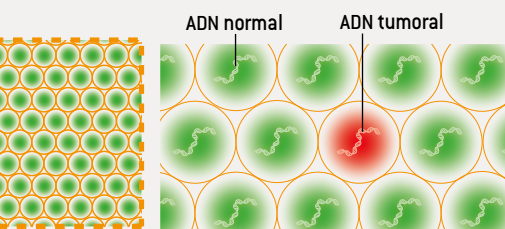


0 ou 1 molécule par gouttelette selon la distribution statistique de Poisson. Cette encapsulation se fait grâce à une puce microfluidique dédiée qui permet de former des gouttelettes d'eau dans l'huile. Après amplification par PCR, chaque gouttelette contient donc un grand nombre de copies soit d'ADN normal, soit d'ADN muté. Cette technique est dite digitale, car les gouttelettes n'ont finalement que deux types de fluorescence possible, correspondant au statut muté ou non de la molécule d'ADN initialement introduite dans la gouttelette.

Toutes les molécules d'ADN sont amplifiées ensemble.

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



Avec cette approche, des événements rares tels que la présence d'ADN tumoral circulant ne sont plus dilués dans le bruit de fond de l'ADN normal, comme ce serait le cas dans une analyse classique. Ils deviennent détectables. Il est alors possible de réaliser dans ces gouttelettes toutes les étapes classiques de l'analyse de mutations.

Par ce processus de digitalisation, l'équipe de Pierre Laurent-Puig, de l'unité Inserm UMR-S775 et de l'hôpital européen Georges Pompidou, a démontré en 2013 qu'une seule copie mutée du gène KRAS (impliqué dans le cancer du côlon) était détectable parmi 200 000 copies non mutées du même gène. Ainsi, la microfluidique de gouttes combine les avantages de la digitalisation, de la miniaturisation et du haut débit pour l'analyse de l'ADN tumoral circulant.

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

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

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

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

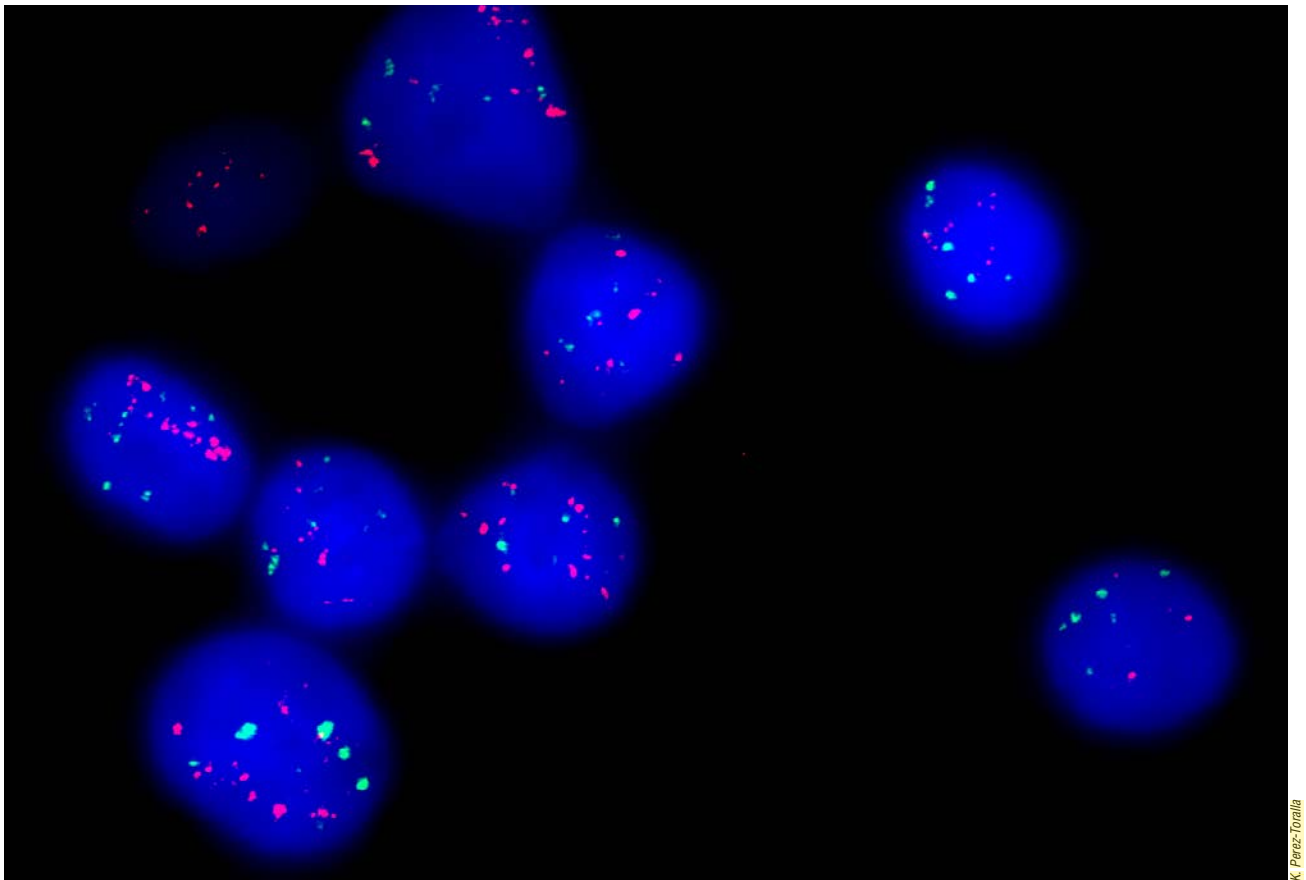
de cellules tumorales pour dépister une tumeur initiale chez des patients dont le risque est avéré. Fin 2015, Paul Hofman a lancé une nouvelle étude avec la même technique, le projet Air, cette fois-ci sur 600 personnes à risque. Les résultats sont attendus pour 2019.

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

Les cellules tumorales circulantes : un intérêt pronostique majeur

Pour une utilisation dans la population générale, sans antécédent de cancer, ce type d'application diagnostique nécessite des techniques de détection extrêmement sensibles – pour ne pas rassurer faussement un patient vraiment porteur d'un cancer (faux négatif) – et spécifiques – pour ne pas diagnostiquer un cancer chez un sujet en réalité indemne (faux positif). De telles sensibilités et spécificités ne sont pas encore atteintes, mais pourraient l'être dans les années à venir avec les améliorations continues des techniques de séquençage.

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



K. Perez-Toralla

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

L'ANALYSE DES ANOMALIES GÉNÉTIQUES des cellules tumorales circulantes fournit une indication sur les thérapies à privilégier. Dans l'analyse ci-dessus, via la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), 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.

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.

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 cuisant. Les résultats d'autres essais sont donc attendus avec

impatience: 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 signifierait 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 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).

Repérer les mutations pour mieux cibler les thérapies

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. Actuellement, on détermine la présence de mutations dans les cellules tumorales en effectuant une analyse génétique des cellules prélevées par biopsie des tumeurs. 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. Dans une étude que nous avons menée à l'institut Curie en 2015, les mutations retrouvées par biopsie chez une quarantaine de patients étaient quasiment identiques à celles retrouvées dans l'ADN tumoral circulant détecté lors d'une simple prise de sang. Ainsi, l'ADN tumoral circulant devrait remplacer dans un avenir proche la biopsie pour déterminer les mutations tumorales ayant un intérêt thérapeutique.

À l'inverse, l'utilisation prédictive des cellules tumorales circulantes, qui comportent dans leur noyau de l'ADN tumoral, reste limitée du fait de leur faible nombre chez certains patients. Leur intérêt semble

donc restreint aux composants ou aux anomalies génétiques, par ailleurs difficilement détectables dans le sang, telles que les changements du nombre de copies d'ADN ou les anomalies de l'ARN tumoral. Par exemple, selon une étude de 2014 de l'équipe de Jun Luo, de l'université Johns Hopkins à Baltimore, certaines formes d'ARN dans les cellules tumorales circulantes seraient associées à une résistance à l'hormonothérapie des cancers de la prostate. Là encore, cette étude préliminaire, sur quelques dizaines de patients, requiert d'être reproduite indépendamment dans de plus larges cohortes de patients pour être validée.

Malgré ces réserves, nous n'avons jamais été aussi proches de l'utilisation en routine de la « biopsie liquide » pour lutter contre les cancers. Déjà, fin 2014, une première autorisation a été donnée en Europe pour détecter des mutations d'un gène d'intérêt (*EGFR*) dans l'ADN tumoral circulant par prise de sang chez les patients atteints de cancer bronchique et dont la tumeur est inaccessible à une biopsie tumorale classique (solide). D'autres applications sont par ailleurs en cours d'exploration, telles que la détection de cancers de la bouche ou de l'oropharynx *via* des tests de détection d'ADN tumoral non plus sanguins, mais salivaires.

Outre ces aspects d'analyse, la microfluidique et la médecine s'attellent aujourd'hui à reproduire dans ces systèmes de puces microfluidiques des « organes miniaturisés » – des organes sur puce. Il s'agit de reproduire *in vitro* sur ce format de carte de crédit les fonctionnalités d'organes *in vivo*. Ce domaine soulève de nombreux espoirs, notamment pour une meilleure compréhension de mécanismes pathologiques tels ceux à l'œuvre dans le développement du cancer, mais aussi pour le criblage d'agents thérapeutiques sur ces modèles biomimétiques, qui permettent alors d'éviter l'expérimentation animale. La révolution microfluidique est en marche ! ■

La biopsie liquide

pourrait être utile
chez les patients ayant
un antécédent
de cancer
susceptible de récidiver

■ 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, n° 10, 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.



L'ESSENTIEL

- Une exoplanète géante semble entourée d'un système d'anneaux 200 fois plus étendu que celui de Saturne.
- Les modélisations suggèrent la présence d'un satellite de la taille de Mars au cœur même des anneaux. Ce serait la première lune à être détectée en dehors du Système solaire.
- Au moyen d'observations quotidiennes et des données d'archives, astronomes professionnels et amateurs collaborent pour étudier ce système plus en détail.

Ron Miller

UN AIR DE SATURNE. Autour d'une étoile distante de 400 années-lumière, une planète géante arbore un système d'anneaux qui serait 200 fois plus étendu que celui de Saturne. Sur cette vue d'artiste, le premier plan est occupé par une lune, grande comme Mars, nichée dans les anneaux de la planète que l'on distingue au centre de l'image. L'étoile brille sur la gauche.