hair is visible. The image is positioned on the left side of the page, partially overlapping the blue background.

ET LE PATIENT DANS TOUT ÇA ?

Le nouveau regard porté sur le cancer et la vague de traitements révolutionnaires récemment mis au point ne doivent pas faire oublier le patient et sa prise en charge. Les progrès se font aussi sur ce front-là. Ainsi, de nouvelles méthodes de dépistage se font moins invasives, et donc moins traumatisantes. Toujours en matière de dépistage, on veille désormais à éviter surtraitement et surdiagnostic quand un cancer peu évolutif est détecté. On prend aussi en compte les aspects psychologiques liés au cancer : ceux qui peuvent favoriser la survenue de la maladie, et ceux qui peuvent améliorer l'efficacité des traitements. Ces derniers sont par ailleurs toujours plus ajustés, adaptés à chaque cas.

L'ESSENTIEL

- Aujourd'hui, les biomarqueurs des cancers sont souvent des protéines que l'on détecte par des biopsies des tumeurs.
- Une nouvelle génération de biomarqueurs émerge: les cellules tumorales circulantes et l'ADN tumoral circulant.
- Très prometteurs, ils seraient détectables par une simple prise de sang.
- Le dépistage précoce des cancers, l'affinement de leur pronostic et la prédiction de l'efficacité d'un traitement deviennent envisageables.

LES AUTEURS



FRANÇOIS-CLÉMENT BIDARD
oncologue, professeur
de médecine à l'institut Curie,
à Paris, et à l'université de
Versailles-Saint-Quentin.



STÉPHANIE DESCROIX
est chargée de recherche
CNRS à l'institut Curie dans
l'unité de physicochimie
(CNRS UMR 168), à l'UPMC
et à l'institut Pierre-Gilles-
de-Gennes (IPGG-PSL).

Faire parler une goutte de sang

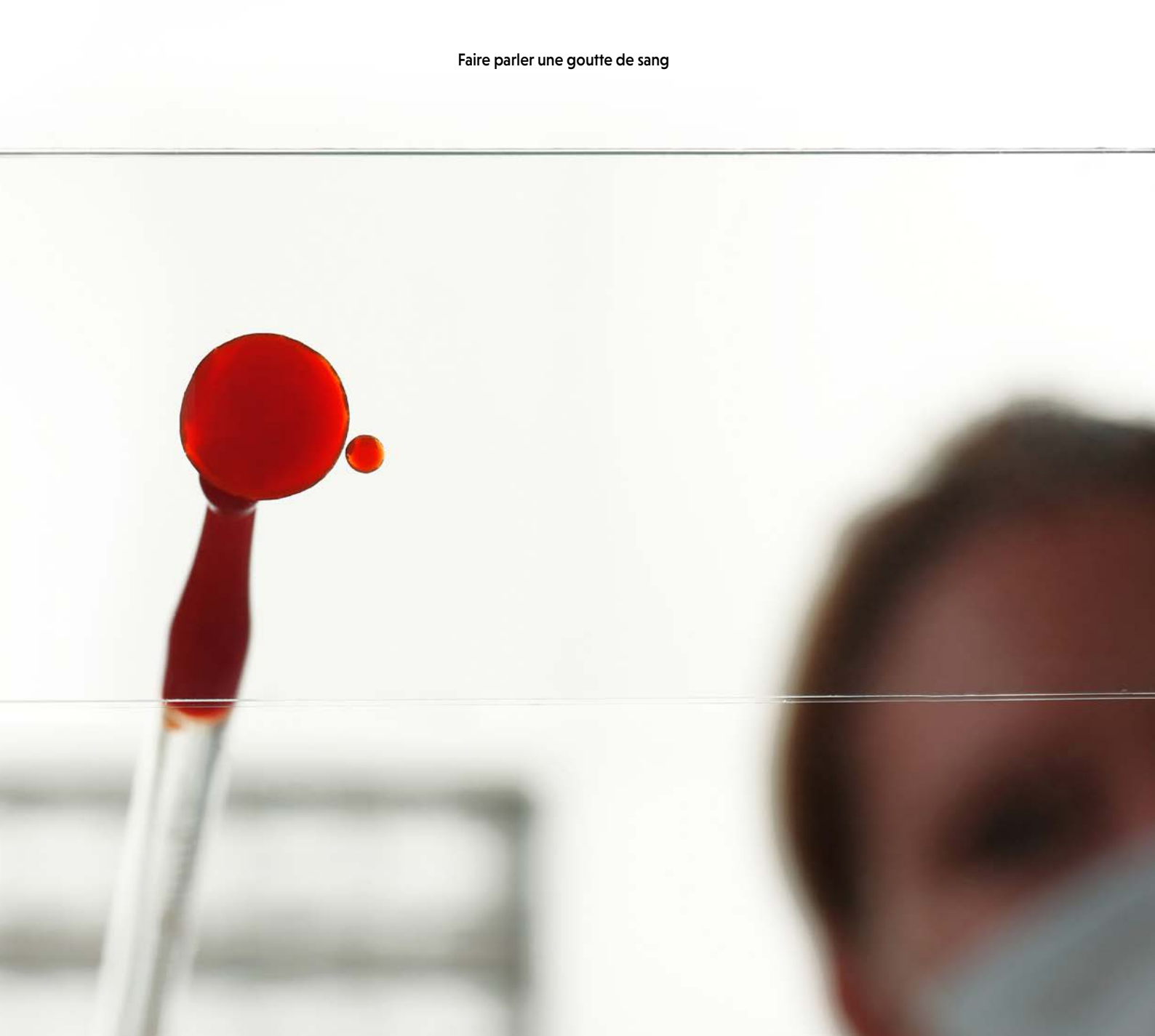
On sait désormais détecter cellules cancéreuses et ADN tumoral lors d'une simple prise de sang. On peut alors diagnostiquer plus précocement et de façon moins invasive de nombreux cancers pour, au final, mieux les traiter.

S

elon l'adage, prendre le mal à sa racine conduit à l'éradiquer plus sûrement. C'est particulièrement vrai dans le cas du cancer où détecter très tôt l'apparition de lésions cancéreuses, avant même qu'une tumeur ait commencé à se développer ou à réapparaître après un traitement, est un peu le Graal des chercheurs. Depuis les années 1950, afin de compléter, voire remplacer les biopsies

pratiquées pour détecter l'éventuelle présence de cellules cancéreuses et les caractériser, on a mis au point des dizaines de tests non invasifs visant à doser dans le sang des marqueurs tumoraux, en l'occurrence certaines protéines, pour dépister et surveiller les cancers; c'est le cas par exemple des tests qui mesurent la concentration de l'antigène prostatique, le PSA, que le cancer de la prostate peut augmenter.

Ces dernières années, la médecine semble être passée à la vitesse supérieure grâce à deux méthodes plus sensibles et précises: la détection de cellules tumorales vivantes qui circulent dans le sang après s'être détachées d'une tumeur, et celle d'ADN provenant de cellules cancéreuses mortes. Jusqu'alors, cette tâche



Une goutte de sang sera bientôt suffisante pour diagnostiquer un cancer et suivre son évolution.

était impossible, car les cellules libérées d'une tumeur éventuelle sont très rares dans le sang, de l'ordre de quelques-unes parmi les environ 50 millions de cellules à noyau (les globules blancs) présentes dans 10 millilitres de sang. Et l'ADN tumoral est tout aussi rare. Toutefois, d'importants progrès techniques, notamment en microfluidique et dans le séquençage de l'ADN, rendent possibles l'utilisation médicale de ces nouveaux marqueurs tumoraux.

DIAGNOSTIC, PRONOSTIC ET PRÉDICTION

En oncologie, le terme «biomarqueur» désigne une caractéristique biologique d'une tumeur détectable dans un organe ou dans un fluide biologique, le sang en général, mais aussi

la salive, les urines et le liquide céphalorachidien. Tout constituant moléculaire de cellules tumorales, voire les cellules entières, nommées en l'occurrence cellules tumorales circulantes (CTC), est donc un biomarqueur possible de cancer. L'intérêt d'un biomarqueur est lié d'une part à sa finalité potentielle, d'autre part à son «niveau de preuve», c'est-à-dire à une évaluation de la solidité des données le concernant, qui permet de distinguer celles qui sont établies, et utilisables en pratique, de celles qui demeurent douteuses. Quelle que soit la finalité d'un biomarqueur, son intérêt médical doit être évalué scientifiquement (*voir l'encadré page 85*).

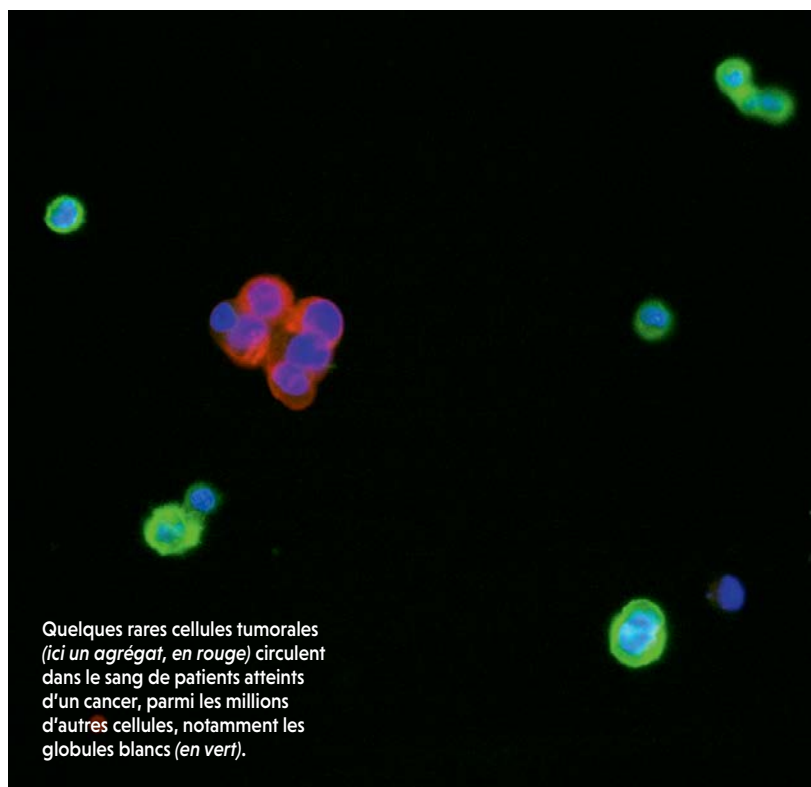
Les biomarqueurs visent trois objectifs. Certains sont utilisés comme aide au



- > **diagnostic:** il s'agit de détecter un type de cancer chez un patient ou dans une population donnée, par exemple un cancer bronchopulmonaire chez les fumeurs. D'autres aident à effectuer le pronostic de la maladie. Ils renseignent alors sur l'évolution plus ou moins agressive d'une tumeur déjà diagnostiquée: on estime par exemple, en l'absence de métastases, le risque futur de rechute ou, en présence d'un cancer incurable, sa vitesse d'évolution. De tels biomarqueurs pronostiques n'ont un intérêt que s'il existe plusieurs traitements possibles, par exemple des chimiothérapies que l'on adaptera à l'agressivité du cancer.

EN QUÊTE DES MEILLEURS BIOMARQUEURS

Enfin, les biomarqueurs les plus activement recherchés en oncologie sont ceux qui prédisent la sensibilité d'une tumeur. Ils indiquent que celle-ci a une probabilité importante d'être sensible (idéalement 100%), ou à l'inverse résistante, à un traitement donné. L'un des exemples les plus connus est l'expression de récepteurs hormonaux dans le cancer du sein: lorsque des récepteurs aux œstrogènes et des récepteurs à la progestérone sont présents à la surface des cellules tumorales, le cancer sera très vraisemblablement sensible à l'hormonothérapie, dont le tamoxifène est un médicament représentatif. En revanche, les cancers du sein dépourvus de ces récepteurs sont résistants à ce même traitement.



Des cellules tumorales échappées d'une tumeur restent parfois au repos dans un autre organe, sans proliférer

Ces dernières années, plusieurs études ont confirmé que les cellules tumorales circulantes retrouvées dans le sang et l'ADN tumoral circulant fourniraient des informations importantes pour détecter des cancers et optimiser les traitements. En d'autres termes, une simple prise de sang suffirait.

Des cellules tumorales se détachent de cancers dits solides – cancers du sein, du poumon, de la prostate, digestifs... – par opposition aux leucémies. Une tumeur émet des cellules cancéreuses, dont certaines pénètrent dans des vaisseaux sanguins. Encore vivantes, elles sont alors entraînées dans la circulation sanguine et s'arrêtent parfois dans d'autres organes, où elles conduisent à l'apparition de métastases. On distingue ces cellules tumorales circulantes des autres cellules à noyau du sang (les globules blancs) par leur plus grande taille ou par la présence à leur surface de molécules spécifiques, des antigènes de tumeur.

Les données expérimentales obtenues chez la souris montrent que la plupart meurent en quelques heures dans la circulation sanguine. Cependant, une petite fraction peut survivre dans un organe distant et y rester au repos, sans proliférer, parfois des années. À ce stade, ces cellules tumorales sont désignées sous le terme de micrométastases. Après cette étape de dormance, dont la régulation est mal connue, elles recommencent à proliférer sous l'effet de déclencheurs de nature encore indéterminée. Ce «réveil» conduit à la formation d'une métastase. Celle-ci grandit et peut former à son tour d'autres métastases qui vont à terme compromettre la fonction des organes où elles croissent et entraîner le décès.

Et l'ADN tumoral circulant? Il provient aussi des masses tumorales solides. En revanche, il est largué dans le sang par un mécanisme biologique très différent: la mort

de cellules cancéreuses. Cette mort est spontanée, du fait par exemple de l'insuffisance d'apport en oxygène ou en nutriments, ou elle se produit sous l'action de la chimiothérapie ou de la radiothérapie. L'ADN des cellules qui meurent est très fragmenté et reste intact dans le sang une heure environ avant d'être dégradé. Les fragments sont des « déchets » et n'exercent aucun rôle biologique connu à ce jour. Cependant, ils ont un intérêt majeur : ils portent la signature génétique des cellules cancéreuses dont ils proviennent.

Compte tenu de leur faible quantité dans le sang, les cellules tumorales circulantes et l'ADN tumoral circulant ne sont devenus des biomarqueurs potentiels que depuis quelques années grâce à des progrès techniques qui ont fortement accru la sensibilité et la spécificité de leur détection dans le sang. C'est le cas notamment des techniques microfluidiques (voir l'encadré page suivante).

Les quantités de cellules tumorales circulantes et d'ADN tumoral circulant détectables sont toutes deux liées au volume de la tumeur. Néanmoins, elles ne reflètent pas forcément des tumeurs au même stade. La dissémination de cellules tumorales circulantes dans le sang n'intervient que si la tumeur initiale s'est suffisamment développée. Les cellules circulantes deviennent donc plus nombreuses avec le développement de la tumeur, à l'approche d'un processus métastatique. En d'autres termes, plus ces cellules sont nombreuses à être détectées, plus la présence de métastases est probable. En revanche, la quantité d'ADN tumoral circulant dérive des mécanismes de mort cellulaire dans la tumeur, qui se produisent assez vite lorsque celle-ci se développe. Elle peut donc caractériser la présence d'une tumeur primitive.

SE PASSER DES BIOPSIES ?

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

Les biopsies sont des examens de routine, mais ont de nombreux inconvénients : coûteuses pour le système de santé, éventuellement douloureuses, elles entraînent dans de très rares cas des complications graves, par exemple des saignements liés au passage de l'aiguille de ponction. Les biopsies demandent par ailleurs du personnel médical entraîné et doivent parfois être réalisées à l'hôpital.

Dans ce contexte, on pourrait imaginer de les remplacer par la recherche de cellules tumorales circulantes ou des mutations génétiques caractéristiques d'un cancer dans l'ADN circulant, sur simple prise de sang. En cas de détection de mutations caractéristiques d'un cancer du pancréas, par exemple, il ne serait plus nécessaire de réaliser la biopsie d'une masse pancréatique suspecte pour poser le diagnostic.

Peu d'études ont été réalisées dans ce sens sur les cellules tumorales circulantes, et la plupart sont revenues négatives. Une exception, cependant, a été observée par l'équipe de Paul Hofman au CHU de Nice, en 2014. Ces chercheurs ont utilisé une technique de filtration du sang qui permet de ne retenir que les plus grosses cellules, dont font partie les cellules tumorales circulantes – une technique différente de celles précédemment utilisées, qui reposaient sur des propriétés biologiques, notamment l'exposition sur la membrane de protéines particulières. Résultat : dans le sang de cinq patients parmi 245 personnes présentant le risque de

UN BON BIOMARQUEUR

Selon la médecine fondée sur les faits (*evidence-based medicine*), l'intérêt médical d'un biomarqueur est évalué en analysant trois critères successifs : sa validité analytique, sa validité clinique et son utilité clinique. Le développement d'un biomarqueur jusqu'à son emploi en médecine requiert de ce fait plusieurs années. La validité analytique correspond à la fiabilité de la mesure : la technique de détection du biomarqueur doit fournir le même résultat avec une faible marge d'erreur, si un même échantillon est analysé plusieurs fois au sein d'un même laboratoire ou dans différents laboratoires. La validité clinique évalue la qualité de l'association entre le biomarqueur et ce qu'il est censé indiquer. On étudie par exemple sur de vastes cohortes de patients sa capacité à distinguer les patients qui resteront indemnes de toute rechute de ceux qui subiront une évolution métastatique de leur tumeur au cours des années suivant le traitement initial. Il est alors souhaitable de démontrer que l'association observée est supérieure (ou complémentaire) à celle issue des critères habituellement utilisés pour décider du traitement.

L'utilité clinique est l'intérêt médical réel du biomarqueur. Sa démonstration reste l'étape la plus difficile à franchir pour que l'on décide de s'en servir à l'hôpital. Il s'agit de montrer que, lorsque le biomarqueur est pris en compte, la prise en charge médicale est améliorée : moins de rechutes métastatiques, moins d'argent dépensé, une meilleure qualité de vie, etc. De nombreux biomarqueurs cliniquement validés n'ont pas d'utilité médicale démontrée. Les tests correspondants ne sont donc pas remboursés par les systèmes de santé. Lors des démonstrations de la validité et de l'utilité cliniques, l'objectivité et la solidité des données sont évaluées selon des échelles de niveaux de preuve. Les études rétrospectives de quelques cas sélectionnés correspondent au plus mauvais niveau de preuve (niveau 5). À l'inverse, les études prospectives internationales reposant sur des centaines de patients, et comparant les stratégies thérapeutiques avec et sans biomarqueur, constituent le meilleur niveau de preuve d'utilité clinique (niveau 1).

LABORATOIRE SUR PUCE ET CANCÉROLOGIE

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

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

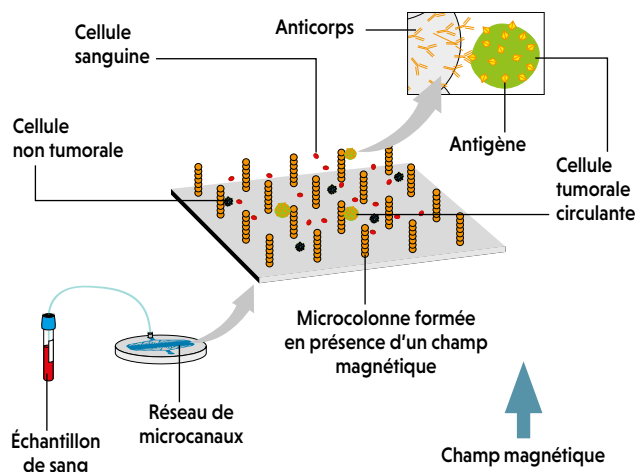
fonction de leur taille ou grâce à des antigènes présents à leur surface. Ainsi, grâce au dispositif microfluidique Ephesia (ci-dessous), développé dans les années 2000 et validé cliniquement par l'équipe de Jean-Louis Viovy à l'institut Curie et à l'IPGG, il est possible de capturer très efficacement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

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

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

LE SYSTÈME MICROFLUIDIQUE EPHESIA

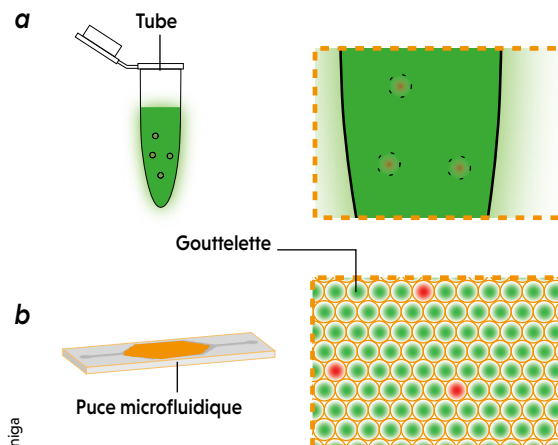
Le nom donné à cette technologie vient du temple d'Artémis à Éphèse, dont les colonnes ont été la proie de nombreuses destructions suivies de reconstructions. Dans ce dispositif, des microbilles magnétiques (*en orange*) portent un anticorps spécifique dirigé contre une protéine de surface propre aux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



V. Taniga

LA PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES

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



V. Taniga

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

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

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

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

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

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

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

DANS L'ATTENTE DES RÉSULTATS

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

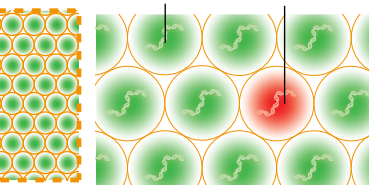
L'impact pronostique de l'ADN tumoral circulant est un peu plus complexe à appréhender. En l'absence de masse tumorale visible, par exemple après qu'un cancer du sein a été opéré, sa détection signalerait la persistance de cellules cancéreuses résiduelles dans l'organisme, dont certaines meurent et libèrent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

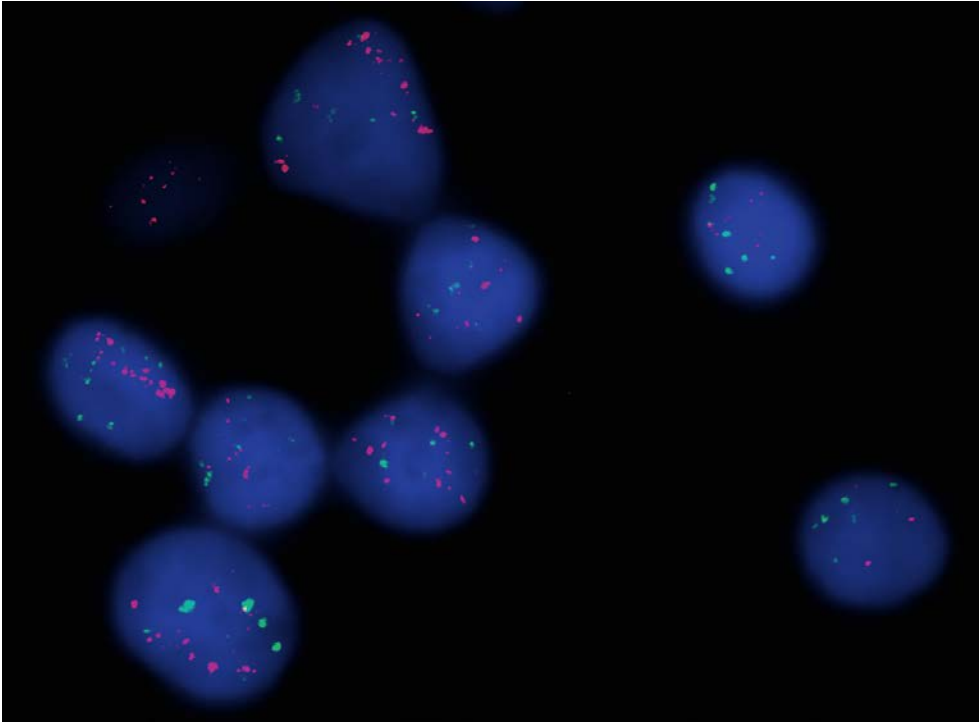
encapsulation se fait grâce à une puce microfluidique dédiée qui permet de former des gouttelettes d'eau dans l'huile. Après amplification par PCR, chaque gouttelette contient donc un grand nombre de copies soit d'ADN normal, soit d'ADN muté. Cette technique est dite digitale, car les gouttelettes n'ont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

Toutes les molécules d'ADN sont amplifiées ensemble.

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

ADN normal ADN tumoral





L'analyse des anomalies génétiques des cellules tumorales circulantes renseigne sur les thérapies à privilégier. Ici, chaque gène d'intérêt marqué se traduit par un point coloré au sein du noyau (en bleu). Dans une cellule non tumorale, le nombre de copies du gène est normal (deux copies par cellules, soit deux points de la même couleur). En revanche, dans une cellule tumorale circulante, le nombre de copies d'un gène (ici *HER2*, points rouges) peut considérablement augmenter, signe qu'une thérapie ciblée (en l'occurrence le trastuzumab) contre le gène perturbé pourrait être efficace.

➤ cellules tumorales disséminées parmi les innombrables cellules saines du corps. Néanmoins, cette piste reste prometteuse.

À l'inverse, en présence de métastases, la détection d'ADN tumoral circulant n'est pas forcément associée à une évolution défavorable : en effet, la quantité d'ADN tumoral circulant est en grande partie liée à la mort des cellules tumorales, qui influe peu sur le devenir des patients (elle peut même être le signe d'une diminution de la masse tumorale).

La dernière piste d'utilisation des cellules tumorales circulantes et de l'ADN tumoral circulant est la prédiction de l'efficacité d'une thérapie. Il s'agit de faire coïncider celle-ci avec un biomarqueur qui indique une sensibilité particulière à un traitement donné. Certains médicaments ne sont en effet efficaces qu'en présence de mutations génétiques spécifiques : par exemple, le trastuzumab (Herceptin), un anticorps monoclonal, stoppe la prolifération des cellules cancéreuses du sein seulement si elles sont porteuses d'anomalies dans le gène *HER2*, qui code un facteur de croissance.

L'ATTAQUE DES CLONES

Actuellement, on détermine la présence de mutations dans les cellules tumorales en effectuant une analyse génétique des cellules prélevées par biopsie. Mais l'ADN tumoral circulant, qui correspond à des fragments d'ADN de cellules tumorales, reflète très bien les anomalies génétiques d'un cancer donné. L'utilisation de l'ADN tumoral circulant pour

la recherche de mutations ayant un intérêt thérapeutique est d'ores et déjà autorisée depuis quelques années par les autorités de santé européennes, mais uniquement chez les patients ayant un cancer du poumon métastatique ; cette autorisation devrait progressivement s'étendre à d'autres types de cancers à mesure que les résultats d'études seront connus.

La facilité de réalisation d'une prise de sang (par rapport à une biopsie profonde à l'aiguille) permet enfin d'ouvrir une toute nouvelle dimension dans la prise en charge des cancers, à savoir la détection – par des prises de sang répétées régulièrement – de l'apparition progressive de cellules résistantes au traitement entrepris. On peut par exemple détecter par prise de sang qu'un sous-groupe de cellules tumorales (on parle de sous-clone) résistant au traitement est en croissance, et ce des mois avant que des métastases ne se mettent à augmenter de taille. Une question se pose donc : modifier le traitement dès la détection dans le sang d'une résistance sera-t-il plus efficace que d'attendre, pour modifier le traitement, que les métastases aient effectivement grossi ? Deux grands essais cliniques, l'un européen (l'essai APPLE, dans le cancer du poumon métastatique), l'autre français (essai PADA-1, dans le cancer du sein métastatique) tentent actuellement de répondre à cette question. Les résultats de ces essais, qui sont les deux premières tentatives de gagner « la guerre des clones » contre le cancer, seront connus en 2020. ■

BIBLIOGRAPHIE

F. C. BIDARD ET AL., Circulating tumor cells in breast cancer, *Molecular Oncology*, vol. 10, pp. 418-430, 2016

J. AUTEBERT ET AL., High purity microfluidic sorting and analysis of circulating tumor cells: towards routine mutation detection, *Lab Chip*, vol. 15, pp. 2090-2101, 2015

M. ILIE ET AL., «Sentinel» circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *PLoS One*, vol. 9, e111597, 2014

C. ALIX-PANABIÈRES ET K. PANTEL, Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer, *Clin. Chem.*, vol. 59, n°1, pp. 110-118, 2013

F. C. BIDARD ET AL., Going with the flow: from circulating tumor cells to DNA, *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, n°207, pp. 207ps14, 2013.

Tous les papiers se recyclent,
alors trions-les tous.

**C'est aussi
simple à faire
qu'à lire.**

La presse écrite s'engage pour le recyclage
des papiers avec Ecofolio.

