

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, il arrive qu'une petite fraction survive dans un organe distant et y reste 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 nouvelle tumeur dans un organe distant du site initial – 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 du patient.

En quête de mutations caractéristiques

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 tumoraux 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 48).

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. Alors seulement les cellules circulantes deviennent 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

LES AUTEURS



François-Clément BIDARD est médecin-chercheur dans le département d'oncologie médicale associé au Site de recherche intégrée sur le cancer (SiRIC) de l'institut Curie, à Paris.

Stéphanie DESCROIX est chargée de recherche CNRS à l'institut Curie dans l'unité de physicochimie (CNRS UMR 168), à l'université Pierre-et-Marie-Curie et à l'institut Pierre-Gilles-de-Gennes (IPGG), au sein de Paris Sciences et Lettres (PSL).

Valider un 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 rechute métastatique, 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).

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

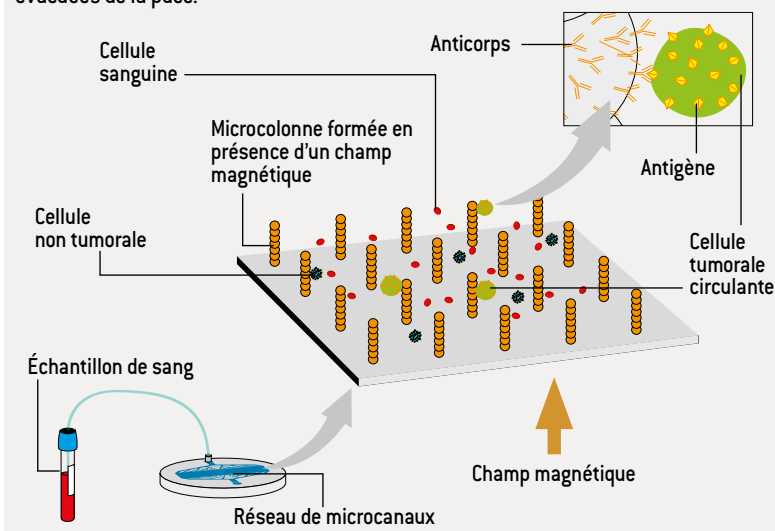
Depuis plusieurs années, la microfluidique a montré tout son potentiel dans la détection des cellules tumorales circulantes, en particulier grâce à des puces capables de trier les événements rares que représentent de telles cellules au sein de la multitude d'éléments non spécifiques que sont les globules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

de leur taille ou grâce à des antigènes présents à leur surface.

Ainsi, grâce au dispositif microfluidique Ephesia (voir la figure ci-dessous), développé dans les années 2000 et validé cliniquement par l'équipe de Jean-Louis Viovy à l'institut Curie et à l'IPGG, il est possible de capturer très efficacement les cellules tumorales contenues dans le sang de patients atteints de cancers métastatiques. On recherche ensuite sur ces cellules des anomalies génétiques prédictives de l'efficacité des traitements. L'ensemble de ces étapes est réalisé dans une

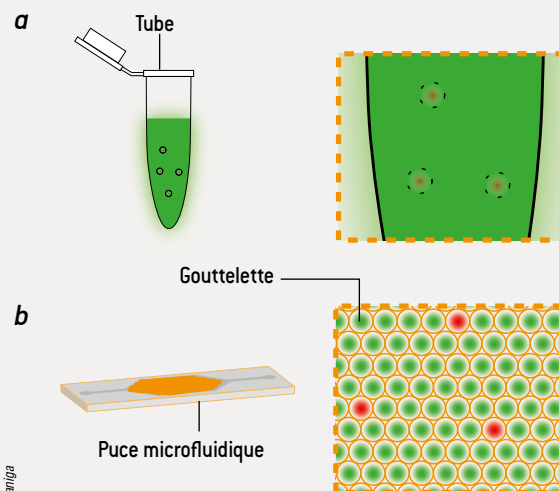
LE SYSTÈME MICROFLUIDIQUE EPHESIA

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



LA PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES

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



puce microfluidique grande comme une carte de crédit.

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

L'ADN contenu dans chaque gouttelette est alors amplifié par PCR (réaction en chaîne par polymérase), une technique de biologie moléculaire qui duplique en grand nombre une séquence d'ADN. Ainsi amplifié, l'ADN devient détectable. Cet ADN est soit normal soit muté, résultat que l'on peut « coder » en 0 ou 1, d'où l'appellation de microfluidique « digitale » (à deux solutions).