

Chroniques génomiques

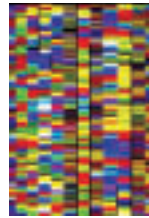
Des puces ADN en clinique ?

Bertrand Jordan

Les puces à ADN ne sont plus une curiosité, et rares sont aujourd'hui les laboratoires qui n'y ont pas recours à un stade ou à un autre de leurs travaux. Les *microarrays* « génome entier », représentant l'ensemble des trente mille gènes humains (pour autant que l'on soit arrivé à les définir) sont disponibles depuis plus de deux ans et, la concurrence aidant, sont devenus relativement abordables. L'utilisation de puces produites par l'industrie se généralise, et un effort soutenu de qualité et de standardisation aboutit à des résultats nettement plus fiables que par le passé, et raisonnablement cohérents d'une plate-forme à l'autre [1]. Un nouveau type d'application, l'analyse à très grande échelle des polymorphismes génétiques humains, intéresse beaucoup les entreprises pharmaceutiques qui cherchent à localiser les gènes impliqués dans diverses maladies plurifactorielles, et a ouvert un marché de masse supplémentaire sur lequel l'entreprise *Illumina*¹ dispute le leadership à *Affymetrix*, l'acteur historique du domaine. La toute récente découverte d'une variation fréquente du nombre de gènes (CNV, *copy number variation*) d'un individu humain à l'autre [2] va imposer la vérification de ce paramètre dans de très nombreuses études - et contribuer au développement du secteur.

Puces « cliniques » : une idée déjà ancienne

L'emploi de puces à ADN pour le diagnostic médical n'est pas une idée neuve : elle est apparue avec les premiers pas de la technologie, et a fait l'objet de publications dès la fin des années 1990 [3, 4]. Nombre d'articles ont affirmé qu'il était possible de distinguer différents types de leucémies, de cancers du sein ou de l'intestin à partir de leur profil d'expression : le patron d'expression d'une tumeur pourrait en indiquer le potentiel métastatique, prédire l'évolution de la maladie ou même l'efficacité à attendre de telle ou telle thérapie [5]. La plupart de ces travaux étaient critiquables sur le plan technique : hété-



rogénéité des échantillons, manque de reproductibilité des expériences² et caractérisation insuffisante des « sondes » présentes sur la puce [6]. L'interprétation des données obtenues était également sujette à caution, en raison notamment de la « malédiction de la dimensionnalité » inhérente à ce type d'étude. Il est difficile de traiter de manière statistiquement valable des résultats lorsqu'on examine l'expression de vingt mille gènes dans cinquante tumeurs en utilisant une technique qui donne des valeurs entachées d'un important coefficient de variabilité. Dans ces conditions, on peut certes observer des différences de patron et les corrélérer avec diverses évolutions cliniques, mais ces corrélations n'ont aucune validité statistique. Et, compte tenu du faible effectif des séries étudiées, bien des équipes ont commis de façon plus ou moins visible l'erreur qui consiste à vérifier la classification... en utilisant certains des échantillons qui ont permis de l'établir !

Mais ces errements sont, pour l'essentiel, derrière nous. Les chercheurs tout comme les *referees* des revues sont devenus plus exigeants, la qualité des microarrays et celle des analyses statistiques n'ont plus rien à voir avec les standards de 1999, et la stricte séparation entre *training set* et *validation set* est maintenant respectée. Pourtant, malgré de multiples annonces médiatiques, et en dépit d'un optimisme affiché dans les prévisions de chiffre d'affaires, la pénétration effective des puces à ADN dans le monde du diagnostic reste très limitée. De plus, elle concerne pour

Marseille-Nice Génopole,
case 901,
Parc Scientifique de Luminy,
13288 Marseille
Cedex 9, France.
brjordan@club-internet.fr

¹ *Illumina* emploie une technologie très ingénieuse faisant appel à des microbilles qui se placent dans des logements dont le diamètre est de trois micromètres seulement et réalise ainsi des *microrarrays* très miniaturisés à un coût modéré.

² La « culture du duplicat » a mis longtemps à s'imposer, notamment en raison du coût très élevé des puces à leurs débuts...

l'essentiel des systèmes visant à établir la présence ou l'absence de mutations (ou de délétions, ou de duplications) plutôt que l'exploitation pourtant si prometteuse des profils d'expression. Que se passe-t-il donc dans le petit monde des puces, et quelles difficultés s'opposent encore à leur irrésistible progression ?

Validité technique et utilité clinique

Il faut d'abord reconnaître que, dans la discussion des vastes perspectives médicales des *microarrays*, l'on a un peu perdu de vue les spécificités d'un diagnostic médical par rapport à une méthode destinée aux laboratoires de recherche. Un test clinique doit être irréprochable du point de vue technique, il doit rester fiable même s'il est effectué dans des conditions imparfaites³ et par un personnel relativement peu qualifié. La « manip ratée » n'a pas sa place dans ce contexte alors que, dans une équipe académique, elle peut, après interprétation, être un élément pédagogique ou même un facteur d'amélioration des protocoles. Par ailleurs, le résultat doit être sans ambiguïté, en noir et blanc, ou sous forme d'un index quantitatif à partir duquel pourront être prises des décisions cliniques. Il ne s'agit plus de manipuler des données sous *Excel* ou dans *GeneSpring*⁴, de formuler des hypothèses ou de discuter des interprétations...

Il faut encore, et surtout, que l'indication fournie ait une réelle utilité clinique, qu'elle oriente effectivement des décisions thérapeutiques. On cherche par exemple à éviter les chimiothérapies superflues dans le cancer du sein, puisqu'une partie seulement des tumeurs présente un potentiel métastatique, et que seules quelques unes d'entre elles répondent à la chimiothérapie. Les critères cliniques et histologiques actuels sont insuffisants pour faire ce choix *a priori* et, en conséquence, de nombreuses patientes subissent un traitement lourd et coûteux qui n'est réellement bénéfique que pour quelques unes d'entre elles... Selon de nombreux travaux, une mesure de profil d'expression pratiquée sur une partie de la tumeur après résection peut donner des informations sur l'agressivité du cancer et donc orienter le traitement. Mais il faut comprendre qu'un test scientifiquement et statistiquement valable, qui différencierait des femmes dont le risque métastatique est de 70 % et d'autres pour lesquelles il est de 20 %, n'aurait aucune conséquence pratique : les médecins tout comme les malades décideraient d'en passer par la chimiothérapie dans les deux cas⁵. Si le résultat n'est pas effectivement utilisé pour choisir le meilleur traitement, le test n'a pas de raison d'être. Ceci d'autant plus qu'il n'est pas facile d'en faire accepter la prise en charge par les assurances-maladie si son coût dépasse une

centaine d'euros : or les mesures utilisant des puces à ADN se situent actuellement bien au-dessus de ce chiffre⁶.

Des puces pour diagnostic génomique

En fait, la question se pose différemment selon la nature du test, selon qu'il vise à caractériser une situation au niveau du génome ou à repérer un profil d'expression ayant un caractère pronostique ou prédictif. Commençons donc par ce que l'on pourrait appeler les « puces à diagnostic génomique ». Il s'agit là de *microarrays* destinés à détecter la présence de certaines mutations, à caractériser les allèles d'un ou de plusieurs gènes, ou encore à repérer la présence de délétions ou de duplications. Dans ce cas, la puce ne constitue au fond qu'un nouvel outil de mesure pour appréhender un état de l'ADN dont les corrélats cliniques sont déjà bien établis. Elle pourra alors s'imposer si elle fournit l'information recherchée de manière fiable et à un coût acceptable. Envisageons par exemple la recherche de mutations dans le cas de la mucoviscidose, qui fait maintenant l'objet d'un dépistage systématique dans plusieurs pays, dont le nôtre, en raison de la fréquence des hétérozygotes (une personne sur quarante environ). Le test ADN n'est effectué qu'après un résultat positif à un test biochimique. Sous sa forme la plus élémentaire, il se limite à définir la présence ou l'absence, dans le gène *CFTR*, de la mutation deltaF508, la plus fréquente. Or l'on connaît maintenant des centaines de mutations dans ce gène, responsables de formes plus ou moins sévères de la maladie, et l'*American College of Medical Genetics* recommande qu'au moins les vingt-trois les plus fréquentes soient examinées dans le cadre d'un programme de dépistage. Les techniques classiques ne sont que difficilement « multiplexables », et leur coût augmente rapidement avec le nombre de mutations envisagées. En revanche, un *microarray* peut facilement vérifier la présence ou l'absence de dizaines ou même de centaines de mutations. S'il donne des résultats fiables et répond par ailleurs aux impératifs de commodité et de rapidité nécessaires, il pourra donc concurrencer efficacement les méthodes existantes, et ce n'est sûrement pas un hasard si plusieurs diagnostics en cours d'examen par la FDA⁷ concernent ce cas de figure. L'entreprise *Osmetech* (États-Unis) a déjà fait approuver un test qui recourt à un système à détection électrique ; celui de *Nanotech* (qui fait également appel à des électrodes actives) est en cours d'homologation, et bien d'autres firmes lorgnent sur ce marché. Leur succès éventuel dépendra des coûts, et du nombre de mutations que l'on estimera pertinent d'analyser : plus celui-ci sera élevé, plus l'avantage des *microarrays* deviendra patent.

³ Un jour où la climatisation est en panne, et où la température du labo d'analyses frise les 35 °C, par exemple...

⁴ Un des logiciels les plus employés pour l'analyse des profils d'expression, très puissant mais demandant un sérieux apprentissage.

⁵ Des enquêtes montrent que les trois quarts des patientes sont prêtes à accepter une chimiothérapie si elle réduit leur risque de 5 %.

⁶ Plus de trois mille dollars pour le test *Mammaprint* d'Agendia évoqué plus loin.

⁷ La *Food and Drug Administration*, responsable de l'autorisation de mise sur le marché de médicaments aux États-Unis, intervient aussi pour les produits de diagnostic. Pour être commercialisé, un test doit obligatoirement être agréé par elle (à moins qu'il ne soit entièrement réalisé à l'intérieur d'un laboratoire lui-même agréé). En Europe, le marquage CE est un peu moins exigeant puisqu'il est obtenu sous un régime déclaratif, mais il faut ensuite que les différents systèmes de santé acceptent de prendre en charge le coût du nouveau diagnostic.



La première homologation

La toute première puce pour diagnostic homologuée par la FDA (et, un peu plus tôt, par le marquage CE) est elle aussi une puce génomique. Il s'agit de l'*Amplichip CYP450*, fondé sur la technologie *Affymetrix* (elle porte 15 000 oligonucléotides courts synthétisés *in situ*) mais commercialisé par *Roche Diagnostics*. L'*Amplichip* est destiné à repérer les différents allèles de deux gènes du complexe des cytochromes P450, les gènes CYP2D6 et CYP2C19, impliqués dans le métabolisme de nombreux médicaments et notamment des psychotropes. Une fraction significative des personnes (plusieurs pour cent) possède un allèle « ultrarapide » et ne répond pas au médicament à la dose habituelle, car celui-ci est trop rapidement dégradé. D'autres, au contraire, sont « mauvais métaboliseurs » et doivent recevoir des doses très réduites sous peine de réactions adverses aiguës. Les concepteurs du test préconisent, naturellement, que celui-ci soit systématiquement effectué avant le début du traitement : ce serait le début d'une médecine personnalisée, adaptée au génotype et au phénotype de chacun. Reste que la puce est vendue plusieurs centaines d'euros, et qu'un laboratoire d'analyses facture le test à plus de mille euros. La plupart des praticiens préfèrent continuer à ajuster les doses par tâtonnement, et les ventes de l'*Amplichip* sont pour le moment très inférieures aux espoirs de *Roche Diagnostics*...

Autre type de puce génomique, la puce CGH (*comparative genomic hybridization*) destinée à remplacer le cytogénéticien pour l'hybridation génomique comparative ou la recherche de translocations. Un *microarray* CGH permet de détecter rapidement des délétions ou des duplications dans l'ADN, avec une résolution qui dépend des sondes choisies : quelques kilobases pour une puce CGH à oligonucléotides couvrant une zone restreinte du génome (par exemple le gène de la dystrophine), une mégabase pour une puce portant trois mille produits d'amplification de BAC et devant analyser l'ensemble du génome. *Combimatrix*, *Spectral Genomics*, *Vysis* et, chez nous, *Integrigen* en association avec la Ligue Nationale contre le Cancer se positionnent sur ce créneau qui a toutes les chances de se développer, d'autant que les méthodes actuellement employées sont parfois très onéreuses (FISH sur noyaux interphasiques, par exemple).

Dans ces différents cas, la démonstration de l'utilité clinique est déjà faite, ou en passe d'être finalisée. Le succès de ces puces cliniques génomiques se jouera sur leur prix, leur facilité d'emploi et le volume d'informations fourni par rapport aux approches classiques, mais n'exigera pas de gros efforts de leurs concepteurs pour établir le corrélat clinique de la mesure effectuée. Je noterai aussi que les techniques employées sont souvent innovantes : détection électrique, analyse optique ne faisant pas appel à la lecture par un scanner confocal... Cela traduit le fait que la mesure n'exige pas une très grande précision : la mutation est présente ou non, le gène est ou non amplifié, mais il n'est pas nécessaire de quantifier des valeurs

sur une échelle de 1 à 1000, comme pour les profils d'expression. C'est donc techniquement moins exigeant, et autorise l'emploi de méthodes moins sensibles mais plus rapides et nécessitant un appareillage moins complexe.

Profils d'expression : la question de la validation clinique

Il en va tout autrement, on s'en doute, pour les approches impliquant l'analyse de profils d'expression. J'ai déjà exposé, dans le cas du cancer du sein, le schéma qui pourrait justifier leur utilisation pour obtenir des indications supplémentaires sur une tumeur ; la question se pose de façon similaire pour d'autres cancers, lymphomes, cancer de la prostate ou des intestins. L'information recherchée peut être pronostique ou prédictive. Ces deux termes, souvent employés de manière interchangeable, ont en fait un sens bien précis : l'information pronostique porte sur l'évolution probable du malade : « ce cancer est fortement métastatique », par exemple. Quant à l'information prédictive, elle est relative à l'effet d'un traitement : « cette tumeur est sensible à l'anthracycline ». Idéalement, bien sûr, on aimerait obtenir les deux informations, savoir s'il convient de traiter et quelle sera la molécule la plus efficace. Cela exige d'abord que les mesures soient fiables et reproductibles : rappelons que des progrès très significatifs ont été réalisés dans ce domaine depuis deux ou trois ans. Mais cela suppose un environnement technique de haut niveau et des procédures parfaitement calibrées. Il est significatif qu'à l'heure actuelle aucun de ces tests ne soit proposé en « libre service », comme un diagnostic classique : ils sont tous effectués *in house* par l'entreprise qui les commercialise.

Mais le plus crucial pour ces nouvelles analyses, c'est justement leur nouveauté : elles fournissent une information inédite, dont la validité clinique doit être établie *de novo*. La valeur prospective ou prédictive d'un profil d'expression doit être validée par l'analyse en aveugle d'un nombre important d'échantillons (il s'agit en général de tumeurs congelées) provenant de personnes qui ont ensuite été suivies plusieurs années, et pour lesquelles on connaît tant les traitements subis que le devenir clinique. Or, même pour des cancers fréquents comme celui du sein⁸, il n'est pas aisé d'accéder à des séries importantes d'échantillons associés à un suivi précis incluant un traitement homogène, d'autant que les thérapies évoluent, que de nouvelles molécules apparaissent, et que des associations différentes sont tentées... Au total, les études incluent au mieux quelques centaines de tumeurs, ce qui est fort peu pour découvrir et vérifier la corrélation entre un profil d'expression et une donnée clinique prospective ou prédictive. Encore faut-il que ces indications soient effectivement utiles pour orienter le traitement...

⁸ 26 000 cas par an rien qu'en France, dix fois plus aux États-Unis.

Tests prospectifs et prédictifs (?) dans le cancer du sein

Le test qui semble aujourd'hui répondre le plus complètement à ces critères est celui que commercialise, aux États-Unis, l'entreprise *Genomic Health* sous le nom de *OncoType DX*, destiné aux femmes atteintes de certains types de cancer du sein⁹. C'est un test pronostique qui évalue le risque de récurrence et peut éventuellement motiver une chimiothérapie, encore qu'il ne soit pas prédictif au sens strict. Je le décris ici, bien qu'il soit réalisé par PCR quantitative et non sur *microarray*, parce qu'il illustre les points développés ci-dessus. L'atout principal de *Genomic Health* est une technique qui permet de réaliser des profils d'expression sur l'ARN extrait de tumeurs incluses dans la paraffine [7], méthode de conservation universellement employée alors que la congélation d'un fragment de tumeur (plus délicate et plus onéreuse) n'est effectuée que très occasionnellement. Cela donne potentiellement accès à des dizaines de milliers d'échantillons. Mais l'ARN ainsi obtenu est passablement dégradé, et les mesures d'expression ne portent que sur un petit nombre de gènes, vingt et un, selon un mode opératoire délicat et complexe qui est la spécialité de l'entreprise. Il s'agit donc d'un diagnostic de la variété dite *home brew*, ce que l'on peut traduire par « test maison », qui ne nécessite pas en tant que tel d'approbation de la FDA mais qui doit être pratiqué par un laboratoire dûment accrédité. Le résultat fourni au clinicien est un « indice de récurrence » (*recurrence score*), exprimé sur une échelle de 1 à 100, et qui va être un des éléments de sa décision sur le traitement à prescrire [8]. Bien que coûteux (3 685 dollars US), ce test rencontre un certain succès et sa prise en charge, aux États-Unis, a été acceptée par au moins une compagnie d'assurance-santé.

Un autre exemple, toujours pour le cancer du sein mais reposant cette fois sur l'emploi de *microarrays*, est fourni par les travaux très médiatisés de l'entreprise néerlandaise *Agendia*, née des travaux de l'équipe de Laura van't Veer au *Netherlands Cancer Institute* [9, 10]. Ces chercheurs ont établi en 2002 un profil d'expression impliquant 70 gènes et qui indique un mauvais pronostic (risque élevé de métastases à court terme) chez les patientes présentant une tumeur localisée en l'absence d'envahissement ganglionnaire. La société *Agendia* a été créée pour commercialiser ce diagnostic, baptisé *MammaPrint* et réalisé en interne, et qui pourrait être utilisé pour éviter une chimiothérapie lorsque le pronostic est favorable. Le test, qui a reçu le marquage CE, est proposé aux États-Unis par une entreprise agréée (*Molecular Profiling Institute*) et son examen par la FDA (qui a elle-même réclaté d'en faire l'étude) est en cours. À l'heure actuelle, cette analyse onéreuse (3 200 dollars US) est considérée comme un

⁹ Cancers de stade I ou II sans envahissement ganglionnaire, et positifs pour le récepteur des œstrogènes.

élément du diagnostic sans être à elle seule déterminante, et son remboursement est en discussion. Un essai prospectif à grande échelle, qui devrait éprouver son caractère prédictif, et non plus seulement prospectif, est en cours de démarrage. Un test du même type développé par l'Institut Paoli-Calmette de Marseille et l'entreprise française *Ipsogen* [11, 12] s'adresse, lui, aux cancers du sein avec envahissement ganglionnaire. Il fait actuellement l'objet d'un essai prospectif et pourrait être mis sur le marché prochainement.

Parmi les autres projets de puces cliniques « expression », celui de *Roche Diagnostics* sur les leucémies paraissait le plus avancé puisqu'il était annoncé pour fin 2006. Fondé sur la mesure du profil d'expression de trois cents gènes et utilisant une puce de type *Affymetrix* (et donc le même système de lecture que l'*Amplichip CYP450*), il semble avoir rencontré quelques problèmes de mise au point, mais devrait néanmoins être soumis à une validation multicentrique courant 2007. Ce retard atteste la difficulté technique de tels diagnostics, les délais liés à leur vérification... et la tiédeur de leur accueil par les hôpitaux compte tenu de leur coût.

D'indéniables atouts

On voit donc que l'adoption des puces à ADN en clinique est nettement plus lente que ne l'espéraient certains, et que différents obstacles techniques, réglementaires et commerciaux ralentissent leur arrivée dans les laboratoires hospitaliers. Je n'ai pas évoqué ici les puces à protéines, dont certaines (les plus simples) sont, elles, déjà utilisées aujourd'hui : puces d'antigènes pour détecter les anticorps présents dans le sérum de patients, puces d'anticorps pour repérer des protéines virales... Il s'agit là d'un multiplexage à échelle modérée (quelques dizaines de plots) de techniques d'ELISA déjà bien implantées, et ces diagnostics sont progressivement adoptés dès que l'équation économique leur est favorable, c'est-à-dire dès qu'il est nécessaire de mesurer au moins une dizaine de paramètres. Pour en revenir aux puces à ADN, il semble qu'il faudra encore quelques années pour que certaines d'entre elles prennent leur place dans l'arsenal du diagnostic de routine - et la plupart appartiendront vraisemblablement à la variété « génomique ». Leur développement va néanmoins dans le sens de l'histoire, avec l'amélioration de la fiabilité, la baisse des coûts et la mise au point de logiciels d'interprétation conviviaux et robustes. Leur point fort est lié à l'accroissement constant de nos connaissances, qui va inciter à mesurer de plus en plus de grandeurs - et c'est là que les puces sont imbattables : elles peuvent aisément déterminer cent ou mille paramètres sans que leur coût ne varie en conséquence. Encore faut-il que leur connaissance présente une réelle utilité clinique... ♦

DNA microarrays in the clinic?

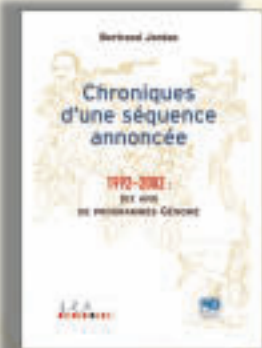


RÉFÉRENCES

- 1. Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 2006 ; 24 : 1151-61.
- 2. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006 ; 444 : 444-54.
- 3. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 ; 403 : 503-11.
- 4. Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000 ; 9 : 2981-91.
- 5. Jardin F, Tilly H. Un saut (de puce) vers une application clinique des profils d'expression génique dans les lymphomes ? *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 848-50.
- 6. Jordan B. Coup de tabac sur les puces. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 487-90.
- 7. Paik S, Kim CY, Song YK, Kim WS. Technology insight: application of molecular techniques to formalin-fixed paraffin-embedded tissues from breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005 ; 5 : 246-54.
- 8. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 2817-26.
- 9. Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002 ; 415 : 530-6.
- 10. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 1999-2009.
- 11. Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, et al. Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Hum Mol Genet* 2002 ; 11 : 863-72.
- 12. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, et al. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 8558-65.

TIRÉS À PART

B. Jordan



ISBN : 2-84254-089-1 204 pages

Les lecteurs de médecine/sciences retrouveront ici les trente et une «Chroniques Génomiques» publiées au cours des dix dernières années. Écrites au jour le jour, elles constituent une sorte d'histoire immédiate du Programme Génome. Reproduites telles quelles, et gardant ainsi leur saveur d'origine, elles sont accompagnées de commentaires qui les resituent dans leur contexte, et permettent d'évaluer la justesse - ou le caractère erroné! - des opinions et des prévisions énoncées à l'époque.

Bertrand Jordan

Préface d'Axel Kahn

BON DE COMMANDE

À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex
Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : _____ Prénom : _____
 Adresse : _____ Adresse e-mail : _____
 Code postal : _____ Ville : _____ Tél. : _____
 Pays : _____
 Fonction : _____

Je souhaite recevoir l'ouvrage :

Chroniques d'une séquence annoncée: Prix public 16 € + 3 € de port = 19 € TTC

Par chèque, à l'ordre de EDK
 Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° [] Signature : _____
 Date d'expiration : [][][][][][][][][] N° de contrôle au dos de la carte : [][][]

