

**Université de Poitiers
Faculté de Médecine et Pharmacie**

Année : 2019

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(décret du 16 janvier 2004)**

présentée et soutenue publiquement
le 31 Octobre 2019 à Poitiers
par **Olivier JOUVE**

Revue narrative de la littérature sur les biopsies liquides.

Composition du Jury

Présidente : Professeure Karayan - Tapon Lucie

Membres :

Docteur Le Bonheur Lakshmipriya

Docteur Archambault Pierrick Maître de conférence associé de Médecine Générale

Docteur Freche Bernard Professeur associé de Médecine Générale

Directeur de thèse : Docteur Freche Bernard

Année : 2019

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 31 Octobre 2019 à Poitiers
par Olivier JOUVE

Revue narrative de la littérature sur les biopsies liquides.

Composition du Jury

Présidente : Professeure Karayan - Tapon Lucie

Membres :

Docteur Le Bonheur Lakshmiprya

Docteur Archambault Pierrick Maître de conférence associé de Médecine Générale

Docteur Freche Bernard Professeur associé de Médecine Générale

Directeur de thèse : Docteur Freche Bernard

Le Doyen,

Année universitaire 2018 - 2019

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie (**retraite 09/2019**)
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUJOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale (**retraite 09/2019**)
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, Informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHEIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie

- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie (**retraite 09/2019**)
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (**en détachement**)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- COUDROY Rémy, réanimation (**en mission 1 an**)
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie (**en mission 1 an**)
- JAVAUGUE Vincent, néphrologie
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PALAZZO Paola, neurologie (**pas avant janvier 2019**)
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- GAY Julie, professeur agrégé

Professeurs émérites

- DORE Bertrand, urologie (08/2020)
- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2019)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (24/11/2020)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (08/2021)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2020)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2021)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier la **Professeure Karayan-Tapon** de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Soyez assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie également mon directeur de thèse le **Professeur Freche** qui a aimablement accepté ma proposition de sujet et qui a su me conseiller malgré la distance. Soyez assuré de mon profond respect.

Je tenais aussi à gratifier les autres membres de mon jury :

Le **Docteur Le Bonheur** pour sa thèse inspirante mais aussi pour avoir accepté de faire partie de mon jury aujourd'hui.

Le **Docteur Archambault** pour votre présence que je remercie chaleureusement.

Merci à vous quatre car je sais que votre temps est précieux et merci de m'en accorder pour cette occasion si spéciale pour moi.

Merci à **mes parents** qui me soutiennent depuis toujours, c'est grâce à vous que je suis ici aujourd'hui. Merci de tout mon cœur. Merci aussi à **mon frère** et à **ma sœur** qui m'ont montré l'exemple dans leurs vies familiale et professionnelle.

J'espère vous rendre tous fiers aujourd'hui.

Merci bien évidemment à toute **ma famille** et tout particulièrement à ma tante et à mes grands parents qui m'ont toujours prodigué des encouragements sincères et chaleureux. A **mes neveux et nièces** qui me gâtent de câlins et d'amour.

Merci à **ma belle famille** qui m'a également soutenu, qui a toujours été de bons conseils et avec qui je partage toujours de bons moments.

Merci à tous **mes amis**, ce lien d'amitié créé aux cours des différentes étapes de ma vie (primaire, collège, lycée, faculté, internat) est quelque chose qui m'habite quotidiennement et pour lequel j'espère être à la hauteur dans la réciprocité. On a vécu tant de choses, que se soit les bons mais aussi les mauvais moments. Peut importe, ils nous ont construit ensemble, et je sais que l'on va encore en vivre de nombreux. J'espère sincèrement vieillir avec vous tous que vous soyez dans ma vie depuis trente, vingt ou dix ans.

Merci à tous **les collègues**, toutes professions confondues, que j'ai croisé pendant mon externat et mon internat auprès desquels j'ai appris et reçu de précieux conseils. Merci particulièrement aux Dr Guillet, Dr Nau et Dr Vignaud pour leurs encadrements lors de mon stage ambulatoire de niveau 1 ainsi qu'aux Dr Tilly, Dr Lecerf et Dr Zaccheo pour leurs recommandations et remarques nécessaires et utiles lors de mon SASPAS. Sans oublier les équipes des services de Gynécologie Obstétrique et de Cardiologie du CH de Niort, celles des Urgences du CH de La Rochelle et celles d'UHA du CHU de Poitiers.

Merci aussi à mes futurs collègues de la **MSP de Cormery**. Merci de m'avoir fait confiance pour les remplacements mais aussi pour votre énergie, votre bienveillance et votre jovialité quotidienne.

Sans oublier les relecteurs Isabelle, Sylvain, Géraldine, Julien, Marion et Maman. Merci de votre temps et vos précieux conseils.

Enfin et par dessus tout, merci à toi **Géraldine** que j'aime de tout mon cœur. Toutes ces étapes tu les a vécu avec moi. Tu m'as soutenu, sans faille. Tu remplis mon quotidien d'amour et de bonheur. Hâte de poursuivre notre quotidien et de continuer la réalisation de nos projets. Je t'aime.

PLAN DE LA THESE

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

REMERCIEMENTS

<u>1/ INTRODUCTION</u>	p.8
<u>2/ METHODE</u>	p.14
<u>3/ RESULTATS</u>	p.15
• Fonctionnement des biopsies liquides :	p.15
a- Les Cellules Tumorales Circulantes	p.16
b- L' ADN tumoral circulant	p.22
c- Les nouvelles technologies	p.28
d- Les autres biomarqueurs	p.34
e- Le test CancerSEEK	p.41
• Intérêt en médecine générale.	p.45
<u>4/ DISCUSSION</u>	p.53
<u>5/ CONCLUSION</u>	p.56
<u>6/ BIBLIOGRAPHIE</u>	p.57
<u>7/GLOSSAIRE</u>	p.64
<u>8/ ANNEXES</u>	p.65
<u>RESUME</u>	p.75
<u>SERMENT D'HIPPOCRATE</u>	

1/ INTRODUCTION

Le cancer est une des premières causes mondiales de mortalité de nos jours, le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) appuyé sur la base de données GLOBOCAN - créée en 2012 pour observer l'évolution de cette maladie dans le monde - comportant près de 185 pays et 36 types de cancer, chapeauté par le Centre International de Recherche sur le Cancer évoque le cancer comme « un fardeau » (1).

En effet, les chiffres prévisionnels mondiaux de 2018 font écho de 18,1 millions de nouveaux cas dans le monde et de 9,6 millions de décès liés aux cancers et dresse le constat d'une progression « rapide » de la maladie. Un homme sur cinq et une femme sur six développeront ainsi un cancer au cours de leur vie ; et un homme sur huit et une femme sur onze mourront de celui-ci. En 2012 (date de la précédente évaluation de la mortalité mondiale) , la « charge du cancer » ne représentait « que » 14,1 millions de nouveaux cas dans le monde et 8,2 millions de décès. Ce phénomène touche toute la population mondiale de par le vieillissement de celle-ci. Toujours d'après cette étude, bien qu'elle ne représente que 9 % de la population mondiale, l'Europe pourrait compter pour quasiment un quart (23%) dans la détection de nouveaux cas de cancer dans le monde en 2018 et un cinquième des décès. Région la plus peuplée du monde (60 % de la population), l'Asie pourrait compter 48,4 % des nouveaux cas pour 2018 et 57,3 % des décès. Notamment du fait que les cancers avec des taux de mortalité plus élevés sont plus nombreux et aussi de part les difficultés de l'accès au diagnostic et à certains traitements dans plusieurs pays. Les Amériques, avec 13,3 % de la population mondiale, pourraient compter pour 21 % des nouveaux cas et 14,4 % des décès. L'Afrique quant à elle représenterait 5,8 % des nouveaux cas et 7,3 % des décès.

Une étude française (2) similaire a été réalisé par l'Institut National du Cancer (INCa) en 2017 évoquant 400 000 nouveaux cas (215 000 hommes et 185 000 femmes) et 150 000 décès (84 000 hommes et 66 000 femmes). L'INCa s'est basé pour ces prévisions sur une stabilisation du taux d'incidence standardisé chez l'homme et une augmentation de ce taux chez la femme. Ils ont également pris en compte le vieillissement de la population.

Et qu'en est - il du lien entre médecine générale et cancer ?

En médecine générale les consultations autour du cancer sont nombreuses. Notamment lorsque que sont évoqués ne serait ce que les antécédents du patient, ou lors des renouvellements, nous en profitons pour faire le point sur les dépistages et/ou sur les facteurs associés/responsables des cancers via les habitus (tabac, alcool entre autres). Mais pas uniquement, en 2016, le Dr Certain et le Professeur Frèche présentaient dans un texte du Collège de Médecine Générale (CMG) (3) un lien nouveau entre généraliste et cancer : « jusqu'à ce jour les membres des institutions nationales et les spécialistes du cancer avaient tendance à cantonner le rôle de la Médecine Générale aux phases de prévention, de dépistage, de diagnostic et aux soins palliatifs. L'augmentation des cas de cancer, l'arrivée des chimiothérapies per os, des thérapies ciblées, mais aussi la volonté d'un virage ambulatoire dans les prises en charges des patients bousculent les dogmes établis. Le partenariat entre le CMG et l'INCa, établi depuis un an (soit depuis 2015), l'entrée d'un membre du comité d'administration du CMG au sein de celui de l'INCa sont des éléments contextuels témoins d'un changement de paradigme dans la prise en charge conjointe des patients atteints de cancer. Il n'est pas question que la médecine générale se substitue aux spécialistes du cancer mais elle peut agir de manière complémentaire et spécifique. Pour cela le transfert d'information entre les spécialités liées au cancer et la Médecine Générale doit nécessairement être amélioré. Rapidité et fluidité de l'information (extension et gravité du cancer ; situations des soins reçus et délivrés ; efficacité des traitements ; effets secondaires des traitements ; pronostic de l'atteinte ; plan de suivi à moyen et à long terme) sont indispensables.»

Un autre impondérable allant dans ce sens est la formation médicale continue pour être le plus à jour possible avec pour finalité de donner les informations et les explications les plus claires, complètes et actualisées possibles à nos patients. Dans ce nouveau contexte, le médecin généraliste devient un acteur du processus et (se) doit (d')être formé.

Nominée en 2015 parmi les 10 plus grandes avancées technologiques de l'année dans le monde par le Massachusetts Institutes of Technology (4), le

MIT à Boston, suivi en 2016 par le journal américain Forbes (5) la listant parmi les 5 technologies révolutionnant la prise en charge médicale d'ici à 2020. Les biopsies liquides commencent à percer dans les mondes scientifique et médical. Aujourd'hui une avancée technologique est aussi une avancée économique pour les entreprises qui se lancent dans ce secteur de recherche, notamment en Chine ou aux États Unis. En 2015 un article du Wall Street Journal (6), écrit par E.Topol professeur de Génomique à San Diego, fait une comparaison entre la biopsie liquide et le stéthoscope des 200 prochaines années. En 2016, Goldman Sachs évaluait le marché de la biopsie liquide à 14 milliards de dollars par an pour les 4 prochaines années et précise que ce n'est que le début de ce marché florissant (7).

Indépendamment des spéculations économiques, les biopsies liquides c'est déjà aujourd'hui. Enfin même hier, en effet, en 2008 la FDA (Food and Drug Administration) équivalent américain de notre ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament) avait d'ores et déjà approuvé l'utilisation d'un test (8), le CellSEARCH, basé sur la technologie de biopsie liquide. Ce système CellSEARCH était autorisé pour la recherche de cellules tumorales circulantes (CTC) dans les cancers métastatiques, qu'ils soient du sein, de la prostate ou du colon ouvrant la porte aux recherches basées sur les biopsies liquides. Puis, au fur et à mesure des recherches scientifiques, et en moins de 10 ans, la FDA a, en 2016, de nouveau approuvé un test basé sur la technologie de biopsie liquide mais poussée à l'échelle génétique (9). Ce test consiste à détecter des mutations du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules. De telles mutations sont présentes dans environ 10 à 20% des cancers du poumon non à petites cellules. L'approbation de 2016 se fait dans un cadre précis certes, mais cette autorisation se révèle être un véritable étendard des soins de santé hautement individualisés couramment appelés médecine personnalisée ayant pour but d'augmenter l'efficacité et la tolérance des médicaments prescrits, primordiales pour le patient, qui plus est en oncologie (10).

En France, cette technique est par ailleurs déjà approuvée et quasi quotidienne (depuis 2015), via un système apparenté, celui du dépistage non

invasif de la trisomie 21 (11), basé sur la recherche de cellules fœtales circulantes (et non des CTC).

L'attrait majeur des biopsies liquides est notamment basé sur la comparaison aux Gold Standard actuels que sont la biopsie tissulaire et / ou la radiologie. Les avantages mis en avant dans la littérature par ces biopsies liquides sont les suivants :

- L'aspect non invasif (évident vis-à-vis des biopsies tissulaires, évoqué vis-à-vis de la radioprotection) est le principal argument mis en avant, notamment puisqu'il permet quasiment sans douleur d'accéder à de nombreuses et cruciales informations.
- La rapidité : 2 à 6 semaines pour les biopsies tissulaires versus 12h à 2 semaines pour les biopsies liquides.
- Son accessibilité, car elle s'obtient via une simple prise de sang tandis qu'une organisation plus complexe est nécessaire pour les biopsies tissulaires ou les examens radiologiques (accentuée par la problématique actuelle d'accès géographique ou financier aux soins).
- Les trois précédents points forts permettent d'en aborder un quatrième majeur en oncologie : la répétabilité. Très utile pour ce qui est du suivi et / ou de l'adaptation des traitements.
- Un autre point fort des biopsies liquides sur lequel pèche actuellement les biopsies tissulaires, de part leur unicité topographique, c'est sur l'échantillonnage (avec un risque de sur-représentation clonale). Celui-ci est contrecarré par l'intégration via les biopsies liquides de ce qu'on appelle l'hétérogénéité tumorale permettant ainsi un véritable reflet complet du patrimoine tumoral et non pas un instantané tumoral statique d'un moment précis, ne reflétant pas les changements dynamiques survenant pendant le traitement du cancer.

- Dans le prolongement de cette analyse qualitative, les résultats de l'analyse de l'ADN tumoral circulant apportent aussi, pour chaque anomalie moléculaire, une notion quantitative; ils renseignent sur leur fréquence au sein de l'ADN tumoral circulant analysé.
- Sa simplicité rend également possible sa généralisation à des patients ne pouvant pas forcément supporter des biopsies tissulaires, plus lourdes médicalement.
- Enfin, son coût est variable en fonction du test employé, mais à titre d'exemple le CellSearch, le seul test approuvé cliniquement par la FDA aujourd'hui, coûte 350 dollars (12). Un autre test américain CancerSeek serait lui autour de 500 dollars. Le test français ISET coûte lui 486 € non remboursé par la Sécurité Sociale (13), pour le moment. Ce qui semble être compétitif vis à vis des Gold Standard actuels.

Tous ces attraits listés précédemment font entrevoir de nombreux enjeux et applications des biopsies liquides. En effet, les potentiels entourant les biopsies liquides sont nombreux car ils touchent toutes les phases du cancer (14):

- le dépistage préalable (« screening » en anglais),
- le diagnostic (« diagnosis »),
- la stadification et le pronostic ; via notamment la détermination des mutations génétiques influençant l'agressivité du cancer (« staging, prognosis »),
- le traitement ; permettant la médecine personnalisée (« therapy selection »),

- et enfin le suivi ; incluant réponse au traitement, le risque de récurrence voir même permettent d'expliquer les résistances aux thérapies initiées (« monitoring »).

Comme de nouvelles méthodes de dépistage pourraient demain devenir la normalité dans la prise en charge du patient et notamment la biopsie liquide, il m'a semblé important de faire un point bibliographique sur cette nouvelle technique.

2/ METHODES

Pour cette revue narrative de la littérature, ayant débutée en juillet 2018 et s'étant achevée en juillet 2019, les sites références PubMed, Google Scholar, The Cochrane Library ont été les principales sources de recherches avec les mots clés ou termes MeSH (Medical Subject Headings) suivants : « liquid biopsy » « liquid biopsy CTC » « exosomes » « ctDNA ctRNA » « Tumor-Educated Platelets » « next generation sequencing » « minimal residual disease » « overdiagnosis » « overtreatment » « ethical issue cancer» permettant une liste d'études de départ ayant par effet boule de neige permis d'en étudier d'autres via les bibliographies de celles – ci.

Pour ce qui est de la lecture grise, les sites des sociétés savantes françaises ou européennes comme l'Institut Gustave Roussy, l'Institut Curie, l'Institut National du Cancer ou l'European Society for Medical Oncology (ESMO) ainsi que ceux des sociétés étrangères, américaines type American Association for Cancer Research (AACR) ou American Society of Clinical Oncology (ASCO) et notamment ses congrès 2018 et 2019, ou canadienne via l'Institut National d'Excellence en Santé et Services Sociaux (INESSS) ont également été des sources de recherches.

Divers revues spécialisées en cancérologie ou en médecine générale type Oncotarget (IF:5,16 en 2016), Cancer Research (IF 9,130), Exercer ou encore Prescrire ont elles aussi fait partie de la lecture grise de cette revue de la littérature.

Tout comme quelques thèses évoquant le sujet des biopsies liquides de manière plus spécifique vis-à-vis d'un cancer en particulier notamment trois thèses de la Faculté de Poitiers des Dr Junca, Evrard et Le Bonheur.

3/ RESULTATS

Une centaine d'études a permis de réaliser cet état des lieux sur le fonctionnement des biopsies liquides mais aussi sur leur intérêt en médecine générale.

Fonctionnement des biopsies liquides.

Depuis le congrès annuel de l'American Association for Cancer Research (AACR) de 2013 ayant eu lieu à Washington, nous retrouvons sous l'étiquette de biopsies liquides deux grands principes biologiques (15). La recherche de cellules tumorales circulantes, couramment raccourcies en « CTC » dans la littérature et la recherche d'ADN tumoral circulant appelé « ctDNA ». Ces deux principes sont résumés dans le schéma suivant.

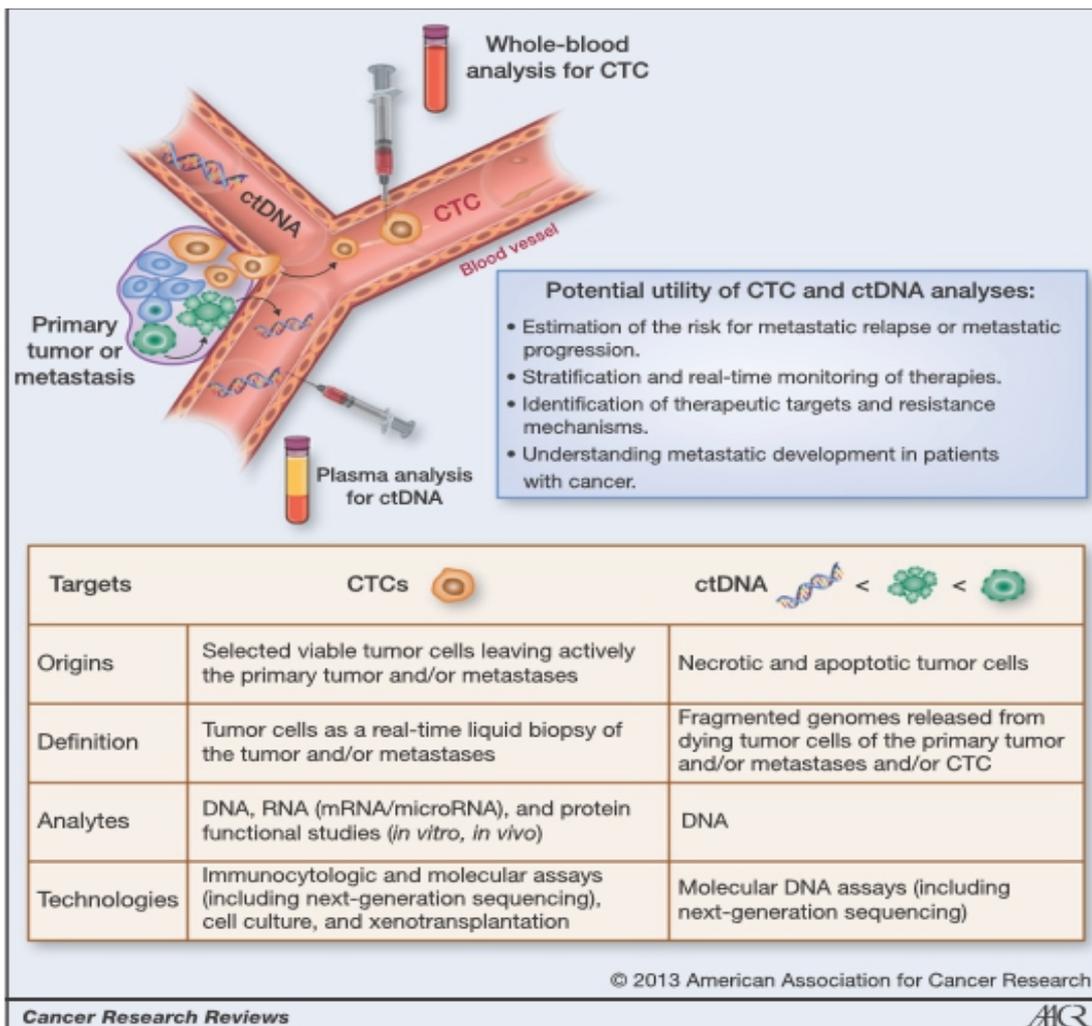


Figure 1. Scheme of blood analysis for CTCs and ctDNA in patients with cancer. The figure describes the origin of CTCs and ctDNA, provides a comparative listing of the technical possibilities of analyses of CTCs and ctDNA, and summarizes their potential use in regard to clinical applications and basic research.

Mais depuis 2013 et les recherches fondamentales initiales basées sur les CTC et les ctADN, les recherches cliniques et biologiques interagissent continuellement pour trouver les marqueurs les plus sensibles et les plus spécifiques ainsi que les machines permettant de les identifier, explorant et découvrant ainsi de nombreuses autres pistes de recherches. Ainsi, de nouvelles études se sont greffées à ces deux précurseurs. La plupart du temps ils sont tous regroupés sous le nom anglais de « blood-based biosources and biomolécules » que l'on pourrait traduire en français par « Biosources et biomolécules sanguines ». Associant ainsi les ADN et ARN circulants (« cell-free DNA and RNA ») et les CTC connus, aux exosomes (protéines et vésicules extracellulaires), et récemment aux plaquettes éduquées par les cellules tumorales (« tumor-educated blood platelets (TEP) »). Encore plus récemment, l'extension aux autres liquides corporels tels que le sperme, l'urine, les crachats ou encore le liquide céphalo-rachidien ont été étudiés (14 ;16).

a- Les Cellules Tumorales Circulantes

Comme décrit précédemment le seul test officiellement autorisé en clinique par la FDA est le CellSEARCH, et ce depuis 2008. Vainqueur en 2009 du Prix Galien (17) aux États Unis dans la catégorie « Best Medical Technology ». Dans le même temps en France, le Tysabri, médicament novateur luttant contre la Sclérose en Plaques (SEP), faisait partie des lauréats. Ce prix a été créé en France en 1970 avec pour but de distinguer : « des innovations en santé (toutes thérapeutiques confondues) remarquables, récentes et à disposition du public ainsi que des travaux de recherche emblématiques. Il contribue donc, notamment, à promouvoir et à dynamiser la recherche en santé et à encourager les laboratoires et les équipes qui la font avancer. Il honore des innovations d'exception dans tous les domaines de la santé : médicament, dispositif médical, e-santé mais aussi l'accompagnement du patient »(18). Par le passé ce prix a également récompensé l'Augmentin en 1986 ou le Xarelto en 2010, par exemple.

La méthode de numération des CTC par la technologie CellSEARCH est composée principalement de deux automates : CellTracks Autoprep

système (préparation de l'échantillon) et CellTracks Analyzer II (analyse de l'échantillon). La technique est basée sur un enrichissement immunomagnétique automatisé des cellules tumorales épithéliales qui expriment la glycoprotéine transmembranaire EpCAM. Puis un ferrofluide magnétique (liquide magnétique) couplé à des anticorps dirigés contre EpCAM permet la capture des cellules tumorales épithéliales présentes dans un volume déterminé de sang total, généralement 7,5mL. Ensuite une analyse par immunofluorescence permet la caractérisation de ces cellules. Les cellules nucléées (DAPI +) qui expriment les cytokines CK8, CK18 et CK19 sont comptées (puisque spécifiques des cancers épithéliaux). Les leucocytes contaminants sont identifiés par le marqueur pan leucocytaire CD45 et sont exclus du décompte. Le site internet de Janssen (19), l'entreprise belge produisant ces appareils et une thèse française de Nancy réalisée par Qian Tu (20) décrivent chaque étape de manière approfondie.



Même si la FDA a approuvé la technologie CellSEARCH, certaines autres sociétés savantes ont fait des études pour évaluer de manière plus précises cette technologie, notamment au Canada. L'Institut National d'Excellence en Santé et Services Sociaux (INESSS) canadienne a donc évalué la technique CellSEARCH mais spécifiquement sur le cancer du sein en

réalisant une méta analyse (de 37 études) dont le compte rendu a été publié en septembre 2016 (21). Regroupant sept études prospectives, une étude rétrospective et deux méta analyses spécifiques des traitement néo adjuvants (datées de 2008 à 2016) ainsi que cinq études prospectives, une étude randomisée et une méta analyse ciblées sur les traitements adjuvants (datées de 2010 à 2015) et pour finir des études sur les cancers du seins métastasés plus nombreuses (car plus à même d'avoir beaucoup de CTC) réunissant dix études prospectives, six rétrospectives, deux essais cliniques (un de phase 2 et un de phase 3) et deux méta analyses datées de 2004 à 2016.

Leurs conclusions remettent en cause l'intérêt de cette technique évoquant notamment des valeurs prédictives en pré ou post traitement non significatives et donc d'utilité clinique peu franche. Alors que dans le même temps des méta analyses chinoises sur le cancer colorectal (11 études incluses de 2008 à 2014) (22) ou sur le cancer gastrique (7 études incluses de 2008 à 2016) (23) penchaient plutôt en faveur de CellSEARCH vis-à-vis d'une utilité, au moins pronostique, notamment du risque de réponse faible à la chimiothérapie, tout en précisant que leurs conclusions devaient être réévaluées avec des études plus solides méthodologiquement parlant.

Une autre méta analyse de 2017 réalisée par les chinois Yan, W.-T. *et al* (24) penche également en faveur de la recherche des CTC mais pas seulement avec le système CellSEARCH. Cette méta analyse regroupe 50 études (dont certaines déjà présentent dans celles des canadiens (marquées d'un point rouge dans l'Annexe 1) soit 14 sur 37 études), conclue à l'utilité des systèmes basés sur la recherche d'ARNm par RT PCR. Elle met aussi en lumière le coté limitant de la recherche via des marqueurs uniquement épithéliaux (EpCAM) du système CellSEARCH puisque certaines cellules tumorales ont ce qui est appelé un « EMT process » dans la littérature (25,26,27,28,29) pour « Epithelial to Mesenchymal Transition » révélant ainsi l'hétérogénéité du phénotype des CTC et la discordance avec le type épithélial de la tumeur primitive.

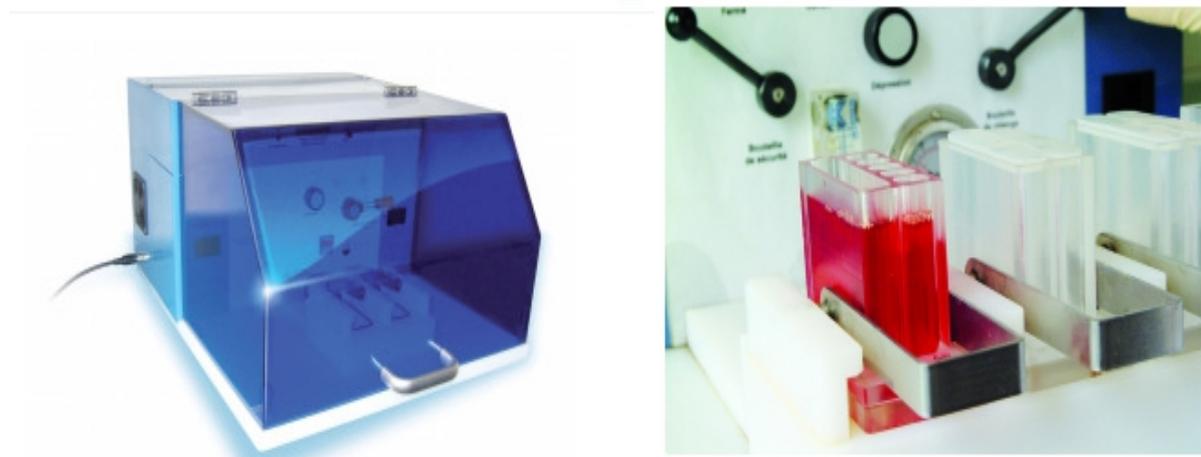
Le processus de l'EMT met en évidence l'évolution du phénotype des CTC et peut fournir de précieuses informations sur le processus métastatique,

l'évolution de la maladie et la résistance à la chimiothérapie, mais entraîne surtout une perte de caractérisation des cellules potentiellement tumorales avec les systèmes d'isolement actuels (basé sur les marqueurs épithéiaux).

En dehors du CellSEARCH basé sur la caractérisation épithéliale (EPCAM +, pour rappel) des CTC, d'autres appareils sont également utilisés pour la recherche de CTC. En France notamment, l'ISET pour Isolation by Size of Epithelial Tumor cells est, comme son nom l'indique, basé sur la caractérisation de la taille des cellules épithéliales. Ce test appartient aux institutions publiques Université Paris Descartes, Assistance publique Hôpitaux de Paris et Inserm, porté au public par la compagnie RareCells, fondée par la Pr Paterlini Brechot.

Rendue médiatique par le livre « Tuer le cancer » publié en janvier 2017 (36 000 ventes sur Amazon) (30), associé à une importante promotion radiophonique (31) et dans la presse écrite (32,33,34). Elle avait également présenté une conférence TEDx (35) en 2016 à Toulouse, disponible sur Youtube.

En lice pour le Prix de l'inventeur Européen 2019 (36), l'ISET est le seul test de biopsie liquide avec le marquage CE - IVD de réglementation européenne, témoin de la conformité aux exigences essentielles de santé et de sécurité fixées par les directives européennes.



On trouve sur le site internet de ISET un fichier PDF (Annexe 2) de demande d'analyse de cytomorphologie sanguine par ISET réalisable dans un laboratoire d'analyse parisien sur rendez-vous les jeudi entre 9h00 et 11h00. Son prix étant, comme précisé précédemment de 486€, non remboursé.

Le descriptif commercial disponible sur site internet de l'entreprise RareCells qui produit cet appareil indique : « Le système (appareil et consommables) extrait de rares cellules tumorales circulantes du sang avec une sensibilité inégalée et maintient leur intégrité morphologique et structurelle. Les CTC intactes peuvent être isolées, par filtration du sang à travers des membranes filtrantes à pores calibrés de 8 microns de diamètre, sous forme vivante ou fixe et être ensuite exposées à un examen de diagnostic in vitro (cytopathologie et / ou immunomarquage) et à d'autres méthodes de caractérisation telles que les analyses d'ADN moléculaire et d'ARN. La technologie ISET permet également de collecter le plasma pour des études sur les cfDNA et les exosomes et sur CTC sans aucune perte ».

D'un côté plus scientifique que marketing, certaines études ont comparé l'ISET et le CellSEARCH. Une étude greco-saoudienne de 2016 (37) portait sur la comparaison de plusieurs systèmes basés sur les CTC spécifiquement dans le cancer du sein avec des sous types moléculaires précis reflétant ainsi l'hétérogénéité moléculaire et phénotypique pouvant affecter la procédure d'isolement des CTC. Les résultats étaient sans appel en faveur de l'ISET.

RECOVERY			
Cells/ml	MCF7	SKBR3	MDA-MB 231
1/ml	100%	100%	98%
10/ml	83%	85%	100%
100/ml	96,9%	93%	100%
Average	93%	93%	99%

Résultats avec ISET

Recovery			
Cells/ml	MCF7	SKBR3	MDA-MB 231
10	57,5%	60%	41.3%
20	79%	50%	44%
100	63%	37%	36.4%
Average	66,6%	49%	40.6%

Résultats avec CellSearch

Une autre étude française de 2011, publiée dans le British Journal of Cancer (38), compare CellSEARCH et ISET chez 60 patients atteints de carcinomes métastatiques confirmés histologiquement. 20 patients étaient

respectivement atteint d'un cancer du sein, de la prostate ou d'un cancer du poumon non à petites cellules. Tous n'ont pas été détectés par les différentes techniques. Au total, 30% des patients (18 sur 60) étaient négatifs selon CellSearch, alors que seulement 5% (3 sur 60) étaient négatifs avec ISET. Les résultats concordants entre ISET et CellSEARCH ne concernant que 28 des 60 patients (47%), alors que les résultats discordants concernent les patients avec un nombre de CTC plus élevé selon ISET (25 sur 60; 42%) ou avec un nombre de CTC plus élevé avec CellSearch (7 sur 60; 12%).

Ces différences dépendent principalement du type de tumeur hébergée par le patient. CellSEARCH détectait plus de CTC dans les cancers du sein métastasés par rapport à ISET, les scientifiques de l'étude évoquaient la perte potentielle de CTC au cours des différentes étapes manuelles de la technique ISET. Pour les cancers prostatique et pulmonaire, la différence mise en évidence entre ISET et CellSEARCH est supposément due à la fameuse EMT (25,26,27,28,29), dont nous avons parlé plus haut avec la perte du caractère épithélial des CTC, alors que leurs tailles ne changeant pas ou peu sont toujours positives sous ISET.

A une échelle plus pratique, une étude française chapeauté par les niçois Illie *et al* de 2014, s'est penchée sur le lien entre CTC et découverte de cancer du poumon (39). Comment ? En examinant la présence de CTC par méthode ISET en complément d'un scanner chez des patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) sans cancer du poumon détectable cliniquement. Cette étude était observationnelle prospective et monocentrique. Une étude précédente avait révélée l'intérêt majeur d'avoir des populations étudiées saines en tant que témoins, c'est pourquoi l'équipe niçoise a recruté, entre juin 2008 et avril 2012, 245 patients sans cancer, 168 atteints de MPOC et 77 patients sans MPOC. Les patients atteints de MPOC ont été contrôlés annuellement par scanner spiralé à faible dose.

Des CTC ont été détectés chez 3% des patients atteints de MPOC (5 patients sur 168). La surveillance annuelle des patients atteints de MPOC positifs au CTC par tomographie à densité axiale a détecté des nodules pulmonaires 1 à 4 ans après la détection du CTC, ce qui a permis une résection chirurgicale

rapide et un diagnostic histopathologique du cancer du poumon au stade précoce (la stadification du cancer a révélé un cancer du poumon au stade IA sans propagation aux ganglions lymphatiques ni aux métastases distantes (pT1aN0M0) dans tous les cas). Le suivi des 5 patients par scanner et ISET 12 mois après la chirurgie n'a révélé aucune récurrence tumorale. Et du côté des patients sains (CTC négatifs), aucun n'a développé de nodule pulmonaire jusqu'à 5 ans après l'inclusion et le scanner de contrôle.

b- L'ADN tumoral circulant

La deuxième révolution des biopsies liquides a eu lieu lorsque les scientifiques ne se sont intéressés pas qu'aux CTC mais aussi à leur environnement. En effet dans le sang, il y a la partie cellulaire et la partie plasmatique. Dans cette partie plasmatique, les chercheurs ont trouvé ce qu'ils appellent les cftNA ou ctNA pour cell-free tumor or circulating tumor Nucleosomal Acid que se soit du ctDNA ou du ctRNA ouvrant la porte à de nombreuses analyses génomiques du cancer.

Les premiers scientifiques à évoquer l'ADN circulant sont les biologistes basés à Strasbourg : Paul Mandel (et non pas Gregor Mendel, le généticien autrichien célèbre grâce à ses petits pois) et Pierre Métais qui écrivaient en 1948 « Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme » parus au sein des « Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales ». (Annexe 3)

Les problématiques principales de ce ctDNA sont sa fragilité de part sa durée de vie très courte (inférieure à 2h d'après Zhang *et al* (40)) ainsi que sa non spécificité aux cellules tumorales, les scientifiques disent souvent qu'il est noyé dans une mer de cfDNA. En effet, les cellules saines lors d'événements non cancéreux à l'image de l'effort ou d'une apoptose cellulaire simple ou de processus inflammatoire (41), libèrent ainsi leur matériel génétique initialement intra cellulaire qui se retrouve mélangé au sein du plasma. Comme évoqué précédemment la grossesse représente une condition particulière car, à cette occasion, peut être retrouvé de l'ADN fœtal permettant ainsi son analyse via le dépistage pré natal non invasif.

En général, les patients cancéreux (surtout lorsqu'ils sont métastatiques) présentent des taux beaucoup plus élevés de cfDNA circulant que les individus en bonne santé (42). À mesure que la tumeur augmente en volume, il en va de même pour le turnover cellulaire et donc le nombre de cellules apoptotiques et nécrotiques (43). Si le ctDNA peut représenter jusqu'à 50 % de l'ADN libre total circulant chez les patients métastatiques, il est souvent inférieur à 1 % dans les stades précoces. Ainsi, un des principaux défis de la biopsie liquide est la sensibilité des techniques moléculaires utilisées pour caractériser l'ADN tumoral. Dans des circonstances physiologiques normales, les restes apoptotiques et nécrotiques sont éliminés par les phagocytes infiltrant. Cela ne se produit pas efficacement dans la masse tumorale, ce qui entraîne une accumulation de débris cellulaires et son inévitable libération dans la circulation.

Sa durée de vie très courte peut également être transformée en avantage. En effet à la différence des marqueurs sériques tumoraux actuels (ACE, PSA, CA-125...) qui ont une demie vie longue (quelques semaines voire quelques mois), cette demie vie courte permet une évaluation de la charge tumorale quasiment en instantané et donc une surveillance dynamique des modifications moléculaires de la tumeur plutôt que de compter sur un point temporel statique (à l'image de la charge virale du VIH par exemple) (44).

Les chercheurs évoquent tout de même une possibilité de distinction par la taille de cet ctDNA pour aider à sa caractérisation. Le ctDNA se trouve le plus fréquemment sous la forme de double hélice, ordinairement présent en fragments de petite taille (par rapport à l'ADN « normal ») inférieurs à 200 pb mais pouvant atteindre plus de 10.000 bp lorsqu'ils proviennent de cellules en apoptose ou nécrose, ou de contamination génomique.

Techniquement le ctDNA est prélevé via des tubes contenant de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), un anticoagulant qui inhibe l'activité de la DNase dans le sang et qui est compatible avec l'analyse par réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Le temps écoulé entre le prélèvement sanguin et le traitement est un autre facteur déterminant de la concentration en cfDNA; il est important d'éliminer les cellules sanguines qui pourraient se lyser et libérer de l'ADN germinal, ce qui diluerait le ctDNA (45).

Enfin, il a été démontré que la température avait une forte influence sur les niveaux de cfDNA. En fait, lorsque le sang est stocké à la température ambiante avant le traitement, il se produit une augmentation massive de cfDNA qui est probablement libérée par les cellules en cours de lyse (46).

Dans le cas du cancer, la concentration d'ADN circulant varie selon les techniques de détection mais aussi en fonction de l'intensité du renouvellement cellulaire, et dépend de plus de la localisation de la tumeur et de sa vascularisation. L'ADN tumoral circulant est également caractérisé par des défauts génétiques (mutations ponctuelles, réarrangements chromosomiques, motifs épigénétiques anormaux...) spécifiques de la tumeur.

Comme décrit précédemment l'étendard de l'analyse du ctDNA, c'est la recherche de mutation du gène EGFR dans le cadre des cancers du poumon non à petites cellules (CPNPC). Celle que la FDA mais aussi les instances européennes ont validé concerne la recherche des mutations L858R, T790M et de délétion de l'exon 19 (Annexe 4). L'approbation est basée sur les résultats de l'essai de phase III nommé FLAURA, présentés au congrès 2017 de la Société européenne d'oncologie médicale et publiés dans le *New England Journal of Medicine* (47). Permettant ainsi à l'immunothérapie via les inhibiteurs de la tyrosine kinase (TKI) de 3ème génération (Osimertinib, en tête) de devenir des traitements de premières lignes dans les CPNPC (48).

En effet, en 2009, l'étude IPASS a établi la supériorité du Géfitinib (TKI de première génération) sur la chimiothérapie chez les patients atteints d'un CPNPC présentant des mutations sensibilisantes de l'EGFR (49). Ont suivi des études de phases III portant sur les TKI de première et de deuxième générations permettant d'arriver à taux de réponse objective de 60 à 70% et surtout à des survies sans progression (SSP) allant de 9 à 15 mois (49,50). Mais malgré des taux de réponse élevés, les patients prenant ses traitements par TKI vont inévitablement développer des résistances acquises au traitement (mutations secondaires, activation de voies de signalisation alternative ou encore transformation phénotypique ou histologique) révélées par Tan *et al* dans le *Lancet* en 2015 (51) ou encore Morgillo *et al* dans l'ESMO (European Society for Medical Oncology) en 2016 (52). Le mécanisme le plus courant de la résistance acquise est la mutation T790M, qui représente 50 à 60% de la

résistance secondaire au traitement primaire par le TKI EGFR (53). C'est aussi la base du développement des TKI EGFR de troisième génération.

Avant l'étude FLAURA citée précédemment, l'étude AURA initialement de phase 1 chez l'animal (54) a montré de bons résultats notamment au niveau de la tolérance mais aussi de la SSP (9,6 mois de médiane versus 2,8 mois). Ces résultats ont permis une étude de phase 2 multicentrique sur des patients ayant progressé sous TKI de première génération (AURA 2 (55)). Et enfin, AURA 3 (56) comparant Osimertinib à l'association de chimiothérapie Permetrexed/Platine habituellement prescrite. La SSP médiane était de 10,1 mois versus 4,4 mois. Les réponses étaient également durables à 9,7 mois dans le groupe Osimertinib comparé à 4,1 mois pour la chimiothérapie.

Moins de patients ont signalé des effets indésirables de grade 3 ou plus dans le groupe Osimertinib (23%) par rapport au groupe Permetrexed + Platine (64%). L'Osimertinib était associé à un taux plus faible d'arrêt définitif (7% contre 10% avec la chimiothérapie), marqueur prédominant en oncologie clinique.



Figure tirée de Tan CS et al (57)

Cette figure met en lumière la survie estimée en mois des différents schémas / séquences thérapeutiques

OS = Overall Survival (mth = month)

Traduction anglais – français de la figure précédente :

1ère ligne : TKI 1ère G puis chimiothérapie ;

survie espérée (SE) 30 mois

2ème ligne : TKI 1ère G puis Osimertinib si T790M + puis chimiothérapie ;

SE : 36 mois

3ème ligne : TKI 2ème G puis chimiothérapie ;

SE : 27 à 28 mois

4ème ligne : TKI 2ème G puis Osimertinib si T790M + puis chimiothérapie ;

SE inconnue mais 36 mois probablement

5ème ligne : Osimertinib puis chimiothérapie ;

SE inconnue mais probablement 30 à 36 mois ou plus

Mais tout n'est pas si simple dans le traitement du cancer, car malgré des résultats prometteurs et améliorant la SSP et la tolérance du traitement des patients, reste toujours la problématique de sensibilité et de spécificité des tests de dépistage (Annexe 5, spécifique à la recherche de la mutation d'EGFR). Mais aussi des mécanismes de résistance au TKI de 3ème génération émergent (soit activation de voies en aval de l'EGFR (signalisation de voie RAS-MAPK), soit celles activant des voies de signalisation parallèles, telles que l'amplification *Her2*, l'amplification *MET*, la perte de *PTEN* et la mutation de *PIK3CA*).

Les chercheurs évaluent l'association des thérapies ciblées basées sur l'analyse du ctDNA et l'immunothérapie comme potentielle solution face à ces problématiques mais uniquement à une échelle scientifique pour le moment, non clinique. Par ailleurs même si cette application clinique a été validée, cela concerne un nombre très restreint de patients (CPNPC avancés ou résistants ayant la mutation d'EGFR), mais cela est pathognomonique à la médecine personnalisée. Dans un compte rendu du comité de la transparence de l'HAS du 13 septembre 2017 (58), l'incidence évoquée est de 1 850 patients par an. Ce compte rendu, très complet, révèle également l'absence d'amélioration de qualité de vie (autre critère cancérologique majeur) chez les patients traités malgré l'amélioration de la tolérance.

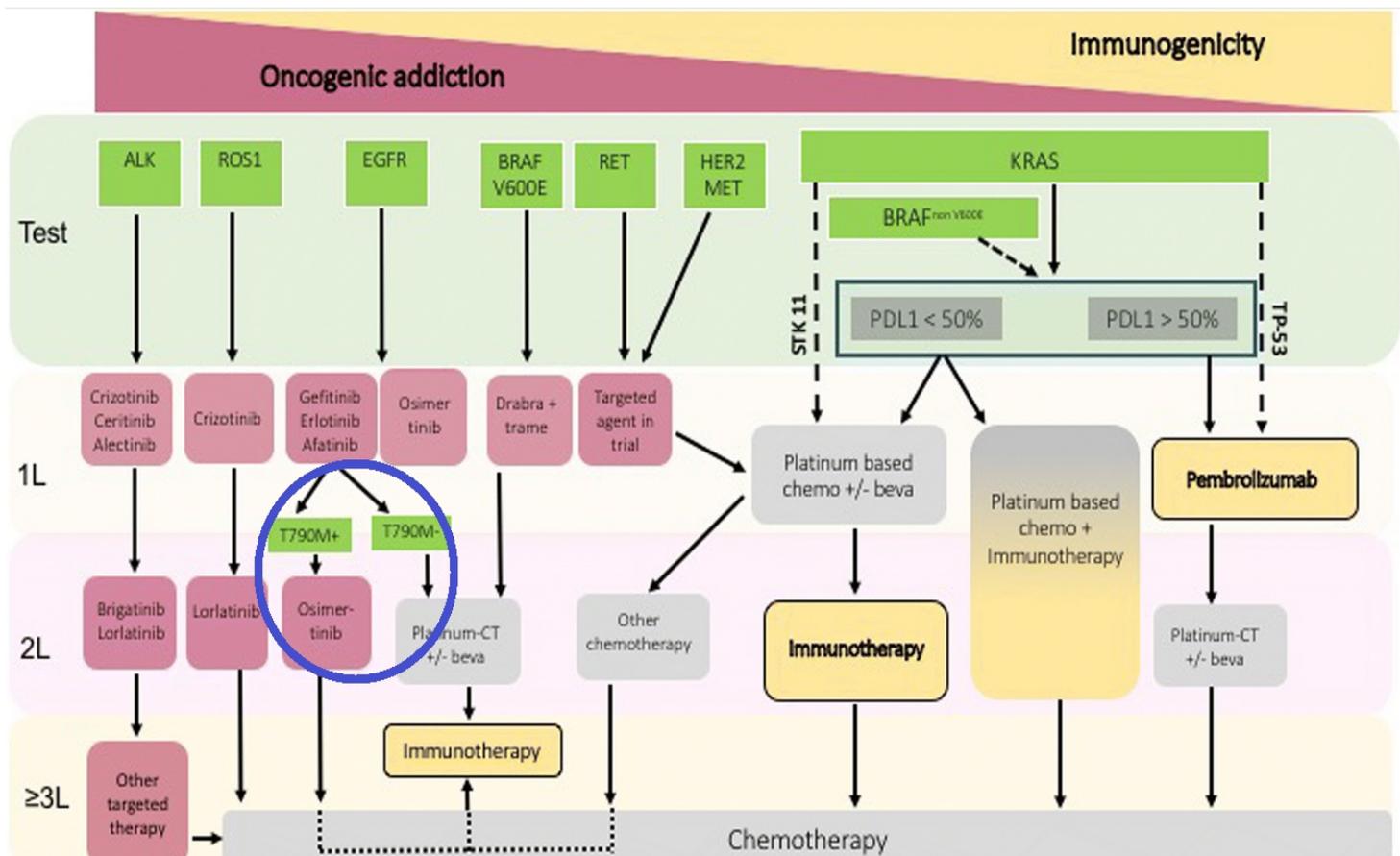


Figure tirée de Mhanna L et al (équipe toulousaine (59))

Mettant en lumière les différentes « addiction d'oncogène » ou « oncogènes conducteurs » (comme peut en être l'EGFR) et donc la place restreinte de l'Osimertinib chez les patients T790M muté uniquement et le lien étroit avec l'immunothérapie, autre grande base de recherche actuelle en cancérologie.

Comme nous venons de l'évoquer, la sensibilité et la spécificité sont des éléments clés dans la fiabilité d'un test de dépistage. Les dernières techniques, développées ou en cours de développement, ont permis de se rapprocher des seuils acceptables pour être à court terme une véritable alternative aux dépistages existants et permettent surtout de lever l'un des principaux freins à l'analyse du ctDNA, à savoir le manque de procédure standardisée des multiples études sortantes sur le sujet.

En effet, la phase pré-analytique est souvent le point noir de la comparaison inter-études faisant également baisser fortement la sensibilité de l'analyse. Pour garantir la plus grande sensibilité des analyses en aval, il est essentiel de parvenir à la récupération la plus élevée possible de ctDNA, car

cela augmentera également le nombre de vrais positifs capturés. Pour augmenter la quantité de ctDNA disponible pour l'analyse, il est nécessaire d'extraire un plus grand volume de sang du patient. Une prise de sang plus importante améliorera considérablement la récupération de l'ADN de l'échantillon. Dans le cas de tumeurs à un stade précoce, par exemple, un échantillon de plasma d'environ 2 mL peut produire une sensibilité de seulement 50%. L'augmentation de la taille de l'échantillon à 4 mL ou plus (jusqu'à 10 mL, rappel : 7,5mL pour CellSearch) peut considérablement améliorer la sensibilité des analyses en aval dans un intervalle allant de 80% à 90% (60).

Une manipulation et un stockage corrects de l'échantillon sont également essentiels. Si l'échantillon n'est pas suffisamment stabilisé, par exemple, l'ADN de fond peut être libéré par les globules blancs. Réduire cet ADN de fond aide à obtenir la sensibilité appropriée. Des tubes de stockage spéciaux (encore plus spéciaux que les EDTA) sont disponibles pour aider à atténuer les effets de l'ADN de fond. Des oligonucléotides bloquants peuvent également être utilisés pour s'assurer que l'ADN de fond n'est pas amplifié ou séquencé, minimisant ainsi ses effets. L'arrivée de kit de préparation et d'analyse ont permis de tendre vers une standardisation des pratiques.

c- Les nouvelles technologies

Ces nouvelles techniques sont classiquement rangées en deux catégories : les techniques ciblées et celles qui ne le sont pas.

Parmi les techniques ciblées nous avons déjà parlé de la recherche de mutation de l'EGFR par exemple. En effet le terme « ciblé » renvoi à quelque chose de prédéfini soit pour analyser des mutations nucléotidiques uniques (technologies BEAMing ou PCR numérique) ou des réarrangements chromosomiques structurels dans des régions génomiques spécifiées de l'ADN plasmatique (technologie PARE pour analyse personnalisée d'extrémités réarrangées) ou pour estimer la fréquence allélique d'une mutation particulière dans un échantillon (technologies TAm-Seq (séquençage en

profondeur d'amplicon étiqueté), CAPP-Seq (profilage personnalisé du cancer par séquençage en profondeur), Safe-SeqS (système de séquençage sécurisé).

Une des études les plus reconnues à l'heure actuelle dans l'utilité de ces nouvelles technologies est celle publiée par l'équipe de Newman *et al* datant de 2016 (61) qui a inventé la technique de CAPP-Seq. Puis ils l'ont mis en œuvre pour le cancer du poumon non à petites cellules avec une conception couvrant plusieurs classes d'altérations somatiques qui identifiait des mutations dans plus de 95% des tumeurs avec une spécificité de 96% pour les fractions d'allèles mutants jusqu'à environ 0,02%. Bien que le ctDNA ait été détecté chez la majorité des patients présentant une maladie de stade II – IV, seuls 50% des patients présentant un CPNPC au stade précoce (stade I) ont été identifiés. L'abondance du ctDNA dans la fraction de cfDNA chez les patients atteints de tumeurs de stade I était environ 10 fois inférieure à celle des patients présentant une maladie plus avancée. Ils ont ensuite intégré une correction des erreurs numériques intégrées via la technologie iDES – CAPP Seq permettant ainsi l'élimination *in silico* des artefacts de fond et le codage à barres moléculaire pour une récupération efficace de l'ADN améliorant la sensibilité à 0,0025%, la sensibilité la plus importante à ce jour dans la littérature (62).

Les nouvelles techniques d'analyse du ctDNA se sont également intéressées à concurrencer les marqueurs ou test de dépistage déjà existants. Une étude française d'octobre 2018, réalisée à Montpellier par Thierry *et al* (63) en font une synthèse en mettant l'accent sur les problématiques de sensibilité et de spécificité.

Cette étude aborde notamment le test EpiProcolon version 2 (approuvé par la FDA en 2016 (64)) qui a l'ambition d'être un concurrent du test de dépistage utilisé en France aujourd'hui : le FIT (*fecal immunochemical test*) qui a lui même remplacé le FOBT (*hemoccult fecal occult blood test*). L'EpiProcolon est basé sur la recherche via PCR en temps réel d'hyperméthylation de l'ADN au niveau du gène codant de la Septine 9. L'approbation de la FDA s'est basée surtout sur une étude de Johnson *et al* (65) ayant révélée une absence d'infériorité entre l'EpiProcolon et le FIT, avec une valeur prédictive négative (révélant le fait de ne pas avoir la maladie lorsque le test est négatif) identique de 99,8%.

Catégorie	Test	Cancer	Sensibilité	Spécificité	AUC
Biomarqueurs et tests conventionnels utilisés	CEA	Colorectal	41-52 %	85-95 %	0,63-0,77
	CA19-9	Colorectal/ Pancréas	23 %	95 %	0,64
	FOBT	Colorectal	13-79 %	87-98 %	-
	FIT	Colorectal	79 %	94 %	-
	Cologuard (test d'ADN fécal)	Colorectal	41 %	94 %	-
	CA 15-3	Sein	55,6 %	98 %	-
	PHI (prostate health index)	Prostate	-	-	0,69-0,77
	PSA	Prostate	-	-	0,55
Biomarqueurs circulants en cours de développement	Epi ProColon (détection du gène de la Septine 9 méthylé)	Colorectal	75-81 %	96-99 %	-
	7 promoteurs méthylés	Colorectal	91 %	73 %	0,85
	Volition (marqueurs de nucléosomes circulants)	Colorectal	75 %	86-90 %	0,97
	ADN circulant	Poumon			0,88
	Concentration totale d'ADN circulant nucléaire	Sein	78 %	83 %	0,91
		Ovaire	70 %	90 %	0,89
		Colorectal	-	-	0,91
	Détection du virus d'Epstein-Barr	Nasopharynx	97,1 %	98,6 %	-
	CancerSeek	Divers	30-99 %	99 %	0,91
	CTC	Numération	Poumon	30-78 %	88-100 %
miARN circulants	Panel	Sein	83 %	41 %	0,67
		Poumon et mésothélium	73-75 %	54-79 %	-

Tableau tiré de Thierry et al (63)

AUC = *Area Under the Curve* soit aire sous la courbe en français, correspond à un critère de discrimination des tests diagnostiques (plus il est proche de 1 plus le test discrimine, sans hasard, les sains des malades, s'il n'est pas plus discriminant que le hasard son AUC est de 0,5).

Depuis, d'autres études ont évalué la recherche de méthylation du gène SEPT9, en 2016 une méta analyse chinoise de Song *et al* (66) basée sur 5 études s'étant servies d'EpiProcolon (notamment celle de Johnson *et al*) retrouvait une sensibilité de 58,3% lors de stade 1 de cancer colorectal puis 73,3% pour les stades 2, 70,8% pour les stades 3 et enfin 87,7% pour les stades 4. Ils citent également une autre étude chinoise de Wu *et al* (67) basée sur SEPT9 assay (différent de EpiProcolon) retrouvant une sensibilité de 77% et une spécificité de 96% et concluent à une majoration franche de ces marqueurs lors de l'association de dépistage SEPT9 / FIT passant ainsi de 77% à 94,4%.

Les études ayant évaluées ce test retrouvent des sensibilités et des spécificités proches du test de notre pratique quotidienne. Cependant il n'est pas indiqué en première intention, en France. Son coût est un frein majeur puisqu'il oscille autour de 150€ alors que le FIT est plutôt autour de 2€. Pourtant une publication de l'association française de formation médicale continue d'hépatogastro-entérologie (68) évoquait qu'un test de dépistage sérique (et non fécal) du cancer colo-rectal présenterait, tout particulièrement, de multiples avantages, notamment en terme de facilité et d'acceptabilité, car susceptible d'améliorer la participation.

Alors que les approches ciblées ont le potentiel de capturer les principales mutations de gènes conducteurs connus à haute résolution, ces méthodes n'interrogent généralement qu'un seul ou un petit ensemble de gènes et ne permettent donc pas d'évaluer l'hétérogénéité génétique du ctDNA de manière non biaisée. Cependant, étant donné que les génomes tumoraux changent constamment en raison de la progression du cancer ou sous la pression sélective de thérapies ciblées (comme décrit précédemment avec les TKI), une analyse complète du génome est avantageuse, au moins chez les patients cancéreux au stade avancé. Malgré les avantages d'une vision globale du paysage génétique, les méthodes non ciblées et pan génomiques telles que le séquençage exome (partie codant les protéines, représentant seulement 1% du génome) entier (WES pour Whole Exome Sequencing) ou le séquençage du génome (intégralité de l'ADN) entier (WGS pour Whole Genome Sequencing) sont actuellement limitées aux échantillons présentant des niveaux élevés de

ctDNA total et leur coût reste prohibitif. Sans parler de l'absence de bénéfice clinique (actuel ?) substantiel découlant de ces analyses.

Ces techniques que sont le WES ou le WGS ont pu se développer depuis l'avènement du séquençage nouvelle génération ou Next Generation Sequencing (NGS) en anglais. La précédente méthode était la méthode Sanger qui a permis le premier séquençage de génome humain en 2003. Alors qu'elle avait débuté en 1990, treize années pour séquencer 3 milliards de nucléotides pour 3 milliards d'euros, avec la participation d'une vingtaine d'équipes de chercheurs à travers le monde. Aujourd'hui le NGS a révolutionné le séquençage de l'ADN grâce aux progrès en nanotechnologie (miniaturisation, automatisation) et en bio informatique (autonomisation, analyse quasi instantanée) raccourcissant ainsi son temps à quelques heures pour un génome entier et ce pour moins de 1000 euros (69). Il existe plusieurs stratégies de séquençage haut débit : la principale est basée sur la technique appelée séquençage par synthèse. Les autres : pyroséquençage, séquençage par ligature ou séquençage par ion semiconducteur sont moins répandues. Une étude autrichienne de Zhou *et al* (70) a étudié les études basées sur le WGS et le WES.

A propos des études basées sur le WES (exome), Zhou *et al* concluaient que des limites persistaient. Leur étude ciblait notamment une capture de séquence insuffisante mais aussi une sensibilité diminuée par le manque de précision des techniques actuelles (parlant de « noises » en anglais pour « bruit »). Pour vulgariser : l'enzyme servant à répliquer l'ADN choisi peut être sujette à des erreurs de réplifications, et comme le nombre de nucléotides et le nombre de cycles de PCR sont très élevés pour avoir le plus de matériel possible à analyser, des erreurs techniques se mélangent aux erreurs mutationnelles recherchées, créant ce « bruit ». Certaines techniques type ajout de codes barres ne suffisent pas encore à compenser.

Pour les études basées sur le WGS (génome), l'une des façons de limiter le temps et le coût de cette technique serait de se concentrer sur les « Somatic Copy Number Alteration » : SCNA en anglais traduit en nombre de copies d'altérations somatiques regroupant les délétions (perte de matériel chromosomique), duplications (gain de matériel chromosomique) ou encore amplifications (copie d'une région génomique relativement petite) au sein du

génomique. Ces altérations sont souvent caractéristiques des cancers (dans une tumeur typique 25% du génome est affecté par des SCNA) et en font ainsi des potentiels marqueurs (71).

Mais la principale limite de ses techniques est leur sensibilité puisqu'en « scannant » une partie (WES) ou la totalité du génome (WGS) ces techniques ont besoin d'au minimum 5 à 10 % de ctDNA au sein de l'ADN étudié, ce qui est quasi impossible à une échelle de (pré)diagnostic mais faisable à une échelle métastatique.

Tableaux (2 sur le WES; 3 sur le WGS) d'après Zhou et al (70) :

Table 2 Selected studies employing whole exome sequencing

Publication	Patients	Capture method	Average no. of reads (mio.)	Average coverage of exomes	VAF detection (%)
Murtaza <i>et al.</i> (9)	Advanced breast, ovarian, lung cancer (n=6)	TruSeq Exome Enrichment Kit (Illumina)	169	31X to 160X	5 to 10 (median)
Klevebring <i>et al.</i> (24)	Prostate cancer and breast cancer (n=7)	SeqCap EZ Exome Library (Roche)	n.a.	n.a.	n.a.
Butler <i>et al.</i> (22)	Metastatic primary intimal sarcoma and breast cancer (n=2)	Agilent SureSelectXT2 (Agilent)	591 and 286	524X and 309X	3.7 (mean)
Dietz <i>et al.</i> (25)	Non-small cell lung cancer (n=6)	Agilent SureSelectXT2 (Agilent)	160	38X to 85X	n.a.
Murtaza <i>et al.</i> (26)	Metastatic breast cancer (n=1) at three different time points	TruSeq Exome Enrichment Kit (Illumina)	126	77.3X to 139.6X	3.8 to 34.9 ¹ ; 2.5 to 19.1 ²

¹, for stem mutations; ², for subclonal mutations. VAF, variant allele frequencies; n.a., not available; mio., million.

Table 3 Selected studies employing whole genome sequencing

Publication	Patients	Average no. of reads (mio.)	Average genomic coverage	Alteration detected
Leary <i>et al.</i> (33)	Stage IV CRC (n=7) and stage IV breast cancer (n=3)	250	8X	rearrangements, SCNAs
Chan <i>et al.</i> (34)	HCC (n=4), synchronous breast and ovarian cancer (n=1)	n.a.	17X (SCNAs), 29.5X (SNVs)	SCNAs, SNVs
Heitzer <i>et al.</i> (35)	Castration-resistant prostate cancer (CRPC) (n=5), castration-sensitive prostate cancer (CSPC) (n=4)	3.3	0.1X	SCNAs
Heidary <i>et al.</i> (10)	Metastatic breast cancer (n=58)	n.a.	0.1X	SCNAs
Mohan <i>et al.</i> (36)	Metastatic CRC (n=10)	4	0.1X	SCNAs
Ulz <i>et al.</i> (32)	Metastatic prostate cancer (n=43)	n.a.	~0.1–0.2X	Rearrangements, SNAs
Dawson <i>et al.</i> (6)	Metastatic breast cancer (n=52)	n.a.	>30X (rearrangements), 10X (SNVs)	Rearrangements, SNVs
Xia <i>et al.</i> (37)	Lung adenocarcinoma (n=8)	20	0.53X	SCNAs
Van Roy <i>et al.</i> (38)	Neuroblastoma (n=37)	10	0.4X	SCNAs

CRC, colorectal cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; SCNA, somatic copy number alterations; n.a., not available; mio., million; SNV, single nucleotide variants.

d- Les autres biomarqueurs

D'autres biomarqueurs sont encore en cours de développement, notamment les recherches autour de nouvelles sources potentielles d'informations (complémentaires ou similaires aux CTC ou au ctDNA) comme les TEP (Tumor Educated Platelets), les ARN circulants (microARN ou miARN pour mitochondrial) ou les exosomes, ou alors les recherches autour des techniques d'études comme les transcriptomes, les protéomes, les métabolomes (Annexe 6), ou les xénogreffes de tumeurs issues directement des patients (Patient Derived Tumor Xenograft ou PTDX ou PDX).

Les recherches sur les exosomes se distinguent aujourd'hui comme les plus prometteuses, celles avec le plus d'applications cliniques potentielles. La présence d'exosomes a été signalée pour la première fois en 1983 par Pan *et al* lors de la culture de réticulocytes de mouton (72). Ces exosomes sont des vésicules de taille nanométrique en circulation excrétés par des cellules vivantes mais aussi par les tumeurs. Ce sont en quelque sorte des vésicules servant de messagers intercellulaires et qui sont par conséquent des (trans)porteurs de matériels type ADN, ARN ou même des protéines transmembranaires et non membranaires (sont également cités : des lipides, des métabolites et des microARN) (73). L'avantage principal tient dans leur composition, en effet une bicouche phospholipidique les protège des enzymes de dégradation (ribonucléases et Dnases sériques) (74).

Plusieurs études ont montré que ces exosomes étaient présents dans de nombreux fluides humains, pas seulement dans le sang mais aussi dans l'urine (75), le lait maternel mais aussi la salive (76), les larmes (77), l'épanchement pleural (78), le sperme (79), le liquide amniotique (80) et même le liquide synovial (81).

L'isolement des exosomes est basé, de manière similaire aux CTC, sur leurs propriétés biophysiques (taille, morphologie, densité) ou sur leur immunoaffinité (CD63, CD9 ou CD81 semblent être des marqueurs spécifiques des exosomes peut importe leur cellule d'origine (82)) ou encore sur leur solubilité pour les faire précipiter (83).

Les principales études sur le cancer en lien avec les exosomes sont notamment celles de Melo *et al* datant de 2015 (84) et ayant trouvé grâce à une protéine de surface: Glypican-1 (GPC1) des résultats très (trop ?) prometteurs dans le cancer du pancréas. En effet dans une seule et unique étude, Melo *et al* ont réussi à prouver scientifiquement (significativement) que les sujets sains ou même les patients porteurs de pancréatites chroniques n'exprimaient pas GPC1 (même si GPC1 est parfois exprimé dans le cancer du sein) en faisant ainsi un marqueur très spécifique. Ils ont également pu révéler que des mutations KRAS n'était pas retrouvées chez les patients GPC1 négatif, et pouvaient l'être chez les GPC1 positif. Mais aussi, que GPC1 était positif dès le stade in situ voir même invisible à l'IRM. Et enfin, ils ont réussi à prouver que les niveaux quantitatifs de GPC1 sont corrélés à la charge tumorale et à la survie chez les patients présentant une résection tumorale pré et post-chirurgicale (principaux résultats en Annexe 7). Certaines études ont toutefois essayer de corroborer ces résultats sans grande réussite pour le moment. Des différences méthodologiques sont avancées par les chercheurs ou même des différences structurelles à GPC1 qui est exprimé naturellement dans plusieurs tissus (85).

D'autres études font partie des étendards liés aux exosomes. Celle de Hochino *et al* (86) publiée en 2015 dans Nature est également connue puisqu'elle a réussi à prouver que la composition des exosomes pouvait permettre de déceler la localisation des métastases et participer à la niche pré métastatique. En effet, ils ont réussi à démontrer que les exosomes dérivés de tumeurs préparent un micro-environnement favorable sur les futurs sites métastatiques et assurent la médiation de modèles non aléatoires de métastases. La clé serait l'expression de protéines membranaires déjà connues, les intégrines (ITG). Celles ci seraient spécifiques de l'organe où elles vont préparer l'accueil des métastases. Par exemple, les exosomes exprimant ITG α V β 5 se lient spécifiquement aux cellules de Kupffer, et sont donc des médiateurs du tropisme hépatique, alors que les exosomes ITG α 6 β 4 et ITG α 6 β 1 se lient aux fibroblastes résidents et aux cellules épithéliales, régissant le tropisme pulmonaire. L'étude révèle aussi que la captation de l'intégrine de l'exosome spécifique au type cellulaire a favorisé la régulation

positive du gène S100 pro-migratoire et pro-inflammatoire, renvoyant ainsi à la préparation du micro-environnement. Comme imagé par le schéma suivant tiré de leur étude :

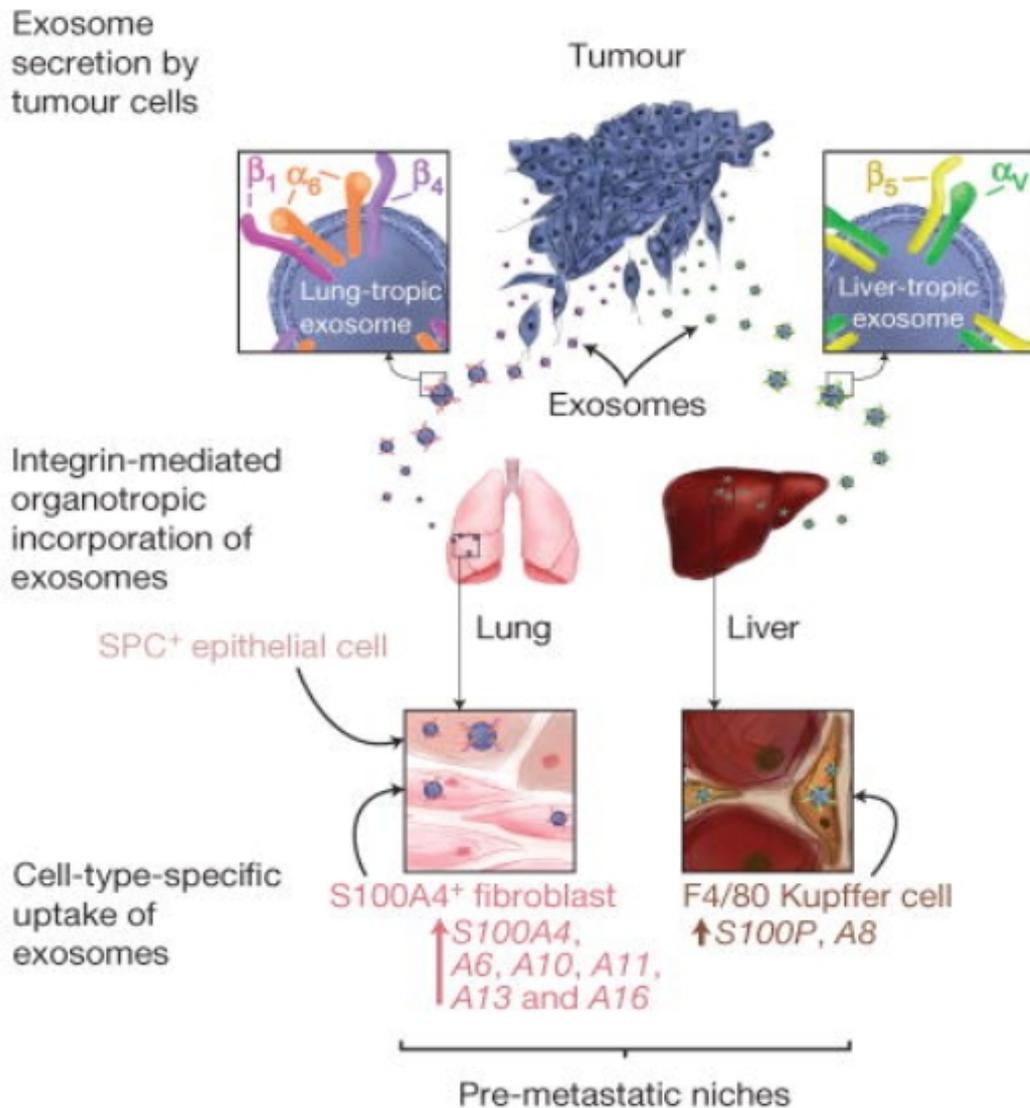


Schéma d'après Hochino et al (86)

Une autre étude de 2015 (87) menée par une équipe similaire (issue du même centre de recherche à New York) a également proposé comme marqueur ressemblant aux intégrines, donc de facteur favorisant les (pré)métastases, le MIF pour Macrophage migration Inhibitor Factor. Celui-ci provoque l'activation des voies fibrotiques et la mise en place d'un milieu pro-inflammatoire favorisant les métastases hépatiques du cancer du pancréas. Novateur à l'échelle scientifique, mais ayant également un retentissement clinique puisque le MIF est également fortement exprimé dans les exosomes plasmatiques isolés chez les patients porteur d'un cancer du pancréas dont la

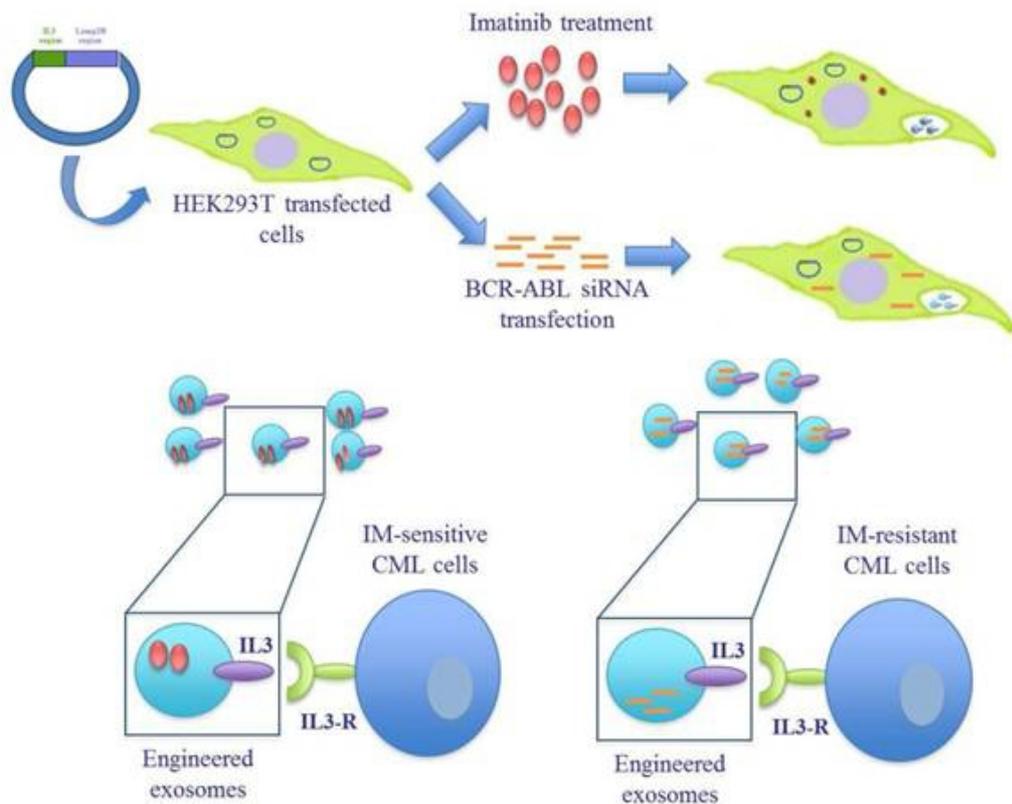
maladie a progressé après le diagnostic. A l'inverse, le MIF n'est pas exprimé chez des patients ne présentant aucun signe de maladie cinq ans après le diagnostic ou chez les sujets témoins en bonne santé. Des études sur des modèles murins de cancer du pancréas testent des anticorps anti MIF sans pour le moment de développement de molécules pour l'homme.

D'autres études existent aussi concernant le mélanome via le récepteur de la tyrosine kinase MET qui permettrait de majorer l'agressivité du cancer en interagissant avec les progéniteurs de la moelle osseuse. A l'inverse, la réduction de l'expression de MET dans les exosomes a diminué le comportement pré métastatique (88) sans proposition thérapeutique pour le moment. D'autres travaux étudient la surexpression du microARN 211-5p au sein des exosomes qui serait corrélé à une sensibilité réduite aux inhibiteurs du gène BRAF (souvent muté) dans les mélanomes (89) (de manière semblable au TKI et à la mutation de l'EGFR).

Une autre des fonctionnalités cliniques étudiées des exosomes est de les utiliser comme transporteur de traitement (« drug vehicle » en anglais). Une des pathologies étudiée *in vitro* et *in vivo* est la leucémie myéloïde chronique (LMC), qui présente parfois des résistances aux traitements habituels. L'idée de Bellavia *et al* (90) était de se servir des exosomes pour délivrer aux cellules atteintes (résistantes ou non) des doses du traitement habituel : l'Imatinib ou des ARN interférents qui ont tous les deux pour objectif d'aller inhiber l'expression du gène BCR-ABL (pathognomonique de la LMC) en ciblant le récepteur de l'interleukine 3 qui peut servir de porte d'entrée puisqu'il est surexprimé au niveau des blastes de la LMC. Ils se sont ainsi servis d'une cellule HEK293T (connue pour sa haute efficacité de transfection et la quantité de leur exosomes libérés) à laquelle ils ont intégré un plasmide recombiné contenant la protéine humaine recombinante IL3-Lamp2b pouvant ainsi cibler le récepteur de l'IL3. Cette idée innovante est illustrée ci-dessous. Ils utilisaient comme modèle *in vivo* des souris qui étaient xénotreffées. Leurs résultats montraient que les exosomes manipulés étaient bien intériorisés par les cellules de la LMC et les xénotreffes résistantes à l'Imatinib et surtout qu'ils conduisaient à une réduction efficace de la croissance tumorale.

Cette étude fait acte dans la recherche pour la délivrance de traitements, qu'ils soient habituels dans le but de diminuer les risques d'intolérance au médicament en faisant une thérapie ciblée ou qu'ils soient des alternatives lors de résistances acquises.

A



B

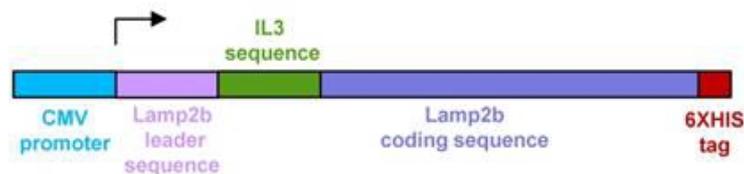


Schéma d'après Bellavia et al (90)

Cette technique d'exosomes transporteurs et/ou cibleurs n'a pas uniquement des fonctionnalités dans la recherche cancérologique : en effet certaines études dans la maladie d'Alzheimer se basent sur la même méthode (91).

Dans les nouveaux marqueurs, nous avons évoqués les Tumor Educated Platelets soit les plaquettes éduquées ou conditionnées par la tumeur en français, aussi appelées TEP. L'idée initiale est de dire que les plaquettes dans le sang seraient éduquées par la tumeur via des ARN principalement. Et c'est cette interaction qui modifierait l'ARN de ces plaquettes permettant notamment la dissémination et la croissance tumorale. Alors qu'habituellement les plaquettes sont plutôt limitées à un rôle d'hémostase, elles peuvent sécréter des facteurs de croissance pouvant influencer sur la croissance cellulaire et l'angiogenèse, ou encore attirer d'autres cellules sanguines comme les monocytes et les granulocytes, ce qui peut aider à créer un micro environnement pro-métastatique.

Elles présentent par ailleurs de nombreux avantages majeurs : c'est qu'elles sont faciles à purifier, sont également nombreuses (deuxième contingent cellulaire plasmatique) et beaucoup moins susceptibles de mourir en se déplaçant dans le système vasculaire, limitant ainsi les problématiques d'isolement.

La principale étude sur les TEP a été réalisée par les néerlandais Best *et al* en 2015 (92), elle traite la possibilité d'un dépistage de pan-cancer. En effet, leur étude trouve des résultats prometteurs : sur 283 échantillons de plaquettes, ils ont réussi à distinguer avec une précision de 96% les sujets atteints d'un cancer (228 patients) des patients sains (55 patients). De plus, ils ont réussi à identifier l'emplacement de la tumeur primitive parmi les six cancers dont les patients étaient atteints avec une précision moyenne de 71%.

Comment ? Via l'amplification et le séquençage d'ARNm associés à une analyse algorithmique. Le séquençage des ARN plaquettaires a donné un nombre moyen de lectures d'environ 22 millions de lectures par échantillon (profondeur du test). Après sélection des lectures d'ARN intronisées (épissées) et exclusion des gènes à faible couverture, Best et son équipe ont détecté 5 003 ARN codant pour les protéines et non codants utilisés pour les analyses ultérieures. Les différences retrouvées entre les patients sains des patients malades concernaient 2246 ARN (1453 augmentés et 793 abaissés).

En comparant ces ARN à une base de données pré établie (CAGE, Correlative Analysis of Gene Set Enrichment), ils ont pu préciser quels types

de processus biologiques étaient augmentés ou abaissés, comme décrit dans le tableau suivant.

Down	Up
Translation	Cancer-associated
Immune, T cell	Infection
Cancer-associated	HDAC
Viral replication	Platelet
IL-signaling	Cytoskeleton
RNA processing	Hypoxia
Ago2-Dicer-silencing	Protease
Protein metabolism	Immunodeficiency
Receptor processing	Differentiation
	Immune differentiation
	Methylation
	Metabolism

Tableau d'après Best *et al* (92).

Par ailleurs, Best *et al* évoquent la possibilité d'analyse génomique via les TEP, avec notamment une caractérisation du statut des facteurs oncogéniques cibles tels que l'EGFR, KRAS, PIK3CA ou encore HER2.

Toutefois, ils relèvent aussi des limites de leur étude sur les TEP: l'absence de différence significative entre cancer métastatique et cancer non métastatique, avec pour explication potentielle le faible nombre de patients. Ils n'ont pas testé les profils plaquettaires en post thérapeutique ne permettant pas d'être un outil de suivi mais font l'hypothèse qu'une normalisation partielle ou complète des profils plaquettaires après un traitement réussi de la tumeur permettrait le suivi de la récurrence de la maladie basée sur l'analyse des TEP.

Une autre équipe, européenne, s'est penchée sur les TEP celle de Nilsson *et al*, en 2016. Elle a étudié le lien entre TEP, traitement et survie sans progression (93). Ils ont analysé les réarrangements EML4-ALK par RT-PCR dans des plaquettes et du plasma isolés à partir de sang obtenu chez 77 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, dont 38 présentent des tumeurs réarrangées EML4-ALK (65% de sensibilité et 100%

de spécificité pour la détection). Dans le sous-ensemble des 29 patients traités par Crizotinib, la survie sans progression était de 3,7 mois pour les patients présentant des plaquettes EML4-ALK + alors qu'elle était de 16 mois pour ceux présentant des plaquettes EML4-ALK- ($p=0,02$). Les TEP peuvent s'avérer utiles pour prédire et surveiller les résultats du Crizotinib, améliorant ainsi les décisions cliniques basées sur la seule imagerie radiographique.

Enfin, les auteurs ont rapporté que la surveillance des réarrangements EML4-ALK dans les plaquettes d'un patient (uniquement) sur une période de 30 mois révélait une résistance au Crizotinib deux mois avant la progression de la maladie par radiographie. Cela offre ainsi aux médecins une opportunité précoce de modifier le traitement et de passer à un inhibiteur d'ALK de deuxième génération, tel que le Céritinib ou l'Alectinib, de manière similaire à l'EGFR sans pour autant être approuvé par les instances américaines ou européennes.

e- Le test CancerSEEK

Une autre approche a fait grand bruit en 2018, celle de Cohen *et al*, avec un test appelé CancerSEEK(94). Basée sur une étude regroupant 1005 patients et étudiant un test combinant une recherche d'altérations génétiques et des biomarqueurs protéiques.

Initialement les conditions à remplir pour que le test soit efficace étaient premièrement que le test devait interroger un nombre suffisant de bases pour permettre la détection d'un grand nombre de cancers.

Deuxièmement, chaque base interrogée dans le test devait être séquencée des milliers de fois pour détecter les mutations de faible prévalence.

Troisièmement, il devait y avoir une limite au nombre de bases interrogées dans le test, car plus il y en a, plus il est probable que des mutations d'artefact soient identifiées, ce qui réduit le rapport signal sur bruit.

Et quatrièmement, pour la mise en œuvre dans un environnement de sélection, le test devait être rentable et se prêter à un débit élevé, facteurs limitant le nombre de séquences pouvant être effectuées. Pour surmonter ces

difficultés, ils ont recherché le nombre minimal d'amplicons courts permettant de détecter au moins une mutation du gène conducteur dans chacun des huit types de tumeurs évaluées.

En utilisant les données de séquençage disponibles au public, les auteurs ont constaté qu'il existait une relation de loi de puissance fractionnaire entre le nombre d'amplicons nécessaires et la sensibilité de la détection, avec un plateau à environ 60 amplicons. Une fois ce plateau atteint, l'augmentation du nombre d'amplicons ne permettrait pas de détecter beaucoup plus de cancers, mais augmenterait la probabilité de résultats faussement positifs. Cette utilité marginale décroissante définit le nombre optimal d'amplicons. Ils ont ainsi sélectionné 61 amplicons ciblant 16 gènes (dont KRAS, TP53, BRAF ou EGFR par exemple).

Cohen *et al* se sont servis de la technologie de multiplex PCR pour marquer directement et de manière unique chaque molécule modèle originale avec un code-barres ADN, avec pour objectif d'augmenter le rapport signal sur bruit et ainsi majorer la sensibilité. Associé à ces amplicons, CancerSEEK est basé sur des biomarqueurs protéiques, initialement ils en avaient sélectionné 41, puis 8 (dont CA 125 – CA19,9 – ACE par exemple) se sont révélées les plus utiles pour distinguer les patients cancéreux des patients sains dans une pré analyse.

Une fois cette association établie, les auteurs l'ont testé sur 1005 patients chez qui, un cancer des ovaires, du foie, de l'estomac, du pancréas, de l'œsophage, colorectal, du poumon ou du sein avait été diagnostiqué aux stades I (20% des patients) à III (31% des patients). Les huit types de cancer étudiés ici représentent 360 000 (60%) décès par cancer estimés aux États-Unis en 2017. Aucun patient n'avait reçu de chimiothérapie néo-adjuvante avant le prélèvement d'un échantillon de sang et aucun ne présentait de métastase à distance visible au moment de l'entrée dans l'étude. L'âge médian au moment du diagnostic était de 64 ans (extrêmes 22 et 93 ans). La cohorte témoin en bonne santé était composée de 812 personnes d'âge médian 55 ans (extrêmes 17 à 88 ans) sans antécédents connus de cancer, de dysplasie de haut grade, de maladie auto-immune ou de maladie rénale chronique.

Les résultats retrouvaient une sensibilité moyenne parmi les huit types de cancer évalués de 70% et variait de 98% dans les cancers de l'ovaire à 33%

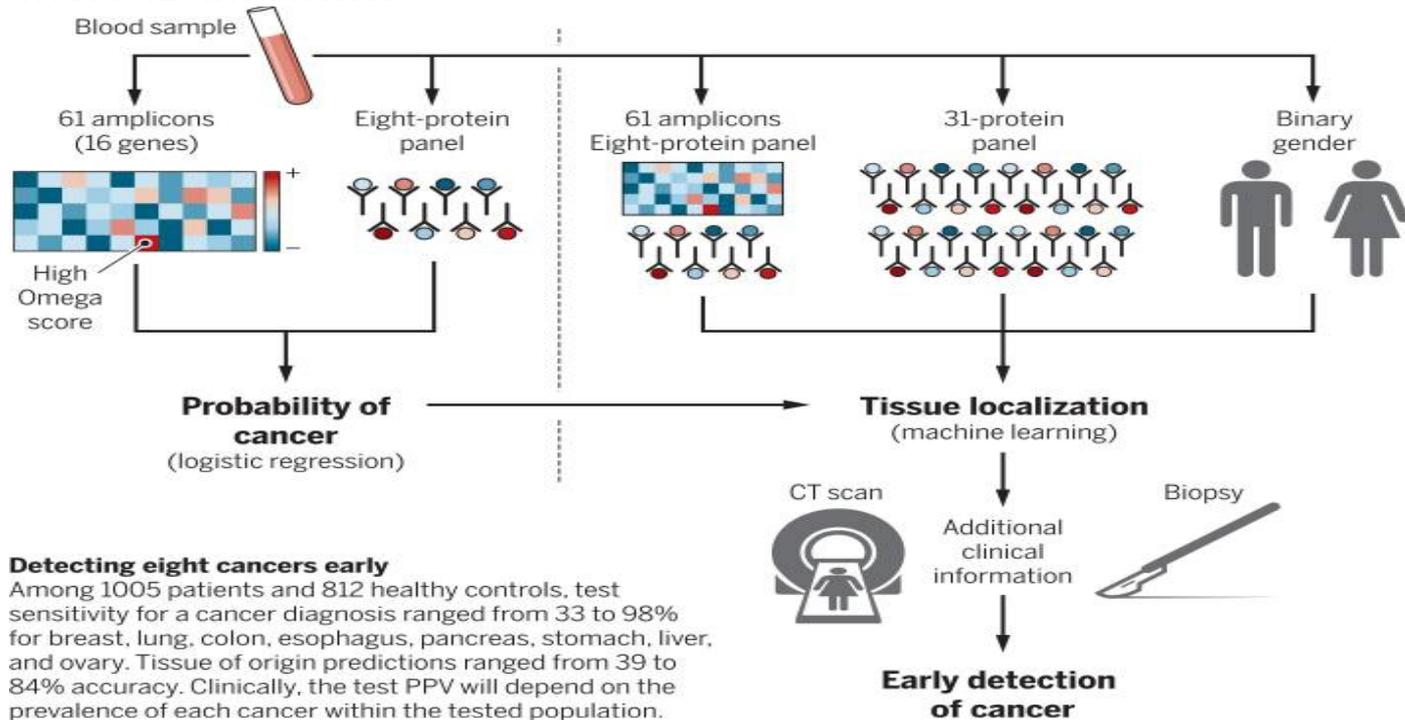
dans les cancers du sein. À cette sensibilité, la spécificité était supérieure à 99%, en effet seuls 7 des 812 personnes sans cancer connu ont eu un résultat (faussement ?) positif. L'un des attributs les plus importants d'un test de dépistage est sa capacité à détecter les cancers à un stade relativement précoce. La sensibilité moyenne de CancerSEEK était de 73% pour le stade le plus couramment évalué (stade II), similaire (78%) pour les cancers du stade III et inférieure (43%, seulement) pour les cancers du stade I. La sensibilité pour les cancers au stade précoce (stade I) était la plus élevée pour le cancer du foie (100%) et la plus faible pour le cancer de l'œsophage (20%).

Ils ont ensuite tenté de démontrer qu'une fois un test positif CancerSEEK, ils seraient capable de retrouver la tumeur primitive. Les résultats basés sur un algorithme à trois entrées : les niveaux de ctDNA et ceux des biomarqueurs protéique associés au sexe du patient. La source du test positif sur un seul organe n'était retrouvée qu'avec une médiane de 63% de ces patients. Comme les mutations du gène conducteur ne sont généralement pas spécifiques à un tissu, la grande majorité des informations de localisation provient de marqueurs protéiques. La précision de la prédiction variait avec le type de tumeur; il était le plus élevé pour les cancers colorectaux (84%) et le plus faible pour les cancers du poumon (39%).

Cohen *et al* rapportaient, eux-même, trois limites à leurs études : premièrement, la cohorte de patients de l'étude était composée de personnes atteintes de cancers connus, diagnostiqués pour la plupart sur la base des symptômes de la maladie. Bien qu'aucun des patients n'ait eu de maladie métastatique cliniquement évidente au moment de son entrée dans l'étude, la plupart des personnes dans un véritable environnement de dépistage auraient une maladie moins avancée et la sensibilité de la détection sera probablement inférieure à celle rapportée ici. Deuxièmement, les témoins contrôles étaient limités à des personnes en bonne santé, alors que dans un véritable environnement de dépistage du cancer, certaines personnes pourraient être atteintes de maladies inflammatoires ou autres, ce qui pourrait entraîner une plus grande proportion de résultats faussement positifs que celle observée dans l'étude. Enfin, la proportion de cancers de chaque type dans l'étude était délibérément non représentative de celle de l'ensemble des États-Unis, car les

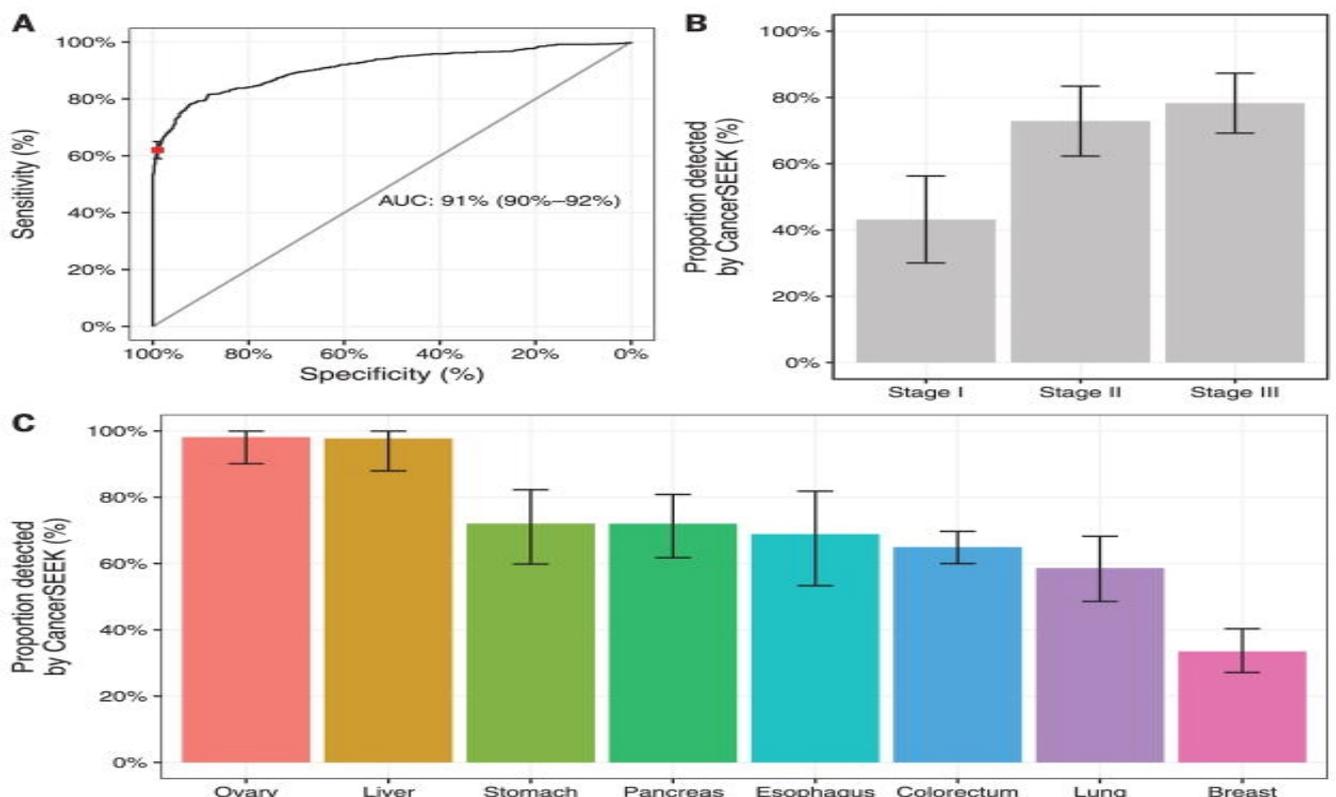
auteurs voulaient évaluer au moins 50 exemples de chaque type de cancer. Aux États-Unis, en pondérant l'incidence réelle la sensibilité de CancerSEEK serait de 55% parmi les huit types de cancer.

Cette pondération n'affecterait pas la sensibilité de CancerSEEK (69 à 98%) permettant de détecter cinq types de cancer (ovaire, foie, estomac, pancréas et œsophage) pour lesquels aucun test de dépistage n'est disponible pour les individus à risque moyen et dont la survie à cinq ans du diagnostic est souvent très abaissée.



Ci-dessus : Schéma d'après Kalinich et al (95).

Ci-dessous : Tableaux des résultats de Cohen et al (94).



Intérêt en médecine générale.

On assiste aujourd'hui à une remise en question importante des techniques de dépistages actuelles que se soit le PSA dans le cancer de la prostate, la mammographie dans le cancer du sein ou encore de la modification récente des modalités de dépistage du cancer du col de l'utérus. Une défiance, envers le monde médical, qui est encore plus marquée envers le monde pharmaceutique, est installée. Sans parler des questions économiques quelles soient dans le sens des dépenses (politique sociomédicale budgétée) ou dans le sens des recettes (cours aux subventions, groupe d'investissement ...) qui défrayent notre quotidien.

Nous venons de le voir, les biopsies liquides touchent toutes les étapes de la prise en charge du cancer. Notre métier de soins primaires nous oriente plus naturellement vers le dépistage que vers le choix du traitement du cancer (pour le moment en tous cas). Mais c'est également le bastion du « Primum non nocere » : Premièrement ne pas nuire. Dont l'origine est incertaine. La plus ancienne trace de ce principe se trouve dans le traité des Épidémies d'Hippocrate, daté de 410 avant JC environ, qui définit ainsi le but de la médecine : « Face aux maladies, avoir deux choses à l'esprit : faire du bien, ou au moins ne pas faire de mal ». Et c'est sous cette impulsion, vocation ou révélation que les termes éthiques de surdiagnostic ou de surtraitement ont fait leur apparition.

Le cadre légal (96) via le code de santé publique (repris également dans le code de déontologie médicale) et son article R.4127-33 centré sur le diagnostic : « *Le médecin doit toujours élaborer son diagnostic avec le plus grand soin, en y consacrant le temps nécessaire, en s'aidant dans toute la mesure du possible des méthodes scientifiques les mieux adaptées et, s'il y a lieu, de concours appropriés.* » et son article R.4127-35 centré sur l'information au patient : « *Le médecin doit à la personne qu'il examine, qu'il soigne ou qu'il conseille, une information loyale, claire et appropriée sur son état, les investigations et les soins qu'il lui propose. Tout au long de la maladie, il tient compte de la personnalité du patient dans ses explications et veille à leur compréhension (...).* » tendent également à limiter ces problématiques éthiques centrales via la communication et l'approche centrée sur le patient, compétences enseignées lors de notre internat (97).

Si l'avenir des biopsies liquides tend vers l'utopie du dépistage pan-cancer comme semble l'orienter le test CancerSEEK, il va s'assombrir avec ces spectres, nécessaires, que sont les notions de surdiagnostic et de surtraitement. En effet comme décrit précédemment, les dépistages actuels ont été remis en cause mondialement et nationalement.

A l'échelle mondiale, on peut par exemple citer le livre de G. Welch sorti en 2011 intitulé *Overdiagnosis. Making people sick in the pursuit of health*. Ce médecin américain fait également parti des auteurs de l'étude parue dans le New England Journal of Medicine (98) en 2012 sur les limites des résultats de trente ans de dépistage par mammographie aux États Unis. Leurs estimations évaluaient à 31% de cancer du sein surdiagnostiqués soit presque 70 000 américaines pour l'année 2008. Son livre, plus généraliste, a été analysé (99) par l'American Society for Clinical Investigation (Impact Factor à 12,8 en 2018) qui concluait : « Peut-être que maintenant, plus que jamais, il est temps d'élever notre conscience collective et de nous demander si ce que nous pouvons faire pour nos patients améliore vraiment leur santé ou leur qualité de vie. » Et qui disait également quelque chose de révélateur vis à vis du futur potentiel que nous proposeront peut être les biopsies liquides : « Nous sommes entrés dans une ère où nous pouvons trouver des maladies et des maladies chez beaucoup plus de personnes - leur donnant ainsi toute leur vie une «maladie» - mais il n'est pas clair qu'en faisant de tout le monde un patient, nous améliorons nécessairement leur santé. »

Des études s'interrogeant sur la pertinence du dépistage généralisé pullulent, qu'elles soient danoise de Gøtzsche *et al* parue dans le BMJ en 2009 (100) , norvégienne de Kalager *et al* parue dans le NEJM en 2010 (101), ou française de Autier *et al* parue dans le BMJ en 2011 (102).

Mais dans le même temps, d'autres études concluent à un rapport bénéfice / risque positif du dépistage notamment via l'étude européenne menée par EUROSCREEN en 2012 (103), avançant des chiffres précis sur le surdiagnostic : « Sur le surdiagnostic, les membres d'Euroscreen se sont appuyés sur les études observationnelles. Ils ont constaté que ces études mentionnaient des chiffres très variables, allant de 0 à 54% de surdiagnostic. Leur analyse des données, qui écarte celles qu'ils estiment non ajustées au risque et aux délais de constitution des cancers, donne une fourchette de 1 à

10% de surdiagnostic. Sur les conséquences du surdiagnostic, Euroscreen estime qu'une femme ayant pratiqué 10 dépistages (sur 20 ans) a un risque cumulatif de 17% de mauvais diagnostic (faux positif) non suivi de procédures invasives (donc sans biopsies ou traitements agressifs), et de 3% d'avoir des examens ou traitements invasifs. » Le centre de recherche internationale sur le cancer a, pour sa part, publié en 2016 dans le NEJM une étude rédigée par 29 experts indépendants de 16 pays différents (104) ayant analysés les données d'études observationnelles et randomisées, aboutissant à un risque de décès lié au cancer du sein diminué d'environ 40% chez les femmes de 50 à 69 ans dépistées par mammographie (par rapport aux femmes non dépistées).

Les associations françaises de patients se sont également faites entendre via une lettre commune (regroupant Collectif Cancer Rose, Groupe Princeps, UFC Que Choisir et Prescrire), dont la revue s'est fait l'écho (105), adressée à Mme Touraine, la Ministre de la Santé en 2016. Cette lettre faisait suite au rapport (106) que la Ministre avait elle-même demandé à l'INCa sur l'évaluation du dépistage organisée du cancer du sein.

Dans cette lettre, les mots y sont clairs : « déséquilibre de la communication à destination des femmes en âge de participer au programme, qui relève davantage de l'injonction que de l'information » ; « l'information disponible, tant pour les femmes que pour les professionnels de santé, doit être rendue plus objective, en présentant aussi bien les avantages que les inconvénients du dépistage » ; « les médecins doivent être mis en situation de délivrer une information non biaisée à leurs patientes. Cela suppose une formation adéquate des professionnels de santé concernés, afin qu'ils soient en mesure d'expliquer la controverse, les effets indésirables et les inconnues du dépistage. Par ailleurs, il est indispensable que soit retiré des critères de la rémunération sur objectifs de santé publique des médecins généralistes le niveau de participation de leur patientèle au dépistage du cancer du sein. C'est seulement ainsi que les femmes pourront en toute confiance se tourner vers leur médecin pour discuter de leur choix, comme elles sont déjà 56 % à le faire. »

Ce rapport de l'INCa résumait en trois points vis-à-vis de la controverse scientifique du dépistage du cancer du sein : l'appréciation de l'efficacité du

dépistage pour réduire la mortalité du cancer du sein, la sécurité du dépistage (risque de surdiagnostic et de surtraitement), les modalités et le contenu de l'information des femmes concernées par le dépistage.

Ce même rapport résume, dans la figure ci-après, la variation de l'évaluation du surdiagnostic et/ou du surtraitement dans les études.

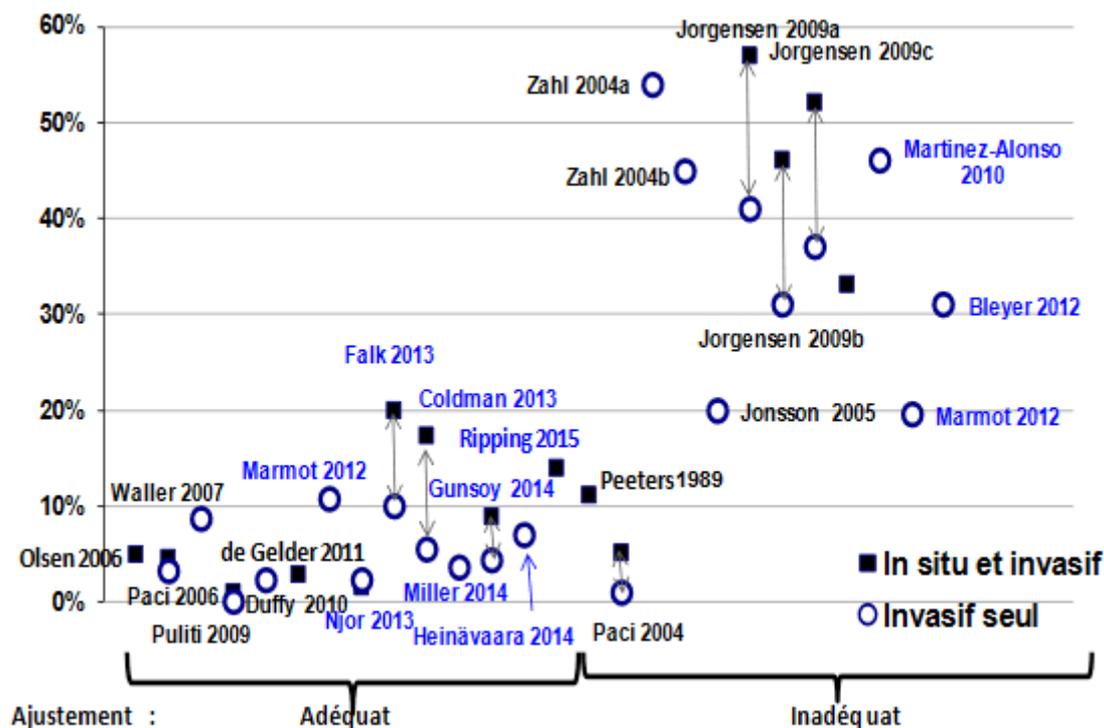


Figure d'après Puliti et al (107) mise à jour par Mme Catherine Hill et présentée lors de son audition par le Comité d'orientation.

La détermination de la période de surveillance post dépistage est essentielle pour évaluer le taux de surdiagnostic. Ce choix explique une grande part de la discordance de taux de surdiagnostic dans la littérature. La qualité des estimations, et en particulier, la prise en compte de l'avance au diagnostic notamment, expliquent également certaines différences.

Les biopsies liquides sont citées dans ce rapport (106) comme ayant pour objectif d'aider à mieux évaluer les risques d'évolution et d'agressivité d'un cancer du sein localisé, pour ensuite adapter plus finement la stratégie thérapeutique en fonction de cette évaluation personnalisée de la gravité, et ainsi limiter le risque de surtraitement.

Actuellement des études sont en cours, une notamment MyPeBS (108)

pour My Personal Breast Screening, soutenue par l'INCa dont les investigateurs sont des médecins généralistes. Financée par l'Union Européenne, cette étude cherche à évaluer, chez les femmes âgées de 40 à 74 ans, si un dépistage personnalisé du cancer du sein pourrait être une meilleure option que le dépistage organisé actuel.

Comment ? En comparant les avantages et les risques de ces deux stratégies, préconisant un dépistage s'appuyant sur une analyse du risque personnel plutôt qu'un dépistage de masse. Cette étude a pour objectif d'inclure 85 000 femmes européennes dont 20 000 françaises.

Ce risque sera calculé à partir de différentes données propres à chacune, comme l'âge, les antécédents familiaux de cancer, le statut hormonal, la densité mammaire, mais aussi le génotype (analyse d'ADN par un test salivaire). Ce calcul de risque résulte d'une collaboration de plusieurs années (entre les équipes de l'Institut Gustave Roussy, les équipes de recherche de l'INSERM: «Génération et Santé» et «Oncostat», et la start-up STATLIFE). Il a permis d'identifier les facteurs de risque associés à la survenue des cancers du sein chez les femmes françaises, en particulier les facteurs modifiables associés aux cancers graves. En fonction du niveau individuel de risque établi pour chaque femme, la fréquence des mammographies à réaliser pour le dépistage sera adaptée: plus le risque sera élevé, plus la fréquence sera importante. Ceci devrait permettre de détecter le plus tôt possible un cancer du sein chez les femmes les plus à risque et de diminuer l'exposition des femmes qui sont le moins à risque aux effets délétères des mammographies (faux-positifs, sur-diagnostic, sur-traitements, anxiété inutile, etc.). Les résultats sont attendus pour 2024.

Dans le même temps, le projet MyPROBE (109), l'un des dix lauréats de l'appel d'offres à projets « Recherche Hospitalo-Universitaire en Santé », participe via les biopsies liquides à aider au développement de ce fameux risque. Il cible les rechutes plutôt que le dépistage précoce. L'objectif est de développer des classificateurs moléculaires pour identifier les patientes présentant un risque élevé de rechute après un traitement conventionnel pour le cancer du sein.

Pour y parvenir, les chercheurs vont développer trois types de tests moléculaires à visée pronostique. Pour réaliser ce projet ambitieux, le

consortium MyPROBE rassemble une combinaison unique d'expertises en recherche, en clinique et en biotechnologie. Six équipes de recherche translationnelles issues de trois centres universitaires leaders dans le domaine de la cancérologie (Centre de cancérologie Gustave Roussy, Institut Curie et Centre Léon Bérard de Lyon), incluant aussi des unités de recherche en biostatistique et bio-informatique. Trois entreprises novatrices spécialisées dans le domaine des biomarqueurs sont également associées au projet, chacune d'entre elles commercialisera l'une des trois catégories de classificateurs moléculaires développés. Les impacts attendus sont d'économiser le coût des nouveaux médicaments et d'éviter les toxicités. Les résultats devraient être connus d'ici 2022.

Parmi les autres dépistages le PSA est également controversé dans le cadre d'un dépistage de masse, et la pratique quotidienne semble adaptée avec une diminution de cet usage et surtout une individualisation de la prescription de ce dosage biologique si et seulement si le patient est symptomatique.

Concernant le dépistage du cancer colo rectal, celui-ci est moins sujet aux polémiques puisqu'il a été reconnu que son fondement est mérité et donc a fait foi de son utilité. Par ailleurs, il est assez bien accepté. Une thèse poitevine de 2017 réalisée par Lakshmiprya Le Bonheur (110) intitulée « *Dépistage organisé du cancer colorectal: évaluation d'un programme de dépistage de masse et défis éthiques, revue de la littérature* » évoque de nombreux défis éthiques comme la connaissance de l'histoire naturelle du cancer, principe de base du dépistage, rappelant qu'« il est important qu'un dépistage permette la détection de lésions précancéreuses permettant de faire diminuer l'incidence du cancer et de lésions cancéreuses précoces permettant de faire diminuer la morbi-mortalité de la pathologie ».

D'autres défis concernent les faux négatifs pouvant amener une fausse réassurance ou un effet inverse comme chez les fumeurs ayant des radiographies pulmonaires rassurantes leurs délivrant ainsi des « faux permis de fumer ». Les faux positifs, quant à eux, amènent souvent à la surmédicalisation, avec la réalisation d'examens complémentaires se révélant normaux et donc inutiles. Le spectre de l'obligation de moyen plus que l'obligation de fin n'est ainsi pas loin pour justifier ces examens.

Aux Etats Unis plus qu'en France, la judiciarisation du monde médical pousse aussi les médecins dans la peur de rater quelque chose. Notons également que les patients aussi ont parfois envie de réassurance et poussent ainsi vers la réalisation d'acte inutile.

L'un des derniers défis souligné dans cette thèse concerne les cancers dit « d'intervalle » qui sont les cancers diagnostiqués entre un test de dépistage ne retrouvant pas d'anomalies et le prochain test proposé. Cette problématique, moins éthique que pratique, n'est pas isolée au cancer colorectal.

Le Dr Le Bonheur citait également dans sa thèse une étude de 2004 (111) énonçant quatre principes éthiques nécessaires pour la pratique quotidienne en médecine générale :

- l'autonomie (versus le paternalisme): il convient de favoriser la liberté du patient à choisir ce qu'il veut faire de son corps;
- l'équité des soins: permettre l'accès aux meilleurs soins à chacun;
- la bienveillance active dont les patients ont besoin;
- la non malveillance: ne pas faire de mal au patient, ne pas imposer de soins lourds évitables ou non désirés par le patient.

Des solutions pour lutter contre ces problématiques éthiques ont été proposées notamment aux États Unis avec l'initiative *Choosing Wisely* (112) qui a débuté sous l'impulsion de l'ObamaCare (la réforme de la santé souhaitée par le président américain) avec pour objectif que toutes les spécialités médicales identifient un top 5 des soins superflus les plus dispendieux, affiné ensuite en liste de pratiques sur lesquelles les médecins et les patients devraient s'interroger. Cette initiative a été déclinée dans une vingtaine de pays notamment en Suisse avec *SmarterMedecine* (113) ou au Canada avec *Choisir Avec Soins* (114).

Un système similaire a été créé au CHU de Nantes avec un guide (115) fourni aux nouveaux internes ciblant 11 prescriptions « opposables à tes chefs » suivantes avec pour objectifs avoués de réduire la sur utilisation des soins et de mieux suivre les recommandations de bonnes pratiques permettant d'améliorer la qualité et la sécurité des soins et de diminuer les dépenses.

LES 11 PRESCRIPTIONS

OPPOSABLES À TES CHEFS



Tu ne prescriras pas systématiquement d'IPP chez les patients traités par AINS ou par aspirine à dose anti-agrégante au long cours.



Tu ne prescriras pas l'oxycodone en 1^{re} intention sans avoir préalablement envisagé la morphine.



Tu ne prescriras pas systématiquement de médicaments par voie injectable dès lors qu'ils sont utilisables per os.



Tu ne demanderas pas d'angioscanner thoracique en cas de suspicion d'embolie pulmonaire aiguë si le résultat du dosage des D-dimères est < 500 µg/L.



Tu ne demanderas pas d'imagerie radiologique de la région lombo-sacrée aux patients consultant en urgence pour une lombalgie aiguë non traumatique sans signe d'alerte.



Tu ne prescriras pas de dosage du NT-proBNP si le diagnostic d'insuffisance cardiaque aiguë est établi après l'examen clinique et la radiographie thoracique.



Tu ne prescriras que la ferritinémie devant une suspicion de carence martiale.



Tu ne prescriras pas systématiquement le trio d'analyses virologique, bactériologique et parasitologique pour toute coproculture.



Tu ne laisseras pas en place une sonde urinaire sans réévaluer sa pertinence clinique.



Tu ne renouveleras pas un pansement hydro-cellulaire s'il n'est pas saturé visuellement.



Tu ne transfuseras pas ton patient sans avoir préalablement déterminé son seuil transfusionnel.

4/ DISCUSSION

La rédaction de la thèse est souvent l'aboutissement des études médicales, alors pourquoi ne pas débiter par une phrase entendue et retenue lors de la première année, lors d'un cours de biologie cellulaire, qui m'avait profondément marquée à l'époque. «Vos connaissances théoriques seront déjà obsolètes d'ici 5 à 10 ans en fonction des matières». Dix ans après, nous y voilà. A l'aube voire même à l'heure de virages profonds du monde médical : intelligence artificielle, télémédecine, médecine prédictive ou encore numérisation du monde médical. La médecine, et la médecine générale notamment sont en pleine transformation. Mais le buzz, l'éphémère, l'instantané, les restrictions budgétaires, les interrogations éthiques et autres scandales sanitaires font également partis de notre quotidien et probablement de notre futur. Alors nous essayons d'encadrer, de légiférer avec notamment la réactualisation de la loi de bio éthique, de repenser notre modèle médical en souhaitant le réformer. L'époque nous incite donc à réfléchir aussi à d'autres grands principes appris pendant les études médicales «Formation Médicale Continue», «Evidence Base Medicine», « Reflexivité », principes éthiques de bienfaisance, de non malfaisance et de justice. Ces derniers renvoient tous au thème abordé que sont les biopsies liquides.

Le cancer est une maladie complexe, hétérogène et dynamique impliquant de multiples interactions gène-environnement et qui affecte de nombreuses voies biologiques. En tant que tel, le développement de plateformes non invasives, fiables et robustes représente une étape essentielle vers la promesse de la médecine de précision et vers l'acceptation de celles-ci par les patients. Les travaux en cours dans le domaine de la biopsie liquide continuent de montrer sa grande utilité potentielle dans le diagnostic et la stratification des patients cancéreux, et ils soulignent aussi une méthode de substitution aux biopsies tissulaires pour surveiller la réponse au traitement.

Notre travail est limité de part sa méthodologie, le fait d'avoir choisi une revue de la littérature narrative n'imposait pas de vérifier la véracité des résultats retrouvés au sein des études citées. Nous avons tâché de citer

principalement des études reconnues ou citées par d'autres études mais la récurrence de ce domaine scientifique fait que peu de méta analyses ont pour le moment été publiées. Une autre limite est liée à l'effervescence des études actuelles. Parfois proche de la frénésie et ressemblant à une course effrénée tout azimut des scientifiques pour trouver la voie ou le biomarqueur prenant le leadership de la recherche sur les biopsies liquides. D'autres études seront probablement sorties entre la fin de mon recueil de données et le jour de la soutenance, des congrès auront également lieu comme celui de l'ESMO fin septembre ou celui du Groupe d'Oncologie de la Langue Française à Toulouse début octobre où une plénière sur les perspectives des biopsies liquides est déjà programmée. The liquid biopsy conference est également prévue à Shanghai en 2020 avec les pontes européens Pr Alix-Panabières et Pr Pantel.

Mais dans le même temps, notre revue de la littérature permet de mettre en avant la facilité (d'accessibilité et d'acceptation) et la fréquence rendues possibles par la collecte en série de biopsies liquides qui offrent de nombreux avantages par rapport aux procédures chirurgicales classiques, notamment la possibilité d'une adaptation plus réactive des traitements administrables. Bien que l'imagerie traditionnelle et les biopsies tissulaires restent la norme en matière de diagnostic du cancer et de suivi de la réponse au traitement, ces approches ne peuvent pas surmonter les contraintes causées par l'hétérogénéité dynamique spatio-temporelle des populations de cellules cancéreuses et ne permettent pas la visualisation d'une maladie résiduelle minimale. D'autant plus à l'époque où la «theranostic» du cancer et l'oncologie de précision sont espérées.

Alors que les progrès technologiques se poursuivent et que de nouvelles innovations dans la méthodologie de la biopsie liquide apparaissent parallèlement, cette approche permettra, peut être, des méthodes robustes d'évaluation pré-diagnostique du risque de cancer à l'image du test prometteur CancerSEEK. Au fur et à mesure que la connaissance de la biologie sous-jacente progressera, la méthode de la biopsie liquide deviendra une réalité clinique permettant ainsi une meilleure gestion des patients atteints de cancer.

Cependant, avant que les biopsies liquides puissent servir de tests de diagnostic viables, les étapes pré-analytiques, telles que la collecte de biofluides (sang, sérum, plasma, etc.), les paramètres de centrifugation, les réactifs d'isolation et les conditions de stockage, doivent être normalisées afin d'assurer une procédure de traitement reproductibles. En effet, les performances cliniques des dosages doivent satisfaire aux exigences des organismes de réglementation respectifs, telles que les Clinical Laboratory Improvement Amendments aux États-Unis ou les pratiques de tests génétiques en vigueur dans les pays européens. En Europe, CANCER-ID, un consortium européen soutenu par l'Initiative sur les médicaments innovants en Europe.

En outre, les étapes analytiques doivent être validées pour simuler les paramètres cliniques. De plus, les sensibilités et les spécificités des tests appliqués doivent être robustes, reproductibles et subir les contrôles de qualité internes et externes appropriés.

Il devient crucial d'évaluer la pertinence clinique des biopsies liquides à différents moments en fonction de l'application, telle que la stratification du patient, l'évaluation de la réponse au traitement, de l'efficacité et de la résistance, ainsi que de valider ces données dans le cadre de vastes études cliniques multicentriques.

5/CONCLUSION

Actuellement, aucun dosage de biomarqueurs circulants (CTC, ctDNA, recherche ciblées ou non, TEP, exosomes) n'est prêt pour le dépistage d'une population à grande échelle. Certaines applications des biopsies liquides allient d'ores et déjà science et clinique mais elles restent minoritaires (recherche de mutation de l'EGF-R). Les limites principales restent inhérentes aux recherches débutantes : robustesse et reproductibilité. Les premières études à grande échelle et autres méta analyses ainsi que la standardisation des procédures vont permettre de contrecarrer ces limites et de franchir le cap de la promesse.

Il ne faut pas oublier les questionnements éthiques entourant le dépistage: le sur-diagnostic et le sur-traitement qui peuvent entraîner une surmédicalisation délétère pour le patient mais aussi pour la société avec des prises en charge invasives puis des suivis coûteux inutiles. Cette notion est d'autant plus importante que la puissance potentielle des biopsies liquides (dépistage multi cancer comme le test CancerSEEK) semble sans fin.

Il est donc essentiel, comme dans toute (r)évolution, d'en faire bon usage et d'espérer que les chercheurs et surtout leurs financeurs respectent le principe fondateur de notre médecine : « Primum non nocere ». En se concentrant sur plusieurs objectifs comme aider à mieux évaluer les risques d'évolution et d'agressivité d'un cancer localisé, pour ensuite adapter plus finement la stratégie thérapeutique en fonction de cette évaluation personnalisée de la gravité, et ainsi améliorer la qualité de vie tout en limitant le risque de surtraitement.

L'autonomisation du patient est primordiale dans notre pratique quotidienne, il doit faire un choix en connaissant les tenants et aboutissants de ses actes, mais ce choix doit être facilité par une communication claire et sincère des professionnels de santé. Et la Médecine Générale doit y jouer activement un rôle central. Mais pour cela elle a aussi besoin d'être à la fois formée et informée.

6/ BIBLIOGRAPHIE

- (1) OMS Globocan 2018, [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>
- (2) INCa 2017, [cité le 14 juin 2019] [En ligne]. <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Projection-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-en-France-metropolitaine-en-2017-Rapport-technique>
- (3) 10ème Congrès de Médecine Générale. Dossier de presse, [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://studylibfr.com/doc/6611881/here>
- (4) MIT Technologies Review Insights [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://www.technologyreview.com/lists/technologies/2015/>
- (5) FORBES, Reenita Das [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://www.forbes.com/sites/reenitadas/2016/03/30/top-5-technologies-disrupting-healthcare-by-2020/#71b375406826>
- (6) The Wall Street Journal, Eric Topol [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://www.wsj.com/articles/eric-topol-and-stephen-r-quake-a-stethoscope-for-the-next-200-years-1420242913>
- (7) Goldman Sachs, Buzzwords, Isaac Ro [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://www.goldmansachs.com/insights/pages/buzzwords/index.html?playlist=0&video=0>
- (8) FDA, Department of Health & Human Services, [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/K073338.pdf
- (9) FDA News Release [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-blood-test-detect-gene-mutation-associated-non-small-cell-lung-cancer>
- (10) Guide ESMO à l'usage des patients. ESMO médecine personnalisée, [cité le 14 juin 2019]. <https://www.esmo.org/content/download/46498/855044/file/ESMO-Medecine-Personnalisee-Guide-Pour-les-Patients.pdf>
- (11) HAS : Actualisation des recommandations de la trisomie 21, [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://www.sfmpp.org/2019/01/31/has-actualisations-des-recommandations-dpn-de-la-trisomie-21/>
- (12) Cancer Today Magazine, Practical Knowledge from the American Association for Cancer Research, [cité le 14 juin 2019], [En ligne]. <https://www.cancertodaymag.org/Pages/Spring2016/A-Blood-Test-for-Cancer-Liquid-Biopsies.aspx>
- (13) France 3 Aquitaine, Iset, le test sanguin qui révolutionne le dépistage du cancer, [cité le 17 juin 2019], [En ligne]. <https://france3-regions.francetvinfo.fr/nouvelle-aquitaine/gironde/bordeaux/iset-test-sanguin-qui-revolutionne-depistage-du-cancer-1283351.html>
- (14) Tadimety, A., Closson, A., Li, C., Yi, S., Shen, T., & Zhang, J. X. (2018). Advances in liquid biopsy on-chip for cancer management: Technologies, biomarkers, and clinical analysis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 55(3), 140-162.
- (15) American Association for Cancer Research, Cancer Research Review [cité le 17 juin 2019], [En ligne]. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/early/2013/10/21/0008-5472.CAN-13-2030.full.pdf>
- (16) Jia, S., Zhang, R., Li, Z., & Li, J. (2017). Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(33), 55632.
- (17) Prix Galien USA 2009 [cité le 17 juin 2019], [En ligne]. http://old.galienfoundation.org/_documents/20090930.pdf
- (18) Innovation & Galien, Le Prix Galien France. [cité le 17 juin 2019], [En ligne].

- <https://www.prixgalien.fr/presentation-du-prix-galien-france/>
- (19) JANSEN, Notice CellSeach, [cité le 17 juin 2019], [En ligne].
https://documents.cellsearchctc.com/pdf/e631600011/e631600011_FR.pdf
- (20) Thèse Qian TU, Application de la technique CellSearch Veridex pour la détection de cellules tumorales dans les liquides biologiques chez les patients atteints de cancers, Juillet 2015. [cité le 17 juin 2019], [En ligne]. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2015_0066_TU.pdf
- (21) INESS, Dominique Arsenault, Cellules tumorales circulantes dans les cas de cancer du sein: utilisation clinique du test CellSearch, Sept 2016, [cité le 17 juin 2019], [En ligne].
- (22) Huang, X., Gao, P., Song, Y., Sun, J., Chen, X., Zhao, J., ... & Wang, Z. (2015). Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC cancer*, 15(1), 202.
- (23) Yang, C., Zou, K., Yuan, Z., Guo, T., & Xiong, B. (2018). Prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in patients with gastric cancer: evidence from a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 11, 1013.
- (24) Yan, W. T., Cui, X., Chen, Q., Li, Y. F., Cui, Y. H., Wang, Y., & Jiang, J. (2017). Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Scientific reports*, 7, 43464.
- (25) Sistigu, A., Di Modugno, F., Manic, G., & Nisticò, P. (2017). Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. *Cytokine & growth factor reviews*, 36, 67-77.
- (26) Kallergi, G., Papadaki, M. A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V., & Agelaki, S. (2011). Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 13(3), R59.
- (27) Kasimir-Bauer, S., Hoffmann, O., Wallwiener, D., Kimmig, R., & Fehm, T. (2012). Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Research*, 14(1), R15
- (28) Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... & Campbell, L. L. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715.
- (29) Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., & Kasimir-Bauer, S. (2009). Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 11(4), R46.
- (30) Amazon, Tuer le cancer, P.Paterlini Brechot [cité le 20 juin 2019], [En ligne].
<https://www.amazon.fr/Tuer-cancer-Patrizia-Paterlini-Br%C3%A9chot/dp/2234080460>
- (31) France Inter, Grand Bien Vous Fasse ! Podcast « Un espoir contre le cancer » 06/02/2017, [cité le 20 juin 2019], [En ligne]. <https://www.franceinter.fr/emissions/grand-bien-vous-fasse/grand-bien-vous-fasse-06-fevrier-2017>
- (32) La Nouvelle République, 18/10/2018, [cité le 20 juin 2019], [En ligne].
<https://www.lanouvellerepublique.fr/tours/patrizia-paterlini-brechot-veut-tuer-le-cancer>
- (33) Le Point, Anne Jeanblanc, 18/01/2017, [cité le 20 juin 2019], [En ligne].
https://www.lepoint.fr/editos-du-point/anne-jeanblanc/patrizia-paterlini-brechot-est-bien-determinee-a-tuer-le-cancer-18-01-2017-2098053_57.php
- (34) Elle Magazine, Isabelle Duriez, 20/01/2017, [cité le 20 juin 2019], [En ligne].
<https://www.elle.fr/Societe/Interviews/Patrizia-Paterlini-Brechot-la-tueuse-de-cancer-3413881>
- (35) Youtube, TEDxTalks, 08/02/2016, [cité le 20 juin 2019], [En ligne].
<https://www.youtube.com/watch?v=LNQ5UeWqK9I>
- (36) Office Européen des Brevets, Finaliste du Prix de l'inventeur européen 2019, [cité le 20

- juin 2019], [En ligne]. https://www.epo.org/learning-events/european-inventor/finalists/2019/paterlini-brechot_fr.html
- (37) Kallergi, G., Politaki, E., Alkahtani, S., Stournaras, C., & Georgoulas, V. (2016). Evaluation of isolation methods for circulating tumor cells (CTCs). *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(3-4), 411-419.
- (38) Farace, F., Massard, C., Vimond, N., Drusch, F., Jacques, N., Billiot, F., ... & Le Moulec, S. (2011). A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *British journal of cancer*, 105(6), 847.
- (39) Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J. M., Padovani, B., ... & Hofman, P. (2014). "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one*, 9(10), e111597.
- (40) Zhang, L., Liang, Y., Li, S., Zeng, F., Meng, Y., Chen, Z., ... & Yu, F. (2019). The interplay of circulating tumor DNA and chromatin modification, therapeutic resistance, and metastasis. *Molecular cancer*, 18(1), 36.
- (41) Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., & Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta*, 313(1-2), 139-142.
- (42) Delgado, P. O., Alves, B. C. A., de Sousa Gehrke, F., Kuniyoshi, R. K., Wroclavski, M. L., Del Giglio, A., & Fonseca, F. L. A. (2013). Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumor Biology*, 34(2), 983-986.
- (43) Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D., & Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61(4), 1659-1665.
- (44) Diaz Jr, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology*, 32(6), 579.
- (45) El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F., & Thierry, A. R. (2013). Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, 424, 222-230.
- (46) Parpart-Li, S., Bartlett, B., Popoli, M., Adleff, V., Tucker, L., Steinberg, R., ... & Browner, I. (2017). The effect of preservative and temperature on the analysis of circulating tumor DNA. *Clinical Cancer Research*, 23(10), 2471-2477.
- (47) Soria, J. C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., ... & Okamoto, I. (2018). Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *New England journal of medicine*, 378(2), 113-125.
- (48) FDA, 19/04/2018, [cité le 24 juin 2019], [En ligne]. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-osimertinib-first-line-treatment-metastatic-nsclc-most-common-egfr-mutations>
- (49) Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., ... & Fujita, Y. (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *New England Journal of Medicine*, 362(25), 2380-2388.
- (50) Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Feng, J., Liu, X. Q., Wang, C., ... & Lu, S. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The lancet oncology*, 12(8), 735-742.
- (51) Tan, C. S., Gilligan, D., & Pacey, S. (2015). Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *The lancet oncology*, 16(9), e447-e459.
- (52) Morgillo, F., Della Corte, C. M., Fasano, M., & Ciardiello, F. (2016). Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. *ESMO open*, 1(3), e000060.
- (53) Tan, C. S., Cho, B. C., & Soo, R. A. (2016). Next-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor receptor-mutant non-small cell

lung cancer. *Lung cancer*, 93, 59-68.

(54) Ballard, P., Yates, J. W., Yang, Z., Kim, D. W., Yang, J. C. H., Cantarini, M., ... & Box, M. (2016). Preclinical comparison of osimertinib with other EGFR-TKIs in EGFR-mutant NSCLC brain metastases models, and early evidence of clinical brain metastases activity. *Clinical Cancer Research*, 22(20), 5130-5140.

(55) Goss, G., Tsai, C. M., Shepherd, F. A., Bazhenova, L., Lee, J. S., Chang, G. C., ... & Han, J. Y. (2016). Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The lancet oncology*, 17(12), 1643-1652.

(56) Mok, T. S., Wu, Y. L., Ahn, M. J., Garassino, M. C., Kim, H. R., Ramalingam, S. S., ... & Lee, C. K. (2017). Osimertinib or platinum–pemetrexed in EGFR T790M–positive lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 376(7), 629-640.

(57) Tan, C. S., Kumarakulasinghe, N. B., Huang, Y. Q., Ang, Y. L. E., Choo, J. R. E., Goh, B. C., & Soo, R. A. (2018). Third generation EGFR TKIs: current data and future directions. *Molecular cancer*, 17(1), 29.

(58) HAS, Comité de Transparence, 13/09/2017, [cité le 28 juin 2019], [En ligne].

https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-15996_TAGRISSO_PIC_REEV_Avis3_CT15996.pdf

(59) Mhanna, L., Guibert, N., Milia, J., & Mazieres, J. (2019). When to Consider Immune Checkpoint Inhibitors in Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Cancer?. *Current treatment options in oncology*, 20(7), 60.

(60) Clinical Lab Products Magazine, 08/05/2015, [cité le 28 juin 2019], [En ligne].

<http://www.clpmag.com/2015/05/liquid-biopsies-less/>

(61) Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C., Modlin, L. A., ... & Shrager, J. B. (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature medicine*, 20(5), 548.

(62) Newman, A. M., Lovejoy, A. F., Klass, D. M., Kurtz, D. M., Chabon, J. J., Scherer, F., ... & Zhou, L. (2016). Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nature biotechnology*, 34(5), 547.

(63) Thierry, A. R., & Tanos, R. (2018). La biopsie liquide-Une voie possible pour le dépistage du cancer. *médecine/sciences*, 34(10), 824-832.

(64) AACR, Karen Honey, 26/04/2016, FDA Approves Blood-based Colorectal Cancer Screening Test, [cité le 28 juin 2019], [En ligne]. <https://blog.aacr.org/fda-approval-epi-pro-colon-colorectal-cancer/>

(65) Johnson, D. A., Barclay, R. L., Mergener, K., Weiss, G., König, T., Beck, J., & Potter, N. T. (2014). Plasma Septin9 versus fecal immunochemical testing for colorectal cancer screening: a prospective multicenter study. *PloS one*, 9(6), e98238.

(66) Song, L. L., & Li, Y. M. (2016). Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: An overview of colorectal cancer screening tests. *World journal of gastrointestinal oncology*, 8(11), 793.

(67) Wu, D., Zhou, G., Jin, P., Zhu, J., Li, S., Wu, Q., ... & Han, X. (2016). Detection of colorectal cancer using a simplified SEPT9 gene methylation assay is a reliable method for opportunistic screening. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(4), 535-545.

(68) Association Française de Formation Médicale Continue en Hépto-Gastro-Entérologie, POST'U 2013 – Paris, Patrice Pienkowski, [cité le 28 juin 2019], [En ligne].

<https://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/file/pdf-2013/actualites-nouveaux-outils.pdf>

(69) Youtube, Inserm, Le séquençage du génome, 12/04/2018, [cité le 28 juin 2019], [En ligne]. <https://www.youtube.com/watch?v=TCnG7R50IIU>

(70) Zhou, Q., Moser, T., Perakis, S., & Heitzer, E. (2017). Untargeted profiling of cell-free circulating DNA. *Translational Cancer Research*, 7(2), S140-S152.

- (71) Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., ... & Mc Henry, K. T. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, *463*(7283), 899.
- (72) Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, *33*(3), 967-978.
- (73) Greening, D. W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B. J., & Simpson, R. J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. In *Proteomic Profiling* (pp. 179-209). Humana Press, New York, NY.
- (74) Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., ... & Kohli, M. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics*, *14*(1), 319.
- (75) Bryzgunova, O. E., Zaripov, M. M., Skvortsova, T. E., Lekchnov, E. A., Grigor'eva, A. E., Zaporozhchenko, I. A., ... & Laktionov, P. P. (2016). Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS One*, *11*(6), e0157566.
- (76) Lässer, C., Alikhani, V. S., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., ... & Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine*, *9*(1), 9.
- (77) Perkumas, K. M., Hoffman, E. A., McKay, B. S., Allingham, R. R., & Stamer, W. D. (2007). Myocilin-associated exosomes in human ocular samples. *Experimental eye research*, *84*(1), 209-212.
- (78) Gamperl, H., Plattfaut, C., Freund, A., Quecke, T., Theophil, F., & Gieseler, F. (2016). Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin. *Cell biology international*, *40*(10), 1050-1061.
- (79) Madison, M. N., Roller, R. J., & Okeoma, C. M. (2014). Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*, *11*(1), 102.
- (80) Keller, S., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., Lugert, S., ... & Altevogt, P. (2007). CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney international*, *72*(9), 1095-1102.
- (81) Skriner, K., Adolph, K., Jungblut, P. R., & Burmester, G. R. (2006). Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *54*(12), 3809-3814.
- (82) Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, *2*(8), 569.
- (83) Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, *7*(3), 789.
- (84) Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., ... & Reissfelder, C. (2015). Glypican1 identifies cancer exosomes and facilitates early detection of cancer. *Nature*, *523*(7559), 177.
- (85) Wang, S., Qiu, Y., & Bai, B. (2019). The Expression, Regulation, and Biomarker Potential of Glypican-1 in Cancer. *Frontiers in oncology*, *9*.
- (86) Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M. T., ... & Singh, S. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, *527*(7578), 329.
- (87) Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., ... & Xiang, J. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature cell biology*, *17*(6), 816.
- (88) Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., ... & Ntadori-Hoshino, A. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor

- cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6), 883.
- (89) Lunavat, T. R., Cheng, L., Einarsdottir, B. O., Bagge, R. O., Muralidharan, S. V., Sharples, R. A., ... & Lötval, J. (2017). BRAFV600 inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), E5930-E5939.
- (90) Bellavia, D., Raimondo, S., Calabrese, G., Forte, S., Cristaldi, M., Patinella, A., ... & Cirrincione, G. (2017). Interleukin 3-receptor targeted exosomes inhibit in vitro and in vivo Chronic Myelogenous Leukemia cell growth. *Theranostics*, 7(5), 1333.
- (91) Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhai, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341.
- (92) Best, M. G., Sol, N., Kooi, I., Tannous, J., Westerman, B. A., Rustenburg, F., ... & Ylstra, B. (2015). RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer cell*, 28(5), 666-676.
- (93) Nilsson, R. J. A., Karachaliou, N., Berenguer, J., Gimenez-Capitan, A., Schellen, P., Teixido, C., ... & van Keulen, M. (2016). Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(1), 1066.
- (94) Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., ... & Hruban, R. H. (2018). Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*, 359(6378), 926-930.
- (95) Kalinich, M., & Haber, D. A. (2018). Cancer detection: Seeking signals in blood. *Science*, 359(6378), 866-867.
- (96) Légifrance, Code de Santé Publique, [cité le 25 juillet 2019], [En ligne]. <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000006912897&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20040808>
- (97) Collège National des Généralistes Enseignants, Présentation du DES, 24/11/2012, [cité le 25 juillet 2019], [En ligne]. https://www.cnge.fr/la_pedagogie/presentation_du_des/
- (98) Bleyer, A., & Welch, H. G. (2012). Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *New England Journal of Medicine*, 367(21), 1998-2005.
- (99) Lichtenfeld, L. (2011). Overdiagnosed: Making people sick in the pursuit of health. *The Journal of clinical investigation*, 121(8), 2954-2954.
- (100) Gøtzsche, P. C., Hartling, O. J., Nielsen, M., Brodersen, J., & Jørgensen, K. J. (2009). Breast screening: the facts—or maybe not. *Bmj*, 338, b86.
- (101) Kalager, M., Zelen, M., Langmark, F., & Adami, H. O. (2010). Effect of screening mammography on breast-cancer mortality in Norway. *New England Journal of Medicine*, 363(13), 1203-1210.
- (102) Autier, P., Boniol, M., Gavin, A., & Vatten, L. J. (2011). Breast cancer mortality in neighbouring European countries with different levels of screening but similar access to treatment: trend analysis of WHO mortality database. *Bmj*, 343, d4411.
- (103) Paci, E. (2012). Summary of the evidence of breast cancer service screening outcomes in Europe and first estimate of the benefit and harm balance sheet. *Journal of medical screening*, 19(1_suppl), 5-13.
- (104) Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Benbrahim-Tallaa, L., Bouvard, V., Bianchini, F., & Straif, K. (2015). Breast-cancer screening—viewpoint of the IARC Working Group. *New England journal of medicine*, 372(24), 2353-2358.
- (105) Prescrire, Dépistage organisé des cancers du sein par mammographie : à faire évoluer. Lettre à la Ministre de la Santé, 14/10/2016, [cité le 15 août 2019], [En ligne]. <https://www.prescrire.org/Fr/3/31/52235/0/NewsDetails.aspx>

- (106) Ensemble améliorons le dépistage du cancer du sein concertation citoyenne et scientifique, Rapport du comité d'orientation, 09/2016, [cité le 15 août 2019], [En ligne]. <http://www.concertation-depistage.fr/wp-content/uploads/2016/10/depistage-cancer-sein-rapport-concertation-sept-2016.pdf>
- (107) Puliti, D., Duffy, S. W., Miccinesi, G., De Koning, H., Lynge, E., Zappa, M., & Paci, E. (2012). Overdiagnosis in mammographic screening for breast cancer in Europe: a literature review. *Journal of medical screening*, 19(1_suppl), 42-56.
- (108) MyPeBS, Dossier de Presse, 28/09/2018, [cité le 19 août 2019], [En ligne]. <http://www.unicancer.fr/sites/default/files/MyPeBS-DP.pdf>
- (109) Université Paris Sud, Le site d'actualité, Gaëlle Degrez, 07/09/2017, [cité le 19 août 2019], [En ligne]. <http://www.actu.u-psud.fr/fr/recherche/actualites-2017/cancer-du-sein-labelisation-d-un-projet-pour-reduire-les-risques-de-rechute.html>
- (110) Thèse Laksmipriya Le Bonheur, Dépistage organisé du cancer colorectal: évaluation d'un programme de dépistage de masse et défis éthiques, revue de la littérature. Octobre 2017, [cité le 19 août 2019], [En ligne]. <http://nuxeo.edel.univ-poitiers.fr/nuxeo/site/esupversions/43698409-a819-4ce6-b40b-b3e30a526b24>
- (111) Ustun, C., & Ceber, E. (2004). Ethical issues for cancer screenings Five countries—four types of cancer. *Preventive medicine*, 39(2), 223-229.
- (112) ABIM Foundation, Choosing Wisely, [cité le 22 août 2019], [En ligne]. <https://www.abimfoundation.org/what-we-do/choosing-wisely>
- (113) Smarter Medicine, Choosing Wisely Switzerland, [cité le 22 août 2019], [En ligne]. <https://www.smartermedicine.ch/fr/page-daccueil.html>
- (114) Choisir Avec Soins [cité le 22 août 2019], [En ligne]. <https://choisiravecsoin.org/>
- (115) Prescrire avec soins, déclinaison nantaise [cité le 22 août 2019], [En ligne]. <https://www.pays-de-la-loire.ars.sante.fr/system/files/2017-06/Pertinence-1erJuin2017-Atelier3-MLAPOSTOLLE-DDURAND.pdf>

7/ GLOSSAIRE

MIT : Massachusetts Institute of Technology

OMS : Organisation Mondiale de la santé (WHO en anglais)

INCa : Institut National du Cancer

CMG : Collège de Médecine Générale

FDA : Food and Drug Administration

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

CTC : Cellules Tumorales Circulantes

AACR : American Association for Cancer Research

ctADN : ADN circulant tumoral

EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition

ISET : Isolation by Size of Epithelial Tumor cells

MPOC : maladie pulmonaire obstructive chronique

ctRNA : cell-free or circulating tumor RiboNucleosomiqueAcid

CPNPC : cancer du poumon non à petites cellules

TKI : inhibiteurs de a tyrosine kinase

SSP : survie sans progression

ESMO : European Society for Medical Oncology

SE : survie espérée

WES : Whole Exome Sequencing

WGS : Whole Genome Sequencing

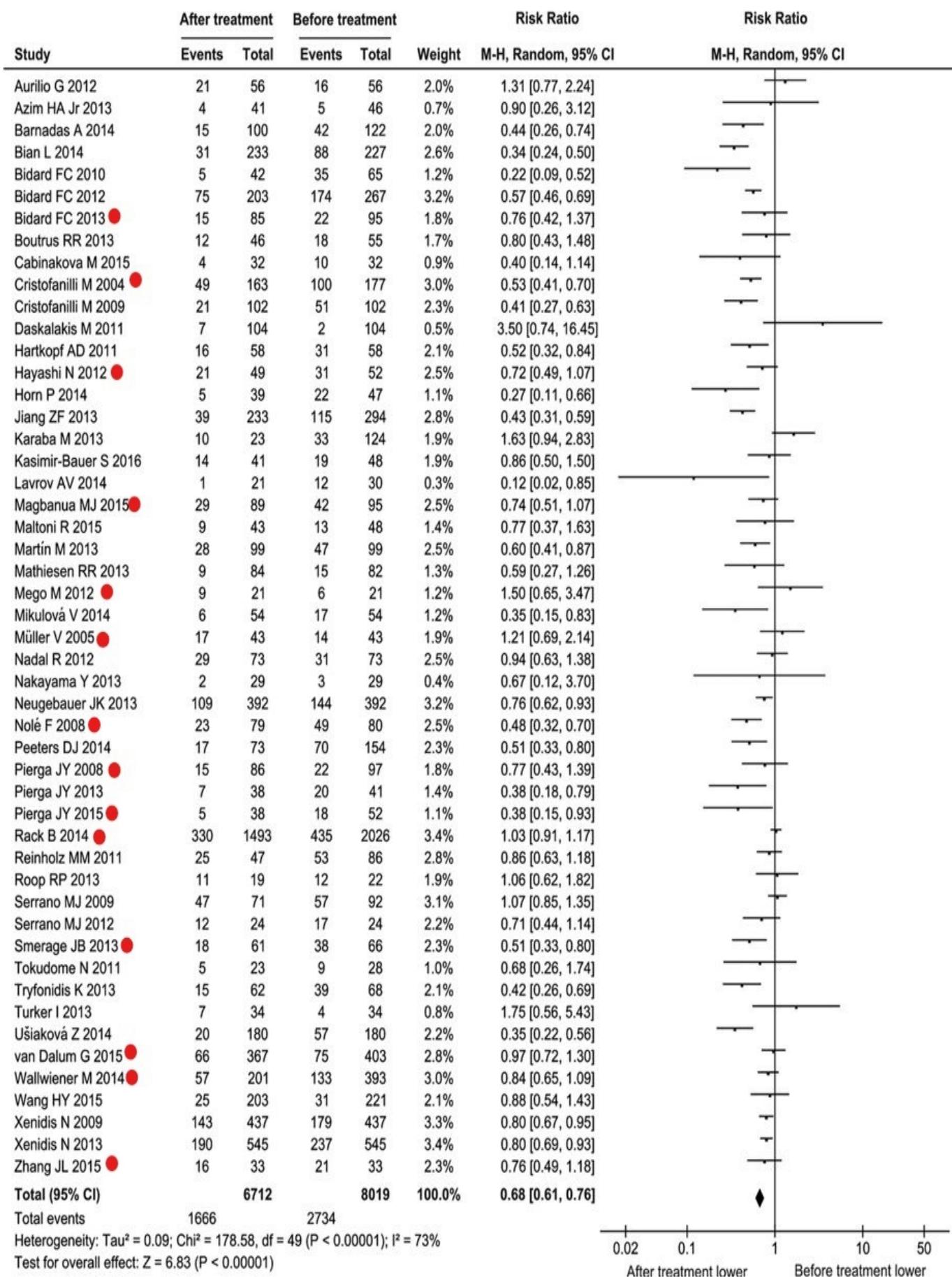
NGS : Next Generation Sequencing

SCNA : Somatic Copy Number Alteration

LMC : Leucémie myéloïde chronique

PSA : Prostate Specific Antigen

8/ ANNEXE 1



ANNEXE 2



DEMANDE D'ANALYSE DE CYTOMORPHOLOGIE SANGUINE ISET® VEUILLEZ REMPLIR LE FORMULAIRE EN LETTRES MAJUSCULES OU DE FACON LISIBLE

FR20190205

ATTESTATION D'INFORMATION ET RECUEIL DU CONSENTEMENT
PATIENT - COORDONNEES
NOM : NOM DE NAISSANCE :
PRENOM : DATE DE NAISSANCE :
SEXE : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> H
ADRESSE E-MAIL : TELEPHONE :
ADRESSE POSTALE COMPLETE :
.....
NATURE DU TEST
La Cytomorphologie Sanguine ISET® est une méthode innovante qui détecte les cellules non sanguines (donc autres que globules blancs, globules rouges et plaquettes) présentes dans le sang. Ces cellules sont appelées « Cellules Rares Circulantes » (CRC) parce qu'elles sont très rares et non détectables par les analyses sanguines courantes. Ces CRC sont de différents types et peuvent inclure des cellules dérivées de cancer. L'appareil Rarecells® isole les CRCs du sang, et permet leur identification par analyse cytomorphologique. Parmi les CRC peuvent exister des cellules cancéreuses circulantes ou CCC. La technique ISET permet de détecter et quantifier les CCC (Cellule Cancéreuse Circulante) dans le sang. Cette analyse est à la fois qualitative et quantitative L'analyse Cytomorphologique Sanguine selon la méthode ISET® détecte l'éventuelle invasion du sang par la tumeur au moment du prélèvement sanguin.
INDICATIONS DU TEST
L'analyse Cytomorphologique Sanguine ISET® est la méthode la plus sensible connue pour la détection des CCC. Elle peut être proposée dans les situations suivantes : <ul style="list-style-type: none">- Patients avec cancer solide au diagnostic : pour effectuer un bilan d'extension du cancer plus précis et complet et définir la meilleure stratégie thérapeutique.• Patients avec cancer solide au stade de rémission : pour surveillance et détection précoce du risque de récurrences.• Patients avec cancer solide au stade invasif : pour évaluer la réponse des CCC éventuellement détectées aux traitements (traitement efficace si disparition des CCC). L'analyse est valable pour tous types de cancer solide (tous types de cancer sauf leucémies et lymphomes). Ce test ne constitue pas un diagnostic médical.
RECOMMANDATIONS ET RISQUES
L'analyse Cytomorphologique Sanguine selon la méthode ISET® consiste en un prélèvement de sang. Pour les patients avec un cancer déjà diagnostiqué, le prélèvement de sang doit être réalisé à distance (au moins quatre semaines) de tout acte iatrogène (chirurgie, biopsie, explorations fonctionnelles) afin d'identifier la circulation spontanée des CCC dans le sang (invasion tumorale). Les seuls risques de la Cytomorphologie Sanguine ISET® sont les complications possibles de la prise de sang (hématome au point de ponction, malaise passager...).
LIMITES DU TEST ET INFORMATIONS SI LE TEST EST EFFECTUÉ EN DEHORS DES INDICATIONS PRECISEES CI-DESSUS CHEZ DES SUJETS SANS CANCER DIAGNOSTIQUE.
Les indications de l'analyse Cytomorphologique Sanguine ISET® effectuée chez des sujets sans cancer diagnostiqué peut être réalisée en cas de « Demande d'analyse de cytomorphologie sanguine ISET » dûment remplie par le prescripteur et le patient. Toutefois, il est nécessaire de rappeler aux patients qu'une seule étude scientifique a été publiée dans ce contexte *. En cas de résultat positif, la Cytomorphologie Sanguine ISET® n'indique pas l'organe d'origine des CCC, et n'est pas prédictive quant au délai de détection de la tumeur par imagerie. Le résultat positif de l'analyse effectuée en l'absence de cancer diagnostiqué indique le besoin de surveillance du sujet avec les méthodes usuelles à évaluer selon l'avis du médecin (imagerie, analyses sanguines, endoscopie... etc.). *L'utilisation du test Cytomorphologie Sanguine ISET en surveillance de l'état de santé pour détection précoce d'un cancer invasif se réfère à la publication Ilie M et al, 2014**, une étude monocentrique qui a duré 6 ans. D'autres études de recherche clinique de ce type sont en cours, y compris des études de validation multicentriques. De ce fait, leurs résultats ne sont pas encore connus. **Ilie M et al: "Sentinel" Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease, PlosOne 2014.
RESULTATS
Le délai habituel d'obtention des résultats est 15 jours ouvrables (3 semaines) à réception du filtre ISET® par le Centre lecteur de Cytomorphologie. Dans des cas exceptionnels le délai peut être de 20 jours ouvrables. La sensibilité d'isolement des CCC par la technologie ISET® est d'une CCC dans 10ml de sang. La spécificité est celle déterminée par la lecture au microscope qui est réalisée par des cytopathologistes spécialisés. La technologie ISET® a été validée par plus de 50 publications scientifiques internationales indépendantes (voir www.rarecells.com et www.isetbyrarecells.com) sur plus de 2000 patients. Le résultat positif (présence et nombre de CCC) indique l'invasion tumorale du compartiment sanguin si les recommandations de prélèvement ont été respectées. Un résultat négatif signifie que le sang du patient ne contient pas de CCC détectables au moment de l'examen.

ANNEXE 2 (suite)

Dans de très rares cas, des éventuelles difficultés de réalisation et/ou interprétation du test peuvent survenir. Une nouvelle analyse sera alors réalisée sans frais.

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ DU PATIENT : CYTOMORPHOLOGIE SANGUINE ISET®

Je soussigné(e), M, Mme, Mlle, (nom, prénom, nom de naissance) :

- Atteste avoir reçu ce jour une information loyale, claire et adaptée (voir texte ci-dessus) qui porte sur : les caractéristiques de l'analyse Cytomorphologie Sanguine ISET® ; ses indications, recommandations, limites et risques ; les modalités de rendu de résultat ; les modalités de prise en charge.
- Avoir pu poser toutes les questions concernant l'analyse Cytomorphologie Sanguine ISET® de telle sorte que j'ai pris note des bénéfices attendus, du risque d'échec ou de résultats décevants. A cet effet les explications fournies l'ont été en termes suffisamment clairs dans un temps suffisamment raisonnable pour me permettre d'arrêter mon choix, et que j'ai été informé(e) que je pouvais bénéficier dans cette intervalle de toute information complémentaire.
- Demande librement d'effectuer l'analyse « Cytomorphologie Sanguine ISET® » pour la recherche de Cellules Rares Circulantes (CRC).
- Je m'engage à me soumettre à toutes les recommandations et précautions qui me seront prescrites à l'occasion de la réalisation de l'analyse Cytomorphologie Sanguine ISET®

Ce consentement constitue une reconnaissance d'information.

Je décide de faire don, sous forme anonyme, de mes données cliniques et des résultats de mes examens de biologie médicale et d'anatomopathologie recueillis lors de la réalisation du prélèvement pour réalisation du test ISET par le laboratoire d'analyses médicales en charge des dits examens, responsable du traitement des données, à toute institution, équipes biomédicale, publique ou privée, aux fins de recherche médicale, d'enquête, de statistique médicale, d'évaluation diagnostique et thérapeutique dans le but d'aider la recherche contre le cancer. Une notice d'information complémentaire relative à mes droits concernant le traitement de mes données personnelles me sera remise par le laboratoire responsable du traitement des données lors du prélèvement pour la réalisation du test ISET.

Je refuse de faire don de mes données cliniques et des résultats de mes examens de biologie médicale et d'anatomopathologie pour aider la recherche contre le cancer.

Le médecin soussigné conserve la copie du présent document et l'original m'est remis pour que je le présente au laboratoire effectuant le prélèvement.

ATTESTATION D'INFORMATION PAR LE MEDECIN :

Je soussigné Docteur

Atteste avoir reçu en consultation ce jour le (la) patient(e) signataire et lui avoir précisément expliqué le but, les modalités ainsi que les limites de l'analyse Cytomorphologie Sanguine ISET® et demande au laboratoire de bien vouloir réaliser pour le (la) patient(e) signataire **une analyse Cytomorphologique Sanguine selon la méthode ISET.**

CONFIDENTIALITE- DONNEES PATIENT

Le médecin s'engage à assurer le strict respect des données confidentielles du patient. A cet effet il s'engage à collecter, utiliser, diffuser et en général traiter les données du patient en stricte conformité avec les mentions d'information, et les consentements, dans le cadre des autorisations ou exigences expresses de législation en matière de protection des données personnelles.

A cet effet et conformément à l'article 13 du Règlement Européen du 27 avril 2016 relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel, vous êtes informé(e) que les données collectées par le présent formulaire sont appelées à faire l'objet d'un traitement de données à caractère personnel à des fins de gestion de vos dossiers d'analyses de biologie médicales incluant notamment des notifications de disponibilité de résultats. Ces données à caractère personnel sont traitées sur la base de votre consentement. Vous disposez néanmoins d'un droit d'accès, de rectification ou d'effacement de vos données qui vous concernent. Vous pouvez également en demander la limitation ou la portabilité dans les conditions exprimées par le Règlement Européen du 27 avril 2016. Par ailleurs vous êtes informé(e) que vous avez la possibilité d'introduire une réclamation auprès de la CNIL si vous estimez que ce traitement de données à caractère personnel ne répond pas aux exigences légales et administratives en vigueur

PATIENT : Date et signature de l'intéressé(e) :	MEDECIN : Nom et prénom : E-mail : Téléphone : Cachet et signature :	Date : _____
LABORATOIRE D'EXAMENS DE BIOLOGIE MEDICALE		
Date du prélèvement :	Cachet du laboratoire :	

Note : La marque ISET® est une marque déposée qui garantit l'excellence de la réalisation des différentes étapes du test Cytomorphologie Sanguine ISET®

ANNEXE 2 (suite)

INFORMATIONS MEDICALES IMPORTANTES POUR L'ANALYSE CYTOMORPHOLOGIE SANGUINE ISET®

VEUILLEZ REMPLIR LE FORMULAIRE EN LETTRES MAJUSCULES OU DE FACON LISIBLE

Remarque : Les informations médicales demandés (voir ci-dessous) sont importantes pour l'information du Cytopathologiste. A titre d'exemple, certains traitements peuvent endommager les cellules qui se trouvent dans le sang, ou encore certains cancers sont caractérisés par des cellules tumorales plus ou moins atypiques. Ainsi, merci d'apporter le plus possible de renseignements dans la fiche suivante.

Avez-vous déjà eu un cancer diagnostiqué ? Oui Non

Si vous avez répondu OUI, merci de fournir les renseignements suivants A et B (à remplir par votre médecin et/ou par vous-même).

Si vous avez répondu NON, merci de vous reporter directement au B. (à remplir par votre médecin et/ou par vous-même).

SECTION A - Diagnostic de Cancer	
Informations concernant votre cancer	Bilan d'extension au diagnostic
Type de cancer (organe) : _____ Date du diagnostic : _____ Type histologique : _____ Classification TNM : _____ Grade : _____	Taille de la tumeur : _____ Ganglions atteints : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Si oui, combien et localisation : _____ Présence de métastases : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Si oui, combien et localisation : _____
Thérapies effectuées	Date et type(s) dernier(s) traitement(s)
<input type="checkbox"/> Chimiothérapie préopératoire : _____ <input type="checkbox"/> Chirurgie : o Nombre d'interventions : _____ o Dates et sites opérés : _____ <input type="checkbox"/> Bilan d'extension per-opératoire : Ganglions atteints : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Si oui, combien et localisation : _____ Présence de métastases : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Si oui, combien et localisation : _____ <input type="checkbox"/> Chimiothérapie et/ou hormonothérapie post-opératoire (laquelle et dates) : _____ <input type="checkbox"/> Radiothérapie (dates et localisation) : _____	Chirurgie (dates) : _____ Radiothérapie (dates) : _____ Chimiothérapie (dates) : _____ Hormonothérapie (dates) : _____

3/4

ANNEXE 2 (suite)

SECTION B - Informations concernant vos antécédents familiaux de cancer et votre mode de vie	
Antécédents familiaux de cancer	
Cancres diagnostiqués à des membres de votre famille : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ○ Type de Parenté : _____ ○ Type de Cancer : _____ ○ Age au diagnostic : _____ ○ Type de Parenté : _____ ○ Type de Cancer : _____ ○ Age au diagnostic : _____ ○ Type de Parenté : _____ ○ Type de Cancer : _____ ○ Age au diagnostic : _____	
Modes de vie	Pathologies Inflammatoires / Auto-immunes
<input type="checkbox"/> Alcool - Vin – Nombre de verres : ○ Par jour ○ Par semaine ○ Nombre d'années <input type="checkbox"/> Alcool - Spiritueux – Type : _____ Nombre de verres à spiritueux : ○ Par jour ○ Par semaine ○ Nombre d'années <input type="checkbox"/> Tabac : ○ Type (cigarettes, cigare, autre) : _____ ○ Nombre par jour : _____ ○ Nombre d'années : _____ <input type="checkbox"/> Activité Sportive (A détailler) _____ _____ <input type="checkbox"/> Traitements passés (ex hormones) et en cours : _____ _____ <input type="checkbox"/> Traitements en cours : _____ _____	<input type="checkbox"/> Bronchique _____ <input type="checkbox"/> Intestinale _____ <input type="checkbox"/> Hépatite _____ <input type="checkbox"/> Pathologies de la coagulation _____ <input type="checkbox"/> Contact avec des toxiques pour des raisons professionnelles ou occasionnelles (ex peintres, pompistes, travailleurs avec antiparasitaires etc..) : _____ _____ _____ <input type="checkbox"/> Pathologies auto-immunes : _____ _____ <input type="checkbox"/> Autres : _____

ANNEXE 3

Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme,

par P. MANDEL et P. MÉTAIS.

Sujet	Sexe	Age	Affection	P phospho- protéine mg.	P ribonu- cléique mg.	P desoxyri- bonu- cléique mg.	P total acides nucléiques mg.
1	F	42	Normal	0	5,0	1,2	6,2
2	F	22	»	0	4,0	0,4	4,4
3	H	24	»	0	5,2	1,3	6,5
4	F	27	»	0	4,7	0,3	5,0
5	F	20	»	0	3,7	0,8	4,5
6	H	48	»	0	4,6	1,3	5,9
7	H	45	»	0	4,5	0,6	5,1
8	H	26	»	0	5,0	0,2	5,2
9	F	37	»	0	4,8	0,6	5,4
10	H	39	»	0	5,0	0,9	5,9
11	H	62	Insuffis. card.	0	3,8	0,7	4,5
12	H	62	»	0	3,8	0,45	4,25
13	H	42	»	0	5,1	0,9	6,0
14	F	33	Endocard. maligne	0	3,35	0,65	4,0
15	H	19	Goutte	0	3,5	0,8	4,3
16	F	5	Basedow	0	5,6	0,4	6,0
17	H	48	Diabète	0	3,6	0,3	3,9
18	H	61	»	0	3,6	0,4	4,0
19	H	48	Cirrhose	0	3,5	0,4	3,9
20	F	52	Ictère	0	5,3	1,2	6,5
21	H	48	Goutte	0	3,6	0,4	4,0
21	»	»	»	0	3,5	1,0	4,5
21	»	»	»	0	2,66	0,8	3,46
22	H	33	Goutte	0	5,5	0,5	6,0
22	»	»	»	0	4,75	0,75	5,5
23	H	26	Néphrite	0	3,75	0,7	4,45
24	H	37	Tuberculose	0	3,5	0,45	3,95
25	F	23	Grossesse 7 ^e m.		7,65	1,35	9,0
25	»	»	»		7,25	1,00	8,25

BIOLOGIE. COMPTES RENDUS. — N° 3-4, 1948. T. CXLII.

ANNEXE 4



Plateforme de Biologie Moléculaire des Tumeurs solides
Pôle de Biologie Pathologie Génétique
Service de Biochimie- Secteur Oncologie moléculaire
CHRU Lille - CS 7001
59 037 LILLE CEDEX

Recherche des mutations L858R, T790M et délétion exon 19 du gène *EGFR* sur ADN circulant à partir d'un prélèvement sanguin

➤ **Indication** : Recherche de mutations du gène *EGFR* en l'absence de tissu pulmonaire/métastatique disponible (ou tissu non contributif) dans un cadre diagnostique avant mise sous traitement anti-EGFR d'un Cancer bronchique Non à Petites Cellules (CBNPC) ou à récidive

➤ Identité du patient

Nom : Nom d'épouse : Prénom :

Date de naissance :/...../..... Sexe : Masculin Féminin

➤ Renseignements cliniques

Statut tabagique : Non fumeur (consommation totale < 100 cigarettes)
 Ancien fumeur Année de début : Année d'arrêt :
 Fumeur Actif Consommation (paquet/jour) :
 Tabagisme passif

➤ Renseignements concernant le cancer pulmonaire

- Anatomopathologie disponible Non Oui

Si oui, quel est le diagnostic histologique ? :
date du diagnostic :

- Métastase : Non Oui

Foie Os
 Cerveau Surrénale
 Ganglion extrathoracique Autre :

- Recherche de mutation déjà effectuée Non Oui non contributif
Si oui, résultat :

- **Projet thérapeutique** Le résultat de la recherche de mutations EGFR servira à :

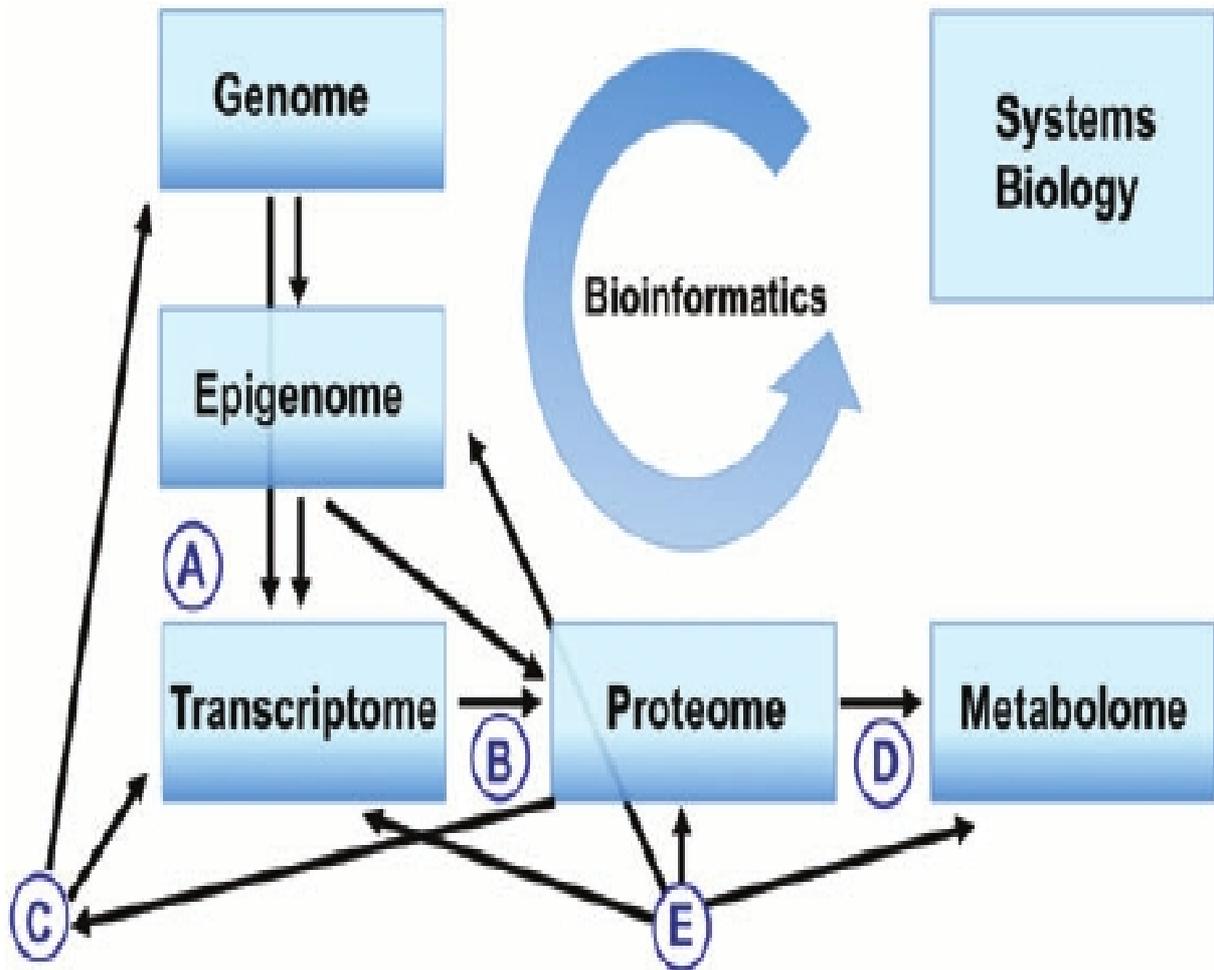
Un traitement de 1^{ère} ligne par TKI
 Un traitement de 2^{ème}/3^{ème} ligne par TKI
Dans ce cas, quel est le traitement antérieur ou en cours :

identifier un mécanisme de résistance (récidive sous TKI) :
 traitement par TKI en cours depuis combien de temps ?
 quel TKI ?

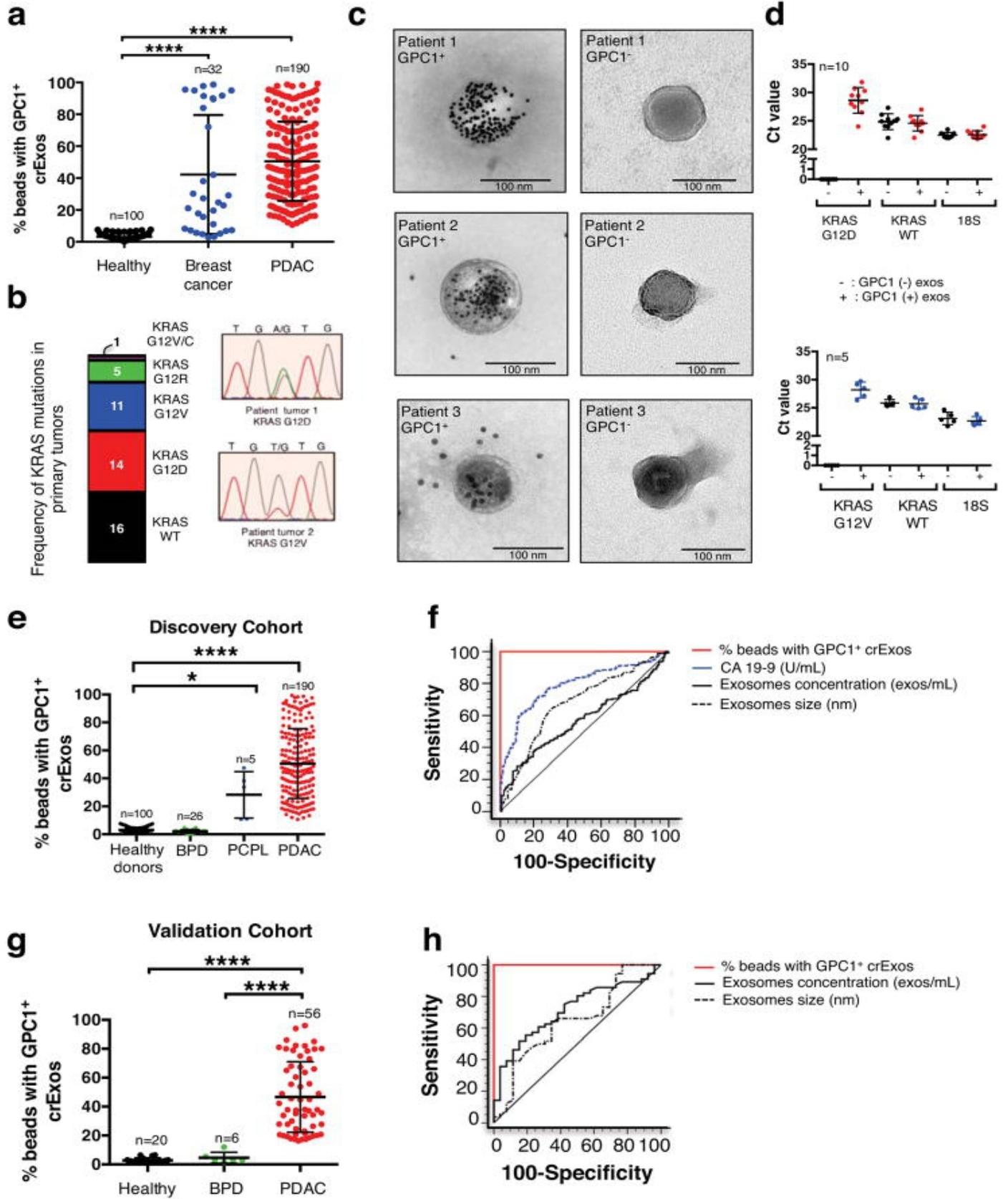
ANNEXE 5

Essais Plasma	Sensibilité n / N (%)		Spécificité n / N (%)		T790 M plasmatique positif / histologie négative (%)	Référence
	EGFR	T790 M après PD sur TKI	EGFR	T790 M après PD sur TKI		
Digital PCR, Microdroplet PCR numérique, microgouttelette	49/60 (81,7)	33/45 (73,3)	2/3 (66,7)	9/18 (50)	9/18 (50)	Kartovich 2016 (Roci)
	43/51 (84,3)	33/41 (80,5)	65/67 (97,0)	14/24 (58,3)	10/24 (41,7)	Thress 2015 (AURA)
	112/136 (82,3)	111/158 (70,3)	78/80 (97,5)	40/58 (69,0)	18/40 (31,0)	Oxnard 2016
	N / A	6/9 (66,7)	N / A	5/7 (71,4)	2/7 (28,6)	Wang 2017
	25/33 (75,7)	20/31 (64,5)	7/8 (87,5)	7/10 (70)	3/10 (30)	Takahama 2016 (groupe d'oncologie de l'ouest du Japon)
PCR allèle-spécifique	9/10 (90)	12/17 (70,5)	28/28 (100)	5/6 (83,3)	1/6 (16,7)	Thress 2015 (AURA)
	30/37 (81,1)	5/17 (29,4)	38/38 (100)	6/6 (100)	0	Thress 2015 (AURA)
	43/51 (84,3)	30/41 (73,2)	65/67 (97,0)	16/24 (66,7)	8/24 (33,3)	Thress 2015 (AURA)
	55/75 (73,3)	21/33 (63,6)	24/24 (100)	61/62 (98,4)	1/62 (1,6)	Kartovich et al. 2016 (Roci)
	N / A	254/414 (61,3)	N / A	99/126 (78,6)	27/126 (21,4)	Jenkins 2017 (pool AURA + pool AURA2), exclut les patients dont les résultats plasmatiques sont inconnus
CTC	13/16 (81,2)	6/10 (60,0)	30/30 (100)	9/15 (60)	6/15 (40)	Sundaresan 2016
	N / A	5/9 (55,5)	N / A	7/12 (58,2)	5/12 (41,7)	Sundaresan 2016

ANNEXE 6



ANNEXE 7



RESUME

Introduction :

La recherche sur le cancer est en constante évolution, récemment le domaine des biopsies liquides connaît un essor important via des applications de recherches intéressant toutes les étapes du cancer mais soulevant dans le même temps des problématiques éthiques.

Matériel et Méthode :

Nous avons réalisé, entre juillet 2018 et juillet 2019, une revue narrative de la littérature via les sites de références, basée sur des mots clés ciblant les biopsies liquides mais également le surdiagnostic et le surtraitement.

Résultats :

Une centaine de références bibliographiques ont permis de faire un état des lieux des différents biomarqueurs des biopsies liquides. Nous avons cité les cellules tumorales circulantes via deux techniques reconnues CellSEARCH et ISET. Mais aussi les recherches basées sur l'ADN tumoral circulant avec notamment la recherche de mutation de l'EGF-R, la seule réalisée en clinique actuellement en France. Les techniques explorant le génome et l'exome ainsi que celles axées sur les Tumor Educated Platelet ou les exosomes ont été abordées. Les résultats issus de l'étude sur le test CancerSEEK ont été cités. Enfin nous avons évoqués les thèmes éthiques fondamentaux que sont le surdiagnostic et le surtraitement.

Discussion :

Plus scientifiques que cliniques les études prometteuses sur les biopsies liquides ne permettent pas encore de bouleverser la prise en charge oncologique. Mais les soins primaires doivent être informés de ces évolutions pour améliorer la communication médecin – patient et ainsi éviter les risques de surdiagnostic ou de surtraitement.

Mots clés : biopsies liquides, cellules tumorales circulantes, ADN tumoral, surdiagnostic, surtraitement, soins primaires.

SERMENT

ϕ±ϕ±ϕ

En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

ϕ±ϕ±ϕ

RESUME

Introduction :

La recherche sur le cancer est en constante évolution, récemment le domaine des biopsies liquides connaît un essor important via des applications de recherches intéressant toutes les étapes du cancer mais soulevant dans le même temps des problématiques éthiques.

Matériel et Méthode :

Nous avons réalisé, entre juillet 2018 et juillet 2019, une revue narrative de la littérature via les sites de références, basée sur des mots clés ciblant les biopsies liquides mais également le surdiagnostic et le surtraitement.

Résultats :

Une centaine de références bibliographiques ont permis de faire un état des lieux des différents biomarqueurs des biopsies liquides. Nous avons cité les cellules tumorales circulantes via deux techniques reconnues CellSEARCH et ISET. Mais aussi les recherches basées sur l'ADN tumoral circulant avec notamment la recherche de mutation de l'EGF-R, la seule réalisée en clinique actuellement en France. Les techniques explorant le génome et l'exome ainsi que celles axées sur les Tumor Educated Platelet ou les Exosomes ont été abordées. Les résultats issus de l'étude sur le test CancerSEEK ont été cités. Enfin nous avons évoqués les thèmes éthiques fondamentaux que sont le surdiagnostic et le surtraitement.

Discussion :

Plus scientifiques que cliniques les études prometteuses sur les biopsies liquides ne permettent pas encore de bouleverser la prise en charge oncologique. Mais les soins primaires doivent être informés de ces évolutions pour améliorer la communication médecin – patient et ainsi éviter les risques de surdiagnostic ou de surtraitement.

Mots clés : biopsies liquides, cellules tumorales circulantes, ADN tumoral, surdiagnostic, surtraitement, soins primaires.