



**HAL**  
open science

# Interactions et coopérations cellulaires dans le processus métastatique

François-Clément Bidard

► **To cite this version:**

François-Clément Bidard. Interactions et coopérations cellulaires dans le processus métastatique. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT: . tel-00392387

**HAL Id: tel-00392387**

**<https://theses.hal.science/tel-00392387>**

Submitted on 7 Jun 2009

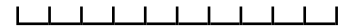
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS XI  
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

2008

Numéro attribué par la bibliothèque



**THÈSE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI**

Champ disciplinaire : Médecine

École doctorale de rattachement : Cancérologie

présentée et soutenue publiquement par

**François-Clément Bidard**

le 22 septembre 2008

Titre

**Interactions et coopérations cellulaires  
dans le processus métastatique**

Directeur de thèse : Mme le Docteur Poupon Marie-France

**JURY**

Président	M. le Pr	Soria	Jean-Charles
Rapporteur	M. le Pr	Bellet	Dominique
Rapporteur	M. le Pr	Mareel	Marc
	M. le Pr	Pierga	Jean-Yves
	Mme le Dr	Poupon	Marie-France

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Bases théoriques</b>	<b>3</b>
2.1	Rappel : les étapes du processus métastatique . . . . .	3
2.1.1	Invasion locale . . . . .	3
2.1.2	Intravasation et circulation des cellules tumorales . . . . .	7
2.1.3	Reconnaissance de l'organe-hôte et ancrage des cellules tumorales . . . . .	10
2.1.4	Extravasation et invasion du tissu . . . . .	14
2.1.5	Croissance secondaire des cellules tumorales disséminées . . . . .	15
2.2	Rappel : Inefficacité métastatique . . . . .	19
2.2.1	Inefficacité numérique . . . . .	19
2.2.2	Apport des techniques de vidéomicroscopie <i>in vivo</i> . . . . .	20
2.3	Rappel : Déterminants génétiques . . . . .	20
2.3.1	Théorie de la sélection clonale . . . . .	21
2.3.2	La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) . . . . .	22
2.3.3	Les gènes suppresseurs de métastase . . . . .	29
2.3.4	Le modèle adaptatif . . . . .	35
2.3.5	Modèle de l'hétérogénéité dynamique . . . . .	37
2.3.6	Modèle de la dominance clonale . . . . .	38
2.3.7	Modèle alternatif : les cellules souches . . . . .	38
2.4	Rappel : Cellules tumorales circulantes et disséminées . . . . .	38
2.4.1	Points communs . . . . .	38
2.4.2	Les cellules tumorales disséminées . . . . .	40
2.4.3	REVUE : Bone marrow micrometastasis in breast cancer : review of detection methods, prognostic impact and biological issues . . . . .	40
2.5	Hypothèse : Coopération intercellulaire et conditionnement des sites métastatiques	48
2.5.1	REVUE : A class action against the microenvironment : do cancer cells cooperate in metastasis? . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>55</b>
3.1	Modélisation <i>in vivo</i> . . . . .	55
3.1.1	Cellules et cultures . . . . .	55
3.1.2	Souris et modèles tumoraux . . . . .	56
3.1.3	Immunohistochimie . . . . .	56

3.1.4	FISH . . . . .	57
3.2	Etude des cellules tumorales disséminées . . . . .	58
3.2.1	Détection . . . . .	58
3.2.2	Données cliniques et biologiques . . . . .	59
3.2.3	Analyse statistique . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Résultats et Discussion</b>	<b>60</b>
4.1	Dissémination initiale médullaire et métastases métachrones . . . . .	60
4.1.1	Rationnel de l'étude . . . . .	60
4.1.2	ARTICLE : <i>Disseminated tumor cells of breast cancer patients : a strong prognostic factor for distant and local relapse</i> . . . . .	60
4.1.3	Discussion . . . . .	67
4.2	Dissémination initiale médullaire et récurrence loco-régionale métachrone . . . . .	68
4.2.1	ARTICLE : <i>Loco-regional relapses and adjuvant treatments of early breast cancers with bone marrow disseminated tumor cells</i> . . . . .	68
4.2.2	Discussion . . . . .	79
4.3	Conditionnement des sites métastatiques, coopération intercellulaire et colonisation	79
4.3.1	ARTICLE : <i>Specific colonization of metastases by non metastasizing circulating tumor cells</i> . . . . .	79
4.3.2	Autres résultats . . . . .	92
4.3.3	Discussion . . . . .	93
4.4	Influence de la dissémination médullaire à la rechute métastatique sur l'évolution des métastases . . . . .	95
4.4.1	Rationnel de l'étude . . . . .	95
4.4.2	ARTICLE : <i>Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells</i> . . . . .	96
4.4.3	Discussion . . . . .	102
4.5	Dissémination médullaire à la rechute métastatique, dormance et latence métastatique . . . . .	102
4.5.1	ARTICLE : <i>Time to metastatic relapse and breast cancer cells dissemination in bone marrow at metastatic relapse</i> . . . . .	102
4.5.2	Discussion . . . . .	114
4.6	Modèle intégratif de la dissémination cellulaire . . . . .	114
<b>5</b>	<b>Projets et Conclusion</b>	<b>116</b>
5.1	Projets . . . . .	116
5.2	Conclusion . . . . .	118
	<b>Bibliographie</b>	<b>120</b>
	<b>Abbréviations</b>	<b>130</b>
	<b>Remerciements</b>	<b>131</b>



# 1 Introduction

La majeure partie des décès imputables aux tumeurs malignes solides est la conséquence de l'apparition et de la croissance de métastases disséminées responsables de dysfonctions d'organes vitaux. Les étapes biologiques qui mènent d'une tumeur primitive à une localisation tumorale secondaire sont relativement bien individualisées, mais les déterminants biologiques du processus métastatique restent non caractérisés à ce jour.

Le principal paradigme actuel expliquant le processus métastatique considère qu'un sous-clone de la tumeur initiale acquiert à un moment donné l'ensemble des caractéristiques nécessaires à la dissémination, et que ce clone est dès lors responsable de l'apparition des macrométastases à distance. Notre hypothèse de travail est que ce modèle néglige les aspects temporels du processus métastatique. En effet, celui-ci se manifeste généralement de manière retardée par rapport à l'apparition de la tumeur primitive, permettant une interaction possiblement coopérative entre sous-clones tumoraux. Cette interaction pourrait ainsi impliquer différents sous-clones d'apparition potentiellement décalée, générés à différents moments de l'évolution génétique tumorale. De même, ces clones peuvent interagir de manière répétée et prolongée avec le microenvironnement des tissus-hôtes, par l'intermédiaire des cellules tumorales circulantes et des cellules tumorales disséminées. Ce conditionnement des organes-cibles serait ainsi progressif, impliquant différents sous-clones génétiquement hétérogènes. Deux sujets d'étude sont utilisés dans ce travail de thèse : les cellules tumorales disséminées (micrométastases) médullaires de cancer du sein et un modèle *in vivo* du processus métastatique de cancer colo-rectal chez la souris.

Les éléments décrits dans ce manuscrit font appel à l'ensemble des étapes décrites du processus métastatique. Celles-ci sont tout d'abord rappelées dans l'introduction, puis deux revues abordent plus spécifiquement les aspects biologiques et cliniques des micrométastases médullaires (*Journal of Clinical Pathology*) et les données de la littérature en faveur d'un processus de coopération temporelle des cellules tumorales entre elles (*Cancer and Metastasis Reviews*). Les méthodes utilisées pour la détection et la caractérisation de ces cellules et qui seraient non décrites dans les articles sont ensuite détaillées, avant les articles qui décrivent les résultats obtenus. Ces résultats s'intègrent dans les tentatives de réponses aux questions suivantes :

- Quel est l'impact d'une dissémination micrométastatique médullaire initiale sur la survenue d'une croissance métastatique métachrone ? (Article publié dans *Clinical Cancer Research*)

- Comment lier dissémination micrométastatique à distance, dissémination loco-régionale et rechute loco-régionale ultérieure? (Article en cours de rédaction)

- Un microenvironnement métastatique préalablement conditionné peut-il permettre la croissance métastatique de cellules tumorales intrinsèquement non métastatiques? (Article en cours de rédaction)

- La dissémination micrométastatique joue-t-elle un rôle dans l'évolution de la maladie macro-métastatique, une fois que celle-ci s'est développée? (Article publié dans *Annals of Oncology*)

- Peut-on associer dissémination micrométastatique médullaire, dormance des cellules tumorales et latence prolongée de la croissance métastatique métachrone? Existerait-il un mode de dissémination plus rapide? (Version révisée, resoumise à *Clinical and Experimental Metastasis*)

L'ensemble de ces résultats plaident pour une plus grande intégration du « facteur temps », en tant que facteur favorisant un conditionnement progressif des futurs sites métastatiques par des sous-clones tumoraux aux propriétés métastatiques hétérogènes, dans notre conception du processus métastatique et proposent plusieurs pistes nouvelles aux conséquences thérapeutiques potentiellement intéressantes, exposées en conclusion de ce manuscrit.

## 2 Bases théoriques

Historiquement, le terme métastase, du grec « μεταστας » je change de place, apparaîtrait au cours du XVIème siècle pour désigner les tumeurs secondaires à une tumeur primitive. Ce phénomène est individualisé en tant qu'objet de recherche à partir de 1889, date de la publication dans le Lancet par J Paget de « l'hypothèse *seed and soil* ». Plus d'une centaine d'années plus tard, le processus métastatique est actuellement défini comme « une dissémination de cellules néoplasiques dans un site secondaire (ou de plus grand ordre) non contigu et distant, au sein duquel ces cellules prolifèrent pour former une masse extravasculaire de cellules incomplètement différenciées » (Welch DR, Breast Dis 2006). Nous aborderons ici exclusivement les métastases par voie hématogène, issues de tumeurs solides non hématologiques.

### 2.1 Rappel : les étapes du processus métastatique

D'un point de vue mécanistique, la distance qui sépare la tumeur primitive de ses métastases implique le franchissement de plusieurs étapes par les cellules tumorales. Le nombre et la nature de ces étapes sont variables selon les auteurs, avec des données contradictoires, principalement sur les étapes de circulation et d'extravasation. Nous rappelons brièvement, pour chacune de ces étapes, les principaux « effecteurs » moléculaires impliqués.

#### 2.1.1 Invasion locale

Cette première étape correspond principalement à trois phénomènes relativement distincts : dégradation du stroma péri-tumoral, migration cellulaire et intravasation. Il est important de remarquer que les phénomènes d'invasion sont pour la plupart acquis lors de l'oncogénèse initiale et ne sont pas une condition suffisante à la formation de métastases.

#### Dégradation du stroma péri-tumoral

La dégradation du stroma péri-tumoral repose physiquement sur la dégradation des protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC). Cette protéolyse est accompagnée de nombreux autres processus microenvironnementaux biologiques, correspondant à une « activation » du stroma péri-tumoral.

**Protéolyse de la MEC** Cinq grandes familles de protéases sont décrites chez les mammifères : cystéine-, aspartate-, thréonine-, sérine- et métallo-protéases. Ces protéases - avec leurs inhibiteurs endogènes - sont nécessaires au développement embryonnaire puis au renouvellement



des tissus sains mais interviennent aussi dans l'invasion tumorale, avec un rôle particulièrement marqué pour les sérine- et métallo-protéases. Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC, qu'elles soient membranaires ou sécrétées, sont synthétisées sous forme de pré-protéases qui nécessitent elle-mêmes une activation par protéolyse (Egeblad M, Nat Rev Cancer 2002).

**le système uPA/uPAR/PAI** L'urokinase (uPA, *urokinase-type plasminogen activator*), de la famille des sérine-protéases, est sécrétée sous forme de pro-enzyme pro-uPA, se lie au récepteur membranaire uPAR et est activée par la plasmine. A son tour, l'urokinase active spécifiquement le plasminogène (pro-enzyme) en plasmine, qui a pour substrat, outre la pro-uPA, la fibrine et d'autres composants de la MEC. L'uPA est inhibée par 2 protéines, PAI1 et PAI2 (*plasminogen activator inhibitor*), qui sont aussi ses substrat. En clinique, des taux intratumoraux élevés d'uPA et de PAI1 ont été associés à une récurrence métastatique de cancer du sein plus fréquentes (Jännicke F, JNCI 2001).

**le système MMP/TIMP** Les métalloprotéases (MMP), caractérisées structurellement par leur noyau zinc, avec leurs inhibiteurs tissulaires ( $\alpha 2$  macroglobuline, Tsp1 et 2, TIMP 1 à 4), sont une famille de protéases (21 sous-types identifiés chez l'homme) virtuellement capables de cliver toutes les protéines de la MEC. Huit sous-classes ont été identifiées sur une base structurelle, 3 restant liées à la membrane plasmique (MT-MMP). Les MMP sont sécrétées pour la plupart d'entre elles sous forme de pro-enzymes puis activées de manière synergique : la plasmine active la plupart des MMP en clivant leur pro-domaine, ce qui initie une auto-activation des MMP en cascade (exemple : MMP-3 active les pro-MMP1 et pro-MMP9). L'expression et l'activité des MMP sont augmentées dans la plupart des cancers humains, et sont généralement corrélées avec l'invasivité locale tumorale (dans les modèles animaux), ainsi qu'avec un pronostic défavorable en clinique. Le rôle des TIMP sur la survenue de métastases est moins clair, avec, dans certains modèles, une action protumorale via l'induction de facteurs antiapoptotiques (Bcl-XL) ou pro-angiogéniques (VEGF) (Egeblad M, Nat Rev Cancer 2002).

**« Activation » du stroma péri-tumoral** Le franchissement de la membrane basale vers le « compartiment » stromal permet aux cellules tumorales d'interagir avec un nouvel microenvironnement péri-tumoral. Ce microenvironnement va être « activé » par les cellules tumorales, activation qui va concourir à la croissance et l'invasion tumorale. La plupart des enzymes protéolytiques de la MEC sont ainsi sécrétées sous la forme de pro-enzyme inactive par les cellules stromales et sont activées par les protéases tumorales. La protéolyse de la MEC permet elle aussi la libération de nombreuses cytokines ou facteurs de croissance retenus dans la MEC, qui jouent un rôle trophique et chemo-attractant pour les cellules tumorales. Les facteurs de croissance et cytokines séquestrées dans la MEC sont nombreux ; il s'agit essentiellement du TGF- $\beta$  (croissance cellulaire, invasion, transition épithélio-mésenchymateuse), du bFGF (angiogénèse), du VEGF (angiogénèse), de l'IGF1 (survie, prolifération), de Ang-1 (angiogénèse), du PDGF (prolifération), du HGF/SF (prolifération, migration, invasion). Il existe par ailleurs un rôle angiogène propre à l'activation de la MMP9 sécrétée, capable d'induire le recrutement de péricytes stabilisant les néo-capillaires. (Mueller MM, Nat Rev Cancer 2004). Des boucles paracrines s'établissent par ailleurs entre les cellules tumorales et les cellules stromales (synthèse de SCF

par les fibroblastes), voire immunitaires (Wyckoff J, Cancer Res 2004). Finalement, ce stroma « activé » (ou « réactif ») présente une angiogénèse augmentée, une activité protéolytique élevée, une augmentation du nombre de facteurs de croissance, un afflux de cellules inflammatoires et la présence de myofibroblastes, tous ces facteurs concourant au développement tumoral initial. (Liotta LA, Nature 2001).

### Migration cellulaire

Pour des cellules tumorales initialement de phénotype épithélial, le processus de migration correspond à une perte de l'adhésion intercellulaire qui s'accompagne de l'acquisition d'un phénotype migratoire avec perte de la polarisation baso-latérale au profit d'une polarisation de type front de migration/arrière.

**Perte de l'adhésion intercellulaire** La migration nécessite une perte de la cohésion de la tumeur initiale, avec individualisation des cellules tumorales migratrices. Un tel phénomène passe par la réorganisation de l'ensemble des protéines impliquées dans l'établissement de jonctions intercellulaires. Au sein des 4 superfamilles des Cell Adhesion Molecules (CAM), les cadhérines sont particulièrement susceptibles de jouer un rôle pro ou anti métastatique lors de cette phase initiale de perte d'adhésion entre cellules tumorales.

**E-Cadhérine** La E-Cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire épithéliale responsable d'une adhésion homophile calcium-dépendante par jonction serrée. Outre leur fonctions cohésives, les jonctions serrées séparent physiquement les zones membranaires apicale et baso-latérale, fonctionnellement distinctes. Le rôle de la E-Cadherine a été particulièrement étudié dans les cancers du côlon et les cancers du sein, dans lesquels son rôle a été mis en évidence par des expériences de type « on/off » : inhibition du potentiel métastatique en présence de E-Cadhérine et augmentation de ce même potentiel lors de sa perte d'expression (Mbalaviele G, Cancer Res 1996 ; Frixen UH, J Cell Biol 1991 ; Vleminckx K, Cell 1991 ; Mareel M, J Cell Physiol 1997). Certaines publications rapportent cependant une relation inverse entre expression de la E-Cadhérine et survenue de métastases dans certains modèles (Mareel M, Mol Biol Rep 1994), notamment pour la formation d'embols intravasculaires (Tomlinson JS, Cancer Res 2001). Les autres modèles dans lesquels cette protéine jouerait un rôle sont nombreux : carcinomes pulmonaire, pancréatique, gastrique (carcinome à cellules indépendantes et limite gastrique), prostatique, ORL (Kudo Y, Clin Cancer Res 2004)... Génétiquement, la dérégulation de l'expression ou de la fonction de la E-Cadherine serait liée à des délétions, à des mutations, à la méthylation du promoteur (Hirohashi S, Am J Pathol 1998). La protéine est en elle-même l'objet de processus de dégradation par les MMP ou d'une régulation anormale de son ancrage au niveau des jonctions intercellulaires (Yang JY, Mol Cell Biol 2006). Il est important de noter que le rôle de la E-Cadhérine ne se limite pas à la seule adhésion intercellulaire. Son interaction intracytoplasmique avec la p120 et les caténines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  forme l'un des complexes protéiques responsables de l'organisation des microfilaments intracellulaires d'actine (modifiés lors de l'acquisition d'un phénotype migratoire, cf infra). Cette interaction est à l'origine d'un signal intracellulaire de survie via les protéines APC et Wnt ; la dérégulation

de ce signal est directement impliquée dans l'oncogénèse de plusieurs types tumoraux, dont le cancer colo-rectal (Gottardi CJ, *Curr Biol* 2001), ainsi que dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (abordée plus loin). Outre cette signalisation intracellulaire directe, d'autres partenaires membranaires de la E-Cadherine (c-erb2, EGFR...) sont aussi impliqués dans les mécanismes d'oncogénèse et de prolifération (Perrais M, *Mol Biol Cell* 2007 ; Stockinger A, *J Cell Biol* 2001). Finalement, l'inhibition de la migration cellulaire par l'expression de la E-Cadherine pourrait ainsi être essentiellement due à sa signalisation intracellulaire, plutôt qu'à la formation directe de jonctions intercellulaires (Wong AS, *J Cell Biol* 2003 ; Herzig M, *Oncogene* 2007).

**N-Cadhérine** Le rôle de cette cadherine au cours des processus d'invasion locale est moins caractérisé, mais apparaît opposé à celui de la E Cadherine. Son expression est associée à un phénotype migratoire des cellules d'adénocarcinome mammaire (Nieman MT, *J Cell Biol* 1999 ; Hazan RB, *J Cell Biol* 2000), pancréatique (Seidel B, *Oncogene* 2004), prostatique (Tran NL, *Am J Pathol* 1999) et de carcinome épidermoïde (Islam S, *J Cell Biol* 1996). Normalement non exprimée par les épithélia, la présence de N-Cadhérine est associée au phénotype mésenchymateux, produit d'une transition épithélio-mésenchymateuse, elle même à l'origine d'une augmentation de la capacité migratoire cellulaire (Nakajima S, *Clin Cancer Res* 2004).

**P-Cadhérine** Cette cadherine est exprimée par certains types de cancer : carcinomes épidermoïdes ORL, adénocarcinomes mammaires et mélanomes. Comme pour la N-Cadhérine, son expression serait pro-métastatique et inversement corrélée à la E-Cadherine (Palacios J, *Am J Pathol* 1995 ; Munoz-Guerra MF, *Cancer* 2005).

**Cadhérines desmosomales** Les desmoglénines et les desmocollines sont impliquées dans la structure des desmosomes liant les filaments intermédiaires de deux cellules voisines. Leur rôle semble très limité, dans le sens d'une inhibition du processus métastatique dans les carcinomes épidermoïdes (Tselepis C, *PNAS* 1998 ; Bosch FX, *Int J Cancer* 2005).

**Mécanismes de la migration cellulaire** Dans les modèles utilisant une surface plane, la migration cellulaire correspond à 4 processus ordonnés et répétés de manière cyclique : protrusion puis adhésion de la membrane cellulaire en avant, déplacement du « corps » cellulaire et finalement rétraction cellulaire en arrière. Ces étapes sont sous la dépendance directe des remaniements du cytosquelette et des adhésions cellules-matrice.

**les petites GTPases** Les GTPases Rho, Cdc42 et Rac jouent un rôle majeur dans la réorganisation pro-migratoire des filaments d'actine en réponse à une activation de la PI3K par des signaux chimiotactiques extracellulaires (Etienne-Manneville S, *Nature* 2002). Ainsi, Rac et Cdc42 ont été décrites comme responsables de la polymérisation des microfilaments d'actine au pôle antérieur de la cellule, ce qui pousse la membrane cellulaire vers l'avant et forme des structures membranaires en doigt (pseudopodes) ou en feuillet (lamellipodes). Rac induit par ailleurs la formation de contacts focaux avec la matrice extra-cellulaire le long de ces extensions. Enfin, Rho régule, via ROCK/Rho kinase, la contraction actine/myosine qui est

responsable de la translation du corps cellulaire vers l'avant (Yamazaki D, Cancer Sci 2005). Le rôle prométastatique de la famille Rho a largement été souligné par des techniques d'analyse génomique comparative (Clark EA, Nature 2000). Dans le cancer du sein, l'expression de RhoC est corrélée avec une présentation clinique inflammatoire (van Golen KL, Mol Cancer Ther 2002). Plus récemment, un lien entre l'expression du facteur de transcription Twist (cf infra transition épithélio-mésenchymateuse) et la régulation de l'expression de RhoC a été rapporté : induction par Twist de la transcription du microARN miR-10b qui inhibe la traduction de l'ARNm du gène HOXD10, ce qui induit la transcription du gène RhoC (Ma L, Nature 2007). Il faut aussi noter que le rôle des petites GTPases n'est pas exclusif et que d'autres protéines sont susceptibles de jouer le même rôle (par exemple, LIM kinase (Wang W, J Cell Biol 2006)).

**les différents modes de migration cellulaire** Les cellules cancéreuses peuvent migrer de différentes manières, qui sont généralement observées simultanément. La migration collective en feuillets concerne les cellules carcinomateuses ayant gardé leur jonctions intercellulaires ; il s'agit du type de migration utilisé par les cellules épithéliales « normales » lors des processus de cicatrisation. Dès lors que les fonctions des cadhérines sont diminuées ou perdues (ce qui correspond la plupart du temps à une transition épithélio-mésenchymateuse), les cellules tumorales peuvent se déplacer de manière isolée. Ces cellules peuvent alors réaliser une migration mésenchymateuse (cellule allongée à morphologie fibroblastique) et/ou une migration amoéboïde (cellule à morphologie ronde) (Friedl P, Nat Rev Cancer 2003). La migration mésenchymateuse correspond au schéma de migration détaillé ci-dessus, reposant sur 4 étapes répétées d'élongation/rétraction cellulaire, auxquelles s'ajoute la dégradation de la MEC. Cette dégradation localisée au pôle antérieur de la cellule est associée à la concentration des protéases (sécrétées ou membranaires) au niveau des pseudopodes ou des lamellipodes ancrés dans la matrice par de nombreux contacts focaux. La migration amoéboïde ne repose pas, quant à elle, sur l'existence de contacts focaux, et les interactions cellule-matrice apparaissent limitées. Cette migration amoéboïde se caractérise par le fait que la cellule se déforme pour se « glisser » entre les fibres de collagène de la matrice extra-cellulaire, sans la dégrader. Ce type de migration est utilisé par les lymphocytes et les polynucléaires neutrophiles, typiquement lors de leur extravasation. *In vitro*, les lignées tumorales utilisant ce type de migration seraient essentiellement d'origine lymphomateuse ou carcinomateuse (essentiellement carcinome bronchique à petites cellules). Il est important de noter qu'en condition non physiologique (par exemple, présence d'inhibiteur de protéase), de nombreuses lignées cellulaires utilisant la migration mésenchymateuse peuvent alors migrer de façon amoéboïde. Autre facteur important de plasticité et de diversité migratoire, la localisation latérale des protéases (légèrement en arrière des domaines d'accrochage membranaire des pseudopodes) permet, grâce à une protéolyse de plus en plus large en marge du front de migration, à une succession de cellules isolées d'initier progressivement une migration collective (Wolf K, Nat Cell Biol 2007 ; Kajita M, J Cell Biol 2001).

### 2.1.2 Intravasation et circulation des cellules tumorales

Après l'intravasation, la circulation des cellules tumorales dans le sang correspond à 3 processus importants : l'interaction avec les éléments figurés du sang (dont ceux du système immu-

nitaire), la résistance à l'anoïkis et la résistance aux régimes de pression élevés de la circulation sanguine veineuse ou artérielle.

### **Intravasation, Interaction avec les éléments figurés du sang**

**Intravation** Ce terme désigne au passage des cellules tumorales dans la lumière des vaisseaux sanguins à travers la paroi capillaire. Les mécanismes de cette translocation sont mal connus, et ce d'autant que les vaisseaux sanguins tumoraux sont de type fenêtrés et présentent en outre des anomalies structurelles importantes, responsables d'une augmentation nette du nombre de cellules tumorales circulantes relâchées par simple massage de la tumeur (Liotta LA, Cancer Res 1976). Il pourrait ainsi s'agir d'un phénomène passif, ou lié à un processus actif d'invasion et de détachement cellulaire. Le premier argument en faveur du caractère passif de l'extravasation tient au fait que la plupart des cellules tumorales circulantes relarguées par une tumeur primitive semblent être apoptotiques ; le courant sanguin serait ainsi capable de détacher les cellules tumorales présentes au niveau de l'endothélium, phénomène qui surviendrait de manière préférentielle avec les cellules tumorales apoptotiques, mais parfois aussi avec des cellules tumorales viables et susceptibles de former des métastases secondaires (Mehes G, Am J Pathol 2001 ; Bockhorn M, Lancet Oncol 2007). La mise en place de modèle d'étude de l'intravasation *in vivo* ou *in vitro* reste particulièrement difficile, et ne permet pas de conclure de manière certaine sur les variations observées.

A noter qu'il a été aussi décrit l'existence d'embols tumoraux enveloppés de cellules endothéliales ; ce phénomène, semble-t-il rare, permettrait aux cellules tumorales de ne pas franchir la paroi endothéliale (Küsters B, Oncogene 2007).

**Interaction avec les éléments figurés du sang** Le passage dans la circulation sanguine place les cellules tumorales circulantes en contact avec les éléments figurés du sang. Il s'agit essentiellement d'interactions avec les plaquettes et les cellules de la lignée blanche (lymphocytes, monocytes, polynucléaires). Les processus à l'origine de l'échappement immunitaire des cellules tumorales ne sont pas spécifiques du processus métastatique, et ne seront pas développés ici. L'existence d'une interaction pro-métastatique entre cellules tumorales circulantes et plaquettes est ambiguë du fait de l'état d'hypercoagulabilité accompagnant généralement les tumeurs évoluées (Akl EA, Cochrane Database Syst Rev 2008). Inversement, la libération de thrombine lors d'évènements thrombo-emboliques est en lui seul un facteur favorisant la croissance et la dissémination tumorale (Nierodzik ML, Cancer Cell 2006). Les plaquettes activées relâchent par ailleurs de l'acide lysophosphatidique (LPA) qui agit comme un facteur de croissance sur les cellules tumorales (Boucharaba A, J Clin Invest 2004). Cependant, à côté de ces interactions indirectes entre activation plaquettaire, thrombose et progression métastatique, il a été rapporté que les cellules tumorales circulantes peuvent former des micro-thrombi en « s'enveloppant » des plaquettes activées. Au niveau moléculaire, l'adhésion cellule-plaquette repose principalement sur les P et L sélectines plaquettaires qui sont capables de fixer les mucines membranaires tumorales (Wei M, J Biol Chem 2004 ; Borsig L, PNAS 2001). L'inhibition pharmacologique (héparines...) de la formation de ces micro-thrombi (mais aussi des autres mécanismes pro-thrombogènes) diminuerait l'incidence des métastases dans les modèles pré-cliniques (Borsig L,

PNAS 2002).

### Résistance à l'anoïkis et résistance mécanique

**Anoïkis** Après extravasation, l'absence de signal issu des molécules d'adhésion membranaires est responsable d'un stress cellulaire. L'anoïkis est le phénomène d'apoptose qui survient à l'occasion d'une perte de contact « extérieur », que cela soit avec un support solide (matrice extracellulaire...) ou avec d'autres cellules. En pratique, ce type d'apoptose est aussi décrit lorsque des cellules sont en contact avec une matrice extracellulaire qui leur est étrangère, ce qui survient lors de la croissance finale des cellules métastatiques dans des organes-hôtes différents de leur organe d'origine.

L'anoïkis est initialement médiée par les intégrines, qui jouent un rôle de « capteur » de matrice extracellulaire, signal qui est ensuite relayé par des voies de signalisation intracellulaire multiples (PI3K, MAPK, Jnk, Src...) (Hynes RO, Cell 2002). L'activation finale du processus de mort cellulaire emprunte les voies intrinsèques (perméabilisation de la membrane mitochondriale avec activation des caspases par les facteurs relâchés dans le cytosol) et extrinsèques (signal intracellulaire initié par les récepteurs à Death Domain, formation de DISC et activation de la caspase 8) de l'apoptose.

Les mécanismes moléculaires de résistance à l'anoïkis sont relativement peu décrits. De fait, les cellules tumorales, même non métastatiques, présentent à partir de leur transformation, une altération des mécanismes déclencheurs et effecteurs de l'apoptose (Mehlen P, Nat Rev Cancer 2006) ; il semble incertain qu'il persiste chez les cellules transformées une fonction apoptotique spécifique à la perte de contact, et que la résistance à l'anoïkis soit une étape supplémentaire à celles déjà décrites du processus métastatique. La plupart des expériences rapportées sur ce type d'apoptose chez les cellules tumorales consiste à augmenter ou diminuer les facteurs pro- et anti-apoptotiques avant de re-exposer les cellules au stress lié à la perte de contact, sans étudier d'autres stress pro-apoptotiques (Ramachandra M, Cancer Res 2002).

**Résistance mécanique** Phénomène peu étudié de manière isolée, les régimes de pression élevés au sein de la circulation seraient responsables d'une destruction plus ou moins aléatoire des cellules tumorales circulantes (Weiss L, PNAS 1985). Il a été rapporté, en microscopie confocale, que la plupart des cellules tumorales se fragmentent au contact de la pression intraluminaire des microvaisseaux (Wyckoff JB, Cancer Res 2000). Dans cette expérience, seules les lignées cellulaires sélectionnées sur leur potentiel métastatique sont capables de survivre dans la circulation sanguine. De fait, la plupart des expériences décrivant l'inefficacité métastatique (cf infra) l'attribue essentiellement à cette destruction aléatoire des cellules tumorales par le courant sanguin, à l'exception notable des expériences de vidéomicroscopie *in vivo* (Luzzi KJ, Am J Pathol, 1998). Il faut remarquer que le caractère aléatoire de la lyse cellulaire n'est pas prouvé, mais qu'il n'a pas été non plus décrit de régulateur moléculaire spécifique à cette résistance cellulaire, sur lequel une sélection pourrait s'effectuer (Weiss L, Invasion Metastasis 1993).

### 2.1.3 Reconnaissance de l'organe-hôte et ancrage des cellules tumorales

La reconnaissance spécifique de l'organe-hôte (futur siège de métastases) par les cellules tumorales a fait l'objet de la communication fondatrice de Paget en 1889, mettant en évidence un profil particulier du siège des métastases de cancers du sein. La théorie « *seed and soil* » édicte que les cellules tumorales (*seed*) ne forment une métastase que dans un tissu qui leur est favorable (*soil*). La distribution des métastases n'apparaît donc que partiellement liée au flux sanguin et à l'existence de « filtres » que sont les poumons (circulation droite), et le foie (circulation cave). Cliniquement, il existe de nombreux exemples de lieux privilégiés de rechute métastatique, sans rapport avec le flux vasculaire : mélanome de la choroïde et métastases hépatiques, liposarcome mixoïde et métastases péritonéales... A un moindre degré, à chaque type de tumeur solide correspond un profil métastatique particulier, plus ou moins marqué. Comme détaillé ci-dessous, la connaissance des bases moléculaires de l'implantation spécifique des cellules métastatiques a particulièrement progressé récemment, ouvrant la voie à de nombreuses applications cliniques potentielles.

#### Bases moléculaires de l'arrêt des cellules tumorales

Trois approches complémentaires de ce sujet ont été développées. La première étudie les déterminants génétiques déterminant l'adressage, et responsable d'un profil métastatique particulier à la tumeur primaire. La seconde étudie les modifications préalables à l'implantation des cellules tumorales circulantes, aboutissant au concept de niche métastatique. La troisième voie de recherche, plus ancienne, concerne les effecteurs de l'ancrage des cellules tumorales sur l'endothélium.

**Adressage métastatique** Il s'agit ici de déterminer dans la tumeur primitive les déterminants génétiques à l'origine d'une localisation sélective des métastases au sein de l'organisme de l'hôte. Si les expériences initiales développaient des approches par gène-candidat en PCR, immunohistochimie ou modification d'expression, la méthodologie des expériences d'adressage est relativement standardisée depuis l'utilisation des puces à ADN. La recherche de gènes candidats se fait initialement par comparaison des profils d'expression de tumeurs métastatiques et non métastatiques dans un organe donné. Cette comparaison peut inclure des tumeurs d'origines différentes (par exemple cancer du sein et cancer de la prostate métastasants tous deux au niveau osseux), afin de réduire le bruit de fond lié à l'organe d'origine. Une autre méthodologie compare une lignée-mère non sélectionnée à une lignée-fille obtenue par plusieurs cycles d'enrichissement par réinjection sous-cutanée des cellules tumorales métastatiques. La validation des gènes retrouvés se fait par analyse d'autres échantillons, typiquement des prélèvements de tumeurs humaines (par exemple biopsies de métastases osseuses), ainsi que par des expériences *in vivo* utilisant des cellules tumorales sur- ou sous-exprimant les gènes d'intérêt.

Le rôle des cytokines et de leurs récepteurs a été retrouvé par de nombreuses approches de type gène-candidat. Par analogie avec les mécanismes de chimiotactisme leucocytaire, il a été démontré que les cellules tumorales mammaires présentent à leur surface des récepteurs (en l'occurrence CXCR4 et CCR7) pour des chemokines (CXCL12/SDF1 et CCL21 respectivement) exprimées par les organes cibles correspondant au profil métastatique des tumeurs mammaires

(foie, poumons, moelle osseuse, ganglions lymphatiques) (Müller A, Nature 2001). Dans une série de cancer du sein, l'expression de CXCR4 a été associée à l'apparition de métastases hépatiques (Andre F, Ann Oncol 2006) ; dans plusieurs autres modèles, CXCR4 est associé à des métastases pulmonaires (Murakami T, Cancer Res 2002). Au niveau moléculaire, l'expression de CXCR4 est activée par la voie de signalisation du TGF- $\beta$  ; et son activation de CXCR4 est, entre autres, à l'origine d'une augmentation d'expression du récepteur uPAR (Serrati S, J Pathol 2007).

Plusieurs profils d'expression ont été rapportés, plus ou moins associés à la survenue de métastases. L'équipe de Joan Massagué a ainsi initialement rapporté des signature génomique associée à l'apparition de métastases osseuses (Kang Y, PNAS 2003) puis pulmonaires (Minn AJ, Nature 2005) d'adénocarcinome mammaire. Parmi les gènes particulièrement associés à l'apparition de métastases pulmonaires au sein de cette signature, la même équipe a montré récemment que l'expression de 4 gènes pouvait être responsable d'un adressage spécifique des cellules tumorales vers le parenchyme pulmonaire. Il s'agit de l'épiréguline (ligand de la famille de l'EGFR), de la cyclooxygénase COX2 et des métalloprotéases de la matrice MMP1 et MMP2 (Gupta GP, Nature 2007). Dans leurs expériences, ces 4 gènes agissent collectivement pour faciliter différentes étapes de la croissance tumorale et du processus métastatique : angiogénèse, extravasation et extravasation des cellules tumorales circulantes. L'explication moléculaire de la localisation pulmonaire de ces métastases reste cependant peu claire en terme mécanistique ; il faut remarquer ici que ces gènes semblent particulièrement associés à la prolifération tumorale initiale et à l'intravasation (Minn AJ, PNAS 2007, Stasinopoulos I, Mol Cancer Res 2007). Il est dès lors possible que la localisation pulmonaire observée ne soit due qu'à une augmentation générale du caractère métastatique de la tumeur initiale, le poumon ne jouant alors que le rôle de premier « filtre » mécanique dans le cas d'une tumeur mammaire ou sous-cutanée.

Dans un modèle *in vivo*, la même équipe new-yorkaise a défini 127 probes sets (102 gènes) dont la variation était associée à la formation de métastases osseuses (Kang Y, PNAS 2003). De manière intéressante, parmi les gènes dont l'expression variait le plus, étaient retrouvés : CXCR4 (récepteur de chimiokine, cf infra), IL-11 (activateur de la différenciation ostéoclastique), MMP1 (cf supra) et CTGF (facteur de croissance du tissu connectif). Par des expériences de corégulation, les auteurs montrent que ces gènes ont une action coopérative sur la formation de métastases osseuses et qu'ils sont d'emblée co-exprimés par une sous-population de la tumeur initiale. D'une manière théorique, cette expérience est un argument important en faveur de la pré-existence d'un sous-clone métastatique au sein de la population tumorale initiale.

Chez l'Homme, moins connue que la signature pronostique dite « de Rotterdam » (abordée ci dessous - Wang Y, Lancet 2005), une signature génomique des tumeurs du sein métastasant à l'os a été publiée (Smid M, J Clin Oncol 2006). L'analyse SAM (Significance Analysis of Microarrays) a défini 69 gènes différentiellement exprimés entre tumeurs métastatiques à l'os et tumeurs n'y métastasant pas. TFF1 (Trefol factor 1), premier gène de cette liste, a ensuite été validé sur un autre échantillon par RT-PCR. Il n'existe à ce jour pas d'explication biologique associant ce « peptide en trèfle » et l'apparition de métastases osseuses. Il faut surtout remarquer que cette analyse est un « sous-produit » de la signature pronostique, dans la mesure où les échantillons considérés sont les mêmes (n=107 patientes), exposant ainsi à un risque important de biais méthodologique de type tests multiples. De plus, si cela n'est pas précisé explicitement, il



semble que l'analyse utilise comme critère « métastase osseuse » toute métastase osseuse, qu'elle survienne en tant que premier site de rechute ou de manière ultérieure au cours de l'évolution de la maladie métastatique, ce qui ne correspond sans doute pas aux mêmes mécanismes biologiques [cf la méthode utilisée pour l'étude des sites initiaux de rechute associés aux micrométastases médullaires : il s'agit de ne retenir pour l'analyse que les sites métastatiques initiaux, et non pas ceux qui surviendraient ultérieurement au cours de la maladie métastatique].

**Niche prémétastatique** L'action du VEGF-A synthétisé par les cellules tumorales agit sur le développement d'une néovascularisation en activant les cellules endothéliales matures déjà présentes dans la paroi vasculaire VEGFR1+ et en recrutant localement des cellules hématopoïétiques progénitrices VEGFR2+, d'origine médullaire. Les cellules VEGFR1+ seraient indispensables à l'extravasation et à l'incorporation locale des cellules VEGFR2+ nécessaires à la néoangiogénèse (Grunewald M, Cell 2006). Un article a par la suite rapporté que des cellules hématopoïétiques médullaires VEGFR1+ sont capables, en réponse à la stimulation endocrine (cytokines...) générée par l'existence de la tumeur primitive, de circuler dans le sang et d'envahir les stromas périvasculaires riches en fibronectine (via une liaison par l'intégrine  $\alpha 4\text{-}\beta 1$ ). Il est supposé que l'envahissement local du stroma par ces cellules progénitrices est responsable d'une « activation » locale du stroma (comme précédemment rapporté pour le stroma péri-tumoral au cours des processus d'invasion tissulaire). L'activation d'intégrines et de cytokines comme SDF1/CXCL12 serait alors responsable du recrutement local des cellules tumorales circulantes, par les mécanismes détaillés auparavant. Les cellules hématopoïétiques médullaires VEGFR2+ formeraient une « niche » pré-métastatique favorisant l'implantation des cellules tumorales circulantes (Kaplan RN, Nature 2006 ; Kaplan RN, Cancer Res 2006). Le recrutement des cellules médullaires hématopoïétiques VEGFR2+ ferait suite à l'arrivée des cellules tumorales circulantes, et contribuerait à l'établissement d'une microvascularisation de la future lésion secondaire. Ainsi, l'inhibition pharmacologique du VEGFR1 provoque selon cette expérience une inhibition de la formation des niches micrométastatiques alors que l'inhibition du VEGFR2 bloque ces micrométastases à un stade infra-angiogénique. Il est aussi particulièrement intéressant de noter que l'inhibition pharmacologique de l'intégrine  $\alpha 4\text{-}\beta 1$  semble inhiber la formation de micro et de macro-métastases, ce qui pourrait déboucher sur des applications cliniques intéressantes.

Il faut cependant noter que, dans ce modèle où les cellules initiatrices des métastases sont monotypiques quel que soit l'organe-cible, le profil métastatique reste cependant déterminé par la tumeur initiale. Il est suggéré que les tumeurs primitives moduleraient l'activation des cellules médullaires VEGFR1+ via la synthèse d'une combinaison unique de différentes cytokines multicibles (par exemple VEGF-A) ou unicibles (PlGF -*Placental Growth Factor*-, spécifique du VEGFR1). Ces différents degrés d'activation seraient responsables d'une affinité variable des cellules VEGFR1+ pour des sites périvasculaires plus ou moins riches en fibronectine (Marcellini M, Am J Pathol 2006). Cette hypothèse complémentaire sur le profil métastatique n'a pas fait l'objet d'étude biologique spécifique et reste potentiellement contestable.

Un deuxième mécanisme de formation de niche prémétastatique pulmonaire a été par ailleurs rapporté : la tumeur primitive induirait, via la sécrétion de VEGF-A, la synthèse de MMP9

par les cellules endothéliales et les macrophages du stroma pulmonaire. Cette synthèse locale de MMP9 serait un élément favorisant l'implantation pulmonaire des cellules tumorales circulantes (Hiratsuka S, Cancer Cell 2002). Cette même équipe a par la suite proposé un troisième modèle de niche pré-métastatique, par le recrutement local de cellules myéloïdes Mac1+ (*macrophage-antigen 1*), en réponse à des chimiokines S100A8 et S100A9 synthétisées par les cellules stromales pulmonaires. Cette synthèse de chemokines surviendrait en présence de tumeur primitive, sans substrat moléculaire clairement identifié (Hiratsuka S, Nat Cell Biol 2006).

Finalement, l'existence d'une niche pré-métastatique reste une observation relativement peu reproduite jusqu'à présent. Les modèles *in vivo* proposés ont été élaborés avec des cellules tumorales syngéniques ou avec des animaux au système immunitaire altéré, ce qui devient critique dès lors que les cellules hématopoïétiques sont appelées à jouer un rôle dans les phénomènes étudiés. Néanmoins, il s'agit d'une révolution dans les modèles d'implantation métastatique, qui laisse évoquer des applications thérapeutiques majeures.

**Mécanismes moléculaires de l'arrêt des cellules tumorales** L'arrêt des cellules tumorales circulantes correspond à deux phénomènes potentiellement complémentaires : arrêt passif par « filtrage » et arrêt « actif » sur une structure endothéliale cible, structure qui peut être les cellules endothéliales elles-mêmes ou la matrice extracellulaire sous-endothéliale.

En un premier lieu, l'arrêt des cellules tumorales circulantes peut avoir lieu de manière passive lors du passage dans un vaisseau capillaire étroit, généralement dans un organe « filtre » (foie, poumons). Cet arrêt mécanique repose sur la différence importante de taille entre les éléments figurés du sang et les cellules carcinomateuses, généralement plus volumineuses, et a été rapporté par plusieurs expériences de vidéomicroscopie *in vivo* (Naumov GN, J Cell Sci 1999; Ito S, Int J Cancer 2001). Cet arrêt mécanique peut être particulièrement favorisé par la formation d'agrégats cellulaires, microembols tumoraux vasculaires fréquemment observés en anatomopathologie, ainsi que par la formation de microthrombi plaquettaires (Im JH, Cancer Res 2004). La plupart des modèles métastatiques *in vivo* correspondent à ce modèle, avec un profil métastatique variant selon l'implantation des tumeurs (implantation sous cutanée et métastases pulmonaires, implantation drainée par la veine porte et métastases hépatiques). La plupart des expériences *in vivo* sur l'adressage des cellules tumorales circulantes ont ainsi recours aux injections intracardiaques (ventricule gauche) de cellules afin de s'affranchir de l'effet de « premier passage » pulmonaire observé avec les injections intraveineuses.

Par ailleurs, le profil métastatique des tumeurs comporte souvent des organes n'ayant aucune fonction de « filtre » (glandes surrénales...), et repose donc sur une reconnaissance spécifique de l'endothélium. Cette reconnaissance peut avoir lieu dans des vaisseaux dont le calibre est nettement plus important que celui des cellules tumorales circulantes (Schlüter K, Am J Pathol 2006). Les mécanismes d'arrêt cellulaire proposés ont été envisagés par analogie avec les processus de reconnaissance endothéliale des leucocytes sanguins au cours de la réponse inflammatoire : (i) la phase initiale de roulement des leucocytes sur la paroi endothéliale est médiée par les sélectines endothéliales. (ii) l'arrêt proprement dit a lieu grâce à des intégrines membranaires tumorales capables d'adhérer à un endothélium activé. (iii) la phase finale de diapédèse transendothéliale des leucocytes repose sur l'activation des petites GTPases de la

famille Rho (Ley K, Nat Rev Immunol 2007). Peu de données sont actuellement disponibles sur les mécanismes de l'arrêt « physique » des cellules tumorales circulantes lorsqu'elles ne sont pas arrêtées de manière passive. Hormis les mécanismes proposés actuellement de niche pré-métastatique (cf supra), la reconnaissance et l'adhérence aux cellules endothéliales peut être réalisée par certaines sélectines, à l'instar de la première étape d'arrêt leucocytaire (Gout S, Clin Exp Metastasis 2007). Ainsi, la E-Sélectine (exprimée par les cellules des sinoïdes hépatiques) est capable de lier les cellules d'adénocarcinome colique (Khatib AM, Cancer Res 2002) et la suppression de son expression inhibe la formation de métastases dans ce modèle tumoral. Les intégrines tumorales pourraient par ailleurs jouer un rôle dans l'attachement à l'endothélium : une expérience publiée récemment suggère que l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  (pro-métastatique et exprimée à la surface des cellules tumorales) serait inhibée par la tétraspanine KAI1, elle-même activée lors de sa liaison à DARC (exprimée par les cellules endothéliales). Dans ce modèle complexe, l'absence de DARC à la surface des cellules endothéliales d'un organe cible serait responsable de l'activation de la prolifération cellulaire tumorale ainsi que de l'augmentation des fonctions d'adhésion de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  (Bandyopadhyay S, Nat Med 2006).

#### 2.1.4 Extravasation et invasion du tissu

**Extravasation** L'existence d'un processus d'extravasation des cellules tumorales arrêtées sur l'endothélium a fait l'objet d'observations contradictoires. L'observation anatomopathologique d'embols tumoraux proliférants dans le secteur intravasculaire suggère en effet que dans certains cas la croissance métastatique a initialement lieu dans les vaisseaux, et que la disparition d'un endothélium périmétastatique (suivi de l'invasion du parenchyme tissulaire) ne surviendrait qu'ultérieurement (Sugino T, Am J Pathol 2002 ; Kusters B, Oncogene 2007). Il a même été proposé que les métastases ne se développent qu'à partir d'embols tumoraux, seuls capables de maintenir une « homéostasie » tissulaire tumorale nécessaire à la croissance des cellules tumorales (Ruiter DJ, Lancet Oncol 2001). Cependant, les nombreuses expériences de vidéomicroscopie *in vivo* (abordées ci-dessous dans la partie sur l'inefficacité métastatique) ont cependant montré de manière directe la capacité des cellules tumorales injectées isolement dans la circulation sanguine à extravaser. Le débat reste donc ouvert sur l'importance respective, chez l'homme, des embols intravasculaires et des cellules isolées extravasées dans la genèse du processus métastatique.

Au niveau moléculaire, il est probable que le franchissement de cette étape repose sur les déterminants moléculaires déjà utilisés par les cellules tumorales lors de l'invasion du stroma péritumoral : protéases de la matrice (Kawamata H, Int J Cancer), kinases intracellulaires (Earley S, Biochem Biophys Res Commun 2008)... Cependant, quelques observations concernent spécifiquement cette étape. Ainsi,  $\beta$ -ig-h3, une protéine de la MEC, synthétisée par les cellules tumorales colorectales initierait l'extravasation en induisant la dissociation des jonctions intercellulaires endothéliales : sa présence induirait la diminution de l'expression et la réorganisation des VE-cadhérines endothéliales responsables des jonctions serrées entre cellules endothéliales (Ma C, Genes Dev 2008).

**Invasion du site secondaire** Une fois que les cellules tumorales ont franchi l'endothélium de l'organe hôte, l'invasion du site secondaire semble essentiellement reposer sur les mêmes déter-

minants moléculaires que l'invasion locale de la tumeur primitive. De fait, les études rapportant spécifiquement une augmentation de l'invasion du site secondaire utilisent des modèles d'injection intraveineuse ou intracardiaque de cellules tumorales, ce qui empêche toute corrélation entre invasion primaire et invasion secondaire. D'un point de vue thérapeutique, cependant, il est communément sous-entendu que l'inhibition pharmacologique des effecteurs moléculaires de l'invasion joue son principal rôle (thérapeutique et biologique) à ce niveau (Mendes O, Clin Exp Metastasis 2007; Lara PN Jr, Clin Cancer Res 2006) plutôt qu'au site primitif, du fait de la multiplicité des mécanismes invasifs utilisés par les différents sous-clones tumoraux primitifs.

Un aspect spécifique de la croissance tumorale secondaire réside dans la nature du microenvironnement des cellules tumorales disséminées; de fait, les propriétés de renouvellement intrinsèque au tissu-hôte sont susceptibles d'être mises à profit par les cellules tumorales de manière à favoriser la dégradation du tissu-hôte, et par là même l'invasion tumorale. Ce phénomène est particulièrement bien décrit dans les métastases osseuses, autour desquelles les ostéoclastes sont stimulés par les cellules tumorales (Bussard KM, Cancer Metastasis Rev 2008). Dans le modèle de cancer de la prostate, cette stimulation passe par diverses molécules sécrétées par les cellules tumorales (PTHrP, IL-1, IL-8, RANK-ligand soluble, TNF- $\alpha$ , prostaglandines...) qui activent la différenciation et/ou l'activité ostéoclastique (dans le cas des métastases ostéolytiques). Ces phénomènes sont devenus la cible de thérapies commercialisées visant à inhiber la croissance métastatique au niveau osseux, en bloquant l'action des cellules tumorales sur leur microenvironnement : les anti RANK-ligands et les biphosphonates. Les premiers (denosumab, ostéoprotégérine...) inhibent la différenciation des ostéoclastes induite par RANK-ligand; les deuxièmes (zolédronate, pamidronate...) diminuent le fonctionnement même des ostéoclastes en inhibant la farnesyl-pyrophosphate synthase, enzyme clé de l'isoprénylation protéique.

### 2.1.5 Croissance secondaire des cellules tumorales disséminées

**Mise en évidence des micrométastases et de leur dormance** Compte tenu de la rapidité de croissance des métastases dans les modèles murins et de la dérégulation, dans les cellules tumorales, des mécanismes contrôlant la division cellulaire, il a longtemps été considéré que la prolifération était ininterrompue au cours du processus métastatique : ayant réussi leur implantation dans un site secondaire, les micrométastases (ou cellules tumorales disséminées) devraient systématiquement former des macro-métastases, au bout d'un délai ne dépendant que de leur capacité proliférative intrinsèque (Liotta LA, Cancer Res 1978; Weinhold KJ, J Exp Med 1979). Cependant, plusieurs modèles cliniques et expérimentaux contredisent ces données, introduisant progressivement l'existence d'une « dormance » des cellules tumorales disséminées au sein des tissus hôtes. La régulation de la dormance, et le déclenchement de la croissance secondaire (ou « colonisation » du site métastatique) serait ainsi l'ultime étape du processus métastatique.

La première observation est certainement la latence d'apparition des métastases dans certaines situations cliniques, parfois supérieure à 10 ans, et qui ne peut pas être expliquée uniquement par la lenteur de la croissance tumorale secondaire. En 1983, la détection de micrométastases médullaires est rapportée dans une première cohorte de cancers du sein en situation adjuvante (Redding WH, Lancet 1983), mais le lien entre micrométastases et rechute métasta-

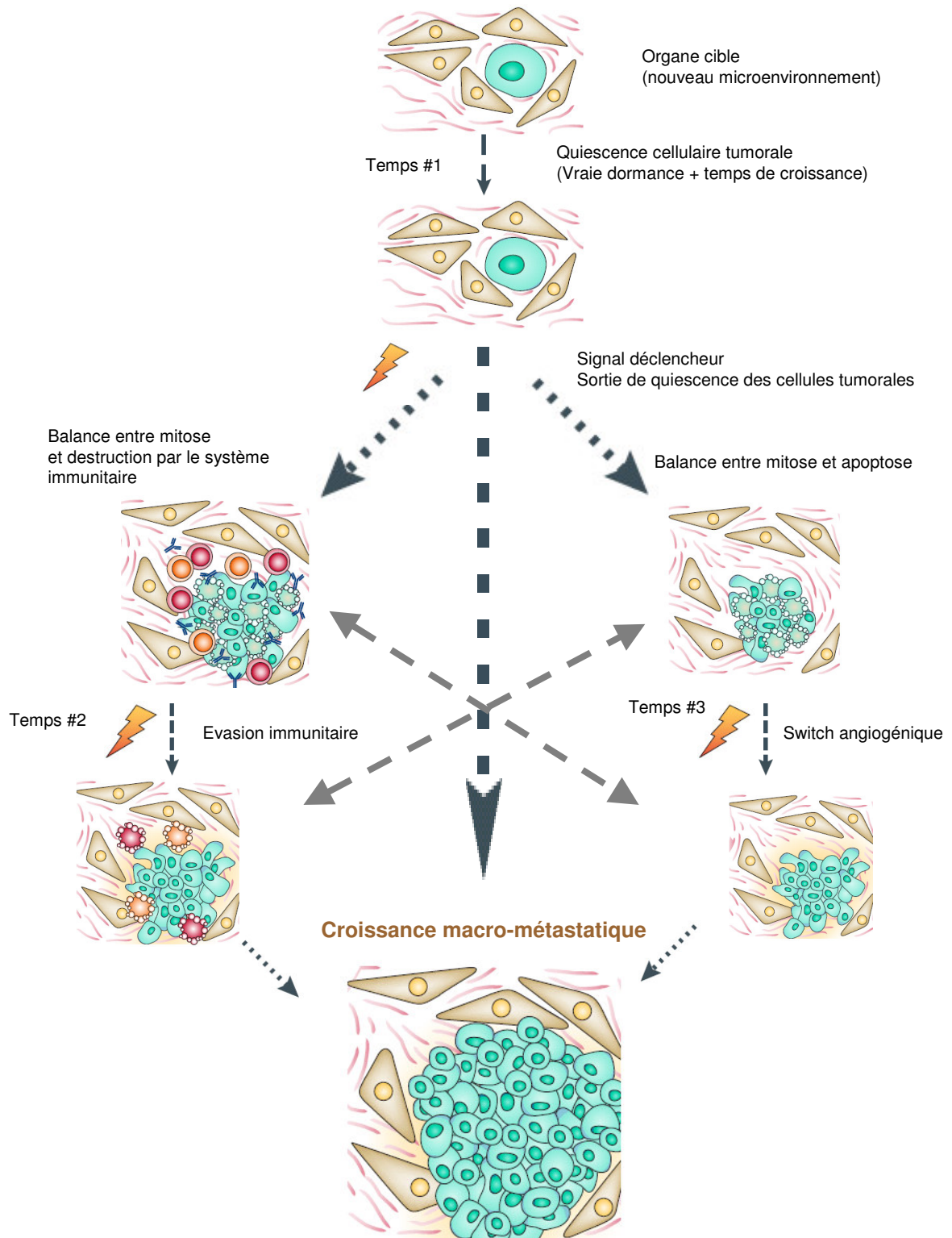
tique n'a pas encore été étudié.

L'équipe de Marie-France Poupon a par la suite utilisé un modèle de rhabdomyosarcome de rat pour étudier la régulation de la dormance des micrométastases pulmonaire (Breillout F, JNCI 1989). Dans cette expérience, les tumeurs primitives ont été retirées chirurgicalement avant l'apparition de métastases pulmonaires, les rats restant alors indemnes. L'administration systémique d'EGF a conduit dans cette situation à l'apparition rapide de métastases pulmonaires, démontrant à la fois l'existence des micrométastases pulmonaires, leur dormance et leur sensibilité aux facteurs environnementaux. Ce modèle est particulièrement intéressant car il suggère pour la première fois que les micrométastases peuvent être maintenue dans un état « dormant » de manière prolongée, sinon indéfiniment, par le micro-environnement des micrometastases.

Par ailleurs, en 1994, l'équipe de Judas Folkman (par ailleurs à l'origine de l'appellation « dormance ») a rapporté l'existence d'une inhibition de la croissance des cellules tumorales disséminées par la tumeur primitive elle-même, via la sécrétion d'angiostatine (O'Reilly MS, Cell 1994). Outre l'importance de l'angiogénèse dans l'histoire naturelle du cancer et du processus métastatique, cette étude ainsi qu'une autre de la même équipe (Holmgren L, Nat Med 1995) ont confirmé que la régulation de la croissance métastatique était réalisée par des facteurs environnementaux régulant la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales disséminées.

**Régulation de la dormance micrométastatique** Actuellement, 3 principaux mécanismes sont actuellement proposés pour expliquer l'existence d'une « pause » au cours de la prolifération tumorale (cf. figure 2.1) : interaction avec le système immunitaire, réversion du switch angiogénique et effet inhibiteur du nouvel microenvironnement tumoral (Aguirre-Ghiso JA, Nat Rev Cancer 2007) : les micrométastases dormantes sont en effet tout d'abord perçues comme le résultat d'une action antitumorale du système immunitaire de l'hôte (Alexander P, J Pathol 1983), limitant la croissance des cellules disséminées. Le rôle du système immunitaire dans la dormance est par la suite nuancé : les micrométastases dormantes sont stimulables par des facteurs de croissance (Breillout F, JNCI 1989), et pourraient être maintenues à un stade pré-angiogénique par des facteurs sécrétés issus de la tumeur initiale (caractérisation de l'angiostatine par le groupe de Folkman (O'Reilly MS, Cell 1994) ; (Naumov GN, JNCI 2006)). Une quatrième explication de la dormance des micrométastases serait l'activation, dans ces cellules tumorales, de gènes suppresseurs de métastases (Eccles SA, Lancet 2007). Finalement, le marquage des cellules tumorales par la Bêta galactosidase ou la GFP a permis se suivre par vidéomicroscopie ou immunocytochimie le devenir précoce des cellules tumorales injectées dans des modèles *in vivo*. Ces études ont retrouvé que la colonisation des sites métastatiques par les cellules tumorales circulantes est bien suivie d'une phase de dormance, sans reprise immédiate de la prolifération tumorale (Lin WC, JNCI 1990 ; Luzzi KJ, Am J Pathol 1998). Les mécanismes régulateurs de la dormance restant donc très mal caractérisés à ce jour (voir revue Vincent-Salomon A, J Clin Pathol 2008 ci dessous), aucun marqueur ne permettant de distinguer, parmi les cellules micrométastatiques, celles qui proliféreront de celles qui resteront dormantes.

Dissémination des cellules tumorales et extravasation



**FIG. 2.1 :** Vue intégrée de la dormance micrométastatique (Aguirre-Ghiso JA, Nat Rev Cancer 2007)

**Signification clinique** L'existence des micrométastases, qui sont renommées « cellules tumorales disséminées » (pour éviter la confusion avec l'envahissement ganglionnaire micrométastatique, régi par des mécanismes différents) a fait l'objet de plusieurs études portant sur le cancer du sein en situation adjuvante (cf revue écrite dans ce manuscrit, Vincent-Salomon A, J Clin Pathol 2008). Leur dormance serait responsable d'une résistance à la chimiothérapie adjuvante (Braun S, J Clin Oncol 2000). Si la détection de micrométastases est maintenant clairement associée à une augmentation du risque de rechute des patientes, deux observations sont à faire :

(i) quelle que soit l'étude considérée (et le temps de suivi médian des patientes), la majorité des patientes présentant des micrométastases ne développent pas de maladie métastatique ;

(ii) les rechutes métastatiques surviennent aussi, bien que moins fréquemment, chez les patientes sans micrométastases médullaires décelées.

La présence de micrométastases médullaires ne serait donc pas d'une condition nécessaire et suffisante au développement de métastases. Ces observations peuvent s'expliquer de plusieurs manières complémentaires :

- La technique de détection des micrométastases médullaires est peu sensible, et se heurte à des problèmes de spécificité. Il s'agit en effet de détecter des cellules présentes dans la moelle à raison de 1 cellule tumorale pour 1 million de cellules mononucléées, ce qui rend impossible les approches de tri cellulaire automatisé de type FACS. Plusieurs techniques de détection, tant moléculaires (détection de transcrits tumoraux par RT-PCR) qu'immunocytochimiques, ont été successivement utilisées jusqu'à obtention d'un consensus européen sur la détection de ces cellules (Borgen E, Cytotherapy 1999 ; Fehm T, Cancer 2006), qui reste la référence en 2008. (cf première partie de la revue Vincent-Salomon A, J Clin Pathol 2008).

- Le processus de régulation de la « dormance » est actuellement inconnu. Du maintien (ou non) des cellules tumorales disséminées dans un état non prolifératif dépend vraisemblablement la survenue d'une rechute métastatique. Plusieurs études ont été rapportées, proposant plusieurs effecteurs moléculaires de la régulation micro-environnementale et intracellulaire de la non-prolifération des micrométastases (cf troisième partie de la revue Vincent-Salomon A, J Clin Pathol 2008).

- La cible médullaire n'est pas forcément la bonne, dans la mesure où les rechutes par métastases médullaires restent peu fréquentes dans le cancer du sein. Si l'on tient compte de la théorie de Joan Massagué proposant l'existence de sous-populations tumorales indépendantes capables de métastaser à des sites différents, la détection de micrométastases médullaires ne serait alors associée qu'à une augmentation du nombre de métastases médullaires (ou osseuses) ; laissant de côté les considérations éthiques et techniques liées à la réalisation d'un prélèvement invasif, il faudrait d'après ce modèle mieux s'intéresser aux micrométastases pulmonaires, hépatiques ou cérébrales. Des arguments contraires suggèrent que les micrométastases médullaires sont extrêmement hétérogènes aux niveaux génétique et phénotypique (Klein CA, Lancet 2002 ; Braun S, Clin Cancer Res 1999 ; Hüsemann Y, Cancer Cell 2008) ; la moelle pourrait ainsi agir comme un « réservoir » de cellules tumorales amenées à recirculer dans un second temps. (cf infra, troisième partie de la revue Vincent-Salomon A, J Clin Pathol 2008).

- Une hypothèse personnelle propose une autre « voie » métastatique, potentiellement plus rapide car s'affranchissant de la phase de dormance associée à la dissémination micrometas-

tatique médullaire (cf chapitre résultats Bidard FC, article soumis à Clinical Experimental Metastasis).

En conclusion, Joan Massagué a proposé une classification (Nguyen DX, Nat Genet 2007) qui prend en compte cette phase ultime de « colonisation » du site métastatique par les cellules tumorales disséminées, séparant ainsi les gènes potentiellement impliqués dans le processus métastatique en 4 catégories :

- les gènes tumorigéniques (oncogénèse et croissance initiale)
- les gènes de l'initiation de la métastase (régulant les étapes de détachement, de motilité, d'invasion, d'angiogénèse et d'intravasation au niveau tumoral initial)
- les gènes de la progression métastatique (survie dans la circulation, adhésion capillaire ciblée, extravasation, survie dans le nouveau micro-environnement)
- les gènes de la virulence métastatique (reprise de la croissance tumorale secondaire)

Si cette classification est probablement trop théorique du fait de l'action pléiotropique de nombreux gènes tout au long du processus métastatique, elle présente l'avantage de mettre en avant l'étape finale de dormance ou de prolifération des cellules tumorales disséminées, pour l'instant peu connue. (Les études portant spécifiquement sur les cellules tumorales disséminées au niveau médullaire sont abordées plus loin).

## 2.2 Rappel : Inefficacité métastatique

### 2.2.1 Inefficacité numérique

Dans les modèles précliniques murins étudiés initialement, les expériences d'injection intraveineuse de lignées cellulaires monoclonales et hautement métastatiques a prouvé que la probabilité pour chaque cellule tumorale (injectées en intra-veineux) de former des métastases était particulièrement faible, estimée aux environs de 1 chance sur 100 000 ou 1 000 000 (Fidler IJ, JNCI 1970). En clinique, les observations d'épanchements ascitiques traités par shunt péritonéo-veineux ont permis à certains auteurs de confirmer ces données (Tarin D, Cancer Res 1984), du fait de la latence importante de survenue de métastases systémiques. De manière plus moderne, la détection des cellules tumorales circulantes en situation adjuvante est associée à une plus grande fréquence de rechute métastatique dans de nombreuses études, mais ne constitue un facteur indépendant de rechute métastatique que dans 3 études portant sur le cancer du sein (Ignatiadis M, J Clin Oncol 2007 ; Pachmann K, J Clin Oncol 2008 ; Pierga JY, Clin Cancer Res 2008 *sous presse*).

L'inefficacité métastatique des cellules tumorales circulantes a été initialement attribuée à de nombreux facteurs, essentiellement à la destruction mécanique au cours de l'étape de circulation (cf ci dessus). En clinique, les cellules tumorales détectées pourraient aussi correspondre à des sous-clones ne possédant pas, dans leur grande majorité, l'essentiel des déterminants moléculaires nécessaires à l'accomplissement du processus métastatique. Si ces cellules circulantes « incomplètement métastatiques » ou sensible à l'anoïkis ne formeront finalement pas de métastase, l'hypothèse *princeps* de la coopération intercellulaire testée dans ce manuscrit propose qu'elles jouent un rôle pro-métastatique via un conditionnement progressif des sites métastatiques candidats avec lesquels elles interagissent (cf infra l'article de revue Bidard FC, Cancer



Metastasis Rev 2008).

### 2.2.2 Apport des techniques de vidéomicroscopie *in vivo*

Le développement des techniques de marquage cellulaire en fluorescence, couplée à celui des techniques d'imagerie confocale ont permis à plusieurs équipes de développer des techniques d'observation *in vivo* de cellules tumorales circulantes injectées dans la circulation. Ces études ont pour la plupart infirmé les données précédentes sur la circulation, l'arrêt des cellules tumorales et l'extravasation :

Dans deux expériences, après une injection de cellules de mélanome B16 de souris, plus des trois-quarts des cellules tumorales sont arrêtés dans les capillaires pulmonaires, ont extravasé et survécu sous forme dormante pendant quelques jours dans l'environnement péri-capillaire (Cameron MD, Cancer Res 2000; Koop S, Cancer Res 1995). Par ailleurs, l'extravasation est un phénomène indépendant du phénotype métastatique, de simples fibroblastes extravasant aussi fréquemment que des cellules métastatiques (Koop S, PNAS 1996; Varghese HJ, Cancer Res 2002). De manière contradictoire, avec le même type de technique, une autre équipe a rapporté que l'extravasation n'était qu'un phénomène minoritaire, l'arrêt intravasculaire étant immédiatement suivi d'une prolifération tumorale intravasculaire (Al-Mehdi AB, Nat Med 2000).

L'une des conclusions de ces études de vidéomicroscopie est que le taux de mortalité (« metastatic efficiency ») observé à chaque étape du processus métastatique est corrélé à la capacité métastatique (« metastatic ability ») de chaque cellule tumorale. D'autre part, ces études ont conclu à l'absence de pression sélective sur les étapes du processus qu'elles ont été en mesure d'étudier. Ainsi il est maintenant communément accepté que les étapes de survie dans la circulation, d'arrêt dans la circulation et d'extravasation sont peu sélectives et potentiellement réalisables par toute cellule tumorale circulante. Les étapes (qui restent non ou peu observées) d'intravasation, de régulation de la survie et, surtout, de la dormance des cellules tumorales disséminées, rapportées en vidéomicroscopie (Naumov GN, Cancer Res 2002; Goodison S, Clin Cancer Res 2003) sont alors supposées correspondre aux étapes sélectives du processus métastatique, faisant appel à des cellules sélectionnées (Chambers AF, Breast Cancer Res 2000). Il est d'ailleurs intéressant de remarquer, d'un point de vue théorique et général, que les étapes du processus métastatique ayant pu faire l'objet d'observations directes ont alors été décrites comme n'étant ni spécifiques et ni sélectives. Les avancées technologiques ont paradoxalement conduit à faire reposer la sélectivité supposée du processus métastatique sur les étapes restant non directement observables.

## 2.3 Rappel : Déterminants génétiques

Plusieurs théories sont actuellement proposées par différents groupes pour expliquer l'origine du processus métastatique. Le paradigme actuel de la sélection clonale (et de l'existence d'un switch métastatique), défendu par « l'école » de Fidler (Dan Welch, Patricia Steeg, James Talmadge) est fortement remis en cause par plusieurs laboratoires, dont celui de Robert Weinberg. D'autres points se sont par ailleurs rajoutés dans l'étude des déterminants génétiques du processus métastatique, avec les données proposant un rôle à la transition épithélio-mésenchymateuse,

aux gènes suppresseurs de métastases, voire même aux cellules souches. De multiples théories alternatives ont donc été proposées, permettant d'intégrer des données expérimentales et/ou cliniques non explicables par la théorie de la sélection clonale.

### 2.3.1 Théorie de la sélection clonale

**Génèse de la théorie de sélection clonale** L'expérience princeps, publiée par Kripke et Fidler il y a 30 ans (Fidler IJ, Science 1977), concluant à l'origine clonale des métastases (autrement dit, à l'existence d'une sous population cellulaire au sein de la tumeur initiale responsable à elle seule de la croissance métastatique) utilisait le modèle du mélanome B16. Fidler y démontre qu'il est possible d'isoler une population de cellules tumorales hautement métastatiques au niveau pulmonaire à partir d'une population cellulaire faiblement métastatique, après plusieurs cycles de sélection (injection de cellules tumorales, excision des métastases pulmonaires, re-injection des cellules isolées suivie à nouveau d'excision des métastases, re-injection...). Ces résultats ont été confirmés sur une autre lignée cellulaire de « fibrosarcome » de rat (lignée UV-2237) (Fidler IJ, Cancer Res 1978). Par ailleurs, l'expérience de Hill (Hill RP, Science 1984) avait pour objectif de distinguer si le processus métastatique repose sur une sélection ou une adaptation des cellules tumorales primitives. En adaptant le principe du test de fluctuation de Luria et Delbrück -utilisé en bactériologie pour distinguer les mutations préexistantes (sélection) ou non (adaptation) de résistance aux antibiotiques- aux cellules tumorales, cette expérience a comparé le potentiel métastatique de plusieurs sous-clones tumoraux à celui de la tumeur initiale. Les 17 sous-clones testés ont alors montré une hétérogénéité statistiquement significative de leur potentiel métastatique (évalué par dénombrement microscopique) par rapport à la tumeur initiale. La conclusion des auteurs était donc que le processus métastatique est issu d'une sous population métastatique pré-existante au sein de la tumeur primitive, et non pas d'une adaptation des cellules tumorales primitives.

Un corollaire de la théorie de la sélection est que plusieurs sous-clones tumoraux peuvent être métastatiques, ces sous-clones pouvant apparaître (du fait de l'instabilité génétique) tout au long de la croissance de la tumeur primitive. Ce phénomène a été montré *in vivo* en utilisant des cellules murines de mélanome, irradiées de manière à créer des cassures aléatoires de l'ADN : les métastases présentaient un profil de remaniement chromosomique différent les unes des autres (Talmadge JE, Science 1982). Pour les tenants de la théorie de la sélection clonale, ce phénomène pourrait expliquer l'hétérogénéité inter-métastatique observée au cours de l'histoire naturelle du cancer (Kuukasjärvi T, Cancer Res 1997). Un autre facteur d'hétérogénéité intramétastatique serait l'évolution génétique liée à l'instabilité génétique des cellules (clonales) après l'établissement des métastases (Talmadge JE, Cancer Res 1984; Talmadge JE, Cancer Res 2007).

La théorie de la sélection clonale fait donc reposer l'apparition de métastases sur la présence, au sein de la population tumorale primitive, d'au moins une sous-population possédant tous les déterminants génétiques et phénotypiques nécessaires au processus métastatique. Si le moment de l'acquisition du potentiel métastatique n'est pas déterminé (Schmidt-Kittler O, PNAS 2003). Cela conduit implicitement à rechercher le(s) gène(s) qui serai(en)t responsable(s) d'un switch métastatique, à l'instar du switch angiogénique. Ce gène (ou petit groupe de gènes, voire même

une « signature » multigénique) verrait son expression dérégulée, après l'oncogénèse initiale, par l'instabilité génétique connue des cellules tumorales. Fidler et Kripke résument ce point de vue en 2003 par l'affirmation « *lack of any single characteristic derails the process and prevents the cell from developing into a metastasis* » (Fidler IJ, Nat Genet 2003).

Ce switch métastatique serait ainsi un évènement rare dont la probabilité de survenue dans une tumeur dépend directement du nombre de cellules tumorales, et donc de la taille de la tumeur. Dans ce modèle de switch, plusieurs gènes peuvent être impliqués, et l'on peut distinguer d'emblée les gènes maîtres (« master genes ») des gènes effecteurs. Les gènes « maîtres » seraient des facteurs de transcription ou de signalisation, et seraient les initiateurs de la dérégulation de l'expression des gènes secondaires, effecteurs. Ces derniers seraient l'ensemble des protéases, molécules d'adhésion, (...), décrits précédemment comme nécessaires au franchissement successif des étapes du processus métastatique.

**Méthodologies d'étude génétique** Le plan de démonstration du rôle d'un gène dans le processus métastatique nécessite une série d'expériences dont le plan est généralement le suivant :

- observation d'une différence d'expression entre cellules métastatiques ou non (à noter que ces expériences s'adressent toujours à des populations cellulaires, et non à une cellule unique)
- augmentation (respectivement, diminution) de l'expression dans les cellules tumorales qui n'expriment pas (respectivement, expriment) ce gène
- étude du phénotype métastatique (ou non) des cellules génétiquement manipulées
- validation clinique sur une cohorte de patients avec analyse univariée de la corrélation avec la survenue de métastases. Les analyses multivariées en présence des facteurs pronostiques cliniques connus sont exceptionnellement publiées.

L'approche par gène candidat a longtemps prévalu. Nous avons vu auparavant que l'étude des étapes successives du processus métastatique a permis de décrire l'implication de nombreux gènes effecteurs pour la réalisation du processus. Pour certains d'entre eux, la sur- ou sous-expression de beaucoup de ces gènes permet en effet d'activer ou d'inhiber complètement la formation de métastases *in vivo*. Ces gènes pourraient donc être les responsables initiateurs du switch métastatique. Il s'agit de :

A côté de ces gènes « effecteurs » et potentiellement initiateurs du processus métastatique, quelques gènes jouant un rôle de signalisation ou de régulation transcriptionnelle ont montré leur capacité à réguler de manière *on/off* le processus métastatique. De par leur fonction, leur rôle de gènes initiateurs du switch métastatique semble très probable. Pour ce type de gènes, méthodologiquement, les analyses comparatives de transcriptome ont permis de compléter les approches par gènes candidats. La recherche des gènes du switch est en effet particulièrement adaptée à une étude comparative tumeur primitive/métastases, ces dernières ne différant, dans la théorie du switch, que par les gènes impliqués dans le processus métastatique.

### 2.3.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

**Cellules épithéliales et mésenchymateuses, définition de l'EMT** Les cellules épithéliales et mésenchymateuses diffèrent par de nombreuses caractéristiques fonctionnelles et phé-

notypiques. Les cellules épithéliales s'associent les une aux autres pour former des structures cellulaires en monocouche grâce à des structures membranaires spécialisées : jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes et jonctions communicantes. Les cellules épithéliales présentent par ailleurs une polarisation cellulaire apico-basolatérale marquée par une localisation sélective des protéines d'adhésion (cadhérines, intégrines), par la présence des jonctions intercellulaires sur la membrane latérale, par l'organisation du cytosquelette d'actine et par la présence d'une membrane basale au contact du pôle basal des cellules. Les cellules épithéliales peuvent migrer au sein d'un même épithélium, mais ne peuvent normalement pas s'en détacher (Thompson EW, Cancer Res 2005 ; Thiery JP, Nat Rev Mol Cell Biol 2006).

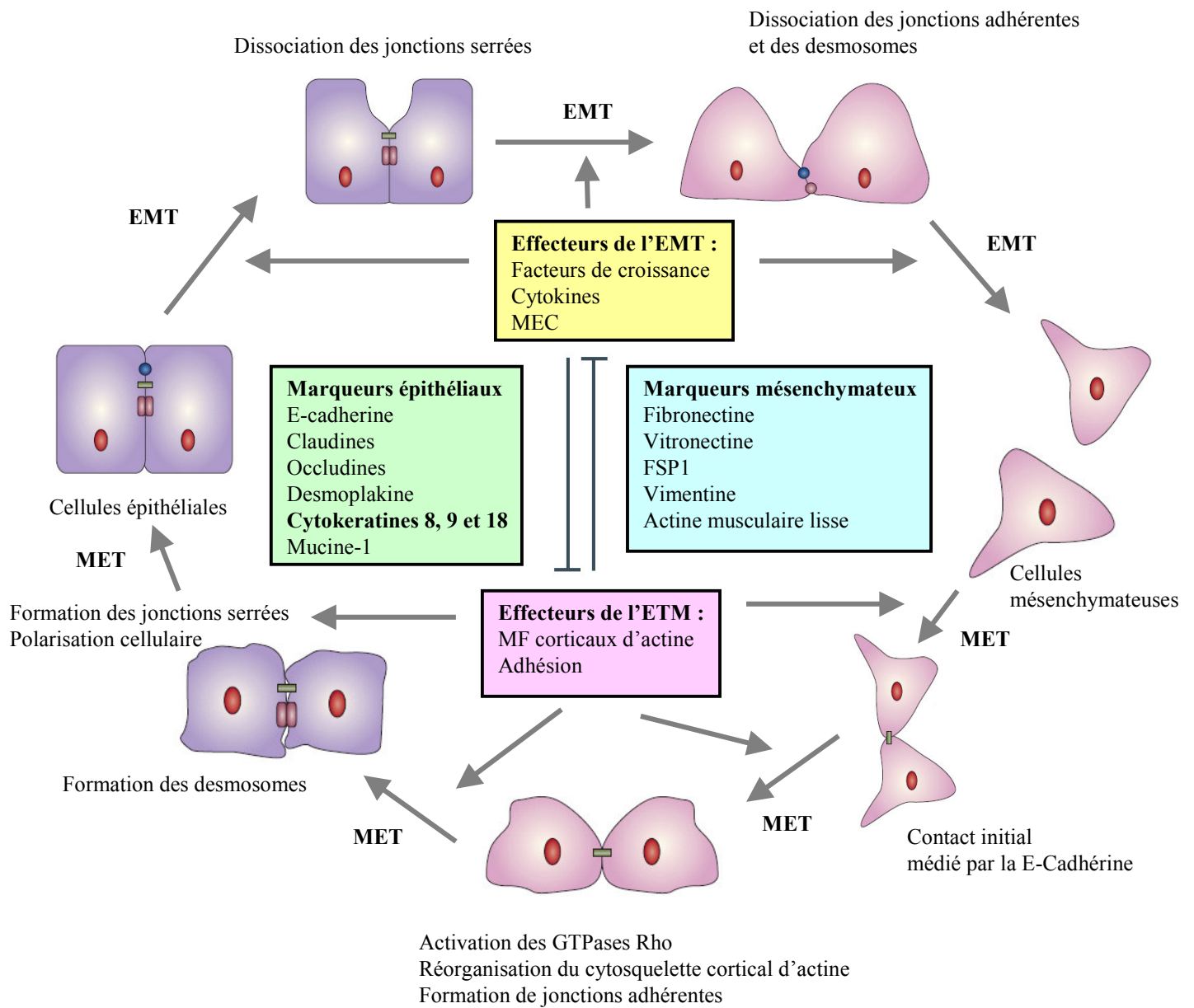
Les cellules mésenchymateuses ne présentent pas cette polarisation cellulaire, ne forment que focalement des adhésions intercellulaires, et ne sont pas associées à l'existence d'une membrane basale. En culture, elles présentent un phénotype fibroblastoïde et ne forment pas d'amas cellulaires, au contraire des cellules épithéliales. Les capacités migratoires de ces cellules sont souvent évidentes *in vitro*, sans que cela soit systématiquement observé *in vivo* (Thiery JP, Nat Rev Mol Cell Biol 2006). Enfin, plusieurs modes migratoires ont été rapportés pour ces cellules par P. Friedl : migration individuelle « classique » par répétition du cycle extension / adhésion / rétraction / déplacement ou par mouvements de « grouillement pseudo-amibien » (« *pseudo-amoeboïd crawling* ») ; migration collective par chaîne cellulaire (auquel nous nous intéresserons en tant que facteur de coopération intercellulaire, cf revue ci dessous Bidard FC Metastasis Cancer Rev 2008) (Friedl P, Int J Dev Biol 2004).

La transition épithélio-mésenchymateuse est définie comme le processus au cours duquel une cellule épithéliale (1) acquiert un phénotype invasif, fibroblastoïde ; (2) diminue l'expression de protéines spécifiquement épithéliales (par exemple les protéines des jonctions serrées et des jonctions adhérentes) alors que des protéines spécifiquement mésenchymateuses sont exprimées (vimentine, N-cadhérine...) ; (3) dégrade et migre à travers la MEC. Il existe une tendance à considérer que l'EMT ne correspond pas à un changement de lignage complet, et que ces modifications d'expression ne sont la plupart du temps que partielles ; l'ensemble des modifications, si mineures soient-elles, dans l'expression des protéines épithéliales et mésenchymateuses ou dans le phénotype cellulaire est donc rapporté dans la littérature sous le nom d'EMT, ce qui complexifie considérablement l'analyse des données publiées (Grünert S, Nat Rev Mol Cell Biol 2003 ; Thiery JP, Nat Rev Mol Cell Biol 2006).

L'EMT est un processus cellulaire intervenant dans plusieurs phases du développement embryonnaire, à commencer au stade de blastula par la formation du mésoderme lors de la gastrulation. D'autres étapes du développement sont accompagnées d'une perte transitoire de la polarisation cellulaire, d'une redistribution membranaire des protéines d'adhésion, d'une migration cellulaire et de modifications d'expression de la E-Cadherine et de la vimentine : formation des tubules mammaires et des voies excrétrices rénales, migration des cellules de la crête neurale (phénomène explicatif du « modèle du même gène » proposé par RA. Weinberg liant mélanogénèse et processus métastatique)...

De part les propriétés migratoires des cellules mésenchymateuses, l'EMT est largement présentée comme pouvant être responsable de l'acquisition du potentiel métastatique par les cellules tumorales épithéliales. Il a été ainsi rapporté dans de nombreux modèles que la progression tu-

morale vers des stades invasifs et métastatiques s'associe à une dédifférenciation cellulaire, avec altération de la polarisation et acquisition d'un morphotype fibroblastoïde (Petersen OW, Am J Pathol 2003; Thiery JP, Nat Rev Cancer 2002). De manière intéressante, ce phénomène a aussi été rapporté dans un modèle d'étude *in vitro* de lignées cellulaires dérivées de micrométastases médullaires (Putz E, Cancer Res 1999). Au niveau moléculaire, la détection des marqueurs signant l'EMT est moins probante ; il suffit par exemple de rappeler que la détection des cytokératines épithéliales sur les cellules de métastases est utilisée quotidiennement pour orienter la recherche du cancer primitif. Quelques travaux rapportent cependant qu'il existe une co-expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans les cellules métastatiques (Oft M, Nat Cell Biol 2002) ; d'autres proposent que l'EMT ne soit qu'un processus transitoire, et que les cellules micrométastatiques se re-différencient en cellules épithéliales (transition mésenchymo-épithéliale) au sein du site métastatique, sous l'effet d'un microenvironnement différent (Brabletz T, PNAS 2001 ; (cf. figure 2.2)



**FIG. 2.2 :** L'EMT et son inverse, la transition mésenchymo-épithéliale (MET), vues comme un cycle dynamique

(Thiery JP, Nat Rev Mol Cell Biol 2006)

Les mécanismes régulant l'EMT sont multiples : de nombreux activateurs extracellulaires peuvent déclencher ou inhiber ce processus, relayés par des réseaux de signalisation intracellulaire activateurs et répresseurs de l'EMT. L'ensemble de ces signaux aboutissent généralement aux mêmes conséquences d'induction ou de répression de la E-Cadhérine et des autres gènes associés à l'EMT. Il faut noter cependant que ces signaux et voies de signalisation n'ont été pour la plupart rapportés que dans un type précis de cellules épithéliales (Thiery JP, Nat Rev Mol Cell Biol 2006).

Conférant potentiellement à une cellule tumorale une capacité migratoire accrue, l'EMT est actuellement le mécanisme le plus plausible d'application de la théorie du switch métastatique. Quelques unes des voies de signalisation décrites comme responsables de l'acquisition d'un potentiel métastatique via l'EMT sont donc présentées ci dessous : TGF- $\beta$ , HGF-SF, NF-kappaB, Twist, Snail et Slug.

### **TGF- $\beta$**

**voies de signalisation du TGF- $\beta$**  Les voies de signalisation du TGF- $\beta$  jouent un rôle important pour les cellules cancéreuses, tant par action directe sur ces cellules que par modification du micro-environnement tumoral. La superfamille du TGF- $\beta$  comporte plus de 35 polypeptides structurellement proches (TGF- $\beta$  1,2,3 ; activines ; BMPs...). Les trois isoformes du TGF- $\beta$  sont synthétisées de manière ubiquitaire et relâchées sous une forme de précurseurs inactifs activés par un milieu acide ou par l'action de protéases (plasmine, MMPs). Les récepteurs cellulaires du TGF- $\beta$  se répartissent en 3 classes (TGF- $\beta$ RI, RII, RIII), dont les deux premières activent (après hétérodimérisation) les voies de signalisation intracellulaires Smad et MAP-kinases. Il existe 8 types de protéines Smad différentes, classées en 3 groupes : Receptor-activated Smads (R-Smads : Smad1,2,3,5,8), common-mediator Smads (Co-Smads : Smad4), et Inhibitory Smads (I-Smads : Smad6,7). Ces voies interagissent (activation et inhibition) avec les principales voies de signalisation MAP-kinases (ERK1/2, JNK1/2, p38s) qui sont elles aussi activées par les récepteurs du TGF- $\beta$ . (Leivonen SK, Int J Cancer 2007 ; Bierie B, Nat Cancer Rev 2006)

**TGF- $\beta$  et EMT** Le TGF- $\beta$  a été isolé comme inducteur d'EMT dans des cellules épithéliales mammaires non transformées en 1994. L'induction d'EMT par le TGF- $\beta$  semble suivre une séquence temporelle déterminée : perte des jonctions intercellulaires, réorganisation du cytosquelette, perte de la polarité épithéliale et remodelage des adhésions cellule-matrice.

A propos de la perte de jonctions intercellulaires, si la voie smad apparaît comme nécessaire à l'induction d'une EMT chez les cellules tumorales métastatiques (Deckers M, Cancer Res 2004), des mécanismes moléculaires directs semblent impliquer les récepteurs le TGF- $\beta$ RII dans la rupture des jonctions serrées via la dégradation de la petite GTPase RhoA. Les jonctions adhérentes sont atteintes par l'inhibition transcriptionnelle de la E-Cadherine par la voie smad activée (Zavadil J, Oncogene 2005).

L'étape suivante est le remodelage du cytosquelette : les fibres d'actine corticales sont redistribuées en fibres de stress d'actine, caractéristiques des cellules mésenchymateuses. Si la perte des adhésions intercellulaires entraîne mécaniquement une perte de la polarité apico-basolatérale,

suivie d'un remodelage du cytosquelette, le TGF- $\beta$  joue par ailleurs un rôle facilitateur, en activant les GTPases de la famille Rho, responsables à leur tour de l'organisation des fibres de stress d'actine et de la formation de contacts focaux avec la matrice extra-cellulaire.

La signalisation du TGF- $\beta$  induit par ailleurs chez les cellules tumorales et stromales la synthèse de protéases (MMPs, plasmine...) favorisant la dégradation de la MEC, la libération et l'activation du TGF- $\beta$  extra-cellulaire (Zavadil J, Oncogene 2005).

**autres effets du TGF- $\beta$**  Aux stades précoces de la transformation cellulaire, le TGF- $\beta$  exerce initialement un effet suppresseur de tumeur antiprolifératif et proapoptotique. L'augmentation de synthèse du TGF- $\beta$  lors de la croissance tumorale ultérieure s'accompagne d'une perte de l'effet inhibiteur du TGF- $\beta$  sur les cellules tumorales (par altération de la voie de signalisation), étape importante de la progression tumorale (Hanahan D, Cell 2000). Passé ce stade, le TGF- $\beta$  joue parfois un rôle protumoral, en favorisant l'invasion, la motilité, la transition épithélio-mésenchymateuse, la survie cellulaire, l'angiogénèse et l'inhibition du système immunitaire (Jakowlew SB, Cancer Metastasis Rev 2006).

L'adressage à certains sites métastatiques serait aussi lié à l'action du TGF- $\beta$  sur les cellules tumorales. L'équipe de Massagué a montré que le TGF- $\beta$  et la voie smad sont responsables, dans un modèle de cancer du sein, de l'expression de facteurs sécrétés (PTHrP, IL11, CTGF...) favorisant l'implantation métastatique osseuse (Kang Y, Cancer Cell 2003; Kang Y, PNAS 2005). Plus récemment, le même laboratoire a rapporté que le TGF- $\beta$  péri-tumoral induit la synthèse par les cellules tumorales (via la voie smad) d'*angiopoietin-like 4* (ANGTL4). Cette induction aurait lieu en périphérie de la tumeur, sur les cellules tumorales susceptibles de réaliser l'étape d'intravasation. ANGTL4, sécrétée par les cellules tumorales circulantes, provoquerait une altération des jonctions intercellulaires endothéliales, et faciliterait l'extravasation des cellules tumorales au niveau des capillaires pulmonaires (Padua D, Cell 2008).

**Met, HGF/SF** La protéine Met est récepteur transmembranaire à tyrosine kinase, proto-oncogène, qui a pour ligand le *Scatter Factor* (SF), aussi appelé *hepatocyte growth factor* (HGF). L'activation de Met par fixation d'HGF/SF est responsable d'une phosphorylation de la protéine intracellulaire Gab1, capable d'activer à son tour diverses protéines de signalisation (PI3K, phospholipase C, Ras, JNK, STAT3, NK-kappaB...). De part ces diverses voies de signalisation, Met contrôlerait la prolifération cellulaire, mais aussi l'adhésion intercellulaire, le réarrangement du cytosquelette, ce qui pourrait conduire à une transition phénotypique épithélio-mésenchymateuse. Fait important, seules les cellules d'ostéosarcome et de glioblastome synthétisent à la fois Met et HGF/SF; les autres types tumoraux n'expriment généralement pas HGF/SF, dont l'origine proviendrait alors du stroma péri-tumoral (ce qui correspond encore à la notion d'EMT induite par le stroma péri-tumoral, comme déjà vue pour TGF- $\beta$ ). Dans les cellules tumorales, le récepteur Met serait aussi surexprimé en réponse à divers signaux, dont l'activation de la voie MAPK (Birchmeier C, Nat Rev Mol Cell Biol 2003).

**NF-kappaB** NF-kappaB correspond à une famille de 3 protéines cytoplasmiques ubiquitaires (p65, NF-kappaB1, NF-kappaB2) qui, quand elles sont activées, sont transloquées dans le noyau pour y jouer le rôle de facteur de transcription. L'activation de NF-kappaB se fait par différents



signaux : cytokines (TNF, EGF...), infection (LPS bactérien, virus...), stress oxydatif, stress métabolique (hypoxie, acidité...), carcinogènes multiples (benzène...). Huit protéines inhibitrices (IkappaB $\alpha$ ,  $\beta$ ...) ont normalement pour fonction de maintenir les protéines NF-kappaB dans le cytoplasme. Dans la plupart des types tumoraux, NF-kappaB est constitutivement activé. Outre leur rôle oncogénique et prolifératif propres, les protéines NF-kappaB sont susceptibles de favoriser la survenue de métastases en régulant l'expression de protéases (MMPs, uPA), de facteurs de l'angiogénèse (VEGF, IL8) et de molécules d'adhésion jouant un rôle lors du processus métastatique (CXCR4, ICAM-1, VCAM-1...) (Aggarwal BB, Cancer Cell 2004).

Le rôle de NF-kappaB dans l'induction de l'EMT apparaît directement dans plusieurs expériences, en réponse à l'activation de diverses molécules de signalisation en amont : TGF- $\beta$  (Neil JR, Cancer Res 2008), Akt (Julien S, Oncogene 2007) voire même absence du récepteur aux estrogènes ER $\alpha$  dans les tumeurs mammaires (Wang X, Nat Cell Biol 2007). L'activation constitutive de NF-kappaB, observée dans la plupart des lignées tumorales, semble donc être un facteur important de la signalisation pro-EMT.

**Twist** La mise en évidence du rôle de Twist dans le processus métastatique a été permise dans le laboratoire de Robert Weinberg par une comparaison des transcriptomes de 4 tumeurs murines mammaires d'origine syngénique (Yang J, Cell 2004). Une de ces lignées était métastatique au niveau pulmonaire, une autre n'était pas métastatique, et 2 lignées avaient des capacités métastatiques intermédiaires, et étaient respectivement à l'origine de métastases ganglionnaires ou de micrométastases pulmonaires. Twist est apparu particulièrement exprimé dans les 3 lignées à « potentiel » métastatique (c'est à dire au moins capables de franchir l'étape d'extravasation), par opposition à la lignée non métastatique. Les rôles de ce facteur de transcription avait déjà été précisé par la biologie du développement : induction de la spécification mésodermique au cours de la gastrulation de l'embryon de drosophile, régulation des mouvements cellulaires à l'origine du développement cranio-facial de la souris (Kang Y, Cell 2004).

Le rôle de Twist dans l'intravasation a été confirmé par l'inhibition de son expression par RNAi, à l'origine d'une diminution majeure du nombre de cellules tumorales circulantes et de la suppression de métastases pulmonaires. Par ailleurs, l'expression de Twist s'accompagne des changements phénotypiques associés à l'EMT déjà décrits. Outre quelques données cliniques sur les adénocarcinomes lobulaires du sein présentées dans l'article *princeps*, mais non confirmées, une expression différentielle de Twist corrélée à l'existence de métastases et/ou à la survie globale a été rapportée dans les carcinomes hépato-cellulaires (Lee TK, Clin Cancer Res 2006) et dans les adénocarcinomes mammaires (Martin TA, Ann Surg Oncol 2005) et prostatiques (Kwok WK, Cancer Res 2005). Quelques effecteurs ont été aussi proposés, comme AKT2 et FOXC2, facteur de transcription qui serait aussi un « intégrateur » des signaux d'EMT (TGF- $\beta$ 1, Snail, etc) (Mani SA, PNAS 2007). Twist se situe donc à mi-chemin entre gène médiateur du franchissement d'une étape (extravasation) et gène inducteur d'un switch métastatique via l'EMT, qui pourrait presque entrer dans la définition de gène suppresseur de métastases, la croissance tumorale n'étant pas ou peu affectée par son induction ou son inhibition.

On peut enfin remarquer que Twist possède à première vue les caractéristiques d'un gène suppresseur de métastase, mais qu'il n'a pas été présenté d'après ce schéma d'interprétation par

le laboratoire Weinberg, connu pour ses positions « anti-switch ».

**Snail et Slug** Snail et Slug (aussi appelés Snai1 et Snai2) appartiennent à la même famille de facteurs de transcription régulant la gastrulation lors du développement embryonnaire précoce. Ils sont présentés actuellement comme « intégrateurs » des différents signaux intracellulaire à l'origine de l'EMT, car ils médient en partie la réponse cellulaire au FGF, TGF- $\beta$ , EGF, SCF, PGE2, VEGF mais aussi la réponse à l'hypoxie cellulaire et à l'activation de Wnt ou de Notch (Barrallo-Gimeno A, 2005). L'activation des gènes Snail, à la fois par augmentation de la transcription et par phosphorylation suivie d'une relocalisation nucléaire, induit à son tour la diminution des marqueurs épithéliaux, l'expression de marqueurs mésenchymateux (fibronectine, vimentine), diminue la prolifération cellulaire, induit la synthèse de métalloprotéases ainsi qu'un remaniement du cytosquelette médié par les protéines Rho (Peinado H, Nat Rev Cancer 2007). Il est actuellement proposé que la réactivation de ces gènes dans les cellules tumorales leur permette d'acquérir un phénotype migratoire ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Une activité pro-angiogénique des gènes Snail a par ailleurs été décrite (Peinado H, J Cell Science 2004), alors que leur activation semble être inhibée par le récepteur des oestrogènes dans les cellules de cancer du sein (Fujita N, Cell 2003). Au niveau clinique, plusieurs études ont rapporté un impact de l'expression de Snail et de Slug sur la récurrence et le pronostic des adénocarcinomes mammaires (Côme C, Clin Cancer Res 2006), coliques et des carcinomes hépato-cellulaires (Miyoshi A, Br J Cancer 2005).

**Lien entre EMT et cellules souches** Des données préliminaires présentées par Robert Weinberg (Hambourg, 2007) seraient en faveur de l'acquisition d'un phénotype « souche » CD44+/CD24- de cellules de cancer du sein dès lors qu'elles subiraient l'EMT, ce phénotype étant accompagné des propriétés tumorigéniques propres aux cellules souches tumorales. Cette observation, jusqu'alors inédite et qui reste à confirmer, est en faveur d'un modèle « plastique » des cellules souches, au contraire des hypothèses actuelles en faveur d'un compartiment cellulaire minoritaire et relativement fixe. D'après cette hypothèse, les cellules souches tumorales présentes à un moment donné sont issues d'une (dé)différenciation de cellules tumorales auparavant « non souches », et non pas des cellules « souches » qui auraient pu être présentes auparavant. Ces données expérimentales, obtenues sur des cellules épithéliales mammaires immortalisées, ont été publiées très récemment (Mani SA, Cell 2008).

### 2.3.3 Les gènes suppresseurs de métastase

L'un des obstacles majeurs aux études génétiques du processus métastatique reste l'accumulation préalable d'évènements génétiques dans les cellules de la tumeur primitive. Ainsi, la dérégulation de l'expression des gènes précédemment cités peut ne pas être spécifique du processus métastatique, mais être déjà acquise lors de l'oncogénèse initiale (pour la résistance à l'apoptose, l'invasion tissulaire...). Un critère supplémentaire a été proposé par certains groupes : les gènes du switch métastatique ne doivent pas avoir d'influence sur la vitesse de croissance de la tumeur primaire (Steeg PS, Nature 2003). Le lien entre la prolifération de la tumeur primitive et la survenue de métastases est largement documenté en clinique (par exemple, par

l'index mitotique dans le cancer du sein), et ce critère permet d'éliminer *a priori* les gènes qui seraient responsables d'une plus forte prolifération cellulaire. Une critique majeure à cette théorie est que ce critère supplémentaire a été établi de manière rationnelle mais sans qu'il existe actuellement d'argument expérimental permettant de valider directement ce critère de sélection. Ainsi, la majorité des gènes précédemment décrits dans cette introduction sont éliminés par cet axiome au profit d'une dizaine de gènes « suppresseurs de métastases », qui seraient donc des gènes majeurs du switch métastatique : NM23 (premier gène décrit en 1988), BRMS1 (2000), KiSS1(1996), KAI1 (1995), MKK4 (1999), RhoGDI2(2002), CRSP3(2003), RKIP(2003), Drg-1(2003), SSeCKS (2001), TXNIP/VDUP1(2003) (Steeg PS, Nat Rev Cancer 2003).

D'un point de vue méthodologique, la recherche de gènes suppresseur de métastases a reposé longtemps sur le transfert de fragments de chromosome à la recherche de fragments inhibiteurs. L'isolement du gène proprement dit se fait par clonage positionnel ou, maintenant, par étude des gènes différentiellement exprimés par puce à ADN. La validation de la fonction suppressive de ces gènes fait appel à des expériences classiques de type on/off avec hyperexpression et inhibition de leur expression dans des lignées cellulaires et test *in vivo* du potentiel métastatique, avec le critère supplémentaire d'une équivalence de vitesse de croissance de la tumeur primitive. La validation en clinique sur des échantillons tumoraux a été testée pour quelques-uns de ces gènes, mais les associations rapportées ne mentionnent que rarement la signification pronostique en analyse multivariée.

**NM23** Ce gène (*non metastatic clone 23*) a été le premier décrit comme contrôlant spécifiquement le potentiel métastatique en 1988 (Steeg PS, JNCI 1988), et reste à ce jour le plus étudié des gènes inhibiteurs de métastase. D'un point de vue fonctionnel, il s'agit de plusieurs gènes (NM23-H1 à NM23-H9) codant pour des nucléoside diphosphate kinases. Ces enzymes catalysent les transferts de groupement phosphate entre nucléosides bi- et tri-phosphorylés et ont été considérées comme des gènes de ménage jusqu'à leur identification en tant que produits des gènes nm23 et la mise en évidence de leur rôle suppresseur de métastase (Boissan M, JNCI 2005 ; Rosengard AM, Nature 1989).

D'autres rôles ont été par la suite rapportés *in vitro* : facteur de transcription du proto-oncogène c-myc dans certaines lignées cellulaires (Nm23-H2), de la MMP2 (Nm23-H1), de la sous unité PDGF-A (Nm23-H1 et H2) ; activité nucléase (Nm23-H2), régulation de l'activité des petites protéines G Rac1 et RhoA par interaction avec leurs régulateurs (GTP-Exchange Factors) Tiam1 (Nm23-H1)et Lbc (Nm23-H2) ; interaction avec les facteurs de transcription Ménine (produit du gène MEN1 -*Multiple Endocrine Neoplasia 1-*) , EBNA (facteur de transcription du virus d'Epstein-Barr) ; interaction avec les protéines du cytosquelette  $\beta$  tubuline et vimentine et avec la phosphodiesterase h-prune. Dernièrement, une approche par puce à ADN a démontré que l'inhibition de la motilité cellulaire par Nm23-H1 était médiée par la diminution de l'expression du récepteur EDG2 à l'acide lysophosphatidique (LPA) (Horak CE, Cancer Res 2007). Les effets de l'expression de NM23-H1 sur la différenciation cellulaire sont controversés et semblent varier selon les modèles cellulaires utilisés (Howlett AR, JNCI 1994 ; Yamashiro S, Oncogene 1994). Enfin, donnée intéressante à remarquer, il a été rapporté pour Nm23-H1 un rôle au cours de l'apoptose cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques (Fan Z, Cell

Nom	Date	Nombre de patientes	Résultat
Hennessy	1991	$n = 71$	+
Tokunaga	1993	$n = 130$	+
Saman	1994	$n = 197$	-
Kapanos	1996	$n = 44$	-
Patel	1996	$n = 39$	-
Yamajuchi	1998	$n = 102$	+
Charpin	1998	$n = 168$	-
Heimann	2000	$n = 168$	-
Mao	2001	$n = 168$	+
Terasaki-Fuzukawa	2002	$n = 44$	+
Kaya	2002	$n = 27$	+
Niu	2002	$n = 196$	+
Belev	2002	$n = 164$	-
Göhring	2002	$n = 325$	-
Hlupic	2004	$n = 192$	+
Sgouros	2007	$n = 14$	-

TAB. 2.1 – Etudes cliniques étudiant l’impact pronostique de l’expression de Nm23 dans le cancer du sein.

2003).

Dans des modèles animaux, l’activité de suppression des métastases a été rapportée pour Nm23-H1 dans des lignées de cancer du sein et du côlon ; pour Nm23-H2 dans des lignées de cancer du sein et de carcinome épidermoïde ORL ; pour leurs homologues murins Nm23-M1 et Nm23-M2 dans diverses lignées de mélanome (Steeg PS, Nat Rev Cancer 2003).

Les études cliniques cherchant à confirmer un lien entre NM23-H1 et potentiel métastatique ont abouti à des résultats variables et discordants. Dans le cancer du sein, une quinzaine d’études ont été rapportées, utilisant des techniques de détection hétérogène et des critères de jugement clinique variés (envahissement ganglionnaire, survie sans métastase, survie globale), et sans conclusion probante (cf. tableau 2.1).

Des résultats similaires ont été obtenus dans les carcinomes hépato-cellulaires, et coliques, alors qu’une corrélation inverse à celle attendue a été rapportée sur de petites séries de cancers des testicules, de la prostate, du rein et le neuroblastome (Hailat 1991). Les études cliniques sur NM23-H2 sont peu nombreuses et la plupart sans significativité (D’Souza RJ, Anticancer Res 2003). A noter que les anticorps anti-NM23 sont actuellement de mauvaise qualité, nécessitent des concentrations de l’ordre de 1/10 à 1/50 en western blot et ne permettent pas de distinguer en immunohistochimie les deux sous-types NM23-H1 et -H2.

Globalement, la fonction exacte dans le processus métastatique de NM23 reste mal définie. La diversité des résultats biologiques et cliniques démontrent que cette famille de protéine ne joue pas le rôle universel initialement imaginé de gène régulateur du switch génétique ; l’effet suppresseur de métastase de NM23 semble particulièrement dépendant du modèle utilisé, et parfois difficilement reproductible.

**BRMS1** Ce gène a été isolé dans le laboratoire de Dan Welch en 2000 ; la transfection stable de son ADNc réduit la formation de métastases *in vivo* sans modifier la croissance de la tu-

Nom	Date	Nombre de patientes	Résultat
Kelly	2005	$n = 124$	–
Hicks	2006	$n = 238$	+
Zhang	2006	$n = 161$	+
Lombardi	2007	$n = 47$	– (inverse)

TAB. 2.2 – Etudes cliniques étudiant l’impact pronostique de l’expression de *Brms1* dans le cancer du sein

meur mammaire primitive (Seraj MJ, Cancer Res 2000). La première fonction rapportée pour le produit du gène *BRMS1* était un renforcement des jonctions communicantes (gap-junction) entre cellules tumorales, par modulation de l’expression des connexines (Saunders MM, Cancer Res 2001). La protéine *BRMS1* apparaît maintenant comme associée au complexe histone-déacétylase (Meehan WJ, J Biol Chem 2004), et responsable d’une inhibition transcriptionnelle de la synthèse de protéines pro-métastatiques comme l’osteonectine (protéine de la MEC; Samant RS, Mol Cancer 2007) ou le facteur de signalisation NF-kappaB (Cicek M, Cancer Res 2005). Le laboratoire de Dan Welch a par ailleurs rapporté l’activité inhibitrice de *BRMS1* sur la transduction intracellulaire de signaux potentiellement pro-métastatiques initiés par des récepteurs transmembranaires comme le PDGFR (Welch DR, communication orale, Hambourg 2007). Au niveau clinique, une relation entre sous-expression de *BRMS1* et potentiel métastatique n’est pas complètement démontrée par les études réalisées dans le cancer du sein (cf. tableau 2.2).

**KISS1** Ce gène a aussi été décrit comme suppresseur de métastase dans le laboratoire de Dan Welch en 1997 (Lee JH, Cancer Res 1997). Le gène *KISS1* est à l’origine d’une protéine « *metastine* », elle-même modifiée par une pro-hormone convertase en plusieurs protéines sécrétées, les Kisspeptines 10, 13, 14 et 64 de plusieurs protéine sécrétées. Ces peptides sécrétés sont les ligands du récepteur GPR54 (récepteur couplé aux protéines G; Ohtaki, Nature 2001). Actuellement, le mode d’action des kisspeptines reste imprécis; en effet, les derniers travaux du laboratoire de Dan Welch ne retrouvent pas l’expression de ce récepteur à la surface des cellules tumorales exprimant *Kiss1*. Son effet antimétastatique peut alors s’effectuer par voie paracrine, via la réponse des cellules stromales à la sécrétion de kisspeptines. L’autre hypothèse serait l’existence d’un autre récepteur, encore non caractérisé, à la surface des cellules tumorales (Welch, communication orale, Hambourg 2007; Nash KT, JNCI 2007). Le rôle physiologique des kisspeptines et de GPR54 est finalement d’ordre endocrinien et reproductif : exprimés dans les cellules trophoblastiques, il s’agit de réguler l’invasion de l’endomètre par les cellules foetales lors de la nidation (Janneau JL, J Clin Endocrinol Metab 2002); exprimés au niveau cérébral, la libération de kisspeptines et leur interaction avec GPR54 serait un signal d’initiation du début de la puberté (Shahab M, PNAS 2005). Quelques petites études cliniques ont été réalisées : les cancers gastriques, vésicaux, oesophagiens ainsi que le mélanome pourraient voir *KISS1* associé à l’apparition de métastases (Dhar DK, Int J Cancer 2004; Nash KT, Front Biosci 2006).

**KAI1/CD82** Le produit de ce gène suppresseur de métastase est une tétraspanine, protéine à 4 domaines transmembranaires (Dong JT, Science 1995; Yang X, Cancer Res 2001). Les té-

traspanines ont pour fonction d'organiser le regroupement de molécules à certains endroits de la membrane cellulaire, formant ainsi des « plateformes de signalisation ». Une série d'expériences rapportent que la surexpression de KAI1 induit une diminution de la signalisation de l'EGFR par une déphosphorylation plus rapide ainsi que par une internalisation de ce récepteur (Odintsova E, *Curr Biol* 2000). De même, la « séquestration » par KAI1 d'uPAR au niveau des adhésions focales (par interaction avec certaines intégrines) inhibe la fixation d'uPA par les cellules tumorales et diminue l'activité protéolytique tumorale ; KAI1 inhibe aussi la signalisation intracellulaire des intégrines et du récepteur c-Met, et diminue de ce fait la migration cellulaire (Takahashi M, *Int J Cancer* 2007). En 2006, une expérience de double-hybride publiée dans *Nature Medicine* a permis d'isoler un ligand pour KAI1, DARC, et de proposer un rôle original d'action de suppression des métastases : DARC est exprimée par les cellules endothéliales des sites métastatiques candidats et son interaction avec KAI1, exprimé à la surface des cellules tumorales circulantes, conduit à l'inhibition de la prolifération tumorale et à l'induction d'une sénescence tumorale (Bandyopadhyay S, *Nat Med* 2006). Ce rôle est retrouvé dans le modèle d'invasion trophoblastique, dans lequel les cellules déciduales maternelles expriment fortement cet inhibiteur de l'invasion (Gellersen B, *Am J Pathol* 2007). Quelques études cliniques ont rapporté une association entre diminution de l'expression de KAI1 et augmentation de l'agressivité tumorale (Dong JT, *Cancer Res* 1996) ; l'absence dans ces études de mutations ou de délétion allélique du gène est en faveur d'une régulation épigénétique de sa transcription, comme pour la plupart des gènes suppresseurs de métastase.

**MKK4/SEK1** MKK4 (MAP Kinase 4) est une kinase de signalisation intra-cellulaire située en amont de JNK et de p38, et a une activité de gène suppresseur de métastase dans des modèles de cancer de l'ovaire et de la prostate (Yoshida BA, *Cancer Res* 1999 ; Hickson JA, *Cancer Res* 2006). MKK4 serait aussi particulièrement sous exprimé dans les cancers de l'ovaire de stade III/IV (Yamada SD, *Cancer Res* 2002) et dans les cancers pancréatiques (Xin W, *Clin Cancer Res* 2004).

**RhoGDI2** Il s'agit d'un inhibiteur de la dissociation du GDP des protéines G Rho et Rac, ce qui correspond à une inhibition de l'activité de ces deux protéines particulièrement impliquées dans le processus de motilité cellulaire (Jaffer ZM, *J Biol Chem* 2004). Sa description en tant que gène suppresseur de métastase remonte à 2002 dans des modèles de carcinome urothélial (Seraj MJ, *Clin Exp Met* 2000) ; sa surexpression diminue celle de l'endothéline, protéine sécrétée aux propriétés vasoconstrictrices et pro-métastatiques (Titus B, *Cancer Res* 2005). une série clinique confirmerait que sa perte d'expression corrèle avec une survie diminuée dans les cancers de vessie (Theodorescu D, *Clin Cancer Res* 2004).

**CRSP3** Il s'agit d'un gène isolé sur une région du chromosome 6 connue pour son activité antimétastatique dans des cellules de mélanome. Il s'agit d'un cofacteur (*Cofactor Required for Specificity Protein activation 3*) du facteur de transcription Sp1, et sa surexpression entraîne celle de KiSS1 (Goldberg SF, *Cancer Res* 2003).

**RKIP** Ce gène (*Raf Kinase Inhibitor Protein*), identifié dans un modèle de mélanome, inhibe l'activation de ERK1/2 et de NK-kappaB (Yeung KC, Mol Cell Biol 2001). Cette protéine est associée aux centrosomes et aux kinétochores, et semble jouer un rôle majeur dans le contrôle de la mise en place du fuseau mitotique, via la voie MAP-kinase et l'inhibition de l'Aurora Kinase B (Eves EM, Mol Cell 2006). De manière paradoxale, RKIP induit une diminution d'expression de la E-Cadhérine, une perte de la cohésion cellulaire et une augmentation des propriétés migratoires de cellules épithéliales (Mc Henry KT, J Cell Biochem 2008).

Cliniquement, c'est dans des cohortes de cancers prostatiques, mammaires et colorectaux qu'une corrélation statistique a été rapportée entre diminution de RKIP et rechute métastatique (Fu Z, JNCI 2003 ; Hagan S, Clin Cancer Res 2005 ; Al-Mulla F, J Clin Oncol 2006). Ces cohortes ont cependant reçu des traitements adjuvants ; RKIP étant un facteur de réponse à la chimiothérapie adjuvante (Chatterjee D, J Biol Chem 2004), on ne peut pas affirmer (en l'absence d'appariement des patients sur le critère « chimiothérapie adjuvante ») son rôle pronostique indépendant en tant que suppresseur de métastase.

**Drg-1** Drg-1 (*differentiation-related gene 1*) inhibe *in vivo* la formation de métastases de cancer colique sans affecter la croissance de la tumeur primitive (Guan RJ, Cancer Res 2000), ce qui ne s'est pas vérifié dans une lignée pancréatique (Maruyama Y, Cancer Res 2006). Son expression serait induite par PTEN et induirait à son tour le maintien de marqueurs de différenciation comme la E-Cadhérine (Bandyopadhyay S, Cancer Res 2004). L'activité anti-métastatique de Drg-1 serait liée à l'inhibition de l'expression d'ATF1, un facteur de transcription (Bandyopadhyay S, Cancer Res 2006), à l'inhibition de la voie WNT et à la surexpression de KAI1 (Iiizumi M, poster 482 AACR 2007). Une étude d'anatomopathologie publiée sur une série de cancers de prostate est positive (Bandyopadhyay S, Cancer Res 2003).

**SSeCKS** Le mécanisme précis de cette protéine d'enveloppe de la PKA et de la PKC reste inconnu au cours du processus métastatique, mais son action suppresseur de métastase a été rapportée dans des modèles précliniques et une série clinique de cancer prostatique (Xia W, Cancer Res 2001).

**TXNIP/VDUP1** Le rôle suppresseur de métastase de TXNIP (*Thioredoxin-Interacting Protein*, protéine de réponse au stress) a été rapporté par une expérience de micro-array cherchant, par analyse de co-variation d'expression, des gènes « en amont » de KISS1 ; Si son expression supprime effectivement la formation de métastases par une lignée de mélanome, TXNIP et KISS1 sont en fait deux cibles de CRSP3 (Goldberg SF, Cancer Res 2003). Une étude a finalement établi que l'expression de TXNIP a une influence importante sur la prolifération cellulaire (Jeon JH, Cancer Res 2005), et ce gène n'est plus considéré aujourd'hui comme suppresseur de métastase.

**En conclusion,** la théorie des gènes suppresseurs de métastase a permis de mettre en valeur, grâce à un argument théorique, certains gènes non liés, par définition, à la prolifération tumorale. Issus de la théorie du switch, ces gènes ne correspondent finalement pas, si l'on considère les données expérimentales et cliniques actuelles, à des gènes « majeurs » de la régulation du

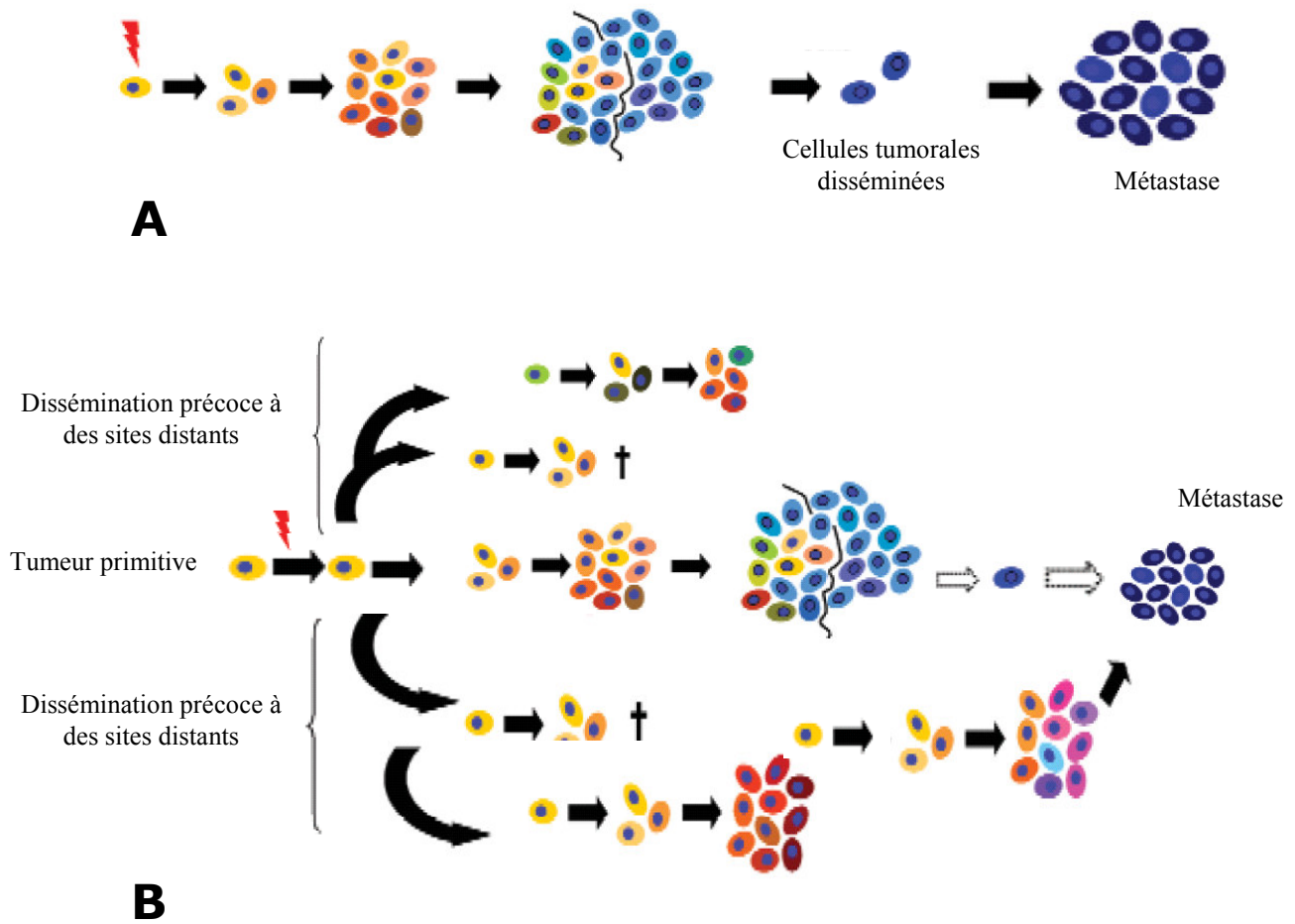
potentiel métastatique de la tumeur primitive. Il est intéressant de remarquer que, sur la seule base de l'interaction KAI1/DARC au niveau de l'endothélium de l'organe-hôte, plusieurs revues sur cette famille de gènes leur attribuent la régulation de la dormance micrométastatique à distance de la tumeur initiale (Berger JC, *Cancer Biol Ther* 2005 ; Hedley BD, *Future Oncol* 2006)

### 2.3.4 Le modèle adaptatif

Le modèle adaptatif est soutenu par plusieurs observations parallèles suggérant que le processus métastatique n'est pas le fruit d'une sous-population ayant réalisé un switch génétique métastatique.

**L'évolution parallèle** Dans les études caryotypiques comparant tumeur initiale et métastases (Kuukasjärvi T, *Cancer Res* 1997), le spectre des aberrations chromosomiques était globalement similaire dans la majeure partie des couples analysés. Pour les autres, il n'était pas possible d'affirmer une filiation entre tumeur primitive et métastases, laissant supposer que chacune avait fortement divergé d'un point de vue cytogénétique à partir du clone tumoral initial. Ce phénomène a été étudié dans les cellules micrométastatiques médullaires de cancer du sein, précurseurs potentiels des métastases qui sont détectés dans la moelle osseuse alors que le cancer est considéré cliniquement comme localisé (cf infra). A partir d'analyses caryotypiques (CGH) de plusieurs cellules micrométastatiques isolées, le laboratoire de Christofer Klein a rapporté une très grande hétérogénéité génétique des cellules micrométastatiques au stade M0 et ne présentaient qu'une faible similarité avec la tumeur primitive, cette hétérogénéité disparaissant lors de la croissance métastatique macroscopique (stade M1) (Schmidt-Kittler O, *PNAS* 2003). Les cellules micrométastatiques dissémineraient donc précocément, de manière polyclonale, et subiraient de manière indépendante à la tumeur primitive les événements oncogénétiques tardifs (crise télomérique...) (Gray JW, *Cancer Cell* 2003). Cette théorie de « l'évolution parallèle » (Talmadge JE, *Cancer Res* 2007) propose finalement d'attribuer la latence d'apparition des métastases à la lenteur de l'évolution génétique des cellules tumorales disséminées dont l'activité répliquative est nettement plus modérée (cf. la notion de « dormance » des cellules tumorales disséminées) que celle de la tumeur dont elles sont précocément issues (cf. figure 2.3).





**FIG. 2.3 :** Le modèle de l'évolution parallèle (Klein CA, Cell Cycle 2004)

A : Scénario « classique », séquentiel, de la progression métastatique. Dans ce modèle, les cellules tumorales disséminées devraient partager les mêmes anomalies moléculaires que la tumeur primitive et que les métastases

B : Modèle de l'évolution parallèle, basé sur l'analyse génétique des cellules tumorales disséminées. La dissémination survient de manière précoce au cours de l'oncogénèse ; les cellules tumorales disséminées doivent accumuler des changements génétiques ultérieurs afin de pouvoir former une métastase. L'acquisition de ces changements génétiques se fait de manière indépendante de celles survenant dans les cellules tumorales de la tumeur primitive.

**L'oncogénèse initiale** La théorie de l'oncogénèse initiale est principalement défendue par Robert Weinberg. Dans ce modèle, la capacité métastatique d'une tumeur donnée est liée à la propension des cellules tumorales à réactiver un programme transcriptionnel normalement latent mais pouvant faire franchir aux cellules les étapes successives du processus métastatique : la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)(Hartwell KA, PNAS 2006 ; Yang J, Cell 2004). Ainsi, le caractère spontanément métastatique des lignées transformées de mélanome pourrait être attribué à des facteurs spécifiques à la lignée mélanocytaire, dont Slug, facteur majeur de l'EMT (Gupta PB, Nat Genet 2005). La théorie proposée est que la sélection darwinienne s'exerce sur l'ensemble des cellules tumorales jusqu'au stade tumoral préinvasif. Après invasion de la membrane basale, l'interaction avec le stroma péri-tumoral activé (cf supra) est responsable de l'induction d'une EMT chez les cellules de la périphérie tumorale, via différentes cytokines dont CCL5/RANTES (Karnoub AE, Nature 2007). Si l'on considère que l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux rend les cellules tumorales métastatiques, la capacité à former des métastases serait finalement un processus induit (par l'évolution et l'invasion tumorale locale) et donc adaptatif.

**Les signatures métastatiques** Plusieurs signatures de mauvais pronostic ont été développées et validées en clinique (Fan C, N Engl J Med 2006), dont les principales sont probablement la « signature d'Amsterdam » (van't Veer LJ, Nature 2002) et la « signature de Rotterdam » (van de Vijver, N Engl J Med 2002). Ces signatures prédisent souvent plusieurs événements cliniques associés à la progression métastatique, modifiés par l'éventuelle réponse aux traitements adjuvants reçus. Il a par ailleurs été démontré que les signatures moléculaires (sous-classe génomique et signature 70 gènes) étaient conservés entre tumeur primitive et métastases (Weigelt B, Cancer Res 2005). Ce type d'observation ne correspond pas au modèle sélectif selon lequel les caractéristiques génomiques prométastatiques du sous-clone tumoral initial sont « diluées » par l'ensemble des autres sous clones tumoraux. De même, toujours selon le modèle de sélection clonale, une tumeur primitive et ses métastases clonales ne peuvent pas avoir un même profil moléculaire. Ces objections ont été relevées par Bernards et Weinberg (Bernards R, Nature 2002), provoquant d'importants débats tendant à faire coïncider modèle sélectif et signatures moléculaires (Edwards PA, Nature 2002 ; Sherley JL, Nature 2002 ; Fidler IJ, Nature 2002).

### 2.3.5 Modèle de l'hétérogénéité dynamique

Le modèle de l'hétérogénéité dynamique suggère que la fréquence, au sein d'une tumeur primitive, des sous-clones métastatiques détermine le potentiel métastatique global de la tumeur (Abal M, Tumour Biol 2007). L'apparition de sous-clones métastatiques serait issu de l'instabilité génétique de la tumeur, et aurait ainsi lieu tout au long de la croissance de la tumeur primitive. Cette instabilité génétique pourrait être responsable d'un équilibre dynamique entre l'apparition et la disparition de sous-clones ayant un phénotype métastatique (Hill RP, Science 1984).

Ce modèle inclut aussi l'hypothèse de l'induction de l'EMT par le microenvironnement péri-tumoral via des mécanismes de régulation génétiques ou épigénétiques. Cette induction pourrait avoir lieu en certains lieux de la tumeur primitive (périphérie tumorale, zones de différencia-

tion anaplasique...) et pourrait être un phénomène transitoire, avec réversion ultérieure du phénotype cellulaire tumoral (Shekhar MP, Am J Pathol 2007).

### 2.3.6 Modèle de la dominance clonale

La théorie de la dominance clonale est une théorie voisine, qui propose que la différence entre sous-clones métastatiques et non métastatiques soit de type purement darwinien, c'est à dire correspondant à un avantage en survie des clones métastatiques par rapport aux clones non métastatiques, y compris au sein de la tumeur initiale. Le phénotype des cellules tumorales non métastatiques serait par ailleurs modifié, avec induction potentielle de l'acquisition du phénotype métastatique. L'émergence d'un sous-clone métastatique s'accompagnerait donc d'une dominance clonale progressive de la tumeur initiale. Cette théorie, ancienne (Kerbel RS, Cancer Surv 1988) a été rappelée récemment pour expliquer la similitude des profils d'expression génomique entre métastases et tumeur primitive.

### 2.3.7 Modèle alternatif : les cellules souches

Les cellules souches tumorales correspondraient à des cellules tumorales, très minoritaires au sein de la tumeur primitive, ayant des capacités d'autorenouvellement et de tumorigénèse illimitées. Ces cellules pourraient initier la formation des métastases, qui comprendraient ainsi une sous-fraction de cellules souches métastatiques et une population cellulaire différenciée au potentiel métastatique plus ou moins altéré (Li F, Cell Res 2007). L'existence des cellules souches au sein des tumeurs solides reste encore sujet à débat, et pour l'instant peu d'expériences sont venues confirmer cette hypothèse (Hermann PC, Cell Stem Cell 2007). Il n'est par ailleurs pas encore tout à fait certain que les cellules souches, a fortiori dans le cadre des études sur le potentiel métastatique, soit réellement « souches » et ne correspondent pas à des sous-clones de haute malignité.

## 2.4 Rappel : Cellules tumorales circulantes et disséminées

### 2.4.1 Points communs

**Signification biologique** Chez l'homme, la biologie du processus métastatique a longtemps reposé sur l'analyse de ses deux extrémités, tumeurs primitives et macrométastases, faisant de la recherche sur les métastases une « *black box research* » (Sahai E, Nat Rev Cancer 2007). Les techniques très sensibles de biologie moléculaire (RT-PCR) et d'immunocytomarquage, étapes parfois précédées d'un immunoenrichissement des cellules tumorales, ont permis l'ouverture de 2 fenêtres supplémentaires d'étude : le sang périphérique et les organes hôtes potentiels.

Ces deux sites de détection correspondent à des niveaux différents d'avancée le long du processus métastatique, et pourraient avoir des valeurs pronostiques différentes. Les cellules tumorales circulantes (CTC), détectées dans le sang périphérique, ont *a priori* une signification biologiques assez simple : il s'agit de cellules tumorales ayant passé l'étape d'extravasation, et qui sont en transit dans le sang, avec une demi-vie relativement courte (Meng S, Clin Cancer Res 2004). Au contraire, les micrométastases peuvent potentiellement se rechercher dans tous

les tissus potentiellement hôtes d'une future croissance métastatique. Pour des raisons tant historiques (modèle de la maladie résiduelle médullaire des hémopathies malignes) que techniques (acceptabilité par les patientes, morbidité de la biopsie hépatique ou pulmonaire, maniabilité des aspirations médullaires), la recherche de micrométastases est actuellement confinée à la moelle osseuse, sans adaptation au profil métastatique de la tumeur initiale. Les données actuelles ne permettent pas de savoir si la moelle osseuse est utilisée comme un « réservoir » par les cellules tumorales disséminées (capables alors de recirculer dans l'organisme vers les sites métastatiques apparaissant secondairement), ou s'il s'agit simplement d'un marqueur indirect d'une dissémination cellulaire multi-organe.

**Détection** Que ce soit dans le sang ou la moelle, la concentration habituelle des cellules tumorales disséminées est de l'ordre de une à dix cellules tumorales pour plusieurs millions de cellules mononucléées. La détection de ces cellules correspond donc à un événement rare, particulièrement sensible aux faux positifs, et fastidieux à faire de manière manuelle ; plusieurs systèmes automatisés avec reconnaissance d'image ont été mis au point pour les CTC (système Véridex par exemple) et pour les cellules tumorales disséminées (lecteur d'image ACIS).

En l'absence de transcrite spécifique détectable par RT-PCR, les marqueurs utilisés pour la détection de ces cellules tumorales disséminées, tant par biologie moléculaire que par immunocytochimie, sont généralement des marqueurs épithéliaux ou tissu-spécifiques. Dans le cancer du sein, il s'agit essentiellement des cytokératines lumineales 8, 18 et 19, de la mammaglobine, de MUC1, d'Ep-CAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) (cf infra, revue Vincent-Salomon A, J Clin Pathol 2008). Ces marqueurs ne sont donc pas ubiquitairement exprimés par les cellules tumorales (faux négatifs) et peuvent être détectés dans des cellules non tumorales (faux positifs). Si aucun des marqueurs actuellement utilisés n'est idéal (sensibilité et spécificité de 100%), un consensus s'est fait récemment sur les méthodologies de détection des MM (Borgen E, Cytotherapy 1999) ; la détection des CTC reste plus hétérogène (mais ne sera pas abordée dans ce manuscrit).

**Applications théoriques** Outre l'intérêt biologique de la caractérisation moléculaire des régulateurs de ces étapes du processus métastatique, les buts que se fixe ce champ de recherche sont essentiellement cliniques. Il s'agit ainsi de permettre une meilleure mesure du risque de rechute métastatique, de permettre une adaptation des traitements adjuvants à ce risque de rechute, d'étudier la réponse aux traitements et d'isoler de nouvelles cibles thérapeutiques présentes dans ces cellules tumorales disséminées.

Si l'on exclut les hémopathies malignes pour lesquelles le concept de processus métastatique semble inapproprié, le transfert en clinique de la détection de MM ou de CTC n'a été jusqu'à présent réalisé que dans certaines tumeurs présentant à la fois un transcrite spécifique et une chimiosensibilité extrême : les protocoles de traitement du sarcome d'Ewing ajustent ainsi la chimiothérapie sur l'existence ou non de micrométastases médullaires lors du diagnostic.

### 2.4.2 Les cellules tumorales disséminées

**Découverte des micrométastases** Le schéma de l'acquisition du potentiel métastatique établi par Fidler (Fidler IJ, Cancer Res 1978) était en faveur d'une croissance secondaire dès lors qu'un sous-clone de la tumeur initiale a acquis l'ensemble des caractéristiques génétiques nécessaires à ce processus. Le délai potentiel entre le traitement de la tumeur initiale et l'apparition de métastases était alors essentiellement expliqué par une prolifération lente, indétectable pendant de nombreuses années. Les micrométastases n'étaient donc que l'étape invisible où les cellules tumorales disséminées, résultat de la dissémination hématogène dans les tissus-hôtes, n'avaient pas encore atteint une taille suffisante pour être histologiquement détectable (Liotta LA, Cancer Res 1978). Le développement de l'immunohistochimie a ensuite permis d'identifier comme micrométastases des amas de cellules dans les tissus-hôtes (Liotta LA, Lancet 1979). Le groupe de Riethmuller (Munich) a été le premier à le premier centre à rapporter l'impact clinique des MM (par immunocytochimie) chez des patients atteintes de cancer du sein (Schlimok G, PNAS 1987), du côlon (Schlimok G, J Clin Oncol 1990), de l'estomac (Schlimok G, Eur J Cancer 1991) et du poumon (Pantel K, Cancer Res 1993). L'impact pronostique des MM dans le cancer du sein, pour lequel les études sont les plus nombreuses (et auquel nous nous restreindrons), est résumé dans la revue ci dessous.

### 2.4.3 REVUE : Bone marrow micrometastasis in breast cancer : review of detection methods, prognostic impact and biological issues

Cette revue a été publiée dans le « Journal of Clinical Pathology » (IF 2006 2,2). Ma contribution concerne principalement la troisième partie de la revue qui aborde certaines des questions biologiques soulevées par les micrométastases médullaires.

# Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues

A Vincent-Salomon, F C Bidard, J Y Pierga

Institut Curie, Paris, France

Correspondence to:  
Dr A Vincent-Salomon,  
Department of Pathology,  
Institut Curie, 26 rue d'Ulm  
75248 Paris Cedex 05, France;  
[anne.salomon@curie.net](mailto:anne.salomon@curie.net)

Accepted 8 November 2007  
Published Online First  
23 November 2007

## ABSTRACT

Immunocytochemical detection of disseminated tumour cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer at surgery has been shown to be an independent prognostic factor in single institutional studies and in a large pooled analysis. However, bone marrow sampling and assessment of disseminated tumour cells is not a routine procedure in the clinical management of patients with breast cancer, but will certainly play a role in the near future for risk stratification and monitoring of therapeutic efficacy. Accurate identification of disseminated tumour cells in bone marrow must be based on standardised methodologies and procedures. This review describes these methodologies and the standardised morphological criteria used for disseminated tumour cell detection. The prognostic value of circulating tumour cells detection in peripheral blood is demonstrated in patients with metastatic disease but remains to be substantiated at early stage. The significance of disseminated tumour cells in bone marrow and in the blood for the prediction of response to therapy is briefly summarised. Finally, this review addresses the main biological questions raised by disseminated tumour cells, in particular understanding tumour dormancy and identifying metastatic stem cells.

In clinical practice, the most important prognostic information about breast cancer is provided by pathological staging, such as tumour grade, tumour size, presence of lymphatic and vascular invasion, axillary lymph node involvement and steroid receptor status. Nonetheless, about 20–30% of patients with a favourable prognosis relapse within 5 years and many patients with poor prognostic factors will survive for more than 10 years. In this context, there is a real need for new, more accurate prognostic factors. One of the promising new parameters is identification of the presence of disseminated tumour cells (DTC) in bone marrow (BM). DTC, the most precise term, are also described by several synonyms such as bone marrow micrometastasis or minimal residual disease. The presence of BM DTC is clearly associated with a poor outcome for patients with stage I to III breast cancer.<sup>1</sup> The procedure is still investigational according to the American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumour markers in breast cancer,<sup>2</sup> and its incorporation into clinical management algorithms is currently the focus of research. Many different methodologies have been used to detect DTC, but standardised guidelines have now been published.<sup>3</sup> The current challenge for pathologists is to improve and standardise early detection

of DTC. In this review, we will summarise the methodologies most commonly used to detect DTC, discuss the clinical impact of DTC in bone marrow at initial diagnosis and during follow-up and treatment evaluation, and highlight the biological and clinical questions raised by DTC.

## METHODOLOGIES FOR DETECTION OF BONE MARROW MICROMETASTASES

The methodology most commonly used to detect DTC is immunocytochemistry performed on BM aspirates. Immunocytochemistry currently remains the gold standard for BM DTC detection, with a sensitivity ranging from 1 DTC in 10<sup>5</sup> to 1 in 10<sup>6</sup> leucocytes.

### Bone marrow aspiration

Ideally, this procedure should be performed under general anaesthesia, at the time of initial surgery, before the skin incision. If necessary, it can be performed under local anaesthesia. Bone marrow aspirates are usually performed from both anterior iliac crests, as no difference has been reported between anterior and posterior iliac crest aspirations.<sup>4</sup> Bone marrow (5–10 ml) should be aspirated and pooled in heparinised tubes, EDTA or sodium citrate until further processing. Optimal storage temperature is at 4–25°C. A Ficoll density gradient centrifugation for tumour cell enrichment is performed, ideally within the first 24 hours after collection. A cell count is performed on the interphase layer containing mononuclear cells, and cytopins are prepared and smeared on positively charged glass slides; 2–3×10<sup>6</sup> cells per patient are examined. The slides (3–6 slides per patient) are air-dried at 4°C or at room temperature overnight before fixation<sup>3</sup> and immunostaining.

### Immunocytostaining Antibodies

The majority of studies use the fact that breast cancer is an epithelial cell tumour and that BM normally does not contain any epithelial cells. Various antibodies have been used over the years: initially polyclonal antibodies raised against epithelial membrane antigen (EMA), which was subsequently abandoned as this antibody can cross-react with plasma cells and immature precursors in bone marrow; then monoclonal antibodies raised against various cytokeratins, mucins (MUC1), mammaglobin and adhesion molecules such as EpCAM. The most commonly used antibody at the present time is A45/BB3 (Micromet, Munich, Germany), a



This paper is freely available online under the BMJ Journals unlocked scheme, see <http://jcp.bmj.com/info/unlocked.dtl>

monoclonal antibody that reacts with common epitopes on several cytokeratins including CK8, CK18 and CK19. Other antibodies include CK2 (mouse IgG1, Boehringer, Mannheim) directed against CK18, and AE1/AE3 that reacts with basic and acidic keratins covering a large spectrum of cytokeratins (CK10, CK14–16, CK19 and CK1-8). The recommended revelation system is the alkaline–anti-alkaline phosphatase technique with levamisole as blocking agent. Cells are counterstained with haematoxylin to visualise their nuclear morphology.

#### Quality control

Because haematopoietic cells can sometimes be stained by anti-cytokeratin antibodies,<sup>5</sup> rigorous internal and external quality control procedures must be applied.

#### Internal controls

Before the technique can be used in clinical practice, it should first be evaluated on bone marrow samples from patients without cancer (orthopaedic surgery specimens, for example) in order to validate its specificity. The technique must also be calibrated (primary antibodies and revelation system dilutions) using breast cancer cell lines such as MCF7 or SKBR3 at different dilutions, spiked into mononuclear cells from patients without breast cancer. All specimens from breast cancer patients must also be systematically examined in parallel with controls, consisting of slides stained with isotype-matched immunoglobulin.

#### External controls

Ring experiments are highly recommended to improve the between-centre reproducibility of bone marrow analysis.

#### Analysis of cell preparations

Morphological analysis has been clearly shown to improve the specificity of DTC identification and is highly recommended, but optimal separation of DTC from cytokeratin-positive haematopoietic or non-haematopoietic cells remains challenging, as it is often difficult to detect single DTC in mononuclear cell fractions from BM. Manual screening of  $2\text{--}3 \times 10^6$  cells and  $2\text{--}3 \times 10^6$  negative control cells using light microscopy is performed by an experienced observer. Morphological analysis of cytokeratin-positive cells is based on consensus criteria.<sup>3–6</sup> The read-out of positive cells should be controlled by at least two independent observers. The screening of large volumes of material by immunocytochemical techniques can be time-consuming; automated image-analysis systems can be used. In a European interlaboratory testing of well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow, the MDS1 from Applied Imaging screening sensitivity was similar to manual screening, while ACIS from Chromavision detected fewer cells.<sup>7</sup>

Standardised interpretation according to European guidelines<sup>3–6,7</sup> is required to improve the specificity of DTC detection.

- ▶ Samples are classified into two categories: positive or negative.
  - Positive samples are those with cytokeratin-positive cells with disseminated tumour cell morphology. The number of cells should be indicated.
  - Negative samples are those with no positive immunocytochemical stained cells or cytokeratin-positive cells without disseminated tumour cell morphology (e.g. haematopoietic cells, squamous cells).

- ▶ All cytokeratin-positive cells should be classified as disseminated tumour cells, i.e. cytokeratin-positive cells with disseminated tumour cell morphology or cytokeratin-positive cells.

The morphological features of DTC are:

- ▶ The presence of cell clusters (fig 1A).
  - ▶ Large cell size with a clearly enlarged nuclear size and a high nuclear-to-cytoplasmic ratio (fig 1B), and strong or irregular cytoplasmic staining for cytokeratin.
  - ▶ Cytokeratin filaments can be seen.
  - ▶ Staining partially covers the nucleus. A large nucleolus can be seen and the nucleus is often granular or stippled (fig 1B).
- Some cytokeratin cells are clearly recognised as haematopoietic or squamous cells (fig 1C).

According to morphological classification guidelines, positivity rates are about 13–15%,<sup>5,8</sup> in contrast with the 30–35% positivity rates reported in studies based exclusively on cytokeratin positivity without morphological analysis.<sup>1</sup> Notably molecular analysis of cytokeratin-positive BM cells has shown that these cells may be malignant.<sup>9–10</sup> Clinical studies<sup>11–12</sup> have also demonstrated the prognostic value of cytokeratin-positive BM cells not classified as DTC and cytokeratin-positive cells.

In order to increase the number of epithelial cells found in the bone marrow, several workers have used immunomagnetic methods of selection (IMS). Available techniques use antibodies, linked to small paramagnetic beads or colloids of 1 nm (ferrofluids), with an affinity for specific cells. The cells can then be selected with a powerful magnet. Beads are available linked to antiepithelial antibodies for positive selection, like epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), or linked to a monoclonal antibody directed against CD45 for negative selection of leucocytes.<sup>13</sup> The use of negative IMS increased the frequency of positive BM in a large series from Norway but did not improve the prognostic value of this detection.<sup>14</sup>

Some studies have assessed DTC detection by using molecular biology techniques such as real-time quantitative PCR determination with several markers: CK19, MUC1,<sup>15</sup> urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), EpCAM<sup>16</sup> and mammaglobin.<sup>17</sup> This detection should be more sensitive (1 tumour cell in  $10^7$  mononuclear cells) and more effective. However, using PCR to detect DTC raises two problems: firstly, the real problem of identifying appropriate sensitive and specific markers; and secondly, a problem of quantification. As no specific markers are available to detect DTC in BM, it is therefore not recommended to detect DTC in clinical trials by RT PCR alone without associated immunocytochemical detection.

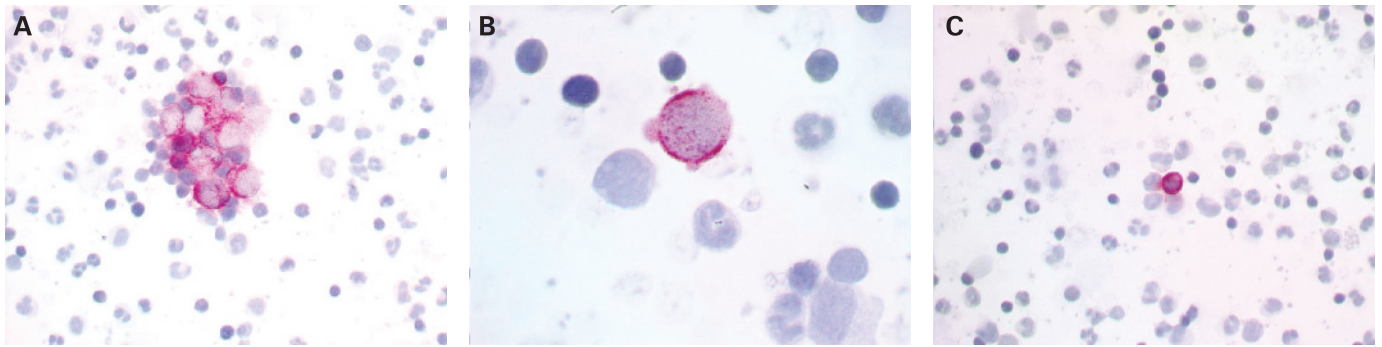
#### Prospects

DTC detection using more specific markers should improve the clinical relevance and reproducibility of this new parameter. One possibility would be to use markers that characterise each subtype of breast carcinoma, such as HER2, as this status is generally maintained in early metastasis such as DTC.<sup>9–18</sup> EGFR overexpression could also be promising in the basal-like subgroup.

#### CLINICAL SIGNIFICANCE OF DTC

Several studies over the last two decades have assessed the prevalence and prognostic value of micrometastatic dissemination of breast cancer cells in bone marrow. These studies estimated that 12–45% of patients with primary operable breast

## Review



**Figure 1** Examples of A45/BB3-positive disseminated tumour cells (DTC) and haematopoietic cells. (A) Clusters of DTC. (B) Isolated DTC. The cell is taller than other surrounding cells, with a high nuclear/cytoplasmic ratio; it shows strong and irregular cytoplasmic staining for cytokeratin. (C) Haematopoietic cell.

cancer could have tumour cells in the bone marrow as determined by immunocytochemistry.<sup>1 5 12 19–22</sup> Table 1 summarises the major studies using immunocytochemical detection of DTC in BM. In a pooled analysis of nine studies comprising 4703 patients with stage I, II or III breast cancer, the presence of micrometastases at diagnosis was detected in 30.6% of patients. With a follow-up of 10 years, this analysis demonstrated that DTC in BM at the time of the initial diagnosis of breast cancer was a significant and independent prognostic factor with respect to poor overall survival and breast cancer-specific survival (univariate mortality ratios: 2.15 and 2.44, respectively;  $p < 0.001$  for both outcomes) and poor disease-free survival and distant disease-free survival during the 10-year observation period (incidence rate ratios: 2.13 and 2.33, respectively;  $p < 0.001$  for both outcomes). This evidence could be sufficient to include DTC analysis in the routine staging of primary breast cancer. However, technical issues remain controversial and bone marrow aspiration is not considered to be a convenient procedure for patients.

Peripheral blood would be an ideal source for the detection of tumour cells, and sequential peripheral blood analyses are more acceptable. Depending on the detection technique used, circulating tumour cells (CTC) were revealed in 50–100% of patients with metastatic breast cancer.<sup>25</sup> Even in patients with no clinical signs of overt metastases, however, detection rates range from 10% to 60%.<sup>24</sup> Detection of CTC with the CellSearch system (Veridex, Warren, New Jersey, USA), which detects CTC using Ep-CAM coated beads for enrichment followed pan CK staining, provided significant prognostic information before and also early (4 weeks) after initiation of chemotherapy in patients with metastatic breast cancer.<sup>25</sup> CTC had superior and independent prognostic value of tumour burden and disease phenotype.<sup>26</sup> In contrast to patients with metastatic disease, and despite promising results,<sup>27</sup> the prognostic relevance of CTC in the blood of patients with early-stage disease without overt metastasis needs to be demonstrated in prospective multicenter studies.<sup>28</sup>

It is not clear if CTC measurements could replace the examination of bone marrow. Two immunocytochemical studies demonstrated statistically significant correlations between DTC detection in BM and CTC in blood, but BM was more frequently positive than blood.<sup>29 30</sup> Recently, Benoy *et al* found that real-time RT-PCR based detection of DTC in BM had superior significance to CTC measurements in blood.<sup>31</sup> In addition, Wiedswang *et al*, with an ICC assay, showed that BM but not blood analyses provided prognostic information.<sup>32</sup> These

finding do not support an exchange of DTC in BM with CTC from blood.

An important potential application for DTC detection is the monitoring of therapeutic efficacy in the adjuvant setting which can currently only be assessed retrospectively in large-scale clinical trials after an observation period of at least 5 years. Persistence of DTC in BM some years after diagnosis and initial therapy is still an indicator of subsequent systemic treatment failure.<sup>33–35</sup> Persistence or disappearance of DTC after systemic treatment could therefore be used as a surrogate marker of treatment response.<sup>36</sup> Studies have shown that adjuvant chemotherapy has no effect on the elimination of single dormant tumour cells in the BM of high-risk breast cancer patients.<sup>37 38</sup> This emphasises the need to develop therapeutic agents that are active on non-proliferating cells. Bisphosphonates have been used to eliminate tumour cells in BM persisting after adjuvant therapy. The most promising agents are antibodies such as edrecolomab directed against EpCAM<sup>39</sup> or trastuzumab directed against HER2.<sup>40</sup> Large-scale prospective clinical trials must now be conducted to determine whether eradication of DTC in BM after systemic therapy results in longer survival.

### BIOLOGICAL AND CLINICAL QUESTIONS RAISED BY MICROMETASTATIC CELLS

The micrometastasis phenomenon is usually described as “tumour cell dormancy”,<sup>41</sup> added as a late step of the metastatic cascade.<sup>42</sup> Although dormancy regulation is a key element of micrometastasis biology, micrometastatic cells can be assumed to be more than just dormant cancer cells; they could help us to understand certain aspects of metastasis biology. The main clinical and biological questions raised by the micrometastatic process and the current answers to these questions, are described below.

#### How and when does micrometastasis occur?

The main clinical study reported that cytokeratin or mucin positive BM cells are associated with tumour size, grade, negative hormone receptors and lymph node metastases.<sup>1</sup> Using a more stringent detection technique, we did not reproduce any of these results,<sup>8</sup> although they have been confirmed by others.<sup>43</sup> This might suggest that micrometastatic dissemination occurs in highly proliferative tumours, when a critical tumour size has been reached. However, DTC may be found at earlier stages of primary tumour development, and comparative genomic hybridisation analyses of disseminated



**Table 1** Major clinical studies of the prognostic value of disseminated tumour cells (DTC) detection in bone marrow (BM) by immunocytochemistry and prognostic value on disease and overall survival (univariate and multivariate analysis)

Reference	Sampling	Marker	No. patients	Detection rate (%)	Follow-up (mth)	Disease free survival		Overall survival	
						Univ	Multiv	Univ	Multiv
Redding 1983 <sup>79</sup>	Smear	MUC	110	28		NA	NA	NA	NA
Manegold 1988 <sup>80</sup>	Biopsy Smear	CK/PCK1	50	8		NA	NA	NA	NA
Landys 1998 <sup>81</sup>	Biopsy	CK/AE1–AE3, KL1, CAM 5-2	128	19	240	NA	NA	Yes	NA
Salvadori 1990 <sup>82</sup>	Biopsy	CK/MBr1	121	16.5	48	No	No	NA	NA
Mathieu 1990 <sup>83</sup>	Biopsy	MUC/EMA, HMFG2 CK/KL1, AE1–AE3, CAM5-2	93	1		No	No	No	No
Kirk 1990 <sup>84</sup>	Smear	MUC/anti-milk fat globulin LICR.LON.M8.4	25	48	34	No	NA	NA	NA
Singletary 1991 <sup>85</sup>	Smear	CK/AE1, AE3, MAK-6 MUC/113F1, 260F9, 317G5	71	38	11	No	No	No	No
Cote 1991 <sup>86</sup>	Smear	MUC/C26, T16 CK/AE-1	49	36.7	30	Yes	Yes	NA	Na
Schlimok 1992 <sup>87</sup>	Cytospin	CK18/CK2	187	18	39	Yes	Yes	NA	NA
Harbeck 1994 <sup>88</sup>	Smear	CK MUC/EMA	100	38	34	Yes	Yes	No	Yes
Ménard 1994 <sup>89</sup>	Cytospin	CK/MBr1, MBr8, CK18/CK2, MUC1	197	31	NA	NA	NA	NA	NA
Molino 1997 <sup>90</sup>	Cytospin	CK/MBr1, MBr8, MOV8, MOV16 MluC1	109	31	36	No	No	No	No
Funke 1996 <sup>91</sup>	Cytospin	CK18/CK2	234	38	NA	NA	NA	NA	NA
Diel 1996 <sup>92, 93</sup>	Smear	MUC/TAG12 (2E11)	727	43.3	78	Yes	Yes	Yes	Yes
Mansi 1999 <sup>12, 94</sup>	Smear	EMA	350	25.4	150	Yes	No	Yes	No
Lyda 2000 <sup>95</sup>	Biopsy	CK/AE1–AE3, 35βH11 CAM 5-2	54	31	38	Yes	NA	NA	NA
Untch 1999 <sup>96</sup>	Cytospin	CK18/CK2	581	28		No	No	No	No
Braun 2000 <sup>11</sup>	Cytospin	CK/CK8,18,19 (A45 B/B3)	552	36	36	Yes	Yes	Yes	Yes
Gerber 2001 <sup>20</sup>	Cytospin	CK/CK8,18,19 (5D3)	554	37	54	Yes	Yes	Yes	Yes
Gebauer 2001 <sup>21</sup>	Smear	CK, MUC/EMA	396	42	75	Yes	Yes	Yes	Yes
Kasimir-Bauer 2001 <sup>97</sup>	Cytospin	CK/CK8,18,19 (A45 B/B3)	128	34	24	NA	NA	NA	NA
Naume 2004 <sup>5</sup>	Cytospin	CK/AE1/AE3	819	13	49	Yes	Yes	Yes	Yes
Braun 2005 <sup>1</sup>	Various	Various	4703	30.6	63	Yes	Yes	Yes	Yes
Bidard 2007 <sup>9</sup>	Cytospin	CK/CK8,18,19 (A45 B/B3)	621	15	50	Yes	Yes	Yes	Yes

CK, cytokeratin; Muc, mucin; EMA, epithelial membrane antigen; NA, not available.

cancer cells were in favour of early dissemination of breast cancer cells to the BM.<sup>10–44</sup> Supervised transcriptomic profiling of 19 primary tumours has been reported,<sup>45</sup> but this micrometastasis-associated profile has not been further validated by independent unsupervised analysis. No pathological studies have demonstrated a link between micrometastasis detection and the recently described breast cancer subtypes.<sup>46</sup> Therefore, although BM DTC may appear early, it is unknown whether they correspond to a genetically homogeneous subgroup of primary cancers.

Among the mechanisms of breast cancer cell dissemination to the BM, bone and bone marrow homing of cancer cells may depend on similar molecular determinants, especially the SDF1/CXCR4 axis.<sup>47–48</sup> CXCR4 is a G protein-coupled receptor,<sup>49</sup> which plays a role in the chemotaxis of breast cancer cells. This cellular response is attributed to activation of the PI3K/PTEN/AKT/mTOR signalling pathway,<sup>49</sup> rather than the MAP/ERK pathway.<sup>50–51</sup> CXCR4 expression in 142 primary breast cancers has been shown to be associated with the detection of BM DTC.<sup>52</sup> This pathway might be responsible for early dissemination of breast cancers, as circulating cancer cells detected in the blood are also characterised by activation of PI3K.<sup>53</sup> Epithelial-mesenchymal transition and primary tumour microvessel density may also be involved in the onset of DTC.<sup>54–55</sup> Finally, the molecular determinants responsible for the establishment of BM DTC are not clearly understood at the present time. BM DTC could be a

useful tool to assess the efficiency of the entire cancer cell migration process and should be analysed together with circulating tumour cells in blood and primary breast tumours.

#### Are micrometastatic cells metastatic progenitors?

Bone marrow is the host organ of breast cancer metastases, which is the most accessible tissue for analysis, as liquid aspirates can be performed under local anaesthesia or during primary surgery. It is of critical importance to determine whether DTC are (or are not) the metastatic progenitors of bone and/or distant non-bone metastasis. A negative answer would limit the accuracy of bone marrow DTC as a biological model, a target for adjuvant treatment and a marker of response. Paget<sup>56</sup> was the first to describe the non-random growth of metastases, and the sustaining molecular determinants of cancer cell homing have been recently characterised.<sup>52–57, 58</sup> If BM DTC are derived from the specific spread of a few tumour subclones into flat bones, their ability to recirculate to other organs would be somehow limited. Consequently, their detection would be linked to an increase of bone metastasis at primary relapse in patients, but not to that of other metastatic sites. Micrometastases retained their clonogenic and tumourigenic capacities in many biological models.<sup>59–61</sup> Clinical studies have reported a link between BM DTC and the onset of bone metastasis,<sup>1–8, 45</sup> strongly supporting the idea of local growth of DTC into macrometastases.

## Review

Surprisingly, other organs (especially the liver) also appear to be a favourite site of breast cancer relapse.<sup>8, 43</sup> However, the CXCR4 receptor is reported to be involved in homing to both sites,<sup>52</sup> but the current literature does not provide strong evidence for a common pool of genes responsible for coupled homing to bone marrow (or flat bones) and liver. The other alternative is that bone marrow may act as a long-term reservoir of tumour cells, which can recirculate to other distant organs before growing into metastases.<sup>62</sup> The high genetic heterogeneity<sup>63</sup> of BM micrometastatic cells might be responsible for recirculation of some cancer seeds from the bone marrow to different host organs. However, no biological or clinical study has directly reported such a process for BM DTC and there is currently no direct evidence suggesting that they are responsible for the late growth of lung or liver metastases. On the contrary, many biological models have reported that the micrometastatic dissemination of mammary tumours occurs in most of the target organs of metastases<sup>64-66</sup> and is not restricted to a unique reservoir in the bone marrow. Also, 40 months after the surgical treatment of non-metastatic breast cancer, the detection of circulating cancer cells in the peripheral blood was not correlated with the presence of bone marrow DTC.<sup>32</sup> Finally, the local growth of some BM DTC into bone macrometastasis is clinically and biologically rational. In the case of distant non-bone or local relapses predicted by BM DTC,<sup>8</sup> these cells mostly appear as a marker of a body-wide dissemination of invasive cancer cells rather than the body's only long-term reservoir of disseminated cancer cells.

### How is micrometastatic dormancy regulated?

Dormancy may be induced in disseminated cancer cells by lack of the primary tumour microenvironment (absence of stimulating growth factors,<sup>67</sup> presence of growth-inhibiting cytokine<sup>68</sup>). Metastatic growth may be a rare and stochastic event secondary to selection and mutations of dormant cancer cells.<sup>69</sup> The end of dormancy may also be induced by any change of the microenvironmental homeostasis, such as the presence of growth factors or an immune response.<sup>70</sup> Many groups investigating the mechanisms of dormancy have reported the role of integrin  $\alpha 5 \beta 1$  in regulating breast cancer cell dormancy. This integrin is activated by the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). Its main signalling pathway is the FAK/Src and ERK pathway to promote cell mobility; inhibition of this integrin leads to cancer cell dormancy in biological models.<sup>71, 72</sup> Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  appears to be necessary, via the PI3K/AKT pathway, for the survival of dormant cancer cells.<sup>68</sup> uPAR expression by BM DTC has also been linked to a poorer prognosis in a population of micrometastatic patients.<sup>16</sup>

Regulation of cancer cell dormancy may also involve genes and other processes, which regulate primary tumour growth. Finally, most BM DTC-positive patients never relapse, while others experience dramatic metastatic progression. These different outcomes cannot be explained at the present time and require further investigation.

### Micrometastasis and cancer stem cells

The role of cancer stem cells in the establishment of metastasis remains controversial in many theoretical proposals and reviews.<sup>73-76</sup> Experimentally, CD44+/CD24-/low cancer cells, a phenotype associated with a stem cell pattern, exhibit an invasive phenotype,<sup>77, 78</sup> which is a prerequisite to metastasis. In a report on 50 cases, most BM micrometastatic breast cancer cells exhibited a stem cell-like immunohistochemical phenotype.<sup>76</sup>

### Take-home messages

- ▶ Immunocytochemical detection of disseminated tumour cells in the bone marrow of primary breast cancer patients at surgery is an independent prognostic factor of poor outcome.
- ▶ Accurate identification of disseminated tumour cells (DTC) in bone marrow must be based on standardised methodologies and procedures.
- ▶ Prognostic value of circulating tumour cells (CTC) detection in peripheral blood is demonstrated in patients with metastatic disease but remains to be substantiated at early stage.
- ▶ DTC and CTC detection should be used in stratification and monitoring of therapeutic efficacy.
- ▶ Research on DTC could help in understanding tumour dormancy and identifying metastatic stem cells.

### CONCLUSION

BM DTC detection is a very promising prognostic parameter that will improve clinical management of patients with breast cancer in the near future. DTC detection must now be implemented in clinical trials to improve treatment selection. DTC specificity is considerably increased by histological examination according to international guidelines and must be submitted to high-level quality control. The future development of targeted therapies against BM DTC should significantly improve patient outcome and raises interesting new biological questions that should further our understanding of breast cancer carcinogenesis.

**Competing interests:** None declared.

### REFERENCES

1. Braun S, Vogl FD, Naume B, *et al.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;**353**:793-802.
2. Harris L, Fritsche H, Mennel R, *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;**25**:5287-312.
3. Fehm T, Braun S, Muller V, *et al.* A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 2006;**107**:885-92.
4. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, *et al.* Detection of isolated tumor cells in BM from breast-cancer patients: significance of anterior and posterior iliac crest aspirations and the number of mononuclear cells analyzed. *Cytotherapy* 2003;**5**:40-5.
5. Naume B, Wiedswang G, Borgen E, *et al.* The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:3091-7.
6. Borgen E, Naume B, Nesland JM, *et al.* Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I: Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. The European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection. *Cytotherapy* 1999;**1**:377-88.
7. Borgen E, Pantel K, Schlimok G, *et al.* A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;**70**:400-9.
8. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S, *et al.* Bone marrow micrometastasis are a powerful prognostic factor in stage I to III breast cancer patients. Abstract S460. *AACR Annual Meeting, Proceedings*, 14-18 April 2007.
9. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, *et al.* Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 2005;**8**:227-39.
10. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, *et al.* From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:7737-42.
11. Braun S, Pantel K, Muller P, *et al.* Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;**342**:525-33.
12. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, *et al.* Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 1999;**354**:197-202.
13. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004;**5**:79-88.

14. **Naume B**, Borgen E, Kvalheim G, *et al*. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001;**7**:4122–9.
15. **de Crémoux P**, Extra JM, Denis MG, *et al*. Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000;**6**:3117–22.
16. **Pierga JY**, Bonneton C, Magdelenat H, *et al*. Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2005;**114**:291–8.
17. **Ferrucci PF**, Rabascio C, Gigli F, *et al*. A new comprehensive gene expression panel to study tumor micrometastasis in patients with high-risk breast cancer. *Int J Oncol* 2007;**30**:955–62.
18. **Vincent-Salomon A**, Pierga JY, Couturier J, *et al*. HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases: a possible tool for anti-HER2 therapy management? *Br J Cancer* 2007;**96**:654–9.
19. **Slade MJ**, Coombes RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;**4**:30–41.
20. **Gerber B**, Krause A, Muller H, *et al*. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001;**19**:960–71.
21. **Gebauer G**, Fehm T, Merkle E, *et al*. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001;**19**:3669–74.
22. **Braun S**, Pantel K. Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *Oncologist* 2001;**6**:125–32.
23. **Zach O**, Lutz D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow. *Curr Opin Oncol* 2006;**18**:48–56.
24. **Muller V**, Hayes DF, Pantel K. Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2006;**8**:110.
25. **Cristofanilli M**, Budd GT, Ellis MJ, *et al*. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;**351**:781–91.
26. **Cristofanilli M**, Broglio KR, Guarnieri V, *et al*. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer* 2007;**7**:471–9.
27. **Ignatiadis M**, Xenidis N, Perraki M, *et al*. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;**25**:5194–202.
28. **Cristofanilli M**, Mendelsohn J. Circulating tumor cells in breast cancer: advanced tools for "tailored" therapy? *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:17073–4.
29. **Muller V**, Stahmann N, Riethdorf S, *et al*. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 2005;**11**:3678–85.
30. **Pierga JY**, Bonneton C, Vincent-Salomon A, *et al*. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:1392–400.
31. **Benoy IH**, Elst H, Philips M, *et al*. Prognostic significance of disseminated tumor cells as detected by quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction in patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2006;**7**:146–52.
32. **Wiedswang G**, Borgen E, Schirmer C, *et al*. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 2005;**118**:2013–9.
33. **Janni W**, Rack B, Schindlbeck C, *et al*. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005;**103**:884–91.
34. **Wiedswang G**, Borgen E, Kaesen R, *et al*. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:5342–8.
35. **Slade MJ**, Singh A, Smith BM, *et al*. Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years. *Int J Cancer* 2005;**114**:94–100.
36. **Lacroix M**. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006;**13**:1033–67.
37. **Quintela-Fandino M**, Lopez JM, Hitt R, *et al*. Breast cancer-specific mRNA transcripts presence in peripheral blood after adjuvant chemotherapy predicts poor survival among high-risk breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell support. *J Clin Oncol* 2006;**24**:3611–8.
38. **Braun S**, Kantenich C, Janni W, *et al*. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000;**18**:80–6.
39. **Braun S**, Hepp F, Kantenich CR, *et al*. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999;**5**:3999–4004.
40. **Bozonellou V**, Mavroudis D, Perraki M, *et al*. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:8185–94.
41. **Allan AL**, Vantighem SA, Tuck AB, *et al*. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis* 2006;**26**:87–98.
42. **Townson JL**, Chambers AF. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* 2006;**5**:1744–50.
43. **Wiedswang G**, Borgen E, Kaesen R, *et al*. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;**21**:3469–78.
44. **Gangnus R**, Langer S, Breit E, *et al*. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:3457–64.
45. **Kollermann J**, Muller M, Goessel C, *et al*. Methylation-specific PCR for DNA-based detection of occult tumor cells in lymph nodes of prostate cancer patients. *Eur Urol* 2003;**44**:533–8.
46. **Perou CM**, Sorlie T, Eisen MB, *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;**406**:747–52.
47. **Wang J**, Loberg R, Taichman RS. The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;**25**:573–87.
48. **Kaifi JT**, Yekebas EF, Schurr P, *et al*. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;**97**:1840–7.
49. **Holland JD**, Kochetkova M, Akekawatchai C, *et al*. Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;**66**:4117–24.
50. **Peng SB**, Peek V, Zhai Y, *et al*. Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2005;**3**:227–36.
51. **Sun Y**, Cheng Z, Ma L, *et al*. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002;**277**:49212–9.
52. **Andre F**, Cabioglu N, Assi H, *et al*. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol* 2006;**17**:945–51.
53. **Kallergi G**, Mavroudis D, Georgoulas V, *et al*. Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells. *Mol Med* 2007;**13**:79–88.
54. **Willipinski-Stapelfeldt B**, Riethdorf S, Assmann V, *et al*. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;**11**:8006–14.
55. **Benoy IH**, Salgado R, Elst H, *et al*. Relative microvessel area of the primary tumour, and not lymph node status, predicts the presence of bone marrow micrometastases detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically non-metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;**7**:R210–9.
56. **Paget S**. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;**8**:90–101.
57. **Minn AJ**, Gupta GP, Siegel PM, *et al*. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;**436**:518–24.
58. **Kang Y**, Siegel PM, Shu W, *et al*. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;**3**:537–49.
59. **Suzuki M**, Mose ES, Montel V, *et al*. Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. *Am J Pathol* 2006;**169**:673–81.
60. **Putz E**, Witter K, Offner S, *et al*. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 1999;**59**:241–8.
61. **Pierga JY**, Bonneton C, Magdelenat H, *et al*. Clinical significance of proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003;**89**:539–45.
62. **Meng S**, Tripathy D, Frenkel EP, *et al*. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:8152–62.
63. **Klein CA**, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, *et al*. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002;**360**:683–9.
64. **Jenkins DE**, Hornig YS, Oei Y, *et al*. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* 2005;**7**:R444–54.
65. **Kurebayashi J**, McLeskey SW, Johnson MD, *et al*. Quantitative demonstration of spontaneous metastasis by MCF-7 human breast cancer cells cotransfected with fibroblast growth factor 4 and LacZ. *Cancer Res* 1993;**53**:2178–87.
66. **Naumov GN**, MacDonald IC, Weinmeister PM, *et al*. Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res* 2002;**62**:2162–8.
67. **Yuhans JM**, Tarleton AE. Dormancy and spontaneous recurrence of human breast cancer in vitro. *Cancer Res* 1978;**38**(11 Pt 1):3584–9.
68. **Korah R**, Boots M, Wiedner R. Integrin alpha5beta1 promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer Res* 2004;**64**:4514–22.
69. **Klein CA**, Holzel D. Systemic cancer progression and tumor dormancy: mathematical models meet single cell genomics. *Cell Cycle* 2006;**5**:1788–98.
70. **Demicheli R**, Miceli R, Moliterni A, *et al*. Breast cancer recurrence dynamics following adjuvant CMF is consistent with tumor dormancy and mastectomy-driven acceleration of the metastatic process. *Ann Oncol* 2005;**16**:1449–57.
71. **Aguirre-Ghiso JA**. Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene* 2002;**21**:2513–24.
72. **Aguirre-Ghiso JA**, Estrada Y, Liu D, *et al*. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 2003;**63**:1684–95.
73. **Wicha MS**. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5606–7.

## Review

74. **Vaidya JS**. An alternative model of cancer cell growth and metastasis. *Int J Surg* 2007;**5**:73–5.
75. **Brabletz T**, Jung A, Spaderna S, *et al*. Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**:744–9.
76. **Balic M**, Lin H, Young L, *et al*. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5615–21.
77. **Hill A**, McFarlane S, Mulligan K, *et al*. Cortactin underpins CD44-promoted invasion and adhesion of breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Oncogene* 2006;**25**:6079–91.
78. **Sheridan C**, Kishimoto H, Fuchs RK, *et al*. CD44+/CD24— breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 2006;**8**:R59.
79. **Redding WH**, Coombes RC, Monaghan P, *et al*. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983;**2**:1271–4.
80. **Manegold C**, Krempien B, Kaufmann M, *et al*. The value of bone marrow examination for tumor staging in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1988;**114**:425–8.
81. **Landys K**, Persson S, Kovarik J, *et al*. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 1998;**49**:27–33.
82. **Salvadori B**, Squicciarini P, Rovini D, *et al*. Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 1990;**26**:865–7.
83. **Mathieu MC**, Friedman S, Bosq J, *et al*. Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990;**15**:21–6.
84. **Kirk SJ**, Cooper GG, Hoper M, *et al*. The prognostic significance of marrow micrometastases in women with early breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1990;**16**:481–5.
85. **Singletary SE**, Larry L, Tucker SL, *et al*. Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinoma patients. *J Surg Oncol* 1991;**47**:32–6.
86. **Cote RJ**, Rosen PP, Lesser ML, *et al*. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991;**9**:1749–56.
87. **Schlimok G**, Lindemann F, Holzmann K, *et al*. Prognostic significance of disseminated tumor cells detected in bone marrow of patients with breast and colorectal cancer: a multivariate analysis. Abstract 102. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1992;**11**.
88. **Harbeck N**, Untch M, Pache L, *et al*. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 1994;**69**:566–71.
89. **Menard S**, Squicciarini P, Luini A, *et al*. Immunodetection of bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients and its correlation with primary tumour prognostic features. *Br J Cancer* 1994;**69**:1126–9.
90. **Molino A**, Pelosi G, Turazza M, *et al*. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1997;**42**:23–30.
91. **Funke I**, Fries S, Rolle M, *et al*. Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int J Cancer* 1996;**65**:755–61.
92. **Diel IJ**, Kaufmann M, Costa SD, *et al*. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996;**88**:1652–8.
93. **Solomayer EF**, Diel IJ, Salanti G, *et al*. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;**7**:4102–8.
94. **Berger U**, Bettelheim R, Mansi JL, *et al*. The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am J Clin Pathol* 1988;**90**:1–6.
95. **Lyda MH**, Tetef M, Carter NH, *et al*. Keratin immunohistochemistry detects clinically significant metastases in bone marrow biopsy specimens in women with lobular breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2000;**24**:1593–9.
96. **Untch M**, Kahlert S, Funke I, *et al*. Detection of cytokeratin (CK) 18 positive cells in the bone marrow (BM) of breast cancer patients—no prediction of bad outcome. (Abstract 2472). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999;**18**:693a.
97. **Kasimir-Bauer S**, Oberhoff C, Sliwinska K, *et al*. Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use? *Breast Cancer Res Treat* 2001;**69**:123–32.

#### Invitation to submit images for consideration as a Cover

Readers are invited to submit images for consideration as a Cover. Cover images are not necessarily linked to a specific paper in that issue but rather are selected for their scientific/clinical interest and aesthetic appeal. We ask that readers only submit those images for which they hold the copyright. Colour images are preferred, should be a minimum of 600 dpi and in CMYK mode. Please submit your images to [jclinpath@bmjgroup.com](mailto:jclinpath@bmjgroup.com) in the first instance. Please also include a clear and concise legend explaining the image. All images will be credited to the appropriate supplier.

## 2.5 Hypothèse : Coopération intercellulaire et conditionnement des sites métastatiques

L'hypothèse de coopération intercellulaire repose principalement sur l'hétérogénéité génétique et phénotypique des tumeurs primitives, responsables de l'apparition continue de nouveaux sous-clones tumoraux. En suivant les données rappelées ci-dessus, une tumeur primitive est à l'origine du relarguage dans la circulation sanguine d'un nombre important de cellules tumorales qui, pour l'immense majorité d'entre elles, ne formeront pas de macrométastases (inefficacité métastatique). D'un point de vue théorique, il semble cependant improbable que ces cellules relarguées n'interagissent pas avec les organes hôtes. Ces interactions pourraient aboutir à un conditionnement progressif des sites métastatiques potentiels, qui deviendraient alors réceptif à l'implantation de cellules tumorales relarguées ultérieurement, et qui n'auraient peut être pas pu réussir seule le processus métastatique. A titre d'exemple, d'une manière extrême, on pourrait imaginer que des cellules tumorales différenciées et faiblement prolifératives conditionnent favorablement les organes hôtes de manière à permettre l'implantation de cellules très indifférenciées mais hautement proliférantes, correspondant potentiellement aux cellules souches tumorales.

Un corollaire de cette hypothèse est qu'elle minimise le rôle du switch métastatique. La sélection existerait, mais serait contournée par la coopération de différents sous clones tumoraux. En listant les principaux gènes effecteurs du processus métastatique (cf ci dessus), il apparaît raisonnablement improbable qu'un sous clone tumoral puisse acquérir l'ensemble des déterminants génétiques nécessaires au processus métastatique, tel qu'envisagé par la théorie de la sélection clonale. Au contraire, le « partage » de la progression métastatique entre différents sous-clones tumoraux de ces déterminants moléculaires serait compatible avec les signatures génomiques pronostiques de la tumeur primitive présentées par les tenants de la théorie adaptative (cf ci dessus).

### 2.5.1 REVUE : A class action against the microenvironment : do cancer cells cooperate in metastasis ?

Cette revue a été publiée par le journal « Metastasis and Cancer Reviews » (IF 2006 6,1). Cela a été l'occasion diffuser les fondements biologiques de l'hypothèse de coopération intercellulaire.

4 **A “class action” against the microenvironment: do cancer**  
5 **cells cooperate in metastasis?**

6 **François-Clément Bidard · Jean-Yves Pierga ·**  
7 **Anne Vincent-Salomon · Marie-France Poupon**

9 © Springer Science + Business Media, LLC 2007

12 **Abstract** The authors review how cancer cells may  
13 cooperate in metastasis by means of microenvironmental  
14 changes. The main mechanisms underlying this cooperation  
15 are clustered migration of cancer cells, extracellular matrix  
16 degradation, paracrine loops of released signaling factors  
17 and/or induction of adhesion molecules on stromal cells.  
18 Another critical factor could be temporal cooperation:  
19 successive waves of cancer cells may induce progressive  
20 conditioning of the microenvironment. The “class action”  
21 of cancer cells against the microenvironment involves  
22 successive steps of the metastatic process: invasion of the  
23 primary tumor microenvironment, collective migration  
24 through the extracellular matrix, blood vessel disruption,  
25 vascular or lymphatic tumor emboli, establishment of a  
26 premetastatic niche by secreted factors and endothelial  
27 precursor recruitment, induction of cell adhesion molecule  
28 expression in endothelial cells, extravasation, micrometastasis

dormancy and establishment of a new growth in distant sites. 29  
As a result, after completion of the metastatic process, the 30  
series of microenvironmental changes from the primary tumor 31  
to the metastatic site may promote colonization of metastases 32  
by nonmetastatic cancer cells of the primary tumor. 33

**Keywords** Metastasis · Microenvironment · Collective 34  
migration · Premetastatic niche · Cooperation · Colonization 35

**1 Introduction** 36

The metastatic process is a cellular marathon which 37  
combines both random and non-random selections of 38  
cancer cells. Random selection roughly corresponds to the 39  
mechanistic and “passive” aspects of the metastatic process 40  
(access to blood vessels, blood flow pressure, passive 41  
trapping of cancer cells in capillaries, etc.) [1], whereas 42  
non-random selection is mostly based on the molecular 43  
determinants displayed (or not displayed) by cancer cells 44  
[2]. These molecular determinants (e.g. E-Cadherin expres- 45  
sion, Nm23 suppression, etc.) are required to proceed 46  
through the highly selective, and putatively “active” steps 47  
of the metastatic process, such as escape from anoikis, 48  
homing in a preferential host organ, extravasation and start 49  
of a new growth in secondary sites [3, 4]. According to the 50  
metastatic switch paradigm, their expression is restricted to 51  
a small subpopulation of cells which pre-exists within a 52  
parental neoplasm [5]. In this model, the lack of any of the 53  
required molecular determinants would prevent tumor cells 54  
from developing into metastases [6]. Globally, the success 55  
rate of the metastatic process is very low, less than 0.1% for 56  
each circulating cancer cell, justifying the term “metastatic 57  
inefficiency” [7]. However, cancer cells which fail to 58  
metastasize may facilitate the establishment of metastasis 59

F.-C. Bidard (✉) · M.-F. Poupon  
Department of Translational Research, Institut Curie,  
26 rue d’Ulm,  
75005 Paris, France  
e-mail: fcbidard@curie.fr

M.-F. Poupon  
e-mail: mfpoupon@curie.fr

F.-C. Bidard · J.-Y. Pierga  
Department of Medical Oncology, Institut Curie,  
26 rue d’Ulm,  
75005 Paris, France

J.-Y. Pierga  
e-mail: jean-yves.pierga@curie.net

A. Vincent-Salomon  
Department of Pathology, Institut Curie,  
26 rue d’Ulm,  
75005 Paris, France  
e-mail: anne.salomon@curie.fr

60 by other cells. A community effect (or “class action”) of  
 61 cancer cells may be responsible for favorable conditioning  
 62 of the host microenvironment, facilitating the final estab-  
 63 lishment of metastases.

64 **2 General mechanisms of cancer cell cooperation**

65 The main mechanisms used by cancer cells to cooperate  
 66 have been largely described, although their cooperative  
 67 potential has not been elucidated. Direct signaling via  
 68 adhesion molecules between cancer cells and surrounding  
 69 non-neoplastic cells have been described [8–9], but most of  
 70 their interactions are mediated by secreted chemokines,  
 71 together with other secreted proteins (e.g. proteases) [10].  
 72 The action of secreted factors on the microenvironment  
 73 may also facilitate the survival and progression of other  
 74 tumor subclones. It has been postulated that two adjacent  
 75 tumor cells may overcome certain host defences and protect  
 76 each other by means of diffusible products [11]. Another  
 77 mechanism is the formation of cancer cell clusters:  
 78 “autologous” intercellular junctions may cluster heteroge-  
 79 neous subclones in tumor emboli or in invasion through a  
 80 basement membrane or endothelium [12–13]. The time  
 81 dimension must also be taken into account: due to the  
 82 genetic instability of the primary tumor, the tumor  
 83 microenvironment is exposed to successive tumor sub-  
 84 clones that may exhibit different phenotypes [14]. Once a  
 85 potential metastatic subclone has undergone a metastatic  
 86 switch, it may take advantage of the prior conditioning of  
 87 the microenvironment induced by other cancer cells.

88 This review details the three main steps of the  
 89 hematogenous metastatic process at which a community  
 90 effect, or “class action”, can occur: invasion and migration  
 91 through the extracellular matrix, pre-metastatic niche  
 92 conditioning, final growth of macrometastasis and the late  
 93 colonization process of metastases.

94 **3 Invasion and migration through the extracellular**  
 95 **matrix**

96 During the metastatic process, invasion of the extracellular  
 97 matrix (ECM) and migration of cancer cells occur during  
 98 primary tumor growth and after arrest of cancer cells in the  
 99 endothelium of the host organ [15]. Invasion and migration  
 100 properties are closely coordinated, and both require  
 101 morphologic changes of the cancer cell: formation of  
 102 pseudopodia at the leading edge, release and activation of  
 103 extracellular matrix proteases at the invasive front, cell  
 104 adhesion to proteolysed ECM and cellular movement by  
 105 detachment at the cell rear [16]. The loss of epithelioid  
 106 polarization and acquisition of an invasive phenotype are

107 mostly acquired via epithelial–mesenchymal transition  
 108 (EMT) [17]. However, focused analyses on the invasive  
 109 front of primary tumors revealed two phenomena which  
 110 allow cooperation between heterogeneous cancer cells: the  
 111 ability of cancer cells to migrate depends on ECM stiffness  
 112 and their ability to degrade ECM components by proteolysis  
 113 [18–19].

114 Experimental and theoretical models have shown that  
 115 the primary invading cancer cells are highly selected in  
 116 terms of their phenotype and correspond to a few tumor  
 117 clones exhibiting aggressive traits [20]. Their migration  
 118 through the ECM is accompanied by the formation of  
 119 migration tracks signaled by cell membrane material,  
 120 such as integrins, released by migrating cancer cells  
 121 during their rear detachment [21–22]. The signaling role  
 122 of this cellular debris and their ability to slow matrix  
 123 remodeling have not been clearly evaluated. However,  
 124 by creating a tunnel of least resistance within the ECM  
 125 and reshaping the collagen fibers at the border of the  
 126 tunnel, primary migrating cancer cells may create  
 127 migrating pathways for other cancer cells [23]. It has  
 128 also been reported that collective cell movement repre-  
 129 sents an efficient dissemination strategy. This collective  
 130 migration of cancer cells exhibits an invasive front  
 131 composed of clustered promigratory, beta-1 integrin-  
 132 expressing cancer cells (described as “guiding” cells)  
 133 and different cellular phenotypes at the rear end of the  
 134 cell cluster [24–25]. Together with other hypotheses, the  
 135 collective migration of cancer cells may explain why  
 136 metastases of epithelial cancers still display epithelial  
 137 markers and do not exhibit a mesenchymal phenotype  
 138 [26]: EMT may concern only the first guiding cancer  
 139 cells.

140 The late step of the migratory pathway within the  
 141 microenvironment of the primary tumor is intravasation,  
 142 i.e. release of cancer cells into blood or lymph [27]. Some  
 143 studies have demonstrated the active involvement of  
 144 specific molecular determinants, such as adhesion mole-  
 145 cules or chemokines [28–30], while others have reported  
 146 the importance of passive, unregulated mechanisms of  
 147 cancer cell release into lymph or blood vessels [1]. In  
 148 clinical studies reporting the existence of circulating cancer  
 149 cells in disseminated breast cancers, the number of  
 150 circulating cancer cells appeared to be at least partially  
 151 linked to disease progression [31] after an initial biological  
 152 regulation [32]. These clinical observations are not in favor  
 153 of a tight regulation of the intravasation process throughout  
 154 tumor growth. To explain how circulating cancer cells may  
 155 be a “biological staging beyond tumor burden,” we propose  
 156 that early intravasating cancer cells require specific molec-  
 157 ular determinants, and that subsequent cancer cells may  
 158 take advantage of an altered endothelium to passively  
 159 extravasate.

160 **4 Premetastatic niche conditioning**

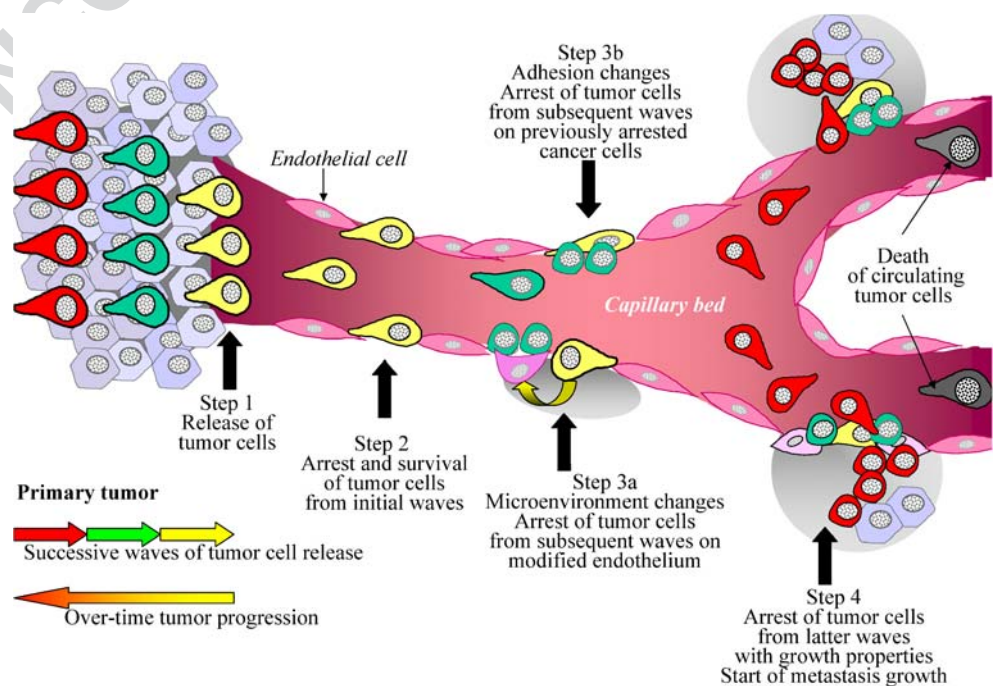
161 Circulating cancer cells are released into the blood by  
 162 nonmetastatic primary tumors, as documented by many  
 163 clinical studies [33]. Many biological studies, including  
 164 those using *in vivo* videomicroscopy, have shown that the  
 165 vast majority of these circulating cells cannot form  
 166 metastases or micrometastases [34–36]. This has been  
 167 described by the well known term “metastatic inefficiency”  
 168 [37]. As these cells do not directly form macrometastases,  
 169 no study has specifically reported the microenvironmental  
 170 changes induced by these “inefficient” cancer cells.  
 171 Concerning modification of the extracellular matrix by  
 172 early migrating cancer cells, we can postulate that the host-  
 173 organ microenvironment may be conditioned by certain  
 174 circulating cells to promote the establishment of metastasis  
 175 by other cancer cells (Fig. 1).

176 A simple experiment in a human colorectal model of  
 177 metastasis reported that E Selectin expression by endothelial  
 178 cells mediated the arrest of cancer cells in the liver [38].  
 179 After injection of cancer cells into the portal vasculature, E  
 180 Selectin was strongly upregulated in the liver, thereby  
 181 facilitating the arrest of further incoming cancer cells [39].  
 182 More recently, E Selectin expression by sinusoidal endothe-  
 183 lial cells was shown to be only part of the proinflammatory  
 184 response of the host-organ microenvironment to arrested  
 185 cancer cells: release of TNF-alpha by Kupffer cells, and  
 186 P-Selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression by sinusoidal  
 187 endothelial cells [40–41]. This process is one of the first  
 188 steps leading to the creation of a favorable metastatic niche.  
 189 Other alterations of the endothelial microenvironment can

also upregulate the metastatic process: expression of integrin  
 adhesion molecules in cancer cells and the endothelium,  
 matrix metalloproteinases, and chemotactic factors that  
 promote the attachment of tumor cells to the vessel wall  
 and/or transvascular penetration [42–43]. Not surprisingly,  
 together with intravascular tumor emboli of the primary  
 tumor [44], prometastatic intravascular “homotypic” adhe-  
 sive interactions between circulating cancer cells have also  
 been reported at the site of primary attachment to the  
 endothelium [12, 45]. These two kinds of cellular cluster  
 may also promote cooperation against the host-organ  
 microenvironment.

In addition to activation of the endothelium and  
 clustering of cancer cells, a primary tumor may also trigger  
 the recruitment of bone-marrow derived cells at future  
 metastatic sites. It has been reported that the secretion of  
 inflammatory chemokines, induced by the primary tumor,  
 attracts both cancer cells and MAC1+ myeloid cells in the  
 premetastatic lung [46]. Moreover, VEGFR1+/VLA-4+  
 bone marrow-derived hematopoietic progenitor cells may  
 form a premetastatic niche in future host organs, and their  
 recruitment is mediated by signaling factors secreted by  
 cancer cells [47–48]. However, it has not been reported  
 whether or not proliferation at the metastatic site is  
 restricted to the cancer cells which were initially responsible  
 for the recruitment of metastasis-facilitating bone marrow  
 cells. Importantly, in the reported experiments, the metastatic  
 pattern (i.e. preferential homing of metastasizing cells)  
 of injected tumor cells depended on the conditioned microenvi-  
 ronment, but not on their own intrinsic metastatic pattern.  
 In the absence of supplementary experiments, it can be hypoth-

**Fig. 1** Premetastatic niche conditioning. Possible cooperations between successive waves of homogeneous or heterogeneous circulating cancer cells



Print will be in black and white



221 esized that chemokine-secreting subclones of the primary  
 222 tumor are responsible for initiation of the premetastatic niche,  
 223 but that the resulting conditioned microenvironment may also  
 224 be a niche for other tumor subclones.

225 **5 Final growth and colonization of macrometastases**

226 The early growth and regulation of micrometastatic cancer  
 227 cells within a host organ remain unclear. Many studies  
 228 have reported that bone marrow micrometastases (BM  
 229 MM) are a strong prognostic factor for metastatic relapse  
 230 of early breast cancers [49–50], in accordance with our  
 231 results [51]. After successful dissemination, isolated  
 232 cancer cells appear to undergo a dormancy phase which  
 233 could last several years, before some of them grow into  
 234 macrometastases [52]. Strikingly, BM MM have almost  
 235 completed the metastatic process but still remain genet-  
 236 ically and phenotypically heterogeneous [53–55]. In the  
 237 breast cancer adjuvant setting, 40 months after completion  
 238 of treatment, the detection of BM MM and circulating  
 239 cancer cells were not correlated in patients, and only BM  
 240 MM had a significant impact on survival. Although  
 241 circulating cancer cells had no prognostic significance in  
 242 the overall population, their detection resulted in an  
 243 especially poor prognosis for the few patients who also  
 244 exhibited BM MM [56]. It can be hypothesized that  
 245 circulating cancer cells might form macrometastases when  
 246 the local microenvironment has been favorably condi-  
 247 tioned by other cancer cells (namely BM MM), but this  
 248 hypothesis needs to be further investigated.

249 The late growth of metastases, after the start of  
 250 secondary proliferation by metastasizing cancer cells, has  
 251 been studied in our laboratory. Although the underlying  
 252 molecular determinants have not been determined, we  
 253 demonstrated colonization of metastases by nonmetastatic  
 254 circulating cancer cells [57]. These types of tumor  
 255 subpopulation interactions in metastasis were also indirectly  
 256 reported in a murine model [58]. We concluded that the late  
 257 part of the metastatic process creates a favorable microen-  
 258 vironment for the arrest and growth of other tumor  
 259 subclones. This cooperative process could also explain  
 260 why primary tumors and macrometastases may exhibit a  
 261 similar molecular profile after clonal initiation of metastases  
 262 [59–60].

263 **6 Conclusion**

264 We have reviewed the main steps of the metastatic process  
 265 in which cooperation of cancer cells progressively creates a  
 266 conditioned microenvironment, and its potential mecha-  
 267 nisms. The cooperation between cancer cells may have

been underestimated by the use of highly selected cell lines 268  
 injected intravenously to mice. It is almost impossible at the 269  
 present time, for technical reasons and due to genetic 270  
 instability, to distinguish all of the genetically and pheno- 271  
 typically different subclones in a primary tumor and to 272  
 follow them in the course of the metastatic process. 273  
 However, this class action type of process might also exist 274  
 in many other hallmarks of cancer, such as angiogenesis or 275  
 immunity escape. If confirmed by further experiments, this 276  
 cooperation may change our understanding of the meta- 277  
 static process. 278

**Acknowledgments** This work was funded by the Institut Curie and 280  
 Inserm. 281

**References** 282

1. Bockhorn, M., Jain, R. K., & Munn, L. L. (2007). Active versus 283  
 passive mechanisms in metastasis: Do cancer cells crawl into 284  
 vessels, or are they pushed? *Lancet Oncology*, 8, 444–448. 285
2. Hoon, D. S., Kitago, M., Kim, J., Mori, T., Piris, A., Szyfelbein, K., 286  
 et al. (2006). Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer* 287  
*Metastasis Reviews*, 25, 203–220. 288
3. Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). 289  
 Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. 290  
*Nature Reviews. Cancer*, 2, 563–572. 291
4. Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: Mechanistic insights and 292  
 clinical challenges. *Natural Medicines*, 12, 895–904. 293
5. Fidler, I. J. (2002). Critical determinants of metastasis. *Seminars* 294  
*in Cancer Biology*, 12, 89–96. 295
6. Fidler, I. J., & Kripke, M. L. (2003). Genomic analysis of primary 296  
 tumors does not address the prevalence of metastatic cells in the 297  
 population. *Nature Genetics*, 34, 23. 298
7. Weiss, L. (2000). Metastasis of cancer: A conceptual history from 299  
 antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Reviews*, 19, 193–383. 300
8. Kapoor, P., Saunders, M. M., Li, Z., Zhou, Z., Sheaffer, N., 301  
 Kunze, E. L., et al. (2004). Breast cancer metastatic potential: 302  
 Correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular 303  
 communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. 304  
*International Journal of Cancer*, 111, 693–697. 305
9. el-Sabban, M. E., & Pauli, B. U. (1994–1995). Adhesion- 306  
 mediated gap junctional communication between lung-metastatic 307  
 cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis*, 14, 164–176. 308
10. Opdenakker, G., & Van Damme, J. (2004). The countercurrent 309  
 principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent 310  
 insights on the roles of chemokines. *International Journal of* 311  
*Developmental Biology*, 48, 519–527. 312
11. Axelrod, R., Axelrod, D. E., & Pienta, K. J. (2006). Evolution of 313  
 cooperation among tumor cells. *Proceedings of the National* 314  
*Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 13474– 315  
 13479. 316
12. Glinsky, V. V. (2006). Intravascular cell-to-cell adhesive interactions 317  
 and bone metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 25, 531–540. 318
13. Kerbel, R. S. (1994–1995). Impact of multicellular resistance on 319  
 the survival of solid tumors, including micrometastases. *Invasion* 320  
*Metastasis*, 14, 50–60. 321
14. Nicolson, G. L. (1984). Generation of phenotypic diversity and 322  
 progression in metastatic tumor cells. *Cancer Metastasis Reviews*, 3, 323  
 25–42. 324
15. Wittekind, C., & Neid, M. (2005). Cancer invasion and 325  
 metastasis. *Oncology*, 69, 14–16. 326

327 16. Yamaguchi, H., Wyckoff, J., & Condeelis, J. (2005). Cell migration  
328 in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*, *17*, 559–564.

329 17. Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks  
330 orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews.*  
331 *Molecular Cell Biology*, *7*, 131–142.

332 18. Zaman, M. H., Trapani, L. M., Sieminski, A. L., Mackellar, D.,  
333 Gong, H., Kamm, R. D., et al. (2006). Migration of tumor cells in  
334 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell–matrix  
335 adhesion and proteolysis. *Proceedings of the National Academy of*  
336 *Sciences of the United States of America*, *103*, 10889–10894.

337 19. Jodele, S., Blavier, L., Yoon, J. M., & DeClerck, Y. A. (2006).  
338 Modifying the soil to affect the seed: Role of stromal-derived matrix  
339 metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis*  
340 *Reviews*, *25*, 35–43.

341 20. Anderson, A. R., Weaver, A. M., Cummings, P. T., & Quaranta, V.  
342 (2006). Tumor morphology and phenotypic evolution driven by  
343 selective pressure from the microenvironment. *Cell*, *27*, 905–915.

344 21. Palecek, S. P., Huttenlocher, A., Horwitz, A. F., & Lauffenburger, D. A.  
345 (1998). Physical and biochemical regulation of integrin release during  
346 rear detachment of migrating cells. *Journal of Cell Science*, *111*, 929–  
347 940.

348 22. Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., & Herzog, V. (2004). Cell  
349 migration: mechanisms of rear detachment and the formation of  
350 migration tracks. *European Journal of Cell Biology*, *83*, 717–724.

351 23. Friedl, P., Maaser, K., Klein, C. E., Niggemann, B., Krohne, G., &  
352 Zänker, K. S. (1997). Migration of highly aggressive MV3  
353 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local  
354 matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins  
355 and CD44. *Cancer Research*, *57*, 2061–2070.

356 24. Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Bröcker, E. B., & Friedl, P. (2002).  
357 Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity  
358 of cell–cell interaction, beta1-integrin function, and migration  
359 strategies. *Cancer Research*, *62*, 2125–2130.

360 25. Brakebusch, C., & Fässler, R. (2005). Beta 1 integrin function *in*  
361 *vivo*: adhesion, migration and more. *Cancer Metastasis Reviews*,  
362 *24*, 403–411.

363 26. Christiansen, J. J., & Rajasekaran, A. K. (2006). Reassessing  
364 epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma  
365 invasion and metastasis. *Cancer Research*, *66*, 8319–8326.

366 27. Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F., & Liotta, L. A. (1997). General  
367 mechanisms of metastasis. *Cancer*, *80*, 1529–1537.

368 28. Gupta, A., Deshpande, C. G., & Badve, S. (2003). Role of E-cadherins  
369 in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer*, *97*, 2341–2347.

370 29. Galaup, A., Cazes, A., Le Jan, S., Philippe, J., Connault, E., Le Coz, E.,  
371 et al. (2006). Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition  
372 of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness.  
373 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*  
374 *of America*, *103*, 18721–18726.

375 30. Siclari, V. A., Guise, T. A., & Chirgwin, J. M. (2006). Molecular  
376 interactions between breast cancer cells and the bone microenvi-  
377 ronment drive skeletal metastases. *Cancer Metastasis Reviews*, *25*,  
378 621–633.

379 31. Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J.,  
380 Miller, M. C., et al. (2004). Circulating tumor cells, disease  
381 progression, and survival in metastatic breast cancer. *New*  
382 *England Journal of Medicine*, *351*, 781–791.

383 32. Cristofanilli, M., Broglio, K. R., Guarneri, V., Jackson, S.,  
384 Fritsche, H. A., Islam, R., et al. (2007). Circulating tumor cells  
385 in metastatic breast cancer: Biologic staging beyond tumor  
386 burden. *Clinical Breast Cancer*, *7*, 471–479.

387 33. Wiedswang, G., & Naume, B. (2007). Can detection of circulating  
388 tumor cells in peripheral blood provide prognostic data in breast  
389 cancer? *Nature Clinical Practice. Oncology*, *4*, 154–155.

390 34. Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N.,  
391 Morris, V. L., Chambers, A. F., et al. (1998). Multistep nature of  
392 metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful  
extravasation and limited survival of early micrometastases. *393*  
*American Journal of Pathology*, *153*, 865–873. *394*

395 35. Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V.,  
396 Morris, V. L., Groom, A. C., et al. (2000). Temporal progression of  
397 metastasis in lung: Cell survival, dormancy, and location depen-  
398 dence of metastatic inefficiency. *Cancer Research*, *60*, 2541–2546. *399*

400 36. Ito, S., Nakanishi, H., Ikehara, Y., Kato, T., Kasai, Y., Ito, K., et al.  
401 (2001). Real-time observation of micrometastasis formation in the  
402 living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged  
403 rat tongue carcinoma cell line. *International Journal of Cancer*,  
404 *93*, 212–217. *405*

406 37. Weiss, L. (1996). Metastatic inefficiency: Intravascular and  
407 intraperitoneal implantation of cancer cells. *Cancer Treatment*  
408 *and Research*, *82*, 1–11. *409*

410 38. Khatib, A. M., Fallavollita, L., Wancewicz, E. V., Monia, B. P., &  
411 Brodt, P. (2002). Inhibition of hepatic endothelial E-selectin  
412 expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal  
413 carcinoma liver metastasis. *Cancer Research*, *62*, 5393–5398. *414*

415 39. Khatib, A. M., Kontogianna, M., Fallavollita, L., Jamison, B.,  
416 Meterissian, S., & Brodt, P. (1999). Rapid induction of cytokine  
417 and E-selectin expression in the liver in response to metastatic  
418 tumor cells. *Cancer Research*, *59*, 1356–1361. *419*

420 40. Khatib, A. M., Auguste, P., Fallavollita, L., Wang, N., Samani, A.,  
421 Kontogianna, M., et al. (2005). Characterization of the host  
422 proinflammatory response to tumor cells during the initial stages  
423 of liver metastasis. *American Journal of Pathology*, *167*, 749–759. *424*

425 41. Auguste, P., Fallavollita, L., Wang, N., Burnier, J., Bikfalvi, A., &  
426 Brodt, P. (2007). The host inflammatory response promotes liver  
427 metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation.  
428 *American Journal of Pathology*, *170*, 1781–1792. *429*

430 42. Lafrenie, R., Shaughnessy, S. G., & Orr, F. W. (1992). Cancer cell  
431 interactions with injured or activated endothelium. *Cancer*  
432 *Metastasis Reviews*, *11*, 377–388. *433*

434 43. Orr, F. W., Wang, H. H., Lafrenie, R. M., Scherbarth, S., & Nance, D. M.  
435 (2000). Interactions between cancer cells and the endothelium in  
436 metastasis. *Journal of Pathology*, *190*, 310–329. *437*

438 44. Ruitter, D. J., van Krieken, J. H., van Muijen, G. N., & de Waal, R. M.  
439 (2001). Tumour metastasis: Is tissue an issue? *Lancet Oncology*, *2*,  
440 109–112. *441*

442 45. Glinsky, V. V., Glinsky, G. V., Glinskii, O. V., Huxley, V. H.,  
443 Turk, J. R., Mossine, V. V., et al. (2003). Intravascular metastatic  
444 cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary  
445 attachment to the endothelium. *Cancer Research*, *63*, 3805–3811. *446*

447 46. Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., & Maru, Y. (2006).  
448 Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruit-  
449 ment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature Cell*  
450 *Biology*, *8*, 1369–1375. *451*

452 47. Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H.,  
453 Vincent, L., Costa, C., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic  
454 bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*,  
455 *438*, 820–827. *456*

457 48. Kaplan, R. N., Psaila, B., & Lyden, D. (2006). Bone marrow cells  
458 in the ‘pre-metastatic niche’: Within bone and beyond. *Cancer*  
459 *Metastasis Reviews*, *25*, 521–529. *460*

461 49. Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P.,  
462 Coombes, R. C., et al. (2005). A pooled analysis of bone marrow  
463 micrometastasis in breast cancer. *New England Journal of*  
464 *Medicine*, *353*, 793–802. *465*

466 50. Wiedswang, G., Borgen, E., Kåresen, R., Kvalheim, G., Nesland, J. M.,  
467 Qvist, H., et al. (2003). Detection of isolated tumor cells in bone  
468 marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *Journal of*  
469 *Clinical Oncology*, *21*, 3469–3478. *470*

471 51. Bidard, F. C., Vincent-Salomon, A., Gomme, S., Thiery, J. P.,  
472 Sigal-Zafrani, B., De Rycke, Y., et al. (2007). Bone marrow  
473 micrometastasis are a powerful prognostic factor in women with  
474 stage I to III breast cancer. (Abstract). AACR annual meeting. *475*

459 52. Wiedswang, G., Borgen, E., Karesen, R., Qvist, H., Janbu, J.,  
460 Kvalheim, G., et al. (2004). Isolated tumor cells in bone marrow  
461 three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients  
462 predict unfavorable clinical outcome. *Clinical Cancer Research*,  
463 *10*, 5342–5348. 476

464 53. Gangnus, R., Langer, S., Breit, E., Pantel, K., & Speicher, M. R.  
465 (2004). Genomic profiling of viable and proliferative micro-  
466 metastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clinical*  
467 *Cancer Research*, *10*, 3457–3464. 477

468 54. Braun, S., Hepp, F., Sommer, H. L., & Pantel, K. (1999).  
469 Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells:  
470 Implications for immunotherapy of minimal residual disease.  
471 *International Journal of Cancer*, *84*, 1–5. 478

472 55. Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M.,  
473 Ahr, A., Blankenstein, T. J., et al. (2003). From latent  
474 disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of  
475 systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National*  
*Academy of Sciences of the United States of America*, *100*,  
7737–7742. 479

56. Wiedswang, G., Borgen, E., Schirmer, C., Kåresen, R., Kvalheim, G.,  
Nesland, J. M., et al. (2006). Comparison of the clinical significance  
of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer.  
*International Journal of Cancer*, *118*, 2013–2019. 480

57. Bidard, F. C., Auger, N., Rosty, C., Assayag, F., Di Santo, J. P., &  
Poupon, M. F. (2007). Specific colonization of metastases by non  
metastasizing circulating tumor cells. (Abstract). AACR annual meeting.  
482 483

58. Miller, F. R. (1983). Tumor subpopulation interactions in  
metastasis. *Invasion Metastasis*, *3*, 234–242. 484

59. Bernards, R., & Weinberg, R. A. (2002). A progression puzzle.  
*Nature*, *418*, 823. 485

60. Inamura, K., Shimoji, T., Ninomiya, H., Hiramatsu, M., Okui, M.,  
Sato, Y., et al. (2007). A metastatic signature in entire lung  
adenocarcinomas irrespective of morphological heterogeneity.  
*Human Pathology*, *38*, 702–709. 486

UNCORRECTED PROOF

## 3 Matériels et Méthodes

Les expériences utilisant des modèles animaux ont été réalisées dans le laboratoire du Dr Marie-France Poupon ; il s'agit de modéliser *in vivo* l'existence de deux sous clones tumoraux par l'utilisation de lignées tumorales humaines de type histologique similaire mais pouvant être distinguées par certains types de marquage. Les données obtenues sur les cellules tumorales disséminées médullaires proviennent de l'analyse des données clinico-biologiques de plus de 800 patientes incluses deux cohortes (une en situation adjuvante, l'autre en situation métastatique), sous la direction du Pr Jean-Yves Pierga. La plupart des articles (cf chapitre Résultat) détaillent les matériels et méthodes utilisés.

### 3.1 Modélisation *in vivo*

#### 3.1.1 Cellules et cultures

**Lignée LoVo** La lignée LoVo est issue d'un adénocarcinome colorectal humain, isolé chez un patient (cellules présentant les chromosomes X et Y) à partir d'un ganglion métastatique à distance (ganglion de Troisier) et entretenue par l'ATCC. Elles sont cultivées dans un milieu de type RPMI (Gibco), supplémenté avec 10 pourcents de sérum de veau foetal (Gibco). Ces cellules ont un phénotype de type instabilité des microsatellites (MSI), comme précédemment rapporté par l'équipe de Marie-France Poupon (Bras-Goncaves RA, Br J Cancer 2000). Après transfection stable, un sous-clone exprimant le gène de la résistance au G418/néomycine (enzyme Néomycine Phospho-Transférase 2, NPT2) a été construit auparavant dans le laboratoire par le Docteur Marc Pocard (Pocard M, Oncogene 1996). L'intérêt de l'expression de cette enzyme réside dans le fait qu'elle permet une sélection des cellules LoVo issues de mise en culture de prélèvements pulmonaires, ainsi qu'un marquage spécifique par immunohistochimie. Cette lignée, appelée LoVoG418, n'est pas cultivée en présence continue de néomycine, mais doit être régulièrement (tous les 5 passages environ) resélectionnée par néomycine (50 microg/ml, Gibco).

**Lignée HT29** La lignée HT29 est elle aussi issue d'un adénocarcinome colorectal humain, isolée chez une patiente (cellules présentant 2 chromosomes X) à partir de la tumeur primitive, et entretenue par l'ATCC. Elles sont cultivées dans un milieu de type DMEM (Gibco), supplémenté avec 10 pourcents de sérum de veau foetal (Gibco). Elles ne présentent pas de phénotype MSI.

**Lignée B16-F10** La lignée de mélanome B26-F10 de souris C57B6 est une lignée largement utilisée, caractérisée par sa prolifération rapide et son potentiel métastatique élevé, maintenue en culture par l'ATCC. Il s'agit d'ailleurs de la lignée utilisée initialement dans les travaux de

IJ Fidler dans les années 1980. Elle est cultivable dans le milieu DMEM (Gibco), supplémenté avec 10 pourcents de sérum de veau foetal (Gibco).

**Lignée MDA-MB-231T** La lignée MDA-MB-231 est une lignée de carcinome mammaire humaine isolée à partir d'un épanchement pleural et maintenue en culture par l'ATCC. Sa culture se fait en milieu DMEM, supplémenté avec 10 pourcents de sérum de veau foetal (Gibco). La sous-population MDA-MB-231T a été construite par clonage dans le laboratoire du Dr Patricia Steeg (NCI, Bethesda) par transfection d'un plasmide exprimant le gène suppresseur de métastases nm23 ainsi que le gène NPT2 de la résistance au G418/néomycine (Leone A, Oncogene 1993). Les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231T nous ont été envoyées congelées par le laboratoire du Dr Steeg. La culture de la lignée MDA-MB-231T a été réalisée en présence de néomycine à faible concentration (20 microg/ml, Gibco), conformément aux recommandations du laboratoire d'origine.

Ce modèle des gènes suppresseurs de métastases nous a semblé particulièrement intéressant dans la mesure où il permettrait de comparer deux sous-populations ne différant génétiquement que par l'expression d'un seul gène. Il s'agirait d'une meilleure modélisation de l'existence de deux sous clones d'une même tumeur primitive plutôt qu'en utilisant deux tumeurs colorectales différentes. Enfin, la population non métastatique serait détectable par immunohistochimie au sein des métastases par son expression de l'enzyme NPT2.

### 3.1.2 Souris et modèles tumoraux

L'ensemble des expériences *in vivo* s'est déroulé en animalerie à l'Institut Curie, en respect de la réglementation du Ministère de l'Agriculture.

**Souris Nude** Les souris principalement utilisées pour la collection de xénogreffe du laboratoire sont des souris porteuses de la mutation nude, sur fond génétique Swiss (fournisseurs : Charles River ou élevage interne à l'animalerie de l'Institut Curie). Ces souris présentent une athymie congénitale responsable d'un déficit de la fonction lymphocytaire T permettant l'établissement de xénogreffes de tumeurs ou de cellules humaines. Du fait de l'absence de lymphocytes T matures, la fonction lymphocytaire B est elle aussi altérée, mais non complètement inactive.

**Souris RAG2/ $\gamma$ C<sup>-/-</sup>** Ces souris ont été obtenues par le laboratoire de James P. di Santo à l'Institut Pasteur (Colucci C, J Immunol 1999). La mutation du gène responsable de l'activation de la recombinaison des chaînes des immunoglobulines (RAG2) (présente chez les souris RAG2), couplée à la mutation de la chaîne  $\gamma$  commune aux récepteurs aux interleukines 2, 4, 7, 9 et 15 (présente chez les souris  $\gamma$ C), conduit à un déficit complet des fonctions B, T et NK. Ces souris alymphoïdes ont pour fond génétique le fond C57BL/6 et ont été fournies par l'élevage de l'Institut Pasteur (JP di Santo).

### 3.1.3 Immunohistochimie

**hMLH1** Le marquage de la protéine hMLH1 a été réalisé au département d'Anatomopathologie, ce marquage y étant réalisé en routine. Les différentes lames ont ensuite été lues par le

Dr Christophe Rosty. Le protocole de marquage était le suivant :

- Déparaffinage par bains successifs de toluène, réhydratation
- Démasquage des antigènes par micro-ondes
- Incubation avec l'anticorps primaire selon les instructions du fournisseur (clone G168-15, dilution 1/50e, incubation 1 heure).
- Utilisation d'un anticorps secondaire biotinylé et révélation par phosphate alcaline
- Contre-coloration et montage des lames

**NPT2** Il n'existait pas de protocole pré-établi ou publié d'immunohistochimie pour la protéine NPT2, responsable de la résistance à la néomycine/G418. La mise au point du protocole a nécessité de nombreuses variations, du type de démasquage antigénique utilisé à la concentration et au temps d'incubation de l'anticorps de lapin finalement utilisé (clone G168-15, Pharmingen). Un autre anticorps (UBS biological) utilisé de prime abord n'a pas permis d'obtenir un marquage spécifique. Le protocole de marquage primaire comprenait donc les étapes suivantes :

- Déparaffinage par bains successifs de toluène, réhydratation
- Démasquage des antigènes par trypsinisation (8 minutes)
- Incubation avec l'anticorps primaire (1/450ème) pendant 4 heures
- Utilisation d'un anticorps secondaire biotinylé et révélation par phosphate alcaline (Vectastain)
- Contre-coloration en hématoxyline et montage des lames

Une fois la technique mise au point, avec spécificité acceptable du marquage sur lame, l'ensemble des lames a été lu par le Docteur Christophe Rosty (Dpt d'Anatomopathologie). Cette lecture était faite en aveugle par rapport au type de tumeur portée par les souris.

#### 3.1.4 FISH

Le marquage par FISH interphasique des chromosomes X et Y a utilisé un mélange de sondes centromériques spécifiques : Y en rouge, X en vert (Qbiogene). L'hybridation des lames blanches a été réalisée en suivant un protocole « classique » de FISH, avec adaptation de la durée de chacune des étapes, brièvement

- Déparaffinage par bains successifs de toluène, réhydratation
- Dénaturation des lames par tampon de dénaturation (2 min, 70°), déshydratation et séchage
- Dépôt de la solution de sondes fluorescentes sur les lames
- Co-dénaturation à 90° (2 minutes)
- Hybridation pendant 14h à 37° en milieu humidifié
- Lavage des lames
- Ajout de DAPI
- Congélation des lames à -20°C avant lecture au microscope de fluorescence.

La présence de spot rouge et vert dans un noyau signalait la présence d'une cellule male, donc LoVo. Cette approche théoriquement intéressante s'est heurtée à la perte du chromosome Y dans de nombreuses cellules LoVo, comme indiqué par les caryotypes métaphasiques initialement réalisés par l'équipe du Dr Bernard Dutrillaux sur les cellules LoVo en culture. Nous

avons ainsi retrouvé au sein des métastases pulmonaires une importante population de cellules ne possédant qu'un seul spot vert visible, malgré les variations que nous pouvions faire manuellement sur la mise au point du microscope (afin d'étudier la lame dans son épaisseur). Si ces cellules correspondaient théoriquement aux cellules LoVo ayant perdu leur chromosome Y, elles pourraient aussi être des cellules HT29 pour lesquelles le deuxième chromosome X serait hors champ ou hors lame. De fait, l'analyse des tumeurs primitives LoVo et HT29 en FISH, faite en contrôle, a montré une proportion nettement augmentée de cellules n'ayant qu'un seul spot vert dans la tumeur LoVo.

La lecture des lames a été réalisée au microscope à fluorescence (Leica) en collaboration avec le Docteur Nathalie Auger (Assistante de Cytogénétique à l'Institut Gustave Roussy, alors en Thèse au laboratoire). Cette lecture a été réalisée en « double » aveugle :

- Lecture aveugle vis à vis des types de tumeurs primitives à l'origine des métastases pulmonaires analysées (LoVo et HT29, ou uniquement HT29).
- Lecture aveugle vis à vis des résultats précédemment obtenus par immunohistochimie, qui n'avait pas retrouvé de cellules LoVo dans les métastases pulmonaires de quelques souris porteuses des deux tumeurs.

Cette lecture en « double aveugle » est méthodologiquement importante, dans la mesure où les résultats obtenus par cette approche a permis de confirmer complètement ceux obtenus par immunohistochimie (cf Résultats).

## 3.2 Etude des cellules tumorales disséminées

Le programme de recherche clinique sur micrométastases médullaires (ou « cellules tumorales disséminées »), tel que rapporté dans cette thèse, a commencé en 1998 à l'Institut Curie. Ma participation à ces travaux a consisté au recueil des caractéristiques des patientes (environ 850) et de leur tumeurs, à l'analyse des résultats et à leur diffusion (congrès, articles). N'ayant pas pris part aux travaux de détection des cellules tumorales au sein des prélèvements médullaires (détection réalisée par le Département d'Anatomopathologie), le rappel méthodologique sur cette partie restera volontairement succinct.

### 3.2.1 Détection

**Préparation des lames** De trois à cinq millilitres d'aspirat médullaire ont été obtenus chez chaque patiente par ponction du sternum ou des crêtes iliaques antérieures et/ou postérieures. Chaque prélèvement a été ensuite dilué volume à volume par une solution isoosmolaire (Hanks solution, Life Technologies) puis séparé par une centrifugation sur gradient de Ficoll (Sigma) pendant 15 minutes. Les cellules mononuclées étaient prélevées et lavées par resuspension dans la solution de Hanks et centrifugation puis resuspendu par PBS. L'équivalent d'un million de cellules mononuclées était alors cytocentrifugé sur une lame de verre chargée positivement mise ensuite à sécher pour la nuit. Six lames étaient ainsi préparées pour chaque patiente à partir du prélèvement médullaire, le reste des cellules étant alors congelé.

**Immunomarquage** L'anticorps A45-B/B3 (Micromet) qui reconnaît plusieurs épitopes des cytokératines 8, 18 et 19 était utilisé pour la détection des cellules tumorales après fixation des lames au paraformaldéhyde 4/100 et une procédure habituelle d'immunomarquage. A noter qu'un anticorps murin aspécifique était utilisé à la même concentration (2 microg/ml) à la place de l'anticorps A45-B/B3 sur des lames contrôles, afin d'étudier l'existence d'un éventuel marquage cellulaire aspécifique sur un nombre équivalent de cellules (3 millions de cellules mononucléées pour chacun des deux anticorps). La sensibilité et la spécificité de cette méthode ont été rapportés auparavant (Pierga JY, Clin Cancer Res 2004). Il est important de noter que l'examen morphologique visuel permis par ce type de technique éliminait ensuite, sur des critères définis et consensuels (Borgen E, Cytotherapy 1999), les cellules marquées qui ne présentaient pas de phénotype tumoral.

### 3.2.2 Données cliniques et biologiques

Toutes les caractéristiques tumorales ont été enregistrées de manière prospective dans le dossier médical informatisé des patientes prélevées. Cependant, certaines données ne faisaient alors pas l'objet d'une recherche systématique. Ainsi, le trastuzumab n'ayant obtenu qu'au cours de la période 1998 à 2004 son autorisation de mise sur le marché en situation métastatique, le statut HER2 n'a été déterminé qu'à la rechute métastatique des patientes prélevées en adjuvant, ce qui introduit un biais important de sélection.

### 3.2.3 Analyse statistique

Tous les tests ont été réalisés avec un risque alpha fixé à 0,05 de manière bilatérale. Les tests statistiques « simples » (Khi deux, test exact de Fisher, test *t* de student...) ont été réalisés avec le logiciel Statview (SAS), avec contrôle de leurs conditions d'application. Ce logiciel a permis par ailleurs de tracer les courbes de survie par la méthode de Kaplan-Meier ainsi que d'analyser les différences entre ces courbes par test de log-rank. Les analyses multivariées ont été réalisées suivant le modèle de Cox, en ne retenant que les critères significatifs en analyse univariée. Chaque article détaille les éventuels tests complémentaires utilisés.



## 4 Résultats et Discussion

### 4.1 Dissémination initiale médullaire et métastases métachrones

#### 4.1.1 Rationnel de l'étude

La dissémination micrométastatique au moment du diagnostic d'une tumeur primitive non métastatique peut être évaluée par la recherche de cellules tumorales disséminées médullaires, comme évoqué dans la revue ci-dessus (Vincent-Salomon A, J Clin Pathol 2008). Il s'agit d'un moyen relativement peu invasif d'évaluation de l'avancée des cellules tumorales le long du processus métastatique. Ces cellules tumorales disséminées sont particulièrement rares au milieu des cellules médullaires normales, et demandent l'aide d'un marquage cellulaire afin d'en permettre la détection. Ce marquage introduit donc des biais, avec d'inévitables faux négatifs, et des faux positifs qui peuvent être limités par une évaluation morphologique des cellules marquées.

En tenant compte de ces contraintes techniques de détection, l'enjeu est ici de vérifier dans quelle mesure ces cellules tumorales disséminées, qui sont décrites comme étant dormantes, influent à long terme sur la survenue d'une rechute macrométastatique ultérieure.

#### 4.1.2 ARTICLE : *Disseminated tumor cells of breast cancer patients : a strong prognostic factor for distant and local relapse*

## Disseminated Tumor Cells of Breast Cancer Patients: A Strong Prognostic Factor for Distant and Local Relapse

Francois-Clément Bidard,<sup>1</sup> Anne Vincent-Salomon,<sup>2</sup> Stéphanie Gomme,<sup>3</sup> Claude Nos,<sup>4</sup> Yann de Rycke,<sup>3</sup> Jean Paul Thiery,<sup>5</sup> Brigitte Sigal-Zafrani,<sup>2</sup> Laurent Mignot,<sup>1</sup> Xavier Sastre-Garau,<sup>2</sup> and Jean-Yves Pierga<sup>1,6</sup> for the Institut Curie Breast Cancer Study Group

**Abstract** **Purpose:** Clinical significance of disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow of early breast cancer patients has been reported, but improvements in detection methods are needed. **Experimental Design:** Bone marrow aspirates from 621 patients with stage I to III breast cancer were screened for cytokeratin-positive (CK+) cells. CK+ cells were categorized into DTC only if they had specific morphologic features of tumor cells. Bone marrow status and clinical and pathologic variables of the patients were correlated with clinical outcome after a median follow-up of 56 months. **Results:** DTC and non-DTC CK+ cells were detected in 15% and 34% of patients, respectively, with no correlation with clinical and pathologic variables. On univariate analysis, DTC detection was associated with a poorer distant metastasis-free survival (DMFS;  $P = 0.0013$ ) and overall survival (OS;  $P = 0.005$ ). Moreover, DTC detection was also associated with local relapse-free survival ( $P = 0.0009$ ). On multivariate analysis, DTC detection was an independent prognostic factor for DMFS, local relapse-free survival, and OS. There was no significant interaction between DTC detection and hormonal receptors status ( $P = 0.34$ ). Non-DTC CK+ cells had no clinical significance. **Conclusion:** DTC detection is a powerful prognostic marker for DMFS and OS in early breast cancer patients and can be individualized from irrelevant non-DTC CK+ cells by morphologic criteria. Biologically, despite high rates of systemic adjuvant therapy and locoregional irradiation in this series, DTC detection remains a prognostic factor of distant and, more strikingly, of local relapse, in favor of resistance to treatment of locally or distant disseminated cancer cells in DTC-positive patients.

Adjuvant chemotherapy and endocrine therapy are commonly used for operable breast cancer patients to reduce the risk of systemic metastasis (1). This risk is assessed on clinical and pathologic variables, including age, tumor size and lymph node staging, histopathologic subtype and grade, hormonal receptors, and HER2 status (2). Hematogenous-driven metastasis is a complex biological process involving many sequential steps (intravasation, circulation in the blood, extravasation, specific recognition of a favorable

“soil,” and final growth within the host organ) and its genetic mechanism remains unclear (3, 4). However, in several cancers, single disseminated cancer cells can be detected in various host organs of patients with early-stage disease (5). Cytokeratins are epithelial markers and epithelial cells can thus be detected in the bone marrow at the time of primary surgery for nonmetastatic breast cancer (6, 7). A pooled analysis showed that these cells are detected in 31% of stage I to III breast cancer patients and have an independent clinical impact on overall survival (OS; ref. 8). However, expression of cytokeratins in rare bone marrow cells does not preclude their carcinomatous nature as some hematopoietic progenitors and plasma cells can be immunolabeled by anti-cytokeratin antibodies (9). Therefore, specific morphologic features of malignancy are required to increase the specificity and relevance of micrometastatic cell detection (9). A consensual classification based on morphologic features and control slides has been reported (10), with a major clinical effect of the most atypical cells (classified as “tumor cells”) and a smaller effect of less atypical cells (“uninterpretable cells”; refs. 11, 12). We studied the clinical outcome of breast cancer patients according to three categories: no cytokeratin-positive (CK+) cells, disseminated tumor cells (DTC), and non-DTC CK+ cells, that do not exhibit morphologic features of tumor cells, and report their clinical significance.

**Authors' Affiliations:** Departments of <sup>1</sup>Medical Oncology, <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Statistics, and <sup>4</sup>Surgery, Institut Curie, Paris, France; <sup>5</sup>IMCB Biopolis, Singapore, Singapore; and <sup>6</sup>Université Paris Descartes, France

Received 10/27/07; revised 12/27/07; accepted 1/3/08.

**Grant support:** Institut Curie micrometastasis incitative research program funded by individual grants.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**Requests for reprints:** Jean-Yves Pierga, Département d'Oncologie Médicale, Institut Curie, 26 rue d'Ulm 75005 Paris, France. Phone: 33-1-44-32-46-81; Fax: 33-1-44-32-46-71; E-mail: jean-yves.pierga@curie.net.

© 2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4749

## Materials and Methods

**Patients.** The accrual in the Breast Cancer Micrometastasis Project was open at the Institut Curie from November 1998 to September 2005 (13–15). Patient characteristics were prospectively recorded in the Institut Curie medical files. All samples were obtained with the patient's written informed consent after approval by the regional ethics committee. The result of bone marrow analysis remained unknown to both patients and clinicians. The eligibility criteria for the study were female patients over age 18 with histologically proven adenocarcinoma of the breast, no previous malignancy other than treated *in situ* carcinoma of the cervix or nonmelanoma skin cancer, no bilateral breast cancer, and no distant metastasis. The routine diagnostic workup included mammography, mammary biopsy, chest X-rays, abdominal ultrasound, bone scan, blood sampling, and clinical examination. Neoadjuvant chemotherapy was allowed. After surgery, radiotherapy and/or adjuvant chemotherapy and/or hormone therapy was delivered when recommended by the local guidelines. Adjuvant and neoadjuvant were based on anthracycline regimens for all patients (FAC or FEC). High-risk patients received also docetaxel. During follow-up, chest X-rays, abdominal ultrasound, mammography, and blood analyses were carried out at each clinical examination at 6- to 12-month intervals at the Institut Curie or by the patient's gynecologist. Further diagnostic workup was done only when patients presented symptoms or signs of progression. Local recurrence was defined as a relapse in breast (including every ipsilateral tumor), chest wall, or axillary lymph nodes.

**Preparation of bone marrow and immunocytochemistry staining.** Bone marrow sampling and processing and mononuclear cell staining have been described previously, together with the sensitivity and specificity of our protocol (14). Briefly, bone marrow aspirate was done at diagnosis from sternum or during primary surgery from both anterior iliac crests, under local or general anesthesia, respectively. Sternal aspiration was done under local anesthesia mainly in patient receiving neoadjuvant chemotherapy, whereas patient treated by primary surgery had bone marrow during general anesthesia (anterior iliac crest). After separation by density centrifugation, mononuclear cells were collected and cytopsins were prepared ( $1 \times 10^6$  mononuclear cells per slide). Three slides were incubated with the primary pancytokeratin monoclonal antibody A45-B/B3 (Micromet and Chromavision), which recognizes three cytokeratins: CK8, CK18, and CK19. Negative controls, stained with anti-FITC IgG1 mouse antibody (Sigma Immuno Chemicals), were done on an equivalent number of cells (that is, three slides,  $3 \times 10^6$  mononuclear cells) for each patient. Immune complexes formed by secondary anti-mouse antibody were revealed by the alkaline phosphatase/anti-alkaline phosphatase reaction, and slides were counterstained with hematoxylin to study nuclear morphology.

**CK+ cell detection by light microscopy.** All slides and controls were screened manually and interpreted by trained pathologists. Bone marrow aspirates were classified into three categories: absence of detected CK+ cells, presence of CK+ cells with atypical cytology features (DTC), and non-DTC CK+ cells. Atypical cytology was defined as large cell size (larger than surrounding hematopoietic cells), a high nuclear/cytoplasm ratio for isolated cells, or the presence of clusters of large cohesive cells. These criteria for evaluation of CK+ cells in bone marrow were adapted from Borgen et al. (10) based on the results of the European Working Group for standardization of tumor cell detection. Control slides were systematically read and were taken into account to classify positive cases. In doubtful cases, positive and control slides were blind reviewed by another pathologist and a consensus was established. The criteria used for DTC classification of CK+ cells in this analysis differ from our previous reports: the first ( $n = 75$  nonmetastatic patients) did not take into account control slides nor CK+ cell morphology (14), whereas the second ( $n = 270$  nonmetastatic patients) did not take into account CK+ cell morphology (8).

**Blood sampling and circulating tumor cells detection.** In 74 patients, blood samples (7–14 mL) were obtained by venipuncture after

discarding the first 5 mL blood to avoid contamination by epidermal CK+ cells. The same detection technique was used to detect circulating tumor cells (CTC), but as the CK+ cell detection rate was low, all stained cells were considered to be CTC.

**Statistical methods.** OS, distant metastasis-free survival (DMFS), and local relapse-free survival (LRFSS) time were measured from the date of surgery until the date of death (or last follow-up) or the date of diagnosis of distant metastasis or local relapse, respectively. Differences between categorical variables were analyzed by  $\chi^2$  tests or Fisher's exact test. Differences between means were analyzed by *t* tests or Mann-Whitney test. Survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method. Statistical significance between survival curves was assessed using the log-rank test. Multivariate analysis and interaction tests were done by the Cox proportional hazards model. For all analyses,  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

**Funding source.** The funding source had no role in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

## Results

Bone marrow aspiration was done in 655 eligible non-metastatic patients. Thirty-four patients were excluded from the analysis: 16 did not undergo surgery and 18 bone marrow aspirates were technically inconclusive. Finally, 621 patients without metastatic disease at diagnosis were eligible for further statistical evaluation.

**Patient characteristics and treatment.** Patient characteristics are shown in Table 1. The median age was 54 years (range, 25–79). Hormonal (estrogen and/or progesterone) receptors were positive in 81% of cases. HER2 receptor was screened in 212 patients and was overexpressed in 39 (18%). Primary tumor size was  $<2$  cm in 321 patients (44%) and 295 (48%) patients were node negative. One hundred and nineteen patients (19%) received neoadjuvant chemotherapy (bone marrow aspiration was done at diagnosis before any chemotherapy). Surgical treatment consisted of radical mastectomy (27%) or breast conserving surgery (73%). Axillary lymph node dissection was done when lymph nodes were clinically involved or after a positive sentinel lymph node biopsy. Standard adjuvant chemotherapy has been administered to 48% of patients and 65% received endocrine therapy. Adjuvant chemotherapy was mostly anthracycline-based (32%) or a combination of anthracycline and docetaxel (5%). High-dose adjuvant chemotherapy with peripheral blood stem cell reinfusion has been administered to 9% of patients. Tamoxifen or aromatase inhibitors after 2003 were used as adjuvant endocrine therapy in hormonal receptor-positive patients according to their menopausal status. More than 96% of patients received adjuvant radiotherapy according to local guidelines.

**Detection of DTC and univariate survival analysis.** One or more DTC or non-DTC CK+ cells were detected within  $3 \times 10^6$  bone marrow mononuclear cells in 94 (15.1%) and 208 (33.5%) patients, respectively. Importantly, no CK+ cell with DTC features was detected on control slides. CK+ cell detection rates were similar between sternal and iliac crest aspiration (51% versus 47%, nonsignificant). DTC (and non-DTC CK+) detection did not correlate with any of the patient's clinical or pathologic characteristics (Table 1).

The median follow-up was 56 months (range, 1–100) and follow-up was  $<6$  months for 6 patients. One hundred and twenty-three patients experienced disease recurrence: local

relapses were diagnosed in 28 patients (4.5%) and distant metastases were diagnosed in 111 patients (18%). Sixteen patients (2.6%) experienced both local relapse and metastases. Seventy-seven deaths (12%) were reported (including 11 breast cancer unrelated deaths) and were included in the OS analysis. As OS was not significantly different for non-DTC CK+ and no CK+ patients (Cox model,  $P = 0.3$ ), statistical analyses compared the DTC-positive population with the DTC-negative population. In univariate analysis, OS of patients was dependent on their bone marrow DTC status as shown in Fig. 1A (log-rank  $P = 0.005$ ). Overall 5-year survival was 89% for DTC-negative patients and 77% for DTC-positive patients. Distant metastases were more frequent in the DTC-positive group ( $P = 0.0013$ ; Fig. 1B). In patients who developed distant

metastasis, DTC detection was associated with liver metastasis ( $P = 0.05$ ) but not with bone metastasis ( $P = 0.9$ ) as first site of relapse. Strikingly, locoregional relapse was also strongly associated with the presence of DTC cells in bone marrow ( $P = 0.0009$ ; Fig. 1C).

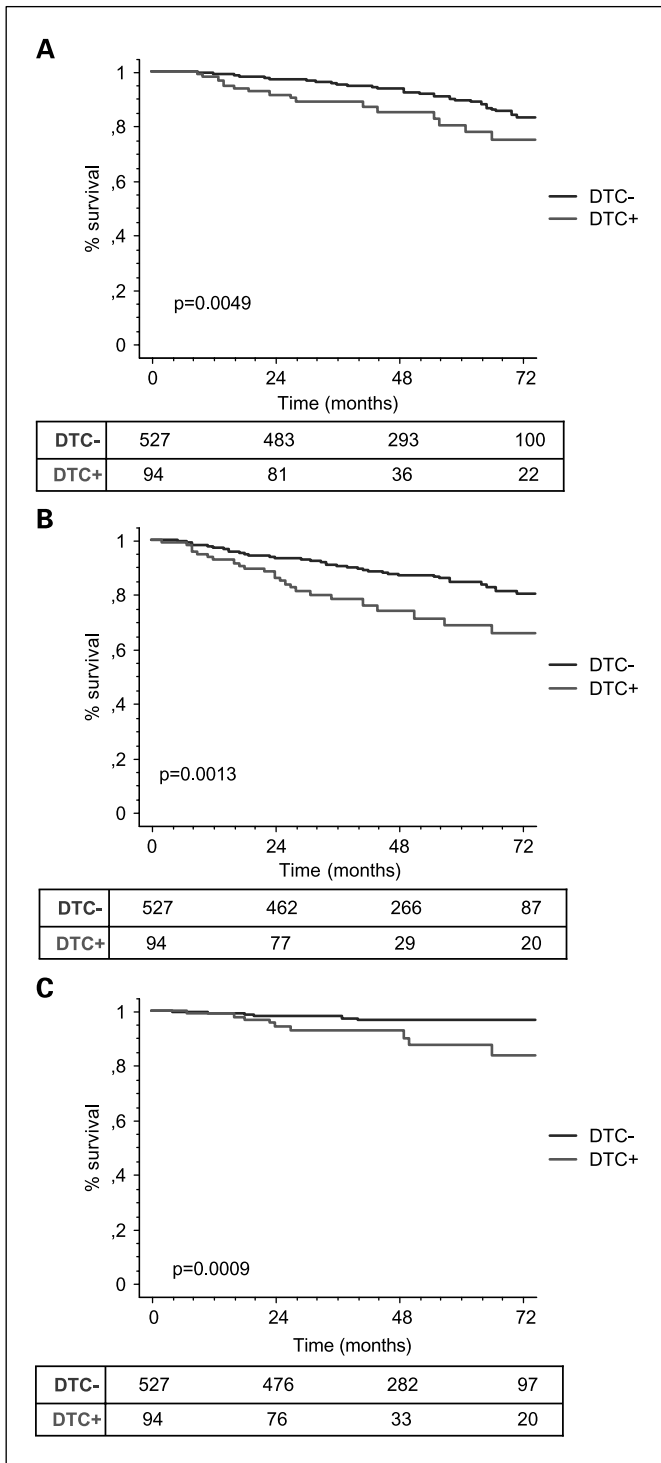
Together with DTC status, clinical stage (according to the tumor-node-metastasis International Union Against Cancer classification), tumor grade, hormonal receptor status, and vascular emboli were also significantly associated on univariate analysis with OS and DMFS. HER2 status and patient age were also associated to DMFS. For LRFS, the other prognostic factors were patient age, hormonal receptor status, HER2 status, and tumor emboli (Table 1). HER2 status was unknown in 66% of patients and was not subsequently tested. In 74 patients

**Table 1.** Patient characteristics, DTC detection rates, and prognostic issues

Characteristics	No. patients (%)	DTC detection rate (%)	OS (P)	DMFS (P)	LRFS (P)
Age (y)					
20-35	29 (5)	17.2			
36-50	201 (32)	12.4			
51-65	321 (52)	15.8			
>65	70 (11)	18.6	0.42	0.01*	0.009*
T					
1	321 (52)	17.4			
2	172 (27)	12.2			
3/4	124 (20)	12.9	<0.0001	<0.0001	0.22
Unknown	4 (1)	25.0			
Node status					
Negative	295 (48)	15.6			
Positive	324 (52)	14.8	<0.0001	<0.0001	0.68
Unknown	2	0			
Clinical stage					
1	223 (36)	16.6			
2A	146 (23)	18.5			
2B	123 (20)	9.6			
3A	72 (12)	15.3			
3B	57 (9)	12.2	<0.0001*	<0.0001*	0.31
Histology					
Ductal	514 (83)	14.4			
Lobular	75 (12)	16.0			
Others	32 (5)	31.3	0.33	0.39	0.89
Tumor grade					
1	203 (37)	14.8			
2	235 (38)	14.9			
3	163 (26)	15.3	<0.0001*	<0.0001*	0.17
Unknown	20 (3)	15.0			
Hormonal receptor status					
Positive	495 (80)	14.3			
Negative	116 (18)	17.3	<0.0001*	<0.0001*	0.006*
Unknown	10 (2)	20.0			
HER2 status					
Negative	173 (28)	19.6			
Positive	39 (6)	25.6	0.19	<0.0001	0.001
Unknown	409 (66)	12.0			
Tumor emboli					
No	412 (67)	13.6			
Yes	189 (30)	18.0	<0.0001*	<0.0001*	0.04*
Unknown	20 (3)	15.0			
Bone marrow DTC					
Negative	527 (85)	—			
Positive	94 (15)	—	0.005*	0.0013*	0.0009*
Total	621	15.1			

NOTE: Hormonal status was positive when estrogen or progesterone receptors were significantly expressed. DTC (and non-DTC CK+ cells; data not shown) detection rate was not correlated with any patient characteristics.

\*Significant prognostic factors that were included in the multivariate analysis (see Table 2).



**Fig. 1.** OS (A), DMFS (B), and LRFS (C) curves according to bone marrow status [DTC positive versus DTC negative; log-rank  $P = 0.0049$  (A),  $0.0013$  (B), and  $0.0009$  (C)].

screened for CTC, DTC detection, but not CTC detection, was associated with OS as reported previously with a median follow-up of only 28 months (14).

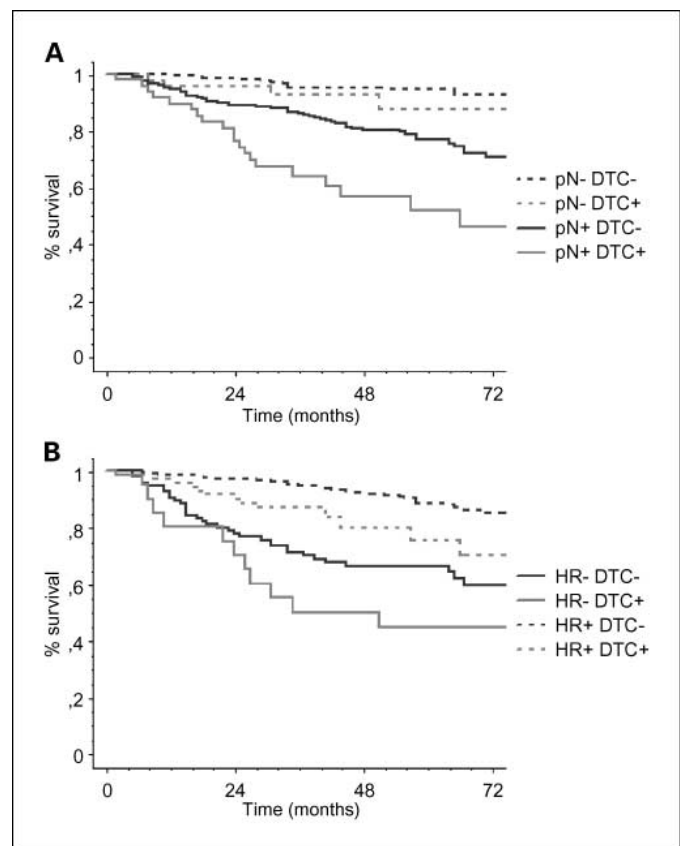
**Subgroups and multivariate analyses.** Subgroup analyses for DMFS and LRFS, based on nodal status, are shown in Fig. 2. The difference in DMFS (and OS; data not shown) for DTC patients was significant in node-positive patients ( $P = 0.002$ )

but was not significant in node-negative patients ( $P = 0.2$ ; Fig. 2A). However, the interaction test was nonsignificant [ $P = 0.80$ ; hazard ratio (HR), 0.86; 95% CI, 0.28-2.69]. On the contrary, the difference in LRFS for DTC patients was mostly seen in node-negative patients ( $P = 0.0002$ ), but the interaction test was also nonsignificant ( $P = 0.24$ ; HR, 0.38; 95% CI, 0.08-1.90). According to a subgroup analysis, DTC prognosis effect on DMFS was not statistically different in patients with hormonal receptor positive or negative primary tumors (interaction test,  $P = 0.44$ ; HR, 0.70; 95% CI, 0.29-1.72; Fig. 2B).

Multivariate analyses categorized DTC detection, clinical stage, tumor grade, hormonal receptor status, vascular emboli and patient age according to their relative independence. Bone marrow DTC was an independent prognostic factor for OS ( $P = 0.02$ ; HR, 1.92; 95% CI, 1.12-3.48), DMFS ( $P = 0.006$ ; HR, 1.96; 95% CI, 1.21-3.17), and LRFS ( $P = 0.0009$ ; HR, 3.73; 95% CI, 1.71-8.13; Table 2).

**Discussion**

Bone marrow cytokeratin-expressing cells can correspond to normal hematopoietic cells or disseminated breast cancer cells. Morphologic analysis of bone marrow in breast cancer patients can display several classes of results for CK+ cells: tumor cells, probable tumor cells, hematopoietic cells, artifacts, and no CK+



**Fig. 2.** A, DMFS curves in node positive ( $pN+$ ) and node negative ( $pN-$ ) patients according to bone marrow DTC status. B, DMFS curves in hormonal receptor positive ( $HR+$ ) and negative ( $HR-$ ) patients according to bone marrow DTC status. Interaction tests between  $pN$  or hormonal receptor status and DTC status were negative.

**Table 2.** Multivariate analysis of prognostic factors for LRFS, DMFS, and OS ( $n = 597$  patients)

Prognostic factors	LRFS		DMFS		OS	
	RR	P	RR	P	RR	P
DTC detection						
Negative	1.0		1.0		1.0	
Positive	3.7	0.0009	2.0	0.006	1.9	0.02
Clinical stage						
1			1.0		1.0	
2			2.5		2.1	
3	Ni		9.4	<0.0001	4.2	0.002
Tumor grade						
1 and 2			1.0		1.0	
3	Ni		1.7	0.02	1.7	0.05
Tumor emboli						
No	1.0		1.0		1.0	
Yes	1.8	0.14	1.7	0.02	2.0	0.01
Hormonal receptor status						
Positive	1.0		1.0		1.0	
Negative	2.3	0.04	1.8	0.008	1.6	0.08
Age (y)						
>54	1.0		1.00		Ni	
<54	3.0	0.02	1.12	0.59		

NOTE: Ni, prognostic factors that were not significant at univariate analysis and not included in multivariate analysis. The median age in our cohort was 54 y.

cells detected (10). In the preliminary analysis including the first 114 patients of our series (14), every CK+ cell was taken into account as a DTC, and we described an incidence for DTC of almost 50% in 75 nonmetastatic patients. The pooled analysis published by Braun et al. also included the first 270 patients of our series and showed the prognostic significance of micrometastases at early diagnosis of breast cancer (8). In this international study, micrometastatic cells were defined as cytokeratin-expressing cells assessed by immunohistochemistry with detection rates ranging from 12% to 38% (38% at the Institut Curie, patients with positive control slides were then considered as being DTC negative; ref. 8). After completion of our breast cancer micrometastasis study, CK+ cells were found in 49% of patients regardless of morphology or control slide (DTC and non-DTC CK+ cells) as reported in our preliminary analysis. The present study, based on a simple classification (DTC positive or negative), confirms that a further pathologic classification lowers the micrometastasis rate to 15% (DTC only) of breast cancer patients, a result similar to the 13% rate reported previously with a similar pathologic methodology (12). The clinical value of restricting the bone marrow analysis to DTC (instead of CK+ cells) is sustained by the lack of prognostic value of non-DTC CK+ cells. However, a few micrometastatic cells may have been misclassified as non-DTC CK+ cells; in the future, molecular analysis techniques (e.g., fluorescence *in situ* hybridization) might enhance the sensitivity and specificity of DTC detection. The DTC distribution was independent of any standard clinical or pathologic prognostic factors and patient stratification was therefore not required before statistical analysis in this series. Univariate and multivariate analyses showed that DTC detection was a strong independent prognostic factor, leading to poor 5-years survival rates.

Unexpectedly, DTC also constituted an independent prognostic factor for local relapse of breast cancer that has not been reported previously. The local relapse rate (4.5%) in the present

study was similar to that reported in the Oslo series (5.9%), with fewer pT<sub>1</sub> tumors (40% versus 61%) and more breast-conserving surgery (73% versus 31%; ref. 11). Our cohort was therefore at high risk of local relapse and adjuvant radiotherapy, an effective treatment to prevent local relapse (16), was administered to 96% of our patients (47% in the Oslo series; ref. 11). The association between DTC detection and local relapses may be due to a repopulation of the primary tumor site by DTC after surgery. This migration of cancer cells may be enhanced by wound-associated chemokines and proangiogenic factors (17, 18). Another explanation of the higher risk of local relapse in DTC-positive patients is to consider that locally disseminated cancer cells have a similar clonal origin to bone marrow DTC and that they share the DTC resistance to adjuvant treatments, which has been reported previously (19–21). According to this hypothesis, the high rate of adjuvant local treatments in our study has therefore unmasked, by killing the sensitive non-DTC-associated locally disseminated cancer cells, a previously unreported link between bone marrow DTC and local relapse.

Finally, the prognostic effect of bone marrow DTC detection in stage I to III breast cancer patients appeared to be homogeneous among the different subgroups of patients included in our series. The Oslo series showed initially that significance of DTC detection was marked and clear in the node-positive group but more restricted in the node-negative not receiving adjuvant treatment group (22). In a subgroup analysis of our study, DMFS and LRFS were significant in node-positive and node-negative patients, respectively. The six deaths registered in the T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> population ( $n = 177$ ) also did not allow statistical analysis. However, interaction tests showed that these results are likely due to a low number of events in the node-negative and node-positive patients, respectively. A recent report also states that DTC detection is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer, DTC

differentially distinguishing clinical outcome in patients with luminal A-type tumors (23). Luminal A-type tumors are mostly characterized by estrogen receptor expression; although we did not analyze the molecular profile of breast cancers, we did not find any prognostic difference between hormonal receptor positive and negative status in our study. In contrary to recent report on CTC in the blood, we did not find a higher rate or a different prognostic value of DTC according to hormonal receptors or HER2 status of primary tumor (24).

Bone marrow micrometastases are a confirmed strong independent prognostic factor in the whole breast cancer patient population; as indicated by this heavily treated cohort study, these micrometastases are still a clinical challenge due to their association with resistance to local and systemic adjuvant therapy. Although micrometastases are a documented clinical entity, only a few biological preclinical studies have focused on the regulatory step between dormant micrometastasis and metastasis (67% of the DTC population remained disease free in our study). Biological studies showed that macrometastases develop under the control of organ-specific molecular determinants (25, 26). In this model, local recurrence or distant metastatic growth in liver or lungs is likely to be derived from other disseminated cancer cells rather than bone marrow DTC. In our study, the presence of DTC in the bone marrow was associated with more frequent liver metastasis but not with a

higher rate of bone metastasis. This point is in contrast with other studies reporting more skeletal and liver metastases (22).

In stage IV patients, we recently reported that DTC detection has no prognosis effect (27), whereas CTC in peripheral blood seem to be associated with outcome and response to treatment as it has been shown by Cristofanilli et al. (28, 29). At early stage, clinical relevance of CTC detection remains to be validated with the same level of proof that DTC in bone marrow with standardized methods (6). As shown in our study, DTC, which indicate occult tumor dissemination and a poorer prognosis, can be detected with an increased specificity by using morphologic criteria. Still now, monitoring adjuvant treatment efficacy in primary breast cancer patients would be based on the analysis of repeated bone marrow aspirates (21, 30). The improved methodology we have used should contribute to the adoption of DTC detection as a standard practice in breast cancer management.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Acknowledgments

We thank F. Huguet for critical review of the article and M. Cally and F. Viard for technical assistance.

### References

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687–717.
2. Goldhirsch A, Wood W, Gelber R, et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007;18:1133–44.
3. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563–72.
4. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453–8.
5. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004;4:448–56.
6. Slade MJ, Coombes RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:30–41.
7. Benoy IH, Elst H, Philips M, et al. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94: 672–80.
8. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:793–802.
9. Borgen E, Beiske K, Trachsel S, et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 1998;185:427–34.
10. Borgen E, Naume B, Nesland JM, et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. The European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection. *Cytotherapy* 1999;1:377–88.
11. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3469–78.
12. Naume B, Wiedswang G, Borgen E, et al. The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3091–7.
13. Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, et al. Clinical significance of proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003;89:539–45.
14. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:1392–400.
15. Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, et al. Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2005; 114:291–8.
16. Clarke M, Collins R, Darby S, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;366:2087–106.
17. Hormbrey E, Han C, Roberts A, McGrouther DA, Harris AL. The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003;9:4332–9.
18. Picardo M, Schor SL, Grey AM, et al. Migration stimulating activity in serum of breast cancer patients. *Lancet* 1991;337:130–3.
19. Braun S, Kentenich C, Janni W, et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000;18: 80–6.
20. Slade MJ, Singh A, Smith BM, et al. Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years. *Int J Cancer* 2005;114:94–100.
21. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10: 5342–8.
22. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, et al. Clinical relevance of detection of isolated tumor cells in bone marrow in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21: 3469–78.
23. Naume B, Zhao X, Synnestvedt M, et al. Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer. *Mol Oncol* 2007;1:160–71.
24. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5194–202.
25. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;436:518–24.
26. Andre F, Cabioglu N, Assi H, et al. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol* 2006;17:945–51.
27. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, et al. Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 2008;19: 496–500.
28. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781–91.
29. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarnieri V, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer* 2007;7:471–9.
30. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005;103:884–91.

### 4.1.3 Discussion

Nos données, obtenues en utilisant une technique de détection conforme au dernier consensus interlaboratoire (Fehm T, Cancer 2006), confirment donc l'impact pronostique majeur des cellules tumorales disséminées sur la survenue d'une rechute métastatique ultérieure. Nous y démontrons par ailleurs l'utilité d'un examen morphologique des cellules marquées par l'anticorps A45-B/B3 (qui reconnaît les cytokératines 8, 18 et 19), examen qui permet de ne pas prendre en compte des cellules non tumorales et sans impact sur la rechute métastatique. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par l'étude de la cohorte norvégienne, de taille similaire (Wiedswang G, J Clin Oncol 2003). Finalement, la présence de cellules tumorales disséminées permet d'isoler de manière reproductible une population à fort risque de rechute métastatique, qui pourrait faire l'objet d'une majoration du traitement adjuvant.

Il est cependant intéressant de voir que la dormance biologique des cellules tumorales disséminées, potentiellement responsables d'une rechute métastatique plusieurs années après le traitement de la tumeur primitive, pourrait être un facteur de résistance aux traitements cytotoxiques cycle-dépendants, à savoir l'essentiel des traitements actuellement proposés (chimiothérapie et radiothérapie). L'hormonothérapie et les thérapies moléculaires ciblées semblent être des traitements prometteurs mais pour l'instant non évalués de manière randomisée chez ces patientes. Un seul essai interventionnel réalisé chez les patientes présentant des cellules tumorales disséminées (avec une autre technique de détection cytologique) a été réalisé, a conclu en faveur de l'administration de biphosphonate en situation adjuvante chez ces patientes mais n'a cependant pas été mis en application clinique (Diel IJ, NEJM 1998). Le consensus de l'*American Society of Clinical Oncology* de 2007 sur les facteurs biologiques utilisables dans le cancer du sein n'a donc pas validé l'utilisation de la détection des cellules tumorales disséminées en pratique courante (Harris L, J Clin Oncol 2007). Outre la variation des techniques successivement utilisées jusqu'à l'obtention récente d'un consensus interlaboratoire, les critiques concernaient essentiellement le fait que cette détection n'est pas obligatoirement synonyme de rechute métastatique, et que des patientes initialement négatives peuvent-elles aussi développer ultérieurement des métastases. Ces objections font très bien remarquer que le processus de dissémination médullaire des cellules tumorales ne correspond pas au schéma classique de la sélection clonale, à savoir que ces cellules, bien qu'ayant réussi l'ensemble du processus métastatique classiquement décrit, semblent ne pas se développer systématiquement, ni même immédiatement, en macrométastases.

Les cellules tumorales disséminées signent néanmoins l'existence indéniable d'une dissémination qui ne se réduit certainement pas à la seule moelle osseuse. La question de l'origine des métastases autres qu'osseuses ou intramédullaires reste ouverte, avec deux principales possibilités : croissance locale de cellules tumorales disséminées d'emblée dans les autres organes-cibles, ou re-ensemencement tumoral des organes-cibles à partir d'une moelle osseuse « réservoir ». Si cette question n'est pas résolue à l'heure actuelle, l'étude des rechutes loco-régionales chez les patientes présentant une dissémination cellulaire tumorale médullaire peut servir de modèle intéressant pour l'étude des mécanismes de dissémination à l'origine d'une rechute.

Les rechutes loco-régionales sont en effet influencées par différents facteurs, notamment la présence ou non d'une dissémination ganglionnaire. La tumeur primitive et l'aire ganglionnaire axillaire font généralement l'objet d'un traitement chirurgical complété par un traitement par ra-



diothérapie du lit tumoral initial, alors que les aires ganglionnaires sus-claviculaire et mammaire interne ne sont traitées par radiothérapie que dans certaines indications limitées. Les cellules tumorales médullaires disséminées étant un facteur indépendant de rechute loco-régionale dans notre étude initiale, nous avons réalisé une étude complémentaire évaluant l'intérêt des modalités du traitement loco-régional sur la survenue de ces rechutes chez les patientes présentant une dissémination médullaire. Biologiquement, l'absence d'influence des traitements locaux serait en faveur d'un re-ensemencement cellulaire à partir des cellules tumorales disséminées à distance (cellules tumorales disséminées médullaires ou provenant d'une co-dissémination dans un autre organe). Au contraire, l'influence d'une modalité du traitement loco-régional serait en faveur d'un re-ensemencement à partir de cellules tumorales disséminées localement, ces cellules loco-régionales étant « co-disséminées » avec les cellules tumorales disséminées médullaires (i.e. leur étant statistiquement associées).

## 4.2 Dissémination initiale médullaire et récurrence loco-régionale métachrone

### 4.2.1 ARTICLE : *Loco-regional relapses and adjuvant treatments of early breast cancers with bone marrow disseminated tumor cells*

## **Loco-regional relapses and adjuvant treatments of early breast cancers with bone marrow disseminated tumor cells**

Bidard FC<sup>1\*</sup>, Kirova Y<sup>2\*</sup>, Vincent-Salomon A<sup>3</sup>, Nos C<sup>4</sup>, de Rycke Y<sup>5</sup>, Sastre-Garau X<sup>3</sup>, Fourquet A<sup>2</sup>, Pierga JY<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Dpt of Medical Oncology, Institut Curie, Paris, France

<sup>2</sup> Dpt of Radiotherapy, Institut Curie, Paris, France

<sup>3</sup> Dpt of Pathology, Institut Curie, Paris, France

<sup>4</sup> Dpt of Surgery, Institut Curie, Paris, France

<sup>5</sup> Dpt of Statistics, Institut Curie, Paris, France

<sup>6</sup> University Paris Descartes, Paris, France

\* both authors contributed equally to this work.

**Research support:** This work was supported by the Institut Curie micrometastasis incitative research program funded by individual grants.

**Corresponding author:** Pr JY Pierga, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris. Tel: 01.44.32.46.72; Fax: 01.44.32.46.71 ; mail: jean-yves.pierga@curie.net

**Key words:** disseminated tumor cells, micrometastasis, radiotherapy, breast cancer, lymphatic dissemination, loco-regional relapse.

**Running head:** breast cancer disseminated tumor cells and loco-regional relapse

**Disclosure:** the authors have no conflict of interest to disclose

## **Abstract**

**Purpose:** To study in early breast cancer (BC) patients (pts) if bone marrow disseminated tumor cells (DTC) are associated with a specific loco-regional dissemination of cancer cells, according to adjuvant treatments.

**Patient and methods:** DTC were prospectively detected in stage I-III BC patients. Local (LR) and regional (RR) recurrences were respectively defined as recurrence in the breast (or chest wall) and in regional lymph nodes. Irradiation fields, DTC status, clinical and pathological variables were correlated with loco-regional relapse-free survival (LRRFS).

**Results:** DTC were detected in 94 of 621 patients (15%) and were not associated with the axillary lymph node status. After a median follow-up of 56 months, 17 LR and 1 RR have been observed (relapse rate =2.9%), of which 8 (44%) occurred in DTC positive patients. In the whole population, DTC detection was the only independent prognostic factor for LRRFS ( $p=0.0005$ ,  $OR=5.2[2.0-13.1]$ ). In subgroup analysis, interaction tests showed that adjuvant hormone therapy ( $p=0.03$ ) and irradiation of supra-clavicular (SCN) and internal mammary (IMN) nodes ( $p=0.03$ ) were associated with a longer LRRFS in DTC positive patients, whereas tumor emboli were associated with a shorter LRRPFS in DTC negative patients ( $p=0.04$ ).

**Conclusions:** DTC strongly influence LRRFS in early BC patients. Our data support the hypotheses of a different lymphatic spread of DTC positive BC and of a possible re-seeding of DTC to the breast. Survival analyses suggest that DTC positive patients take advantage of adjuvant hormone therapy but also of adjuvant SCN and IMN irradiation.

## Introduction

Adjuvant radiotherapy of breast cancer (BC) aims at reducing the rate of loco-regional relapses and has also a significant impact on overall survival. Irradiation fields concern the tissue areas in which tumor cells may have locally spread before the surgical removal of the primary tumor. These dissemination areas are (*le lit tumoral*), (*la paroi ou le sein résiduel*), axillary lymph nodes, sus-clavicular lymph nodes and internal mammary lymph nodes. Fields size, volume and irradiation doses used for adjuvant radiotherapy of BC are consensual, but every field is not treated in every patients. Giving more early and late toxicities, sus clavicular and internal mammary lymph node irradiations should be therefore restricted to patients who have a high risk of tumor dissemination within these fields.

Dissemination of BC cells occurs by at least two pathways: lymphatic and haematogeneous dissemination. Most of the time, the lymphatic dissemination occurs at first in a "sentinel" axillary lymph node which can be retrieved and removed surgically. After invading this first lymph node, BC cells can progress through other axillary lymph nodes (which can also be removed by surgery) and/or to sus-clavicular lymph nodes, following lymphatic vessels. Another lymphatic dissemination pathway starts from the primary tumor and goes to internal mammary lymph nodes, which are difficult to remove surgically. Haematogeneous dissemination can occur independently or after an initial lymphatic spread: cancer cells can then be detected in blood as circulating tumor cells, and in bone marrow (BM) as disseminated tumor cells (DTC) (also called micrometastases). In adjuvant BC patients circulating tumor cell detection has been associated with a worse survival. However, as BM DTC reflect a more advanced metastatic process, their detection could be a better evaluation of the risk of metastatic relapse; In all studies conducted with adequate detection method, BM DTC had an independent impact on metastasis-free and overall survival of early BC patients. In the prospective Institut Curie BC micrometastasis serial, BM DTC detection was also an independent prognostic factor for loco-regional relapse-free survival (LRRFS), a fact previously unreported.

Our study was realized to report the full determinants of loco-regional relapses and to generate some hypotheses about the adjuvant loco-regional treatment that shall be given to BM DTC positive patients.

## Patients and Methods

The accrual in the BC Micrometastasis Project was open at the Institut Curie (Paris, France) from November 1998 to September 2005. Patient characteristics were prospectively recorded in the Institut Curie medical files. The eligibility criteria for the study were female patients over the age of 18 with histologically proven adenocarcinoma of the breast, no previous malignancy other than treated *in situ* carcinoma of the cervix or non-melanoma skin cancer, no bilateral BC and no distant metastasis. The routine diagnostic work-up included mammography, mammary biopsy, chest X rays, abdominal ultrasound, bone scan, blood sampling and clinical examination. All samples were obtained with the patient's written informed consent, after approval by the regional ethics committee. Neoadjuvant chemotherapy was allowed. After surgery, adjuvant chemotherapy and/or hormone therapy was delivered when recommended by the local guidelines. *Radiotherapy... (indications d'irradiation des différents champs et qqes indications de doses).*

Bone marrow sampling (iliac crest or sternum aspirates), processing and mononuclear cell staining using the pancytokeratin monoclonal antibody A45-B/B3 (Micromet, Germany and Chromavision, USA) have been described previously. Bone marrow aspirates were classified by trained pathologist into three categories, adapted from the results of the European Working Group for standardization of tumor cell detection: absence of detected cytokeratin positive (CK+) cell, presence of CK+ cells with atypical cytology features and others CK+ cells. CK+ cells with atypical cytology features were the only cells to be classified as BM DTC. The result of bone marrow analysis remained unknown to both patients and clinicians

During follow up, mammography and clinical examination were carried out at 6- to 12- month intervals at the Institut Curie or by the patient's gynecologist. For this study, local recurrence (LR) was defined as recurrence of the breast or chest wall; Regional recurrence (RR) was defined as lymph node (axillary, sus clavicular or internal mammary lymph nodes) recurrence after loco-regional treatment. All recurrence had to be proven histologically. Metastasis-associated loco-regional tumor growths, i.e. loco-regional tumor growths occurring after or concurrently (less than 3 months interval) to distant metastases, were not included in our analysis.

Loco-regional relapse-free survival (LRRFS) time was measured from the date of surgery until the date of LR or RR (or last follow-up). Differences between categorical variables were analyzed by Chi-square tests or Fisher exact test. LRRFS curves were plotted according to the Kaplan-Meier method. Statistical significance between survival curves was assessed using the log-rank test. Stepwise multivariate analyses were performed by the Cox proportional hazards model. Besides usual tumor characteristics, HER2 status was not taken into account in our study, as it has been assessed retrospectively, in a small subgroup of our serial, and mostly at metastatic relapse.

## Results

Six hundred and twenty one patients with stage I-III BC were eligible for our study, with a mean follow up of 56 months. Patient characteristics and loco-regional treatments are detailed in Table 1. Besides surgery of the primary tumor and axillary lymph nodes (sentinel lymph node or axillary lymph nodes dissection), the treatment of disseminated cancer cells combined loco-regional (radiotherapy) and systemic (chemotherapy, hormone therapy) treatments. Surgical treatment consisted of radical mastectomy (27%) or breast-conserving lumpectomy (73%). Axillary lymph node dissection (68%) was performed with radical mastectomy and/or when lymph nodes were clinically involved and/or after a positive sentinel lymph node biopsy. More than 96% of patients received adjuvant radiotherapy, according to local guidelines ; radiotherapy fields are detailed Table 1. Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy (mostly anthracycline-based) has been administered to 19% and 48% of patients, respectively (bone marrow aspiration was performed at diagnosis before any chemotherapy). Sixty-five percents of patients received endocrine therapy: tamoxifen or aromatase inhibitors (after 2003) were used in hormonal receptor positive patients according to their menopausal status.

As previously reported, the BM DTC detection rate was 15.1%. There was no significant association between detection of DTC in the BM and detection of cancer cells in axillary lymph nodes ( $p=0.78$ ). Eighteen patients (2.9%) without any previous or concurrent distant metastases experienced loco-regional relapses (17 LR and 1 RR). Their characteristics are shown in Table 1. Of note, in the whole population, BM DTC detection was an independent prognostic factor for LRRFS in univariate and multivariate analysis

( $p<0.0001$ , RRisk=5.1, 95%CI[2.0-13.0]), as shown in Table 1 and Figure 1A. In BM DTC positive patients, LRRFS was longer when patients received adjuvant hormone therapy ( $p=0.03$ , RRisk=11.5, 95%CI[1.26-106]) and RT of supra-clavicular (SCN) and internal mammary (IMN) nodes ( $p=0.055$ , RRisk=4.8, 95%CI[0.97-24.4]), as retrieved by multivariate analysis (Table 2). On the contrary, in BM DTC negative patients, tumor lympho-vascular emboli was the only significant prognostic factor for LRRFS ( $p=0.048$ , RRisk=3.3, 95%CI[1.1-11.7]). Of note, the site of BM aspirates (sternum or iliac crest) did not influence these results.

## Discussion

In this prospective study, BM DTC detection in 94 of 621 early BC patients (15%) was the only significant prognostic factor independently associated with shorter LRRFS. Using a clinically relevant definition of loco-regional relapse, we confirm here our initial report who described BM DTC-associated systemic but also loco-regional relapses. To our knowledge, no other published series has reported a significant association between the presence of BC cells disseminated in the BM and BC loco-regional recurrences. As for overall survival, most discrepancies between published serials are due to BM DTC detection technical issues (reviewed in Salomon 2008). Technically, our study follows the current guidelines for BM DTC detection proposed by an interlaboratory working party. In the Oslo series, which is the other big series fulfilling these detection guidelines, BC were smaller ( $pT1$  rate: 61% vs 40% here), less breast conserving surgery were performed (31% vs 72% here) and less patients received adjuvant radiotherapy (47% vs 96% here). The Oslo series was therefore at lower risk of loco-regional relapse, a fact which may explain the lack of association between BM DTC detection and LRRFS.

The biological basis of loco-regional relapses in BM DTC positive patients is not completely understood. However, cancer cells which have escaped the primary tumor before its loco-regional treatment have been reported to recirculate within the body. This secondary seeding of DTC could be guided to the primary tumor area by chemo-attractants released during the post-surgery and post-radiotherapy loco-regional wound-healing processes. Bone marrow (and all the other tissues in which tumor cells disseminate) may therefore act as a tumor cell reservoir in which disseminated cancer cells escape the loco-regional treatment. In their new microenvironment, BM

DTC have been described to undergo a dormancy process, which provokes a relative chemo-resistance of these non-cycling tumor cells. Effective adjuvant systemic treatments should therefore include cycle-independent therapy such as hormone-therapy, as suggested by our results. Biphosphonate, which act on bone remodelling, might also be used as they have been reported to prevent metastatic relapse in BM DTC positive patients. Moreover, adjuvant biphosphonate treatment has been recently reported to be also an effective treatment to prevent loco-regional relapse in early BC patients. This result further supports the hypothesis of a re-seeding of DTC to the loco-regional area after adjuvant surgery and radiotherapy, and the use of adjuvant biphosphonate in BM DTC patients.

Besides adjuvant hormonal therapy, our study suggests that BM DTC positive BC patients could take advantage of larger irradiation fields, including IMN and SCN. Noteworthy, no significant association has been found between BM DTC detection and

axillary lymph node tumoral involvement in our series. Taken together, these observations are in favour of a possible alternate lymphatic dissemination in BC which gave raise to BM DTC. Although this fact was not reported in the Oslo series, several comparative studies did describe that the dissemination in BM and in axillary lymph nodes could be two opposite, or at least separate, processes. Seventeen of the 18 loco-regional relapses observed in our study were located in the breast or in the chest wall (LR), and only one concerned directly regional lymph nodes (RR). A possible explanation of the efficacy of extended radiotherapy in BM DTC positive patient on SCN and IMN is that such treatment could prevent local re-seeding from DTC located in BM and/or in these lymph nodes.

Finally, these results suggest that BM DTC should be investigated in future trials in order to confirm their loco-regional prognostic value and their sensitivity to adjuvant treatment such as hormone therapy and/or extended lymph node radiotherapy.

**Table 1: patient characteristics, DTC detection rates and loco-regional relapses**

HR status = Hormone receptors status (positive when estrogen and/or progesterone receptors were positive); RT = radiotherapy; CW = chest wall; SCN = supra clavicular nodes; IMN = internal mammary nodes. Univ = univariate; Multiv = stepwise multivariate analysis; Risk = relative risk. Ni = not included in multivariate analysis. “-“ = Included but not significant in stepwise multivariate analysis.

Characteristic	Number of patients (%)	DTC detection rate (%)	Loco-regional relapses (n)	LRRFS		
				Univ. analysis p value	Multiv. Analysis (n=602 pts) p value	RRisk 95%CI
<b>Age</b>						
< 45 yo	103 (17%)	17.5	6			2.4
≥ 45 yo	518 (83%)	14.7	12	<b>0.037</b>	0.08	[0.9-6.4]
<b>cT</b>						
1	321 (52%)	17.4	8			
2	172 (27%)	12.2	7			
3/4	124 (20%)	12.9	3	0.78	Ni	
<b>pN</b>						
0	295 (48%)	15.6	10			
1	324 (52%)	14.8	8	0.46	Ni	
<b>Histology</b>						
Ductal	514 (83%)	14.4	16			
Lobular	75 (12%)	16.0	2			
Other	32 (5%)	30.0	0	0.96	Ni	
<b>Tumor grade</b>						
1	203 (37%)	14.8	5			
2	235 (38%)	14.9	7			
3	163 (26%)	15.3	6	0.81	Ni	
<b>HR status</b>						
Positive	495 (80%)	14.3	13			
Negative	116 (18%)	17.3	5	0.32	Ni	
<b>Tumor emboli</b>						
No	412 (67%)	13.6	11			
Yes	189 (30%)	18.0	7	0.50	Ni	
<b>BM DTC</b>						
Negative	527 (85%)		10			5.0
Positive	94 (15%)		8	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0006</b>	[2.0-12.7]
<b>Surgery</b>						
Lumpectomy	449 (72%)	14.9	13			
Mastectomy	165 (27%)	15.1	5	0.98	Ni	
<b>RT (all modalities)</b>						
Yes	572 (92%)	14.8	15			
No	48 (8%)	18.7	3	0.11	-	-
<b>Breast / CW RT</b>						
Yes	568 (92%)	14.9	15			
No	42 (8%)	21.5	3	0.07	-	-
<b>Boost RT</b>						
Yes	277 (45%)	15.5	8			
No	332 (53%)	15.4	10	0.93	Ni	
<b>Axillary RT</b>						
Yes	116 (19%)	15.5	3			
No	496 (80%)	15.3	15	0.73	Ni	
<b>SCN and IMN RT</b>						
Yes	372 (60%)	15.3	10			
No	237 (38%)	15.6	8	0.48	Ni	
<b>Chemotherapy</b>						
Yes	346 (56%)	15.6	11			
No	275 (44%)	14.5	7	0.83	Ni	
<b>Hormone therapy</b>						
Yes	404 (65%)	14.8	8			0.41
No	210 (34%)	16.2	10	<b>0.037</b>	0.06	[0.2-1.04]
<b>TOTAL</b>	<b>621</b>	<b>15.1</b>				



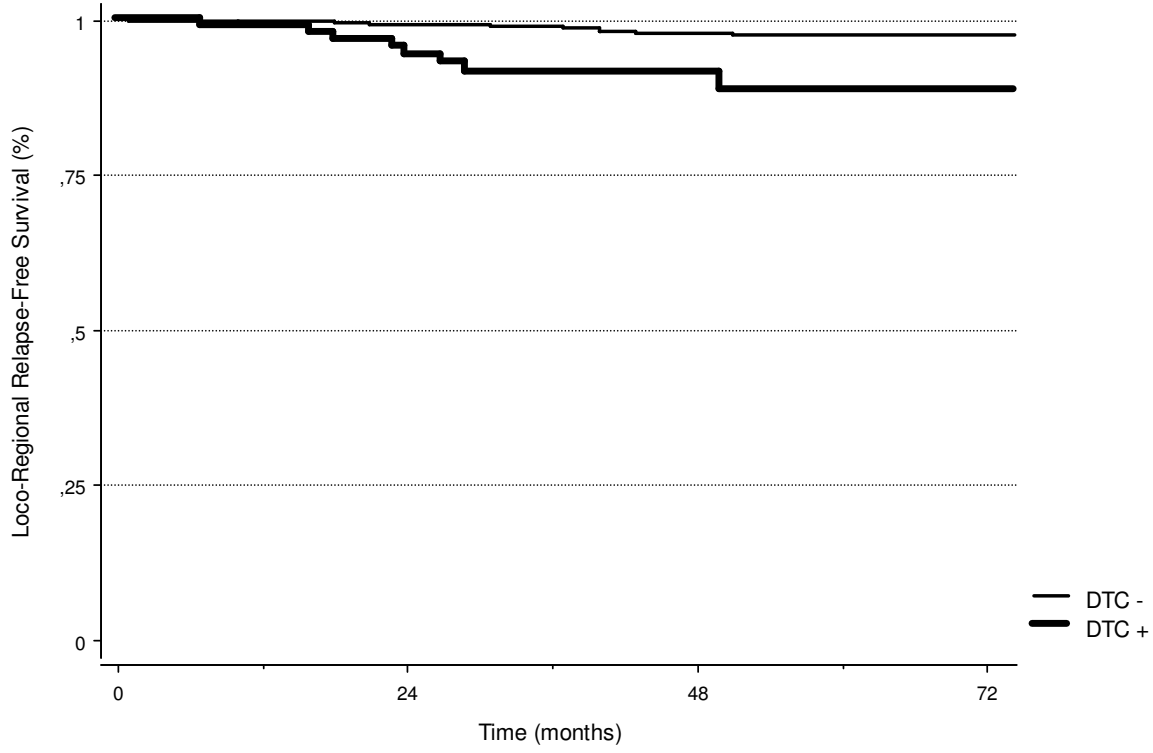
**Table 2: Prognostic factors of loco-regional relapse in DTC-positive and negative patients.**

HR status = Hormone receptors status (positive when estrogen and/or progesterone receptors were positive); RT = radiotherapy; CW = chest wall; SCN = supra clavicular nodes; IMN = internal mammary nodes. Univ = univariate; Multiv = multivariate; Risk = relative risk. Ni = not included in included in multivariate analysis.

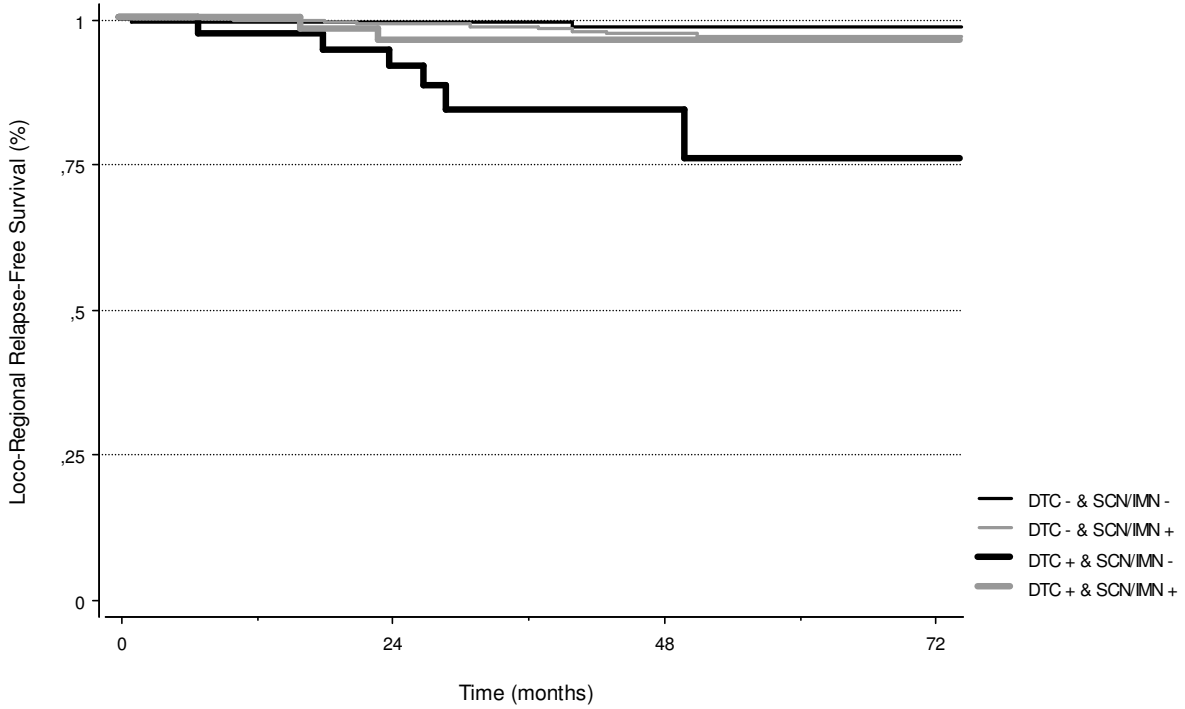
Characteristic			DTC +		DTC-		Interaction Test
	N of relapses / N patients (relapse rate %)	LRRFS			Number of locoregional relapses / n patients (%)	LRRFS	
		Univ. analysis	Multiv. analysis			Univ. analysis	
		p value	p value	RRisk 95%CI		p value	
<b>Age</b>							
< 45 yo	5/76 (7%)				3/85 (4%)		
≥ 45 yo	3/18 (17%)	0.15	Ni		7/442 (2%)	0.18	
<b>cT</b>							
1	5/56 (9%)				3/265 (1%)		
2	1/21 (5%)				6/151 (4%)		
3/4	2/16 (12%)	0.64	Ni		1/108 (1%)	0.18	
<b>pN</b>							
0	5/46 (11%)				5/249 (2%)		
1	3/48 (6%)	0.50	Ni		5/276 (2%)	0.79	
<b>Histology</b>							
Ductal	8/72 (11%)				8/442 (2%)		
Lobular	0/12 (0%)				2/63 (3%)		
Other	0/10 (0%)	0.81	Ni		0/22 (0%)	0.51	
<b>Tumor grade</b>							
1	3/30 (10%)				2/173 (1%)		
2	3/35 (9%)				4/200 (2%)		
3	2/25 (8%)	0.94	Ni		4/138 (3%)	0.55	
<b>HR status</b>							
Positive	4/72 (6%)			<b>1.3</b>	9/424 (2%)		
Negative	4/20 (20%)	<b>0.04</b>	<b>0.68</b>	<b>[0.31-6.03]</b>	1/96 (1%)	0.48	0.12
<b>Tumor emboli</b>							
No	7/56 (12%)				4/356 (1%)		
Yes	1/34 (3%)	0.16	Ni		6/155 (4%)	<b>0.048</b>	<b>0.04</b>
<b>Surgery</b>							
Lumpectomy	6/67 (9%)				7/382 (2%)		
Mastectomy	2/25 (8%)	0.85	Ni		3/140 (2%)	0.87	
<b>RT (all modalities)</b>							
Yes	6/85 (7%)				9/487 (2%)		
No	2/9 (22%)	0.14	Ni		1/39 (3%)	0.67	
<b>Breast / CW RT</b>							
Yes	6/85 (7%)				9/483 (2%)		
No	2/9 (22%)	0.14	Ni		1/33 (3%)	0.59	
<b>Boost RT</b>							
Yes	2/43 (5%)				6/234 (2%)		
No	6/51 (12%)	0.21	Ni		4/281 (1%)	0.34	
<b>Axillary RT</b>							
Yes	2/18 (11%)				1/98 (1%)		
No	6/76 (8%)	0.46	Ni		9/418 (2%)	0.40	
<b>SCN and IMN RT</b>							
Yes	2/57 (4%)			<b>4.8</b>	8/315 (3%)		
No	6/37 (16%)	<b>0.03</b>	<b>0.055</b>	<b>[0.97-24.4]</b>	2/200 (1%)	0.30	<b>0.03</b>
<b>Chemotherapy</b>							
Yes	4/54 (7%)				7/292 (2%)		
No	4/40 (10%)	0.67	Ni		3/235 (1%)	0.49	
<b>Hormone therapy</b>							
Yes	1/60 (2%)			<b>11.5</b>	7/344 (2%)		
No	7/34 (21%)	<b>0.0009</b>	<b>0.03</b>	<b>[1.26-106]</b>	3/176 (2%)	0.87	<b>0.03</b>
<b>TOTAL</b>	<b>8/94 (9%)</b>				<b>10/527 (2%)</b>		

**Figure 1: LRFS according to BM DTC status (1A) and SCN/IMN irradiation (1B)**

**Figure 1A**



**Figure 1B**



### 4.2.2 Discussion

Nous avons donc montré que l'augmentation des récurrences loco-régionales chez les patientes présentant une dissémination médullaire lors du diagnostic initial est probablement attribuable à une co-dissémination des cellules tumorales au sein d'aires ganglionnaires généralement peu fréquemment atteintes. Il est intéressant de penser que ces cellules médullaires pourraient être le reflet d'une dissémination mammaire interne et/ou sus-claviculaire d'emblée, et pourraient éventuellement guider les traitements loco-régionaux complémentaires. Il est important de remarquer que la dissémination tumorales dans ces aires ganglionnaire n'est pas un fait courant, ni même commun à toutes les cancers du sein.

Cette observation suggère que le processus de dissémination micrométastatique médullaire, tel que nous le détectons, n'est possiblement pas un phénomène généralement partagé par l'ensemble des cancers du sein qui seront à l'origine d'une rechute métastatique. Il est ainsi possible que cette dissémination soit le reflet d'une capacité de dissémination de clones ou sous-clones tumoraux particuliers. Il est intéressant de rappeler ici les observations rapportées par le laboratoire de C.A. Klein, qui a démontré dans de multiples types tumoraux l'existence d'une grande hétérogénéité génétique parmi les cellules tumorales disséminées (Klein CA, Lancet 2002), avant que celles-ci ne soient à l'origine de l'apparition de macrométastases (Hüsemann Y, Cancer Cell 2008). Cette diversité génétique des cellules tumorales disséminées n'est généralement pas retrouvée lors de la croissance finale macro-métastatique (Schmidt-Kittler O, PNAS 2004).

Dans ce contexte, si l'on adopte le point de vue proposé par la revue sur la coopération intercellulaire ci dessus (Bidard FC, Met Cancer Rev 2008), les cellules tumorales disséminées, dormantes et non prolifératives, pourraient correspondre à des cellules « conditionnantes », capables de modifier favorablement leur micro-environnement de manière à y favoriser la croissance ultérieure d'un autre sous-clone tumoral potentiellement plus prolifératif.

Sur la base des données publiées en faveur d'un conditionnement progressif des futurs sites métastatiques, nous avons cherché à étudier *in vivo* les interactions entre deux sous-clones tumoraux possédant des propriétés métastatiques différentes.

## 4.3 Conditionnement des sites métastatiques, coopération intercellulaire et colonisation

### 4.3.1 ARTICLE : *Specific colonization of metastases by non metastasizing circulating tumor cells*

## Specific colonization of metastases by non metastasizing circulating tumor cells

F-C Bidard<sup>1,2</sup>, N Auger<sup>1</sup>, C Rosty<sup>3</sup>, M Lae<sup>3</sup>, J P Di Santo<sup>4</sup>, M-F Poupon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inserm U612, <sup>2</sup> Department of Medical Oncology and <sup>3</sup> Department of Pathology, Institut Curie; <sup>4</sup> Inserm U688, Institut Pasteur, Paris, France.

Correspondence: Dr Marie-France Poupon, Inserm U612, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France. E-mail: [mfpoupon@curie.fr](mailto:mfpoupon@curie.fr)

Acknowledgements: we are indebted to Franck Assayag for technical assistance. This work has been funded by Inserm and Institut Curie.

We postulate that a favorable microenvironment leads to the colonization of the metastatic niche by circulating cancer cells. Two human colorectal cell lines were injected subcutaneously in alymphoid mice: HT29 tumors were metastatic in lungs whereas LoVo were not. In mice bearing a mixed HT29/LoVo tumor, LoVo cells were found in lung metastases. These non metastatic cells colocalized with HT29 and represented up to 80% of cells within metastases. This specific colonization of metastases (proved by colony-forming assays, immunohistochemistry and FISH analyses) was due to LoVo circulating cells and also occurred when LoVo tumors were implanted separately from HT29. LoVo cells cultured from lung metastases remained non metastatic by themselves, showing that metastatic switch is not a hallmark of all metastatic cells. The specific colonization of the metastatic niche may have significant consequences in that macrometastases may contain substantial amounts of non-metastatic tumor cells recruited into the site colonized by the metastatic cells by as yet unknown mechanisms.

Metastases involve different sequential steps (1) and are thought to arise from a rare tumoral sub-population after a metastatic switch enabling the cells to go through this selective process (2,3). In this model, the lack of any of the required characteristics prevents tumoral cells from developing into metastases (4). It has recently been shown that hematopoietic cells can initiate the premetastatic niche, pointing out the existence of a conditioning that occurs before the metastatic growth itself (5). It has also been shown that premetastatic lungs are conditioned by the recruitment of myeloid cells (induced by cancer cell-secreted chemokines) before cancer-cell invasion (6,7). According to studies focused on the attachment step, interactions between cancer cells and stromal cells modify the host-organ microenvironment in order to favor the establishment of metastases (8,9). In accordance with these data, we postulate that, after the establishment of an initial metastatic niche made of cancer cells and conditioned stromal cells, the subsequent metastatic growth could involve different non metastatic subpopulations originating from the primary tumor.

HT29 and LoVo cells had similar growth properties after subcutaneous injection in alymphoid RAG2/ $\gamma_c$  mice (10) but differed in their metastatic abilities. HT29 tumors formed macroscopic lung metastases at 45 days (n=10 mice), whereas LoVo tumors did not form any microscopic metastasis at day 60 (n=10) (Experiment #1 – See supplementary online material for details on these experiments). We used these two different cell lines originated from two patients instead of selecting high- and low- metastatic cell clones originated from the same parental tumor because of the tumoral genetic instability: a low metastatic subclone can switch because its cells share the same genetic background and genetic instability as those which have already switched.

We evaluated the metastatic potential of mixed HT29/LoVo tumors at day 45 (Experiment #2). Lung examination showed more and broader metastases among the HT29/LoVo-tumor-bearing mice (n=8), compared with HT29-tumor-bearing mice (n=5); this

finding was confirmed by histological analysis. After a 7-day culture of the dislocated lungs, median numbers of LoVo colonies were 2 and 10 in mice bearing only LoVo tumors or mixed HT29/LoVo tumors respectively. This result is in accordance with a brief morphological report which, in 1983, mentioned the simultaneous presence of metastatic and nonmetastatic subpopulations within metastases of a murine cancer (11). The finding of non metastatic LoVo cells within metastases was confirmed by hMLH1 staining which exhibited numerous LoVo cells in most of the lung metastases in 5 mice bearing a mixed tumor (Fig 1A).

As hMLH1 staining may not be conclusive by itself, and in order to pick the LoVo cells out of the colony-forming assay, we repeated similar experiments with G418-resistant LoVo cells (due to NPT2 expression) (12). Beta-galactosidase expressing HT29bl cells were also used (12). These two types of cells exhibited the same metastatic properties as their parental cell lines. With mice bearing a mixed HT29bl/LoVoG418 tumor, and by the use of G418 selection and beta galactosidase staining of metastatic lung-derived colonies (n= 11), we have been able to reproduce the same results as above (Experiment #3).

The presence of non metastatic cells in lung metastasis might be attributed to their migrating together with metastatic cells within mixed tumoral emboli coming from the primary tumor. An alternative explanation would be a specific recognition of the lung metastases by circulating non metastatic cells. In order to decide between these hypotheses, we injected the two kinds of cells separately, each in a flank of the mice, thus avoiding mixed tumoral emboli. This led to the growth of a LoVoG418 and a HT29bl tumor. At day 45, more metastases and more colonies were observed in mice bearing the two kinds of tumor than in mice bearing only HT29bl tumors (n=9 and 4, respectively) (Experiment #4). The analysis of the NPT2 immunostaining, conducted in a blind fashion by a pathologist, revealed LoVoG418 cells within lung metastases in 6 mice out of 9 (Fig 1 B-C-D) and no positive cells in control groups with HT29 tumor. Because NPT2 staining is not routinely used by pathologists, we



also relied on a non immunohistochemical technique to confirm these results (13) : as HT29 and LoVo cells are respectively male and female, we performed Y chromosome detection by interphase FISH analysis. This analysis, done independently and in a blind fashion by a cytogeneticist, detected the LoVoG418 cells in the same 6 mice than NPT2 immunohistostaining (Fig 1 E and F).

From a quantitative point of view, 80% of the total lung metastases showed the presence of LoVoG418 cells. Significantly, none of these metastases was exclusively made of LoVoG418 cells. The co-localization of both kinds of cancer cells is a major argument for sustaining the idea of an intercellular cooperation within a pro-metastatic environment. It suggests the existence of a specific recognition of metastatic sites by non metastatic circulating cancer cells. Within biclonal metastases, 20% to 80% of cancer cells were LoVoG418. To determine the timing of this colonization process, we set up a similar experiment with pulmonary analysis at day 30 instead of day 45. The ratio of mice exhibiting heterogeneous metastases remained unchanged (8 mice out of 12 - Experiment #5). A slight diminution of the ratio of LoVo cells was observed, most of mixed metastases exhibiting less than 10% of LoVo cells.

Today, the current paradigm considers macrometastases as being made of a monoclonal population of cancer cells which have undergone a metastatic switch. This model does not explain the presence of LoVo cells in lung metastases of HT29/Lovo tumors when the LoVo-bearing mice remain metastasis-free (experiments #2 to #5). To check that the LoVo cells found in lung metastases had not undergone a metastatic switch, we selected G418-resistant cells issued from metastatic lung culture, checked their karyotype to be LoVo-derived and reinjected them into new mice (n=4). Tumor growth rates and colony-forming assays were similar to those of parental LoVoG418 tumors (n=4). As no metastasis was found

histologically at day 60, it turned out that the LoVoG418 cells metastatic ability was not due to a stable metastatic genetic switch.

Put together, these experiments show that LoVoG418 cells do not acquire their metastatic ability within the mixed primary tumor or in heterogeneous clumps of cancer cells released from mixed primary tumors. Metastatic ability is acquired later, by means of an interaction between circulating LoVoG418 cells and the metastatic sites, and do not rely on a stable genetic switch. The final composition of metastases might be the result of a Darwinian-like competitive growth. We have shown here that human cancer cells, that are not metastatic by themselves, are able to proliferate specifically in metastatic sites when driven to do so by innate metastasizing cancer cells. The colonization process might explain the decrease in the genetic diversity of disseminated cancer cells -such as circulating cancer cells and micrometastases (14-16)- when macrometastases arise (17). It explains why a primary tumor and its metastases exhibit a similar genomic profile (18). This new step of the late metastatic development leads to a complexification of the metastatic process. A limit of the present study is the lack of description of the molecular events underlying metastasis colonization. This point once clarified, and in a long-term perspective, one can imagine that this process might ultimately be used as a Trojan horse for cellular therapy of metastases, using drug or gene delivery.

- (1) Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**: 563-572.
- (2) Hill RP, Chambers AF, Ling V, Harris JF. (1984). Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science* **224**: 998-1001.
- (3) Fidler IJ. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-458.
- (4) Fidler IJ, Kripke ML. (2003). Genomic analysis of primary tumors does not address the prevalence of metastatic cells in the population. *Nat Genet* **34**: 23.
- (5) Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**: 820-827.
- (6) Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* **8**: 1369-1375.
- (7) Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. (2006). Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* **66**: 11089-11093.
- (8) Khatib AM, Kontogianna M, Fallavollita L, Jamison B, Meterissian S, Brodt P. (1999). Rapid induction of cytokine and E-Selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res* **59**: 1356-1361.
- (9) Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y et al. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* **25**: 387-408.
- (10) Colucci F, Soudais C, Rosmaraki E, Vanes L, Tybulewicz VL, Di Santo JP. (1999). Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model: investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation. *J Immunol* **162**: 2761-2765.

- (11) Miller FR. (1983). Tumor subpopulation interactions in metastasis. *Invasion Metastasis* **3**: 234-242.
- (12) Pocard M, Chevillard S, Villaudy J, Poupon MF, Dutrillaux B, Remvikos Y. (1996). Different p53 mutations produce distinct effects on the ability of colon carcinoma cells to become blocked at the G1/S boundary after irradiation. *Oncogene* **12**: 875-882.
- (13) McCabe A, Dolled-Filhart M, Camp RL, Rimm DL. (2005). Automated quantitative analysis (AQUA) of in situ protein expression, antibody concentration, and prognosis. *J Natl Cancer Inst* **97**: 1808-1815.
- (14) Brail LH, Hill RP. (1995). Clonal heterogeneity in plasminogen activator activity produced by two murine tumor cell lines. *Clin Exp Metastasis* **13**: 439-452.
- (15) Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH et al. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumors cells in minimal residual cancer. *Lancet* **360**: 683-689.
- (16) Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D et al. (2002). Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* **8**: 2073-2084.
- (17) Klein CA. (2003) The systemic progression progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell - the unit of selection. *Adv Cancer Res* **89**: 35-67.
- (18) Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* **33**: 49-54.

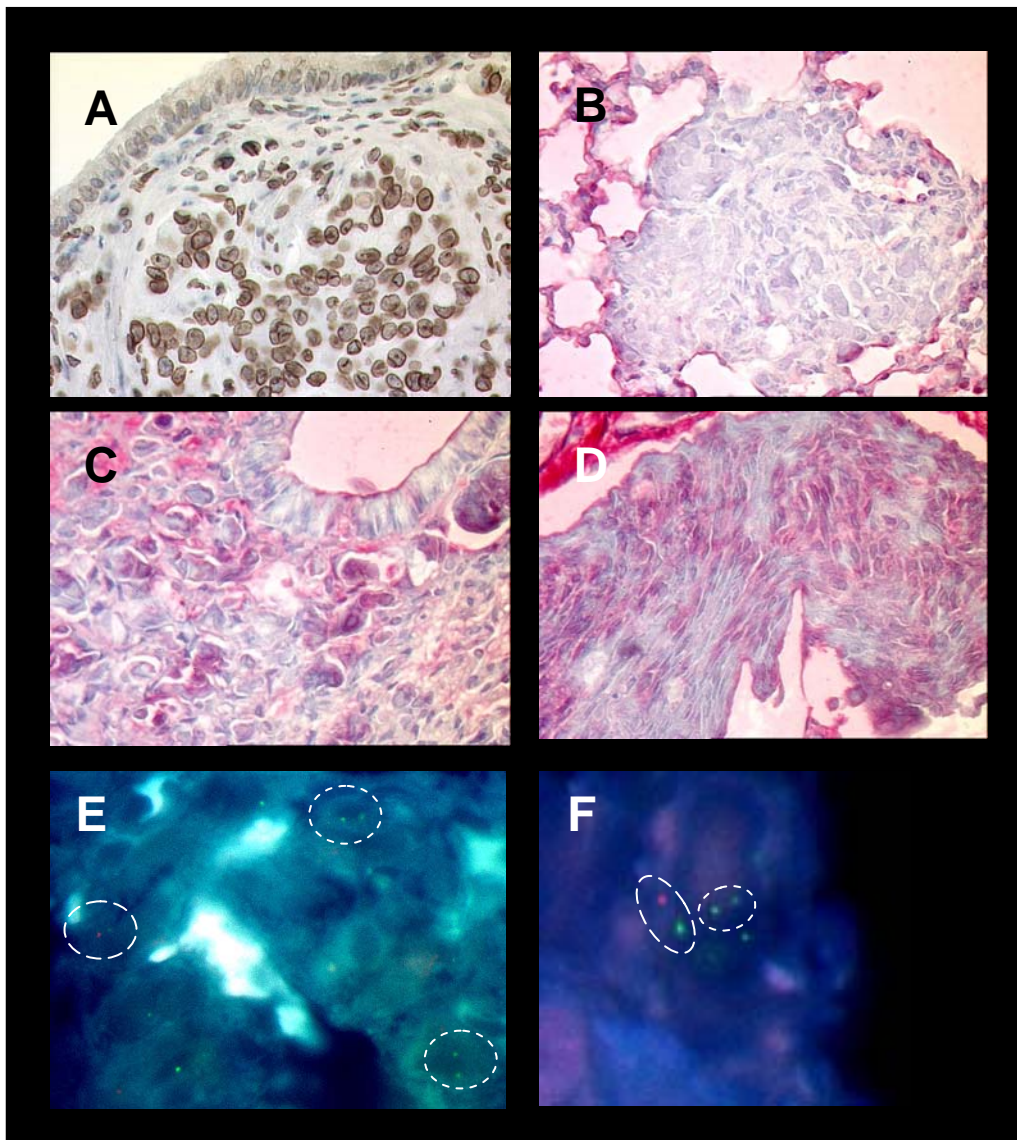


Figure 1

A : hMLH1 immunostaining (G168-15 clone, Pharmingen) of lung metastasis in a mouse with a subcutaneous heterogeneous LoVo/HT29 tumor. HT29 cells exhibit homogeneous nuclear staining, whereas LoVo cells exhibit a nuclear staining associated with a strong perinuclear staining. Here, about 70% of metastatic cells are LoVo cells.

B : NPT2 immunostaining (N2008-05 clone, USBiological) of lung metastasis in a mouse bearing a HT29 tumor (control).

C and D : NPT2 immunostaining of lung metastases in two mice bearing two distinct primary tumors. Here NPT2 positive LoVoG418 cells (in red) represent from 30% (C) to 60% (D) of metastatic cells. This staining has been blindly read by CR.

E and F : FISH analysis (X,Y centromeric probes, Qbiogen) of lung metastases in two mice bearing two distinct primary tumors. LoVoG418 cells exhibited both green (X) and red (Y) spots, HT29bl cells exhibited 2 green spots. Many single green spots were seen, corresponding to cells that have loosed the other X or Y chromosomes.

## Supplementary online material

Except otherwise specified,  $1.10^6$  cells were injected subcutaneously to each mouse.

**Experiment #1 :** Pulmonary baseline metastatic ability of subcutaneously injected cell lines.

Microscopic analysis was done after HES staining of paraffin-embedded slides. In preliminary experiments, LoVo cells were not metastatic in lung or liver at day 45 after subcutaneous, retro-orbitary or intra-splenic injections (data not shown) ; HT29 tumors reached the maximal ethically authorized size before day 60.

Injected cell lines	Mice	Day 45		Day 60	
		macroscopic analysis	microscopic analysis	macroscopic analysis	microscopic analysis
LoVo	n = 10			-	-
HT29	n= 10	+	+		

**Experiment #2 :** At day 45, hMLH1 staining of LoVo cells in lung metastases and colony forming assays. For mixed injections,  $5.10^5$  LoVo cells were mixed to an equal amount of HT29 cells before injection. Bacterial and fungal contaminations are responsible for the missing colony assays data (“ \* ”) -and occurred frequently when lungs exhibited a metastatic disease, unsurprisingly-. Mice were numbered retrospectively for an easier understanding.

Mice number	Injected cells lines	microscopic analysis	hMLH1 staining	Number of LoVo colonies	Number of HT29 colonies
1	mixed	+	+	16	53
2	mixed	+	+	7	48
3	mixed	+	+	*	*
4	mixed	+	+	*	*
5	mixed	+	+	*	*
6	mixed	+	-	10	29
7	mixed	+	-	*	*
8	mixed	+	-	*	*
9	HT29	+	-	0	45
10	HT29	+	-	0	32
11	HT29	+	-	0	26
12	HT29	+	-	*	*
13	HT29	+	-	*	*
14	LoVo	(day 60) -		5	0
15	LoVo	(day 60) -		4	0
16	LoVo	(day 60) -		2	0
17	LoVo	(day 60) -		0	0
18	LoVo	(day 60) -		0	0

**Experiment #3** : Baseline metastatic ability and colony forming assays of HT29bl and LoVoG418 cells lines, alone or mixed. Analysis was done at day 45 if not otherwise specified. Colony assay was not done (“ nd ”) in mice #11.

Mice number	Injected cell lines	Microscopic analysis	Number of LoVoG418 colonies	Number of HT29bl colonies
1	HT29bl	+	0	34
2	HT29bl	+	0	30
3	HT29bl	+	0	27
4	HT29bl	+	0	18
5	LoVoG418	(day 60) -	3	0
6	LoVoG418	(day 60) -	1	0
7	LoVoG418	(day 60) -	0	0
8	LoVoG418	(day 60) -	0	0
9	mixed	+	28	50
10	mixed	+	14	39
11	mixed	-	nd	nd

**Experiment #4** : At day 45, LoVoG418 detection by NPT2 staining and FISH in lungs of mice injected with  $1.10^6$  LoVoG418 and  $1.10^6$  HT29bl cells at distinct sites. Importantly, NPT2 staining and FISH were read separately by 2 independent investigators, both in a blind fashion. “ \* ” : contamination ; “ nd ” : not done.

Mice number	Injected cells lines	microscopic analysis	NPT2 staining	FISH	Number of LoVoG418 colonies	Number of HT29bl colonies
1	LoVoG418 and HT29bl	+	+	+	10	46
2	LoVoG418 and HT29bl	+	+	+	12	40
3	LoVoG418 and HT29bl	+	+	+	6	15
4	LoVoG418 and HT29bl	+	+	+	*	*
5	LoVoG418 and HT29bl	+	+	+	*	*
6	LoVoG418 and HT29bl	+	+	+	*	*
7	LoVoG418 and HT29bl	+	-	-	9	36
8	LoVoG418 and HT29bl	+	-	-	5	28
9	LoVoG418 and HT29bl	+	-	-	*	*
10	HT29bl	+	-	-	0	65
11	HT29bl	+	-	-	*	*
12	HT29bl	+	-	-	*	*
13	HT29bl	+	-	-	*	*
14	LovoG418	-			1	0
15	LovoG418	-			0	0
16	LovoG418	-			nd	nd
17	LovoG418	-			nd	nd
18	LovoG418	-			nd	nd

**Experiment #5** : At day 30, LoVoG418 detection by NPT2 staining in lungs of mice injected with  $1.10^6$  LoVoG418 and  $1.10^6$  HT29bl cells at distinct sites. One mouse bearing only the HT29bl tumor was not metastatic at day 30.

Injected cell lines	Number of mice	microscopic analysis	NPT2 staining
LoVoG418 and HT29bl	12	+ in 12 mice	+ in 9 mice
LoVoG418	1	- in 1 mice	
HT29bl	4	+ in 3 mice	- in 3 mice



Nous avons démontré avec 2 techniques différentes d'immunohistochimie et une technique de FISH, sur des expériences réalisées 2 fois, les données suivantes :

- Les cellules LoVo sont capables de circuler et/ou de former des micrométastases (non détectables par histologie) au niveau pulmonaire, lorsqu'elles sont injectées seules (présence de colonies LoVo lors de mise en culture des poumons de souris porteuses de tumeur LoVo seule)
- Lorsque les cellules LoVo et HT29 sont co-injectées pour former une tumeur mixte, les métastases pulmonaires sont fréquemment mixtes elles aussi.
- Lorsque les cellules LoVo et HT29 sont injectées à des endroits séparés, de manière à éviter les embols intravasculaires mixtes, les métastases pulmonaires sont encore fréquemment mixtes.
- Lorsque les cellules LoVo issues des métastases pulmonaires sont réinjectées seules, elles ne forment pas de métastase.
- Les métastases mixtes contiennent toujours des cellules HT29. Il n'a pas été observé de métastases formées uniquement de cellules LoVo.

Les cellules LoVo sont donc capables de proliférer au sein des sites métastatiques formés par d'autres cellules tumorales métastatiques. Les rôles des différents sous-clones au sein de chacune de ces deux lignées cellulaires n'ont pas été étudiés.

#### 4.3.2 Autres résultats

**Spécificité de la coopération : cellules B16** Une expérience similaire a été réalisée avec les cellules de mélanomes B16 de souris. Ces cellules, injectées en sous cutané, sont tumorigéniques mais non métastatiques dans la lignée de souris nude que nous utilisons. Ces cellules, remplaçant les cellules LoVo dans une expérience à double injection séparée (n=20 souris), n'ont pas donné colonisé de manière macrosocopique (sécrétion de mélanine visible à l'oeil) les métastases pulmonaires initiées par les cellules HT29. L'augmentation du nombre de métastases n'a pas non plus été retrouvée.

Cette expérience, qui présente d'évidentes limites expérimentales, serait en faveur d'une spécificité de classe tumorale dans les phénomènes de colonisation pulmonaire.

**Utilisation d'un gène suppresseur de métastases : cellules Nm23** Sur la base de la fonction du gène nm23, nous pensons utiliser un modèle « parfait » : 2 sous clones tumoraux d'une même tumeur mammaire humaine, l'une métastatique, l'autre non métastatique (par expression de nm23) et exprimant NPT2. Les clones cellulaires ont été obtenus directement du laboratoire de Patricia Steeg.

Nos expériences de contrôle n'ont cependant pas permis de retrouver de métastases après injection sous cutanée de la lignée « métastatique », que ce soit dans les souris nude (n=20) ou les souris alymphocytaire RAG2/gammaC (n=20), que ce soit à J30 ou J40 après injection. Cette différence de pouvoir métastatique entre les publications de quelques laboratoires et nos résultats seraient potentiellement attribuables au fond génétique des souris utilisées.

**Adressage des cellules tumorales non métastatiques** Une expérience de modification de l'adressage des cellules colonisantes a été réalisée. Il s'agissait de tester si, au lieu de métastases pulmonaires, les cellules LoVoG418 circulantes étaient capables de coloniser des métastases hépatiques. Ces métastases ont été obtenues par injection intra-splénique sous anesthésie des cellules HT29, les cellules LoVo ayant précédemment été injectées en sous cutané.

Sur 20 souris initialement incluses dans l'expérience (n=5 souris dans chacun des 2 groupes contrôle monotumoraux, n=10 souris dans le groupe expérimental portant les 2 types tumoraux), seule une souris a montré des signaux FISH compatibles avec une colonisation des métastases. L'immunohistochimie sur NPT2 n'a pas confirmé cette donnée ; il semble donc que la colonisation hépatique soit difficile à partir d'une tumeur implantée en sous-cutané, peut être du fait du rôle de filtre pulmonaire.

### 4.3.3 Discussion

Les expériences menées au laboratoire visaient à démontrer l'existence d'une coopération, au cours du processus métastatique, entre sous-clone métastatique et sous-clones non métastatique au sein d'une même tumeur.

**Choix du modèle expérimental *in vivo*** L'hétérogénéité du potentiel métastatique entre différents sous-clones issus d'une même tumeur est facilement démontrable à un temps donné : il s'agit par exemple de la base méthodologique des travaux expérimentaux initiaux de Fidler sur l'origine monoclonale des métastases. Cependant, l'instabilité génétique continue des cellules tumorales ne permet pas d'être certain que les cellules filles d'un sous-clone initialement non métastatique n'acquiescent pas ultérieurement un potentiel métastatique (phénomène d'autant plus probable que d'autres sous clones sont déjà métastatiques). De plus, le marquage différentiel de deux sous-clones cellulaires qui seraient originaires de la même tumeur nécessite une manipulation d'ordre génétique -par exemple, insertion d'un gène marqueur- susceptible de modifier le potentiel métastatique des sous clones marqués.

Nous avons donc utilisé deux lignées humaines en culture, issues d'un même type tumoral (cancer colorectal) afin se rapprocher expérimentalement de l'interaction entre deux sous clones tumoraux différents. Cliniquement, ce modèle correspond aux cancers synchrones colorectaux fréquemment retrouvés dans le cadre de certaines affections génétiques (polypose adénomateuse familiale, syndromes de Lynch). Le potentiel métastatique de ces cellules, injectées selon différentes voies, ont fait l'objet de contrôles préliminaires, afin de s'assurer de la persistance de la différence du potentiel métastatique entre cellules HT29 (métastatiques) et LoVo (non métastatiques). Le modèle murin choisi correspond à des souris alymphocytaires (déficience T, B et NK), chez lesquelles les cellules HT29 peuvent développer des métastases, au contraire des souris nude (déficience T et B). Le rôle des lymphocytes NK dans le rejet tumoral hétérologue n'est pas parfaitement défini, sans avoir fait l'objet d'étude complémentaire.

**Quel mécanisme moléculaire ?** Les résultats rapportés dans ce manuscrit n'abordent pas les mécanismes moléculaires sous jacents au processus de colonisation des métastases. Deux types d'approches seraient envisageables :

**l'approche gène-candidat** Le processus de colonisation des métastases peut faire intervenir une reconnaissance spécifique des sites métastatiques, comme nos résultats le suggèrent. Cette reconnaissance pourrait reposer, en première hypothèse, sur des molécules d'adhésion intercellulaires (E-Cadherine, E-Selectine...) et/ou sur des couples chemokines/récepteur des chemokines. Il pourrait aussi s'agir des molécules d'adhésion cellule-matrice (reconnaissant une matrice dégradée correspondant au microenvironnement « conditionné »). Les mécanismes de croissance ultérieure des cellules colonisantes font quand à eux potentiellement appel aux propriétés d'invasion cellulaire locale, mais aussi de prolifération (surtout si l'on imagine une compétition darwinienne entre les sous-clones tumoraux au sein de la métastase croissante). Aucun gène candidat ne nous a semblé justifier la réalisation d'une inhibition à long terme par inhibiteur exogène (injection d'anticorps) ou par biologie moléculaire (knock out ou surexpression d'un mutant tronqué -les stratégies d'interférence ARN ne conduisant pas à une inhibition prolongée tout au long de la croissance tumorale) dans les deux types cellulaires utilisés.

**l'approche globale** Il s'agit ici d'utiliser la technologie de type « puce » pour analyser de manière globale l'expression de plusieurs molécules à la fois. Il peut s'agir de puces pan-génomiques bien évidemment, mais aussi de membranes dédiées à l'analyse de certains gènes choisis pour leur fonctionnalité. L'analyse comparative des deux tumeurs primitives ne devrait pas livrer beaucoup d'information sur les mécanismes en jeu dans la colonisation des métastases. L'analyse du signal humain au sein des poumons de souris pourrait être plus intéressante. Quatre situations sont alors possibles pour les prélèvements : pas de cellule humaine, LoVo seul (pas de métastases visibles), HT29 seul (métastases purement HT29), HT29 et LoVo (métastases en majorité mixtes). Pour obtenir une information sur les mécanismes mis en jeu par les cellules LoVo et HT29 lors de la colonisation des métastases, il faudrait procéder à l'analyse du signal suivante, pour chaque gène étudié :

$$\text{signal « colonisation »} = (\text{signal mixte}) - A \times (\text{signal HT29 seul}) - B \times (\text{signal LoVo seul})$$

avec  $A + B = 1$  et  $A, B$  représentant les proportions de cellules tumorales respectivement HT29 et LoVo au sein des échantillons examinés.

La détermination de  $A$  et  $B$  nécessiterait l'utilisation de gènes marqueurs spécifiques, avec quantification des transcrits par RT-QPCR. Les sondes d'hybridation doivent être spécifiquement humaines et ne pas reconnaître les gènes homologues murins (ce qui demanderait une normalisation supplémentaire par rapport à la proportion de tissu murin analysé).

De fait, une expérience préliminaire, réalisée sur un seul échantillon et non présentée dans ce manuscrit, avait utilisé une membrane d'hybridation dédiée aux « molécules d'adhésion ». Dans notre modèle, la détermination de  $A$  est indirecte, en l'absence de marqueur spécifique des cellules HT29. On détermine donc  $A$  par soustraction entre le signal total humain (déterminé par un gène de ménage humain) et le signal des cellules LoVo pour ce même gène de ménage, ce dernier point étant quant à lui obtenu par étalonnage entre le signal du gène marqueur (NPT2) et celui du gène de ménage sur des cellules LoVo en culture... Compte tenu du nombre d'étapes nécessaires, il semble peu probable que les « résultats » obtenus soient corrects.

**Coopération intercellulaire ou colonisation métastatique ?** Nous rapportons pour la première fois que des cellules tumorales non métastatiques peuvent proliférer au sein de sites secondaires. Cette présence ne semble pas être un phénomène tardif (pas de variation significative de la proportion de métastases mixtes entre J20 et J30), même si les stades les plus précoces (micrométastases pulmonaires) n'ont pas été étudiés. Dans notre schéma d'interprétation initial présenté dans la revue sur la coopération intercellulaire, le conditionnement du terrain métastatique est réalisé par des cellules tumorales qui ne participent finalement pas à la croissance métastatique finale, assurée par d'autres sous-clones plus prolifératifs.

Dans notre modèle, les deux types de cellules tumorales utilisées possédaient des caractéristiques prolifératives similaires (temps de culture *in vitro*, temps de croissance tumorale *in vitro*) et le conditionnement et la croissance tumorale secondaire étant assurée ici par des cellules HT29. Au lieu d'une croissance exclusive de métastases LoVo, nous avons observé une colonisation par les cellules LoVo des métastases de cellules HT29. Si l'observation de ce colonisation des métastases par des cellules non métastatiques est un argument inédit en faveur de notre hypothèse de coopération intercellulaire, le modèle utilisé ne nous permet donc pas de démontrer formellement notre hypothèse de départ.

La mise en évidence d'une colonisation des métastases par les cellules non métastatiques a cependant une application directe sur la méthodologie des études sur la biologie des métastases. Les approches basées sur la comparaison des génomes/transcriptomes entre tumeur initiale et métastases peuvent être en effet sérieusement affectées par ce processus. Un argument (indirect) est d'ailleurs la pauvreté des résultats obtenus par ce type d'approche, alors qu'il s'agirait, dans le cas d'un switch génétique métastatique de type on/off d'une situation assez facilement analysable. Au contraire, la colonisation expliquerait la conservation « globale » des profils d'expression entre tumeur primitive et métastases rapporté auparavant (cf Introduction).

## 4.4 Influence de la dissémination médullaire à la rechute métastatique sur l'évolution des métastases

### 4.4.1 Rationnel de l'étude

Comme nous avons pu le rapporter, la dissémination micrométastatique médullaire en situation adjuvante signe un avancement des cellules tumorales dans le processus métastatique. D'après les données de coopération entre clones métastatiques et non métastatiques que nous avons rapportées, cette dissémination cellulaire tumorale peut être à l'origine d'un début de conditionnement des futurs sites métastatiques, ce qui correspond à nos résultats rapportant des taux plus élevés de rechute métastatique chez les patientes présentant des cellules tumorales disséminées lors du diagnostic de cancer du sein localisé.

Lors de la rechute métastatique elle-même, la présence de cellules tumorales disséminées n'avait pas été rapportée à l'exception d'une petite série portant sur une trentaine de patientes (Janni W, Cancer 2000). Utilisant une technique de détection similaire à la notre, la présence de cellules tumorales disséminées médullaires y avait été associée à une survie globale diminuée des patientes métastatiques. L'interprétation selon laquelle la micro-dissémination médullaire

pourrait influencer l'évolution de la maladie macro-métastatique demandait une confirmation sur une série plus importante de patientes présentant une rechute métastatique avérée de leur cancer du sein.

Par ailleurs, en appliquant la même méthode d'isolement des cellules tumorales à des prélèvements sanguins, nous avons testé la valeur pronostique de la détection des cellules tumorales circulantes dans un sous-groupe des patientes incluses dans l'étude.

**4.4.2 ARTICLE : *Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells***

# Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells

F.-C. Bidard<sup>1,2</sup>, A. Vincent-Salomon<sup>3</sup>, B. Sigal-Zafrani<sup>3</sup>, V. Diéras<sup>1</sup>, C. Mathiot<sup>4</sup>, L. Mignot<sup>1</sup>, J.-P. Thiery<sup>5</sup>, X. Sastre-Garau<sup>3</sup> & J.-Y. Pierga<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology; <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U612; <sup>3</sup>Department of Pathology; <sup>4</sup>Hematology Laboratory; <sup>5</sup>Department of Translational Research, Institut Curie, Paris; <sup>6</sup>University René Descartes, Paris 5, France

Received 16 July 2007; revised 29 September 2007; accepted 1 October 2007

**Background:** At metastatic relapse, detection of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood is predictive of poor survival of breast cancer patients. Detection of disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow (BM) is an independent prognostic factor in early breast cancer. We evaluated the prognostic value of DTC detection in the BM of metastatic breast cancer patients.

**Materials and methods:** BM aspirates from 138 patients were screened for DTC with the pancytokeratin mAb A45-B/B3, according to the ISHAGE classification. One hundred and ten patients (80%) were enrolled before first-line treatment. Thirty-seven patients were simultaneously screened for CTC in the blood.

**Results:** DTC detection rate in the BM was 59%. DTC were associated with bone metastasis ( $P = 0.0001$ ), but not with a poorer overall survival. Adverse significant prognostic factors were hormone receptor negativity ( $P = 0.0004$ ) and more than one line of chemotherapy ( $P = 0.002$ ). CTC detection in the subgroup of 37 metastatic patients was associated with shorter survival ( $P = 0.01$ ).

**Conclusions:** Detection of CTC but not BM DTC had a prognostic significance in stage IV breast cancer patients. CTC in blood are a more reliable and a less invasive tool to evaluate prognostic and monitor tumor response in this metastatic setting.

**Key words:** bone marrow, breast cancer, circulating tumor cells, metastasis, micrometastasis

## introduction

Hematogenous metastasis is a complex biological process involving many sequential steps (extravasation, circulation in the blood, specific recognition of a favorable 'soil', extravasation and finally growth within the host organ) and its genetic mechanism remains unclear [1, 2]. The tumor metastatic potential could be monitored by the detection of cytokeratin-expressing (CK+) cancer cells in blood [as circulating tumor cells (CTC)] or in bone marrow (BM) [as disseminated tumor cells (DTC)]. A pooled analysis showed that BM CK+ cells are detected in 31% of stage I–III breast cancer patients and have an independent clinical impact on overall survival (OS) [3], although some rare CK+ BM cells are nonmalignant cells (plasma cells) [4]. On the basis of morphological screening of CK+ cells, we recently reported a 15% BM DTC detection rate in the Institut Curie series of 621 early breast cancer patients [5]. In this study in the adjuvant

setting, BM DTC had an independent impact on OS, distant metastasis-free survival and local relapse-free survival. In women with metastatic breast cancer, data on the prognostic value of BM DTC are rare [6], whereas blood CTC have been associated with a poorer OS in 177 patients [7, 8]. On treatment of metastatic breast cancer, changes in CTC number have also been associated with treatment response [9, 10]. In this study, we examined the clinical outcome of women with metastatic breast cancer according to their BM DTC and blood CTC status.

## materials and methods

From November 1998 to September 2005, 837 women with breast cancer were included in the Breast Cancer Micrometastasis Project in the Institut Curie (Paris, France) [11–13]; 138 of these women had documented metastatic dissemination. Patient characteristics were recorded prospectively on Institut Curie medical files. All samples were obtained with the patient's written informed consent after approval by the regional ethics committee.

BM and blood sampling, processing and mononuclear cell (MNC) staining have been described previously [11]. Briefly, BM aspirates was

\*Correspondence to: Dr J.-Y. Pierga, Département d'Oncologie Médicale, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France. Tel: +33-1-44-32-46-71; Fax: +33-1-44-32-46-71; E-mail: jean-yves.pierga@curie.net

carried out from sternum or from both anterior iliac crests, under local or general anesthesia, respectively. Blood samples (7–14 ml) were obtained by venipuncture after discarding the first 5 ml of blood to avoid contamination by epidermal CK+ cells. After separation by density centrifugation, MNC was collected and cytopspins were prepared ( $1 \times 10^6$  MNC per slide). Three slides were incubated with the primary pancytokeratin mAb A45-B/B3 (Micromet, Munich, Germany and Chromavision, San Juan Capistrano, CA), which recognizes several cytokeratin epitopes CK 8, CK 18 and CK 19. Negative controls, stained with anti-fluorescein isothiocyanate immunoglobulin G1 mouse antibody (Sigma Immuno Chemicals, Saint Quentin Fallavier, France), were carried out on an equivalent number of cells (i.e. three slides,  $3 \times 10^6$  MNC) for each patient. Immune complexes formed by secondary anti-mouse antibodies were revealed by the alkaline phosphatase/antialkaline phosphatase reaction, and the slides were counterstained with hematoxylin to study nuclear morphology.

For BM samples, all slides and controls were read manually by trained pathologists for CK+ cells and further classified into three groups: absence of cytokeratin-positive cells (BM-), presence of CK+ cells with atypical cytologic features (ITC) and other CK+ cells (OCK+). Only ITC were considered to be BM DTC. Atypical cytology was defined as large cell size (larger than surrounding hematopoietic cells), a high nuclear/cytoplasmic ratio for isolated cells or the presence of clusters of large cohesive cells.

These criteria for evaluation of CK+ cells were on the basis of the results of cooperative groups [14, 15]. Control slides were systematically read and were taken into account to classify positive cases. In doubtful cases, positive and control slides were blind reviewed by another pathologist and a consensus was established. For blood samples, as the CK+ cell detection rate was much lower, all stained cells were considered to be CTC.

Differences between treatment groups were analyzed by chi-square tests for categorical variables. Survival time and disease-free survival time were measured from the date of BM aspiration until the date of death or last follow-up. Survival curves were determined using a Kaplan–Meier product-limit method [16]. Statistical significance between survival curves was assessed using the log-rank test. Multivariate analysis was carried out to assess the relative influence of prognostic factors on OS, using the Cox proportional hazards model in a forward stepwise procedure [17]. Statistical analyses were carried out by Statview software (SAS Institute, Inc., Cary, NC). For all analyses, a *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

## results

The median age of the patients at the time of BM aspiration was 53 years (range: 30–78 years) and 75% were postmenopausal. Primary tumor was a ductal or lobular invasive carcinoma in

**Table 1.** BM DTC and blood CTC detection according to patient characteristics

	DTC detection			CTC detection		
	Number of patients	DTC+ <i>n</i> (rate %)	<i>P</i> value	Number of patients	CTC+ <i>n</i> (rate %)	<i>P</i> value
Age						
≤50	51	28 (54)	NS	17	4 (24)	NS
>50	87	53 (61)		20	11 (55)	
Histology			0.049			NS
Ductal	106	60 (57)		32	11 (34)	
Lobular	21	17 (81)		5	4 (80)	
Other	11	5 (45)		0	–	
Hormone receptors			NS			NS
Negative	40	25 (62)		10	3 (30)	
Positive	94	55 (59)		27	12 (44)	
Unknown	4	1 (25)		0	–	
Number of metastatic sites			NS			NS
1	46	24 (52)		11	2 (18)	
>1	92	57 (62)		26	13 (50)	
Liver metastasis			NS			NS
No	76	40 (53)		18	9 (50)	
Yes	62	41 (66)		19	6 (32)	
Bone metastasis			<0.0001			NS
No	64	24 (37)		14	4 (29)	
Yes	74	57 (77)		23	11 (48)	
Chemotherapy			NS			NS
First line	110	64 (58)		30	10 (33)	
More than first line	28	17 (60)		7	5 (71)	
BM DTC			–			NS
Negative	–	–		13	3 (23)	
Positive	–	–		24	12 (50)	
Blood CTC			NS			–
Negative	22	12 (54)		–	–	
Positive	15	12 (80)		–	–	
Total	138	81 (59)		37	15 (41)	

BM, bone marrow; DTC, disseminated tumor cells; CTC, circulating tumor cells; NS, not statistically significant.

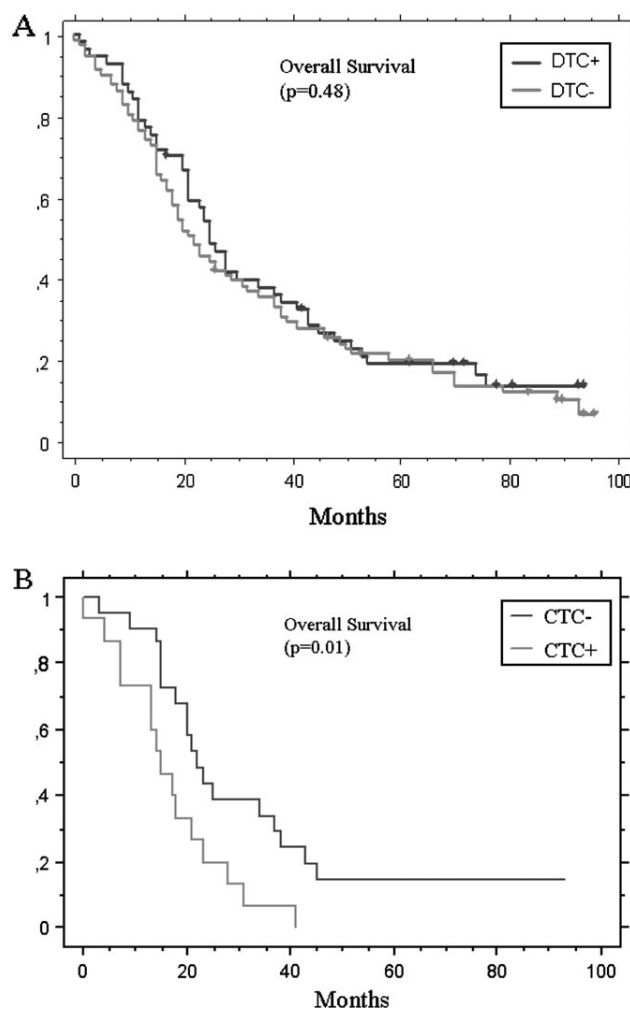
77% and 15% of patients, respectively. Hormone (estrogen and/or progesterone) receptors were positive in 67% of cases. HER2 receptor was screened in 48 out of 138 patients and was overexpressed in 8 (16%) cases. One hundred and ten patients (80%) were screened for disseminated cancer cells before first-line treatment. Forty-six patients (33%) had only one metastatic site. Metastatic sites at the time of BM aspiration were as follows: bone (54%), liver (45%), lungs (30%), lymph nodes (25%), skin (19%), pleural cavity (11%), peritoneal cavity (3%), contralateral breast (3%) and other sites (10%). Only a few patients (<5%) had cytologically-proven (myelogram) BM involvement. One hundred and twenty patients (87%) were followed until their cancer-related death, 4 (3%) were lost during follow-up and 14 (10%) were alive at the time of analysis. OS was measured from the date of BM DTC screening until the date of death or last follow-up and mean OS was 24 months (range: 2–94 months).

Patient characteristics and BM DTC detection rates are shown in Table 1. BM DTC were detected in 81 of the 138 patients (59%). Median number of ITC was 9 (range: 1–3000). The frequency of DTC was significantly higher in lobular carcinomas ( $N = 21$ ) compared with ductal carcinomas ( $N = 106$ ) (81% versus 57%,  $P = 0.049$ , Fisher's exact test). DTC were significantly associated with bone metastasis ( $P < 0.0001$ ). Presence or absence of BM DTC did not correlate with the other parameters on univariate analysis and were not associated with a change in OS (Figure 1A). With a cut-off of 10 ITC per BM sample, BM DTC positivity was associated with a poorer OS ( $P = 0.04$ ). OCK+ and BM- patients had a similar survival (data not shown). Other adverse prognostic factors for OS were hormone receptor negativity ( $P = 0.0004$ ) and more than one line of chemotherapy ( $P = 0.002$ ). Liver involvement was not a statistically significant prognostic factor ( $P = 0.12$ ). All factors which were significant on univariate analysis were analyzed at multivariate analysis on 126 patients. Hormone receptor status [relative risk (RR) = 2.4,  $P = 0.0001$ ] and number of lines of treatment (RR = 2.3,  $P = 0.001$ ) were statistically significant. A nonsignificant trend was observed for DTC positivity with a cut-off of >10 cells (RR = 1.4,  $P = 0.06$ ).

CTC were screened in a subgroup of 37 patients and were detected in 15 patients (41%). CTC were not associated with the other parameters (including BM MM,  $P = 0.2$ ) (Table 1), but were a significant prognostic factor for OS (Figure 1B,  $P = 0.01$ ) at univariate analysis (Table 2). CTC were not included in the multivariate analysis due to the small number of patients.

## discussion

The BM DTC detection rate is markedly increased in the metastatic setting (59%) compared with the 15% detection rate in early breast cancer [5, 18]. No significant difference in BM DTC detection rate was observed between patients in first-line (58%,  $n = 110$  patients) and second (or more) lines of treatment (61%,  $n = 28$  patients). For CTC detection, the standard Ficoll technique used in this study was responsible for a lower blood CTC detection rate compared with an epithelial-cell adhesion molecule (Ep-CAM) enrichment method described previously (40% versus 61%) [7, 8, 19]. This lack of



**Figure 1.** (A) Overall survival according to BM disseminated tumor cells (DTC) status in 138 patients. (B) Overall survival according to circulating tumor cells (CTC) status in 37 patients.

sensitivity may be counterbalanced by a higher specificity, i.e. detection of patients with high CTC count, and could explain why CTC detection represented a significant prognostic factor in our study on a subgroup of 37 patients. Due to the small number of patients with parallel BM and blood sampling, this observation should be reinforced by further studies.

Janni et al. [6] previously reported that an increased number of DTC identified in the BM represents an independent prognostic factor in a short series of 33 metastatic breast cancer patients. In our study, including a much larger number of patients, BM DTC detection was of less clinical significance. We explored the prognostic value of this parameter according to the two methods of analysis: presence or absence or by defining a cut-off value for the number of tumor cells. Neither of these analyses was statistically significant for predicting OS in these 138 patients. Several biological studies assessing the persistence of BM DTC after adjuvant treatments have indicated a possible resistance of these cells to chemotherapy [20–22]. BM DTC detection has been shown to be predictive for bone metastases in the early breast cancer setting [18, 23]. In the present study, we showed that the strong correlation between BM DTC and



**Table 2.** Prognostic factors for overall survival

Adverse factors	Patients at risk/patients assessed	Univariate analysis	Multivariate analysis	
		P	RR (95% CI)	P
Negative hormone receptor status	40/134	0.0004	2.41 (1.54–3.76)	0.0001
More than one line of chemotherapy	28/138	0.002	2.30 (1.40–3.77)	0.001
Liver metastasis	62/138	0.12 (NS)		
More than one site of metastases	92/138	0.14 (NS)		
One or more blood CTC	15/37	0.01	a	
One or more bone marrow DTC cells	81/138	0.48 (NS)		
10 or more bone marrow DTC cells	41/130	0.04	1.45 (0.97–2.15)	0.06 (NS)

All factors which were significant on univariate analysis were analyzed on multivariate analysis, except for “a” blood CTC, due to the small number of patients.

CI, confidence interval; NS, not statistically significant; CTC, circulating tumor cells; DTC, disseminated tumor cells.

bone metastasis was maintained after metastatic growth. We observed a higher frequency of DTC in patients with lobular carcinoma compared with ductal carcinoma. These observations indicate that the homing of cancer cells to bone and BM may depend on similar molecular determinants [24, 25]. This is in accordance with the more extensive metastatic spread of lobular carcinoma previously reported by our group [26]. In contrast, CTC were not associated with a specific metastatic pattern.

Finally, DTC, detected in the BM (DTC) or in the blood (CTC), can be assessed at both the early and metastatic stages of breast cancer. In our experience and as reported by other teams, BM DTC detection at an early stage appears to be more closely correlated with breast cancer prognosis than CTC [11, 27, 28]. Clinical studies are currently ongoing to define the value of CTC in the adjuvant setting using more sensitive and specific techniques [29]. This study, in the metastatic setting, using a different (and less sensitive) technique, indicates that CTC in the blood could be a more reliable and much less invasive tool than BM DTC to evaluate prognosis and to monitor tumor response in stage IV breast cancer.

## funding

Institut Curie micrometastasis incitative research program.

## acknowledgements

The authors would like to thank M. Caly and F. Viard for technical assistance.

## references

- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 563–572.
- Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 448–456.
- Braun S, Vogl FD, Naume B et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 793–802.
- Borgen E, Beiske K, Trachsel S et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 1998; 185: 427–434.
- Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S et al. Bone marrow micrometastasis are a powerful prognostic factor in stage I to III breast cancer patients. Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting: 14-18 April 2007; Los Angeles, CA. Philadelphia, PA: AACR; 2007. Abstract no. 5460.
- Janni W, Gastroph S, Hepp F et al. Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2252–2259.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781–791.
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1420–1430.
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4218–4224.
- Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells versus imaging—predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6403–6409.
- Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1392–1400.
- Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H et al. Clinical significance of proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 539–545.
- Vincent-Salomon A, Pierga JY, Couturier J et al. HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases: a possible tool for anti-HER2 therapy management? *Br J Cancer* 2007; 96: 654–659.
- Borgen E, Naume B, Nesland JM et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. The European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection. *Cytotherapy* 1999; 1: 377–388.
- Fehm T, Braun S, Muller V et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 2006; 107: 885–892.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457–481.
- Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc Ser B* 1972; 34: 187–220.
- Wiedswang G, Borgen E, Karesen R et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3469–3478.

19. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 920–928.
20. Braun S, Kutenich C, Janni W et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 80–86.
21. Janni W, Hepp F, Rjosk D et al. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer* 2001; 92: 46–53.
22. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5342–5348.
23. Braun S, Pantel K, Muller P et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 525–533.
24. Kang Y, He W, Tulley S et al. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13909–13914.
25. Smid M, Wang Y, Klijn JG et al. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2261–2267.
26. Ferlicot S, Vincent-Salomon A, Medioni J et al. Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 2004; 40: 336–341.
27. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 2013–2019.
28. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3678–3685.
29. Pantel K, Alix-Panabieres C. The clinical significance of circulating tumor cells. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 62–63.

### 4.4.3 Discussion

Nos résultats montrent donc tout d'abord l'absence d'influence pronostique des cellules tumorales disséminées en situation métastatique, au contraire de ce qui avait été rapporté dans la série publiée par Janni (Janni W, Cancer 2000). Nous pouvons donc en conclure que, dès lors qu'il existe une maladie macrométastatique, la mesure de l'avancement de la maladie métastatique par la recherche de cellules tumorales disséminées n'a pas d'intérêt clinique.

De manière inattendue, et malgré l'utilisation d'une technique probablement très peu sensible, nous retrouvons une incidence élevée de cellules tumorales circulantes (40 pour cent), ainsi qu'une influence pronostique forte de ces cellules sur la survie des patientes. Ces résultats sont très proches de ceux obtenus avec le lecteur semi-automatisé CellSearch (Veridex, USA), qui rapporte une incidence moyenne de 50 pour cent et une influence pronostique justifiant son intégration actuelle dans le management quotidien des cancers du sein au Etats-Unis (Cristofanilli M, NEJM 2004). La différence rapportée en incidence et en nombre total de cellules tumorales circulantes (par le système CellSearch) entre cancer du sein métastatique (Cristofanilli M, NEJM 2004) et cancer du sein localisé en situation néoadjuvante (Pierga JY, Clin Cancer Res 2008) est un argument fort pour affirmer que les cellules tumorales circulantes sont probablement un reflet du volume tumoral total, expliquant leur rôle pronostique en situation métastatique.

Enfin, l'intérêt de cette cohorte est que le processus métastatique a été « franchi » avec succès chez l'ensemble des patientes par les cellules tumorales. Quarante pour cent d'entre elles ne présentent cependant pas de cellule tumorale disséminée médullaire, ce qui pose la question de la sensibilité (au sens large) de la technique de détection. S'agit il d'un manque de sensibilité « technique » pur, ou peut-on faire l'hypothèse de l'existence de deux voies de processus métastatique ? A côté d'un processus de dissémination relativement codifié, associé à la formation de cellules tumorales disséminées médullaires, il pourrait peut-être exister un autre processus n'« utilisant » pas (ou peu) l'étape que nous détectons, c'est à dire la formation de cellules cytokeratine-positives généralement engagées dans un processus de dormance cellulaire induite par le micro-environnement. Sur l'hypothèse d'une différence dans la latence de la croissance métastatique entre processus « dormant » et processus « non-dormant », l'article suivant compare ainsi le temps jusqu'à la rechute métastatique entre les deux groupes de patientes. (Article soumis).

## 4.5 Dissémination médullaire à la rechute métastatique, dormance et latence métastatique

### 4.5.1 ARTICLE : *Time to metastatic relapse and breast cancer cells dissemination in bone marrow at metastatic relapse*

## **Time to metastatic relapse and breast cancer cells dissemination in bone marrow at metastatic relapse**

François-Clément Bidard <sup>1</sup>, Anne Vincent-Salomon <sup>2</sup>, Brigitte Sigal-Zafrani <sup>2</sup>, Manuel Rodrigues <sup>1</sup>, Véronique Diéras <sup>1</sup>, Laurent Mignot <sup>1</sup>, Xavier Sastre-Garau <sup>2</sup>, Marie-France Poupon <sup>3</sup>, and Jean-Yves Pierga <sup>1,4</sup>

(1) Department of Medical Oncology, Institut Curie, Paris, France

(2) Department of Pathology, Institut Curie, Paris, France

(3) Department of Translational Research, Institut Curie, Paris, France

(4) University Paris Descartes, Paris, France

**Correspondence to:** FC Bidard, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.  
[francois.bidard@curie.net](mailto:francois.bidard@curie.net) , Tel: +33-144-32-40-00.

### **Running head:**

Time to metastatic relapse and breast cancer cell dissemination

### **Abbreviations:**

BM: bone marrow; DTC: disseminated tumor cells; MNC: mononucleated cells; ER: estrogen receptor.

### **Key words:**

Disseminated tumor cells; bone marrow; micrometastasis; metastasis; breast cancer.

This work has been presented in part at the 2008 AACR meeting (San Diego, USA)

## **Abstract**

Breast cancer dissemination can be monitored in patients by detecting circulating and/or disseminated tumor cells. However, bone marrow disseminated tumor cells (BM DTC) may undergo a dormancy during several years before growing (or not) into clinically detectable metastases. We therefore hypothesized that breast cancers which have formed BM DTC in the course of their metastatic growth might exhibit a longer interval before metastatic relapse. We examined the association of DTC detection (cytokeratin 8, 18 or 19 positive epithelial cells with cancerous morphological features), at metastatic relapse, with the metastasis-free interval in breast cancer patients. In the 110 metastatic patients studied, 42% (n=64/110) were classified as BM DTC-negative. These patients had a significantly shorter metastasis-free interval than BM DTC-positive patients ( $p=0.02$ ). In multivariate logistic regression analysis, the metastasis-free interval was an independent predictor of DTC detection ( $p=0.02$ ), together with bone metastasis ( $p=0.0003$ ) and low tumor grade (grade I or II,  $p=0.05$ ). We finally suggest that a faster metastatic process might skip in some patients the BM DTC-associated dormancy step. Dissemination of DTC in other host organ and/or epithelial-mesenchymal transition from cytokeratin-positive to cytokeratin-negative DTC may explain this observation.

## **Introduction**

Hematogenous metastasis is a complex biological process involving many sequential steps (extravasation, circulation in the blood, specific recognition of a favorable “soil”, extravasation and finally growth within the host organ) and its mechanisms remain unclear [1-3]. The dissemination of cancer cells along the metastatic process could be monitored in patients by the detection of cytokeratin-expressing cancer cells in blood (as circulating tumor cells, CTC) or in bone marrow (as disseminated tumor cells, DTC). In stage I-III breast cancer patients, bone marrow (BM) DTC have an independent clinical impact on overall survival [4-6], whereas CTC impact on survival remains unclear [7-9]. On the contrary, in metastatic breast cancer patients, CTC detection had a clear prognostic significance [10-11], but no DTC detection [12].

Biologically, CTC detection signs the cancer cells ability to extravasate and to circulate in blood vessels, whereas DTC detection shall reflect a more advanced state in the metastatic process [13]. After their early dissemination, BM DTC are thought to undergo a cellular dormancy; this dormancy could explain why they may be detected several years after the treatment of the primary tumor, in the absence of any metastatic relapse [14]. We hypothesized that, in a subgroup of patients, the metastatic process might skip the DTC-associated dormancy. In this study, we examined the association of DTC and CTC detection, at metastatic relapse, with the metastasis-free interval in 110 breast cancer patients.

## **Patients and Methods**

### ***Patients***

From November 1998 to September 2005, 837 women with breast cancer were included in the Institut Curie Breast Cancer Micrometastasis Project [6,7,12], after approval by the regional ethics committee. One hundred thirty eight of these women had documented metastatic dissemination. Clinical history was recorded prospectively on Institut Curie medical files. Importantly, metastatic sites were recorded at time of first metastatic relapse,

and later metastatic sites were not taken into account in our analysis. All samples were obtained with the patient's written informed consent.

### ***Tumor cells detection***

One hundred thirty eight patients had a proven metastatic relapse at time of BM DTC detection. DTC detection technique have been described previously, together their respective prognostic significance in these 138 patients [12]. Briefly, mononucleated cells (MNC) were separated from bone marrow aspirates and blood samples by density centrifugation and cytopins were prepared ( $1 \times 10^6$  MNC/slide). Three slides were incubated with the primary pancytokeratin antibody A45-B/B3 (Micromet, Germany and Chromavision, USA), which recognizes several cytokeratin epitopes CK8, CK18 and CK19. Cytokeratin-positive cells with atypical cytologic features were considered to be BM DTC according to the current consensus [15, 16].

### ***Statistical analyses***

Metastasis-free interval was measured from the date of breast cancer diagnosis until the date of breast cancer metastasis diagnosis. Overall survival was measured from the date of bone marrow DTC screening until the date of death or last follow-up. Survival and interval curves were determined using a Kaplan-Meier product-limit method. Statistical significance between curves was assessed using the log-rank test. Statistical analyses were performed by Statview software (SAS Institute, USA).

### **Results**

Within the 138 metastatic breast cancer patients included in the Institut Curie Breast Cancer Micrometastasis Project, 110 were screened for DTC at metastatic relapse before any treatment. DTC detection rate were respectively 58% ( $n=64/110$ ). DTC detection was associated with low grade ( $p=0.05$ ) and bone metastasis ( $p<0.0001$ ) (Table 1). However, DTC detection was not associated with a change in overall survival ( $p=0.60$ , Figure 1).

The metastasis-free interval (between breast cancer and metastasis diagnoses) was significantly longer in DTC positive patients ( $p=0.02$ , Figure 2A). No other clinical or pathological characteristic was associated with the metastasis-free interval (Table 1). As BM DTC

status has been previously reported to be of much stronger prognostic value in luminal A molecular subgroup [17], we stratified our analysis according to estrogen receptor (ER) status, using ER positivity as a surrogate marker of luminal tumors. Figure 2B shows that ER status was of no influence on the reported association between BM DTC detection and the metastasis free interval. Inversely, metastasis-free interval was an independent predictor of DTC detection in multivariate logistic regression analysis ( $p=0.02$ ), together with bone metastasis ( $p=0.0003$ ) and low tumor grade (grade I or II,  $p=0.05$ ) (Table 2).

## **Discussion**

The dissemination of tumor cells is a necessary pre-condition for metastasis development. In the adjuvant setting of breast cancer, BM DTC positivity means that some cancer cells have entered the metastatic process, and BM DTC detection has been repeatedly associated with later metastatic relapse [16]. Therefore, the mere scattering of malignant cells does not guarantee that DTC will grow into macrometastases and BM DTC status is not currently used in everyday practice [18]. The significance of BM DTC positivity in early breast cancer patients (about 15% of patients) is currently quite well understood: cancer cells have entered the metastatic process and the vast majority of DTC will undergo a dormancy state in their new microenvironment [14]. Metastatic relapses should occur when DTC escape this dissemination-associated dormancy, by means of several putative mechanisms [19]. In the adjuvant setting, as far as DTC have already entered the metastatic process, BM DTC positive patients relapse more frequently and maybe more rapidly than BM DTC negative patients. The significance of BM DTC negativity in early breast cancer patients (about 85% of patients) is less well understood: most of them will not relapse but a few patients who were initially BM DTC negative will still develop a metastatic disease. Besides technical issues of BM DTC detection, this fact raise the question whether BM DTC dissemination is associated a particular way to metastasis or whether all tumor develop BM DTC in the course of their metastatic dissemination.



Here, the incidence of BM DTC rose to 58% at first metastatic relapse of breast cancer patients, before the start of any treatment. Compared to the 15% detection rate in the adjuvant setting, this 4-fold increase in detection rates means that BM DTC have appeared in the course of the metastatic dissemination (i.e. after the primary tumor resection). On the other side, 42% of metastases occurred without any detectable BM DTC. At first, this rate might be explained by a weak sensitivity of DTC detection technique, as BM status cannot resume the tumoral dissemination in every metastasis-threatened organ [20]. Another explanation might be that cancer cells could disseminate without undergoing the cellular dormancy which is almost considered as a hallmark of DTC. This hypothesis is supported by the observation that BM DTC detection at metastatic relapse was indeed statistically associated with a longer metastasis free interval. However, this association must be interpreted cautiously, due to multiple hypotheses testing on a small cohort.

A few hypotheses could be proposed about these fast relapsing tumor cells that are not associated with BM DTC detection in stage IV patients. Technically, DTC with high affinity to poly-sugar may be lost during the poly-sugar density gradient centrifugation (Ficoll). Such changes in sugar affinity of cancer cells have been associated with increased metastatic properties [21]. Another hypothesis is that BM DTC negativity could be associated to an epithelial-mesenchymal transition downregulating the cytokeratin expression within DTC. Evidences are accumulating that most of cancer cells that have undergone an epithelial-mesenchymal transition are highly metastatic and exhibit stem cell properties [22].

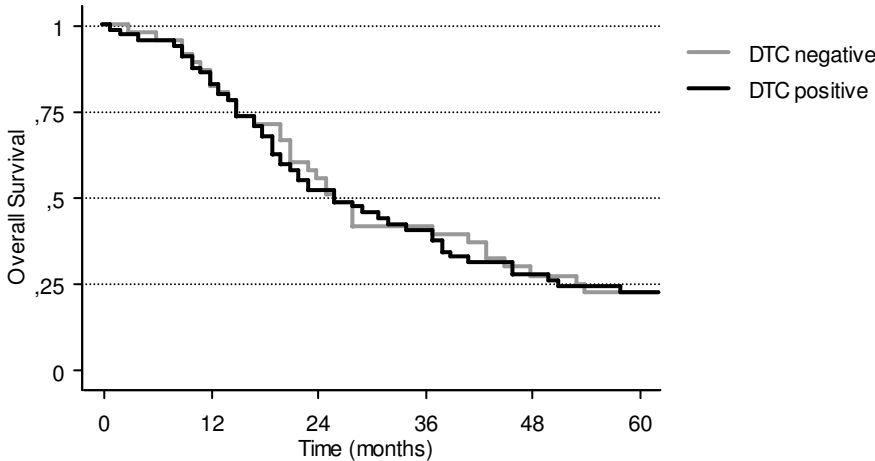
Finally, we propose (i) that most breast cancers metastasize by forming dormant DTC which can be detected in BM, and (ii) that a faster metastatic process might skip the BM DTC step (Figure 3).

**Acknowledgments:** M. Caly and F. Viard for technical assistance. This work has been supported by the Institut Curie micrometastasis incitative research program funded by individual grants.

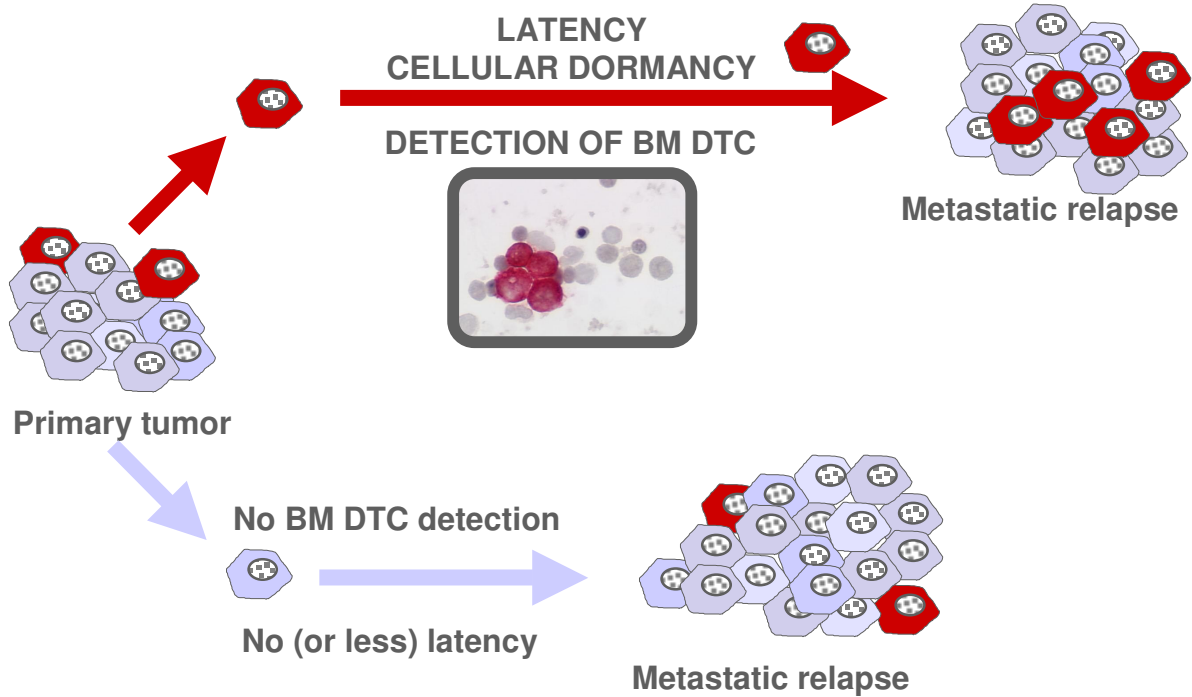
## References

1. Eccles SA, Welch DR. (2007) Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 369:1742-1757.
2. Steeg PS (2006) Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12:895-904.
3. Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A et al (2008) A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev* 27:5-10.
4. Braun S, Vogl FD, Naume B et al (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353:793-802.
5. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R et al (2003) Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 21:3469-3478.
6. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S et al. Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin Cancer Res* 14:3306-3311.
7. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A et al (2004) Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 10:1392-1400.
8. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A et al (2008) Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 26:1208-1215.
9. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C et al. (2008) Circulating tumor cell detection predicts early relapse after neoadjuvant chemotherapy in operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res*, in press.
10. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781-791.
11. Nolé F, Munzone E, Zorzino L et al (2008) Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol* 19:891-897.
12. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B et al (2008) Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 19:496-500.
13. Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE et al (1995) Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* 14:279-301.
14. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R et al (2004) Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 10:5342-5348.
15. Fehm T, Braun S, Muller V et al (2006) A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 107:885-892.
16. Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY (2008) Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol* 61:570-576.
17. Naume B, Zhao X, Synnestvedt M et al (2007) Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer. *Mol Oncol* 1:160-171.
18. Harris L, Fritsche H, Menne R et al (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:5287-5312.
19. Aguirre-Ghiso JA (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7:609-617.
20. Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K et al (2007) Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev* 26:705-715.
21. Witz IP (2008) The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 27:19-30.
22. Mani SA, Guo W, Liao MJ et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-715.

**Figure 1: Overall survival according to DTC detection at metastatic relapse (p=0.60)**



**Figure 3: Two pathways to metastasis ?**



**Figure 2: Metastasis-free interval according to DTC (Fig 2A, p=0.02 and 2B, stratified by ER expression, p=0.04) or CTC (Fig 2C) detection at metastatic relapse**

Figure 2A

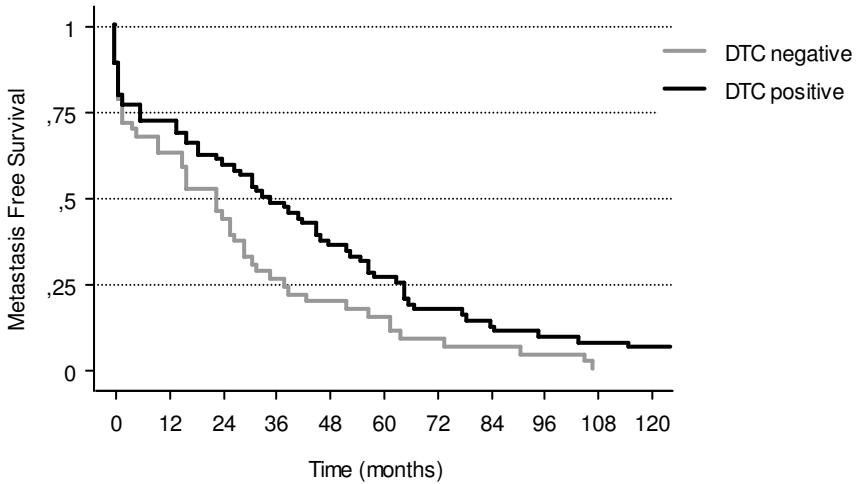
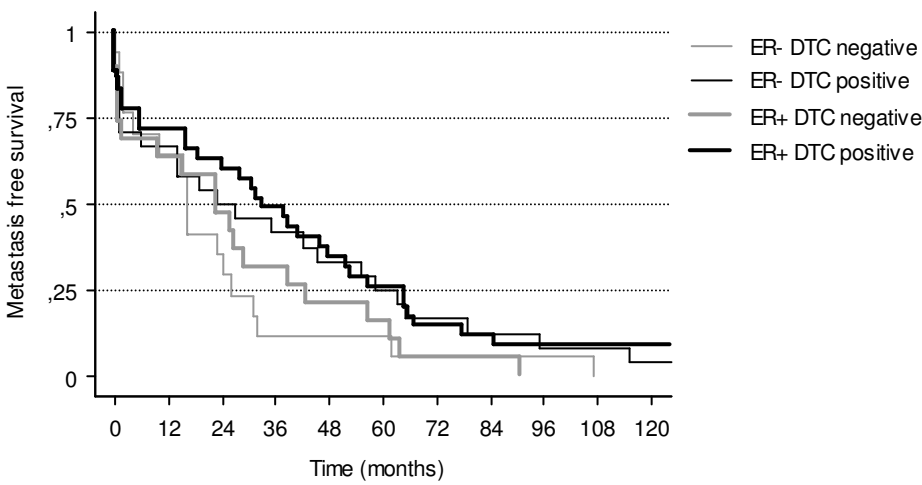


Figure 2B



**Table 1: Tumor characteristics, DTC detection rate and metastasis free interval**

ER: Estrogen receptor, PR: progesterone receptor.

Tumors characteristics	number of patients n (%)	DTC detection at metastatic relapse		Metastasis Free Interval Univariate Analysis p value (log rank)
		n (%)	p value ( $\chi^2$ )	
<b>Menopausal status</b>				
not menopausal	29 (26%)	17 (59%)	0.95	0.41
menopausal	81 (74%)	47 (58%)		
<b>Histology</b>				
ductal	87 (79%)	49 (56%)	0.96	0.41
other	23 (21%)	13 (57%)		
<b>SBR grade</b>				
grade 1-2	46 (58%)	34 (74%)	<b>0.05</b>	0.18
grade 3	33 (42%)	14 (42%)		
<b>ER status</b>				
positive	54 (57%)	35 (65%)	0.53	0.50
negative	41 (43%)	24 (58%)		
<b>PR status</b>				
positive	35 (42%)	18 (51%)	0.20	0.80
negative	49 (58%)	32 (65%)		
<b>HER2 status</b>				
positive	8 (17%)	6 (75%)	0.26	0.91
negative	40 (83%)	17 (43%)		
<b>DTC status at relapse</b>				
positive	64 (58%)	-	-	<b>0.02</b>
negative	46 (42%)	-		
<b>Bone metastases at relapse</b>				
No	52 (47%)	18 (35%)	<b>&lt;0.0001</b>	0.29
Yes	58 (53%)	46 (80%)		
<b>Liver metastases at relapse</b>				
No	60 (55%)	32 (53%)	0.26	0.89
Yes	50 (45%)	32 (64%)		
<b>Lung metastases at relapse</b>				
No	76 (69%)	47 (62%)	0.24	0.79
Yes	34 (31%)	17 (50%)		

**Table 2: Predictors of DTC positivity at metastatic relapse**

ER: Estrogen receptor, PR: progesterone receptor, “-“: not included in the multivariate analysis. Low SBR grade, long metastasis-free interval and presence of bone metastases independently predict BM DTC positivity.

<b>Tumors characteristics</b>	<b>Univariate analysis</b>	<b>Multivariate analysis</b>
	p value (logistic regression)	p value (logistic regression)
Menopausal status	0.95	-
Histology	0.97	-
SBR grade	<b>0.006</b>	<b>0.05</b>
ER status	0.53	-
PR status	0.20	-
HER2 status	0.27	-
Metastasis-free interval	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>
Bone metastases	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0003</b>
Liver metastases	0.26	-
Lung metastases	0.26	-

### 4.5.2 Discussion

Cet article retrouve donc une différence du temps de latence jusqu'à rechute métastatique selon que les patientes ont, ou non, développé des cellules tumorales disséminées médullaires.

Il s'agit d'un argument s'inscrivant contre un manque de sensibilité « technique » de la méthode de détection des cellules tumorales disséminées, dans la mesure où ce manque de sensibilité serait soit aléatoire, soit lié à un plus faible nombre de cellules tumorales disséminées. Un manque de sensibilité « aléatoire », par exemple lié aux paramètres techniques de la détection (i.e. temps entre prélèvement médullaire et centrifugation, qualité du Ficoll...) ne peut théoriquement pas être à l'origine d'une telle différence observée. Un manque de sensibilité non aléatoire, lié au nombre de cellules tumorales disséminées, reste peu probable : la latence de rechute métastatique serait ainsi inversement liée au nombre de cellules tumorales disséminées, ce qui s'inscrirait contre de nombreuses données, et particulièrement contre celles que nous avons rapportées concernant l'existence potentielle d'une coopération entre cellules tumorales au cours de la dissémination métastatique.

Quarante pour cent des patientes ont donc développé une maladie métastatique ne faisant pas (ou peu) appel à l'étape de la dissémination cellulaire telle que nous l'observons avec les cellules tumorales disséminées médullaires. L'étape de la dissémination cellulaire est physiquement indispensable, mais d'autres caractéristiques sont potentiellement mises en jeu. La diminution de l'expression des cytokératines épithéliales (qui sont à la base de notre méthode de détection) est observée de manière continue dans le sous-type moléculaire « basal-like » et de manière transitoire dans les cellules tumorales ayant acquis un phénotype mésenchymateux suite à une transition épithélio-mésenchymateuse. Nos résultats stratifiés selon la présence ou l'absence du récepteur aux oestrogènes (non exprimés par les tumeurs « basal-like ») montrent que la différence observée ne repose pas sur une différence de détection des cellules tumorales disséminées en fonction du sous-groupe moléculaire. L'hypothèse d'une transition épithélio-mésenchymateuse est intéressante car l'augmentation du potentiel métastatique qui lui est associée pourrait expliquer dans la population métastatique la corrélation entre absence de détection des cellules tumorales disséminées cytotkeratine-positives et temps réduit jusqu'à rechute métastatique.

## 4.6 **Modèle intégratif de la dissémination cellulaire**

Si l'on considère que la formation de cellules tumorales disséminées médullaires correspond à un processus associé à certains types tumoraux, qui restent à caractériser, l'ensemble des données collectées permettent de proposer un modèle cohérent intégrant en situation adjuvante l'ensemble des résultats observés.

Pour rappel, 15 pour cent des patientes présentent des cellules tumorales disséminées au diagnostic. Ces cellules tumorales sont disséminées de manière probablement diffuse et non restreinte à la moelle seule, avec probable dissémination ganglionnaire loco-régionale. Cette dissémination ganglionnaire loco-régionale et médullaire peut servir de réservoir, favorisant alors une recolonisation du site opératoire sous le fait de divers signaux chemo-attractants libérés par les phénomènes de cicatrisation post-opératoire. A distance, les cellules tumorales disséminées sont avancées dans le processus métastatique et ont potentiellement conditionné leur

microenvironnement de manière à favoriser le développement ultérieur d'une métastase. Ces patientes, chez qui la dormance des cellules tumorales disséminées est potentiellement réversible, présentent des taux de rechute plus importants, que ce soit au niveau loco-régional qu'à distance.

De l'autre côté, 85 pour cent des patientes en situation adjuvante ne présentent pas de cellules tumorales disséminées médullaires au diagnostic. Les résultats décrits en situation métastatique nous permettent de proposer que ces patientes puissent être réparties en 4 catégories :

- Une partie d'entre elles n'a pas de dissémination de cellules tumorales, et ne présentent pas de risque de rechute métastatique.
- Une seconde partie d'entre elles présente des cellules tumorales disséminées médullaires qui n'ont pas été retrouvées par l'analyse d'un échantillon médullaire unique (« faux négatif »). Ces patientes ont un bien sûr un risque et une latence similaire aux patientes positives, et présenteront probablement des cellules tumorales médullaires lors d'une éventuelle rechute métastatique.
- Une troisième partie des patientes a développé une dissémination non médullaire au moment du prélèvement médullaire, dissémination qui peut-être ganglionnaire loco-régionale ou dans un autre organe-cible. Ces cellules disséminées ont un comportement biologique proche des cellules tumorales disséminées médullaires, sont soumises à des processus de dormance et sont à l'origine de l'apparition des cellules tumorales disséminées détectables dans la moelle lors de l'examen des patientes à la rechute. La cinétique d'apparition des macrométastases est alors lente, du fait de la dormance cellulaire à laquelle est sensible ce type de cellules disséminées.
- Une dernière partie des patientes présente une dissémination cellulaire non détectable par notre technique, associée à une croissance métastatique plus rapide, possiblement suite à une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules disséminées.

Dans ce modèle, les deuxièmes et troisièmes catégories de patientes complètent les patientes initialement positives pour former, en cas de rechute métastatique, le groupe des patientes positives à la rechute (60 pour cent de la population métastatique). La quatrième catégorie correspond aux patientes restant sans cellule tumorale disséminée médullaire lors de la rechute métastatique (40 pour cent de la population métastatique).

Les 3 hypothèses actuellement décrites pour expliquer le développement de métastases après une période prolongée de dormance cellulaire sont l'acquisition de mutations supplémentaires, d'une capacité angiogénique et l'échappement au système immunitaire. De plus, nous proposons d'après nos résultats expérimentaux que les cellules tumorales disséminées réalisent un conditionnement progressif du microenvironnement nécessaire à la croissance métastatique secondaire, possiblement initiée par un autre sous clone tumoral.



## 5 Projets et Conclusion

### 5.1 Projets

**Une métastase hépatique colonisée ?** Un prélèvement anatomo-pathologique précis pourrait correspondre à notre modèle murin. Il s'agit des échantillons tumoraux (conservés en paraffine) d'un patient opéré en un temps pour une double résection de 2 adénocarcinomes colorectaux avec métastasectomie hépatique. La première tumeur est colique, classée pT3N2, et faiblement différenciée ; la deuxième tumeur est au niveau de la charnière sigmoïdo-rectale, classée pT3N0, et bien différenciée avec une composante mucineuse. Dans ce contexte d'une double tumeur, le raisonnement oncologique habituel attribuerait la métastase à la tumeur la plus avancée et la moins différenciée. Cependant, l'examen microscopique retrouve un contingent mucineux au sein de la métastase hépatique. Il s'agit potentiellement d'un premier exemple humain de colonisation métastatique, ce qui serait démontrable par analyse comparative de l'ADN (CGHarray) des 2 tumeurs initiales et de la métastase hépatique.

**Utilisation expérimentale d'autres modèles tumoraux** D'autres modèles tumoraux sont exploitables avec notre modèle, dès lors que l'on peut disposer d'une tumeur métastatique et d'une tumeur non métastatique de même type histologique, différant par un au moins un marqueur « robuste » présent dans la tumeur non métastatique (comme l'était le chromosome Y des cellules LoVo dans nos expériences). Dans les tumeurs mammaires, qui constituent l'essentiel des modèles de xénogreffe disponible au laboratoire, peu de marqueurs de ce type sont disponibles en routine, l'expression de nombreuses protéines (HER2, récepteurs hormonaux, EGFR...) pouvant varier spontanément entre tumeur primitive et métastases (Wu JM, Clin Cancer Res 2008).

Les gènes suppresseurs de métastases restent un modèle théoriquement intéressant et représentent peut être la seule méthode « propre » de confirmation de la colonisation, malgré l'absence de métastase observée dans la lignée nm23 mutée obtenue du laboratoire de Patricia Steeg.

L'existence d'une coopération intercellulaire pourrait aussi être étudiée par l'utilisation de cellules « prémétastatiques » possédant des caractéristiques complémentaires. Le laboratoire de Joan Massagué a ainsi fabriqué des cellules n'exprimant que quelques uns des gènes dont la coexpression conduirait à une augmentation nette du potentiel métastatique au niveau pulmonaire (Minn AJ, Nature 2005). Ces cellules sont faiblement métastatiques individuellement, mais pourrait potentiellement coopérer entre elles (expérience non réalisée par le groupe de J Massagué).

Autre possibilité expérimentale, le conditionnement des futurs foyers micrométastatiques pourrait être effectué par des cellules métastatiques (de type HT29 donc), qui exprimeraient un gène-suicide (HSV-TK ou autre). Cela permettrait de supprimer sélectivement les cellules métastatiques pour ne laisser vivantes que les cellules non métastatiques. Ce type d'expérience pourrait permettre de caractériser la durée minimale du conditionnement microenvironnemental nécessaire pour que les cellules non métastatiques puissent en tirer partie.

**Analyse couplée CGHarray/Transcriptomique des tumeurs primitives des cellules tumorales disséminées** La tumorothèque de l'Institut Curie contient la quasi totalité des tumeurs primitives opérées chez les patientes screenées pour la présence de cellules tumorales disséminées, ce qui représente la première collection de tissu tumoral de ce type. Il s'agit donc d'analyser ces tumeurs en couplant l'analyse des altérations chromosomiques (CGHarray) et analyse du transcriptome (RNA microarray).

D'un point de vue de l'analyse statistique, on peut isoler dans cette population 4 catégories de patientes sur la base des deux critères absence/présence de cellules tumorales disséminées et absence/présence d'une rechute métastatique. Cela permet de concevoir une étude en plan factoriel 2x2, qui permettra d'obtenir des informations sur les anomalies génomiques associées d'une part à l'apparition d'une rechute et d'autre part à la formation de cellules tumorales disséminées. Un autre mode d'analyse complémentaire est de proposer l'hypothèse d'un classement graduel de 3 de ces 4 catégories : patiente sans cellule tumorale disséminée ni rechute métastatique, patiente avec cellules tumorales disséminées sans rechute et finalement patiente avec cellules tumorales disséminées et rechute. Ce classement pourrait s'accompagner d'anomalies génétiques graduelles de la tumeur primitive, à la manière d'un « Vogelgram ».

Ce projet a fait l'objet d'une demande de financement auprès de la fondation de France en Avril 2008.

**Tumeurs HER2 positives et cellules tumorales disséminées** Programme interrompu depuis 2004, la détection des cellules tumorales disséminées médullaires va reprendre pour des patientes en situation adjuvante présentant une tumeur primitive HER2 positive. Outre la détection de ces cellules, il s'agit de continuer l'analyse des différences génotypiques entre tumeur primitive et cellules disséminées (Vincent-Salomon A, Br J Cancer 2007). L'efficacité du traitement par trastuzumab adjuvant sur l'éradication de ces cellules disséminées sera mesurée par une ponction répétée après 1 an de traitement.

La mise en place du protocole d'étude a eu lieu en Juin 2008.

**Autres projets Cellules Tumorales Disséminées** La détection de ces cellules n'a d'intérêt clinique qu'en présence d'une réponse thérapeutique adaptée. En suivant les résultats présentés ici, deux pistes s'ouvrent alors à nous : amélioration du traitement loco-régional par irradiation choisie des chaînes ganglionnaires mammaire interne et sus-claviculaire, intensification du traitement adjuvant par ajout d'une chimiothérapie, d'une hormonothérapie ou d'une thérapeutique moléculaire ciblée. Ces derniers médicaments ont l'avantage de ne pas être cycle-dépendants et sont donc susceptibles d'éradiquer les cellules tumorales disséminées en état de dormance cellulaire.

Compte tenu de la diversité des cibles thérapeutiques présentes dans les cellules tumorales disséminées, et de l'hétérogénéité génotypique et phénotypique qui y sont observable, il semble enfin nécessaire de faire progresser la méthode de détection des cellules tumorales disséminées, le consensus actuel ayant bientôt 10 ans (Borgen E, Cytotherapy 1999). Il s'agirait de conserver la détection morphologique des cellules en détectant non plus un mais plusieurs antigènes simultanément, via un passage de l'immunocytochimie à l'immunocytofluorescence, en utilisant éventuellement une fluorescence par quantum-dots, sans affaiblissement de la fluorescence à la lumière.

**Cellules Tumorales Circulantes** La détection des cellules tumorales circulantes dans le sang périphérique n'a pas été abordée dans ce manuscrit. Les travaux coordonnés par le Pr JY Pierga m'ont permis de participer à deux publications récentes (Pierga JY, Mol Oncol 2007; Pierga JY, Clin Cancer Res 2008). Plusieurs projets sont en cours, d'ordre essentiellement clinique : Athena, CirCé, CirCé07, PHRC...

## 5.2 Conclusion

Plusieurs modèles de processus métastatiques ont été proposés jusqu'à présent. Deuxième modèle après celui de Paget, le modèle de la dominance clonale limitait le potentiel métastatique à un switch génétique restreint à une sous population tumorale donnée. Ce modèle a justifié de nombreuses études à la recherche du « LE » gène majeur du switch. Un nombre très important de gènes « majeurs » ont été retrouvés et caractérisés, sans retombée clinique de portée équivalente jusqu'à présent. Hormis la théorie attribuable à Robert Weinberg d'induction de l'EMT par le microenvironnement tumoral et de l'absence de clones métastatiques ou non métastatiques en soi, la plupart des autres modèles proposés peuvent être considérés comme des compléments de la théorie du switch.

Avec les réserves qu'imposent les limites de notre modèle, l'existence d'une colonisation des métastases conduit à relativiser la place de la théorie du switch, et suggère d'utiliser comme principal sujet d'étude les cellules tumorales circulantes ainsi que les cellules tumorales disséminées, dont la/les régulation(s) reste(nt) encore complètement inconnue(s). Ces cellules nous confrontent par ailleurs à une hétérogénéité majeure tant génétique que phénotypique. Il est particulièrement intéressant de prendre aussi en compte les données sur les variations phénotypiques induites par le micro-environnement tumoral, comme peuvent l'être l'acquisition transitoire d'un phénotype mésenchymateux ou d'un phénotype « souche ». Cette hétérogénéité peut être à l'origine d'une coopération entre différents sous-clones tumoraux apparus successivement dans la tumeur primitive, coopération elle-même responsable d'un conditionnement progressif des potentiels organes-hôtes de métastases, ou tout au moins d'une colonisation des sites métastatiques par des cellules ne pouvant pas métastaser par elle-mêmes. Ce « recentrage » des expériences sur les phases les plus précoces du développement des métastases permettrait d'éviter ce qui pourrait être responsable d'un « bruit de fond » sans rapport avec les déterminants du processus métastatique.

Une autre dimension importante soulignée par ces travaux de thèse est le temps nécessaire à un éventuel conditionnement progressif du microenvironnement, à l'implantation des cellules

tumorales disséminées, à la rechute métastatique et à la colonisation des métastases par des cellules non métastatiques. Cette dimension temporelle est particulièrement difficile à reproduire avec les modèles animaux murins immunodéficients et a été jusqu'à présent négligée dans les études sur le processus métastatique ; nous pensons ainsi que les expériences reposant sur les injections en bolus intraveineux de cellules tumorales sont susceptibles de reposer sur un biais méthodologique majeur ; ces modèles ont été, et sont encore, largement utilisés pour l'élaboration des paradigmes actuels sur le processus métastatique.

Outre les modèles précliniques utilisables, les travaux présentés dans ce manuscrit sont enfin en faveur d'un abord dans sa continuité du processus métastatique chez les patients : tumeur initiale, cellules tumorales circulantes, cellules tumorales disséminées et métastases forment un processus continu, dynamique et non cloisonnée ; les études longitudinales, jusqu'ici non réalisées, pourraient être les plus prometteuses d'avancée dans la compréhension et le traitement de la maladie métastatique.

# Bibliographie

- Abal M, Fsihi H, Bras-Gonçalves R, Doll A, Boyé K, Janssen KP, Alameda F, Reventós J, Louvard D, Magdelenat H, Poupon MF, Robine S. Heterogeneous metastasis efficiency of isogenic orthotopic colon cancer xenografts reveals distinctive gene expression profiles. *Tumour Biol.* 2007 ;28(3) :139-50.
- Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB : the enemy within. *Cancer Cell.* 2004 Sep ;6(3) :203-8.
- Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 2007 Nov ;7(11) :834-46.
- Akl EA, Barba M, Rohilla S, Terrenato I, Sperati F, Muti P, Schünemann HJ. Anticoagulation for the long term treatment of venous thromboembolism in patients with cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Apr 16 ;(2) :CD006650.
- Alexander P. Dormant metastases—studies in experimental animals. *J Pathol.* 1983 Nov ;141(3) :379-83.
- Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells : a new model for metastasis. *Nat Med.* 2000 Jan ;6(1) :100-2.
- Al-Mulla F, Hagan S, Behbehani AI, Bitar MS, George SS, Going JJ, García JJ, Scott L, Fyfe N, Murray GI, Kolch W. Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006 Dec 20 ;24(36) :5672-9.
- Andre F, Cabioglu N, Assi H, Sabourin JC, Delaloge S, Sahin A, Broglio K, Spano JP, Combadiere C, Bucana C, Soria JC, Cristofanilli M. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol.* 2006 Jun ;17(6) :945-51.
- Bandyopadhyay S, Pai SK, Gross SC, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Saito K, Commes T, Hayashi S, Watabe M, Watabe K. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. *Cancer Res.* 2003 Apr 15 ;63(8) :1731-6.
- Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Takano Y, Saito K, Commes T, Piquemal D, Watabe M, Gross S, Wang Y, Huggenvik J, Watabe K. PTEN up-regulates the tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in prostate and breast cancer. *Cancer Res.* 2004 Nov 1 ;64(21) :7655-60.
- Bandyopadhyay S, Wang Y, Zhan R, Pai SK, Watabe M, Iizumi M, Furuta E, Mohinta S, Liu W, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Takano Y, Saito K, Commes T, Piquemal D, Hai T, Watabe K. The tumor metastasis suppressor gene Drg-1 down-regulates the expression of activating transcription factor 3 in prostate cancer. *Cancer Res.* 2006 Dec 15 ;66(24) :11983-90.
- Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, Watabe M, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Takano Y, Saito K, Pauza ME, Hayashi S, Wang Y, Mohinta S, Mashimo T, Iizumi M, Furuta E, Watabe K. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med.* 2006 Aug ;12(8) :933-8.
- Berger JC, Vander Griend DJ, Robinson VL, Hickson JA, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis suppressor genes : from gene identification to protein function and regulation. *Cancer Biol Ther.* 2005 Aug ;4(8) :805-12.
- Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature.* 2002 Aug 22 ;418(6900) :823.
- Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment : TGFbeta : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Jul ;6(7) :506-20.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Dec ;4(12) :915-25.
- Bockhorn M, Jain RK, Munn LL. Active versus passive mechanisms in metastasis : do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol.* 2007 May ;8(5) :444-8.
- Borgen E, Naume B, Nesland JM, et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. The European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection. *Cytotherapy* 1999 ;1 :377-88.
- Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited : mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13 ;98(6) :3352-7.
- Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19 ;99(4) :2193-8.

- Bosch FX, Andl C, Abel U, Kartenbeck J. E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma : a comparison of E-cadherin with desmosomal components. *Int J Cancer*. 2005 May 1 ;114(5) :779-90.
- Boucharaba A, Serre CM, Grès S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, Guglielmi J, Clézardin P, Peyruchaud O. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest*. 2004 Dec ;114(12) :1714-25.
- Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28 ;98(18) :10356-61.
- Bras-Gonçalves RA, Rosty C, Laurent-Puig P, Soulié P, Dutrillaux B, Poupon MF. Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status. *Br J Cancer*. 2000 Feb ;82(4) :913-23.
- Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kantenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 1 ;19(5) :1468-75.
- Braun S, Hepp F, Kantenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmüller G, Willgeroth F, Sommer HL. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients : monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res*. 1999 Dec ;5(12) :3999-4004.
- Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2000 Jan ;18(1) :80-6.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25 ;353(8) :793-802.
- Breillout F, Antoine E, Lascaux V, Rolland Y, Poupon MF. Promotion of micrometastasis proliferation in a rat rhabdomyosarcoma model by epidermal growth factor. *J Natl Cancer Inst*. 1989 May 3 ;81(9) :702-5.
- Bussard KM, Gay CV, Mastro AM. The bone microenvironment in metastasis ; what is special about bone ? *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Mar ;27(1) :41-55.
- Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC. Temporal progression of metastasis in lung : cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res*. 2000 May 1 ;60(9) :2541-6. Chambers AF, Naumov GN, Vantyghe SA, Tuck AB. Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res*. 2000 ;2(6) :400-7.
- Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, Braastad C, Sun Y, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB, Darnowski J, Pantazis P, Wyche J, Fu Z, Kitagawa Y, Keller ET, Sedivy JM, Yeung KC. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23 ;279(17) :17515-23.
- Cicek M, Fukuyama R, Welch DR, Sizemore N, Casey G. Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor-kappaB activity. *Cancer Res*. 2005 May 1 ;65(9) :3586-95.
- Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*. 2000 Aug 3 ;406(6795) :532-5.
- Colucci F, Soudais C, Rosmaraki E, Vanes L, Tybulewicz VL, Di Santo JP. Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model : investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation. *J Immunol*. 1999 Mar 1 ;162(5) :2761-5.
- Côme C, Magnino F, Bibeau F, De Santa Barbara P, Becker KF, Theillet C, Savagner P. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15 ;12(18) :5395-402.
- Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Löwik C, van der Pluijm G, ten Dijke P. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Feb 15 ;66(4) :2202-9.
- Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N. Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 2004 Oct 10 ;111(6) :868-72.
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*. 1995 May 12 ;268(5212) :884-6.
- Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res*. 1996 Oct 1 ;56(19) :4387-90.
- D'Souza RJ, Sheikh ZA, Busund LT, Russell PJ, Crowe PJ, Yang JL. Expression of nm23 protein in adult soft tissue sarcoma is correlated with histological grade. *Anticancer Res*. 2003 Jul-Aug ;23(4) :3289-94.
- Earley S, Plopper GE. Phosphorylation of focal adhesion kinase promotes extravasation of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Feb 8 ;366(2) :476-82.
- Eccles SA, Welch DR. Metastasis : recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*. 2007 May 19 ;369(9574) :1742-57.

- Edwards PA. Metastasis : the role of chance in malignancy. *Nature*. 2002 Oct 10;419(6907) :559-60.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3) :161-74.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002 Dec 12;420(6916) :629-35.
- Eves EM, Shapiro P, Naik K, Klein UR, Trakul N, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol Cell*. 2006 Aug;23(4) :561-74.
- Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, van't Veer LJ, Perou CM. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Aug 10;355(6) :560-9.
- Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003 Mar 7;112(5) :659-72.
- Fidler IJ, Kripke ML. Genomic analysis of primary tumors does not address the prevalence of metastatic cells in the population. *Nat Genet*. 2003 May;34(1) :23.
- Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 1977 Aug 26;197(4306) :893-5.
- Fidler IJ. Metastasis : quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 1970 Oct ;45(4) :773-82.
- Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*. 1978 Sep ;38(9) :2651-60.
- Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6) :441-9.
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration : diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003 May ;3(5) :362-74.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991 Apr ;113(1) :173-85.
- Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, Keller ET. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Jun 18;95(12) :878-89.
- Fujita N, Jaye DL, Kajita M, Geigerman C, Moreno CS, Wade PA. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2) :207-19.
- Gellersen B, Briese J, Oberndörfer M, Redlin K, Samalecos A, Richter DU, Löning T, Schulte HM, Bamberger AM. Expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells at the human maternal-fetal interface : Regulation and functional implications. *Am J Pathol*. 2007 Jan ;170(1) :126-39.
- Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP, Welch DR. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6 : evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res*. 2003 Jan 15;63(2) :432-40.
- Goodison S, Kawai K, Hihara J, Jiang P, Yang M, Urquidi V, Hoffman RM, Tarin D. Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. *Clin Cancer Res*. 2003 Sep 1;9(10 Pt 1) :3808-14.
- Gottardi CJ, Gumbiner BM. Adhesion signaling : how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19) :R792-4.
- Gout S, Tremblay PL, Huot J. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2007 Sep 21.
- Gray JW. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*. 2003 Jul;4(1) :4-6.
- Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Aug;4(8) :657-65.
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization : recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006 Jan 13;124(1) :175-89.
- Guan RJ, Ford HL, Fu Y, Li Y, Shaw LM, Pardee AB. Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. *Cancer Res*. 2000 Feb 1;60(3) :749-55.
- Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massagué J. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137) :765-70.
- Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, Naber SP, Weinberg RA. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet*. 2005 Oct ;37(10) :1047-54.
- Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, Oien K, Ferrier R, Gusterson B, García JJ, Kolch W. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20) :7392-7.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1) :57-70.
- Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA. The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 12;103(50) :18969-74.

- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 2000 Feb 21;148(4) :779-90.
- Hedley BD, Allan AL, Chambers AF. Tumor dormancy and the role of metastasis suppressor genes in regulating ectopic growth. *Future Oncol.* 2006 Oct ;2(5) :627-41.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007 Sep 13;1(3) :313-23.
- Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H, Christofori G. Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. *Oncogene.* 2007 Apr 5;26(16) :2290-8.
- Hickson JA, Huo D, Vander Griend DJ, Lin A, Rinker-Schaeffer CW, Yamada SD. The p38 kinases MKK4 and MKK6 suppress metastatic colonization in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4) :2264-70.
- Hill RP, Chambers AF, Ling V, Harris JF. Dynamic heterogeneity : rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science.* 1984 Jun 1 ;224(4652) :998-1001.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2002 Oct ;2(4) :289-300.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* 2006 Dec ;8(12) :1369-75.
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases : balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995 Feb ;1(2) :149-53.
- Horak CE, Mendoza A, Vega-Valle E, Albaugh M, Graff-Cherry C, McDermott WG, Hua E, Merino MJ, Steinberg SM, Khanna C, Steeg PS. Nm23-H1 suppresses metastasis by inhibiting expression of the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res.* 2007 Dec 15 ;67(24) :11751-9.
- Howlett AR, Petersen OW, Steeg PS, Bissell MJ. A novel function for the nm23-H1 gene : overexpression in human breast carcinoma cells leads to the formation of basement membrane and growth arrest. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Dec 21 ;86(24) :1838-44.
- Hynes RO. Integrins : bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002 Sep 20 ;110(6) :673-87.
- Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, Stathopoulos EN, Stathopoulou A, Lianidou E, Chlouverakis G, Sotiriou C, Georgoulis V, Mavroudis D. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Nov 20 ;25(33) :5194-202.
- Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, Muschel RJ. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res.* 2004 Dec 1 ;64(23) :8613-9.
- Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 1996 Dec ;135(6 Pt 1) :1643-54.
- Ito S, Nakanishi H, Ikehara Y, Kato T, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A, Tatematsu M. Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int J Cancer.* 2001 Jul 15 ;93(2) :212-7.
- Jaffer ZM, Chernoff J. The cross-Rho's of cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20 ;279(34) :35123-6.
- Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep ;25(3) :435-57.
- Jänicke F, Pechtl A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M; German N0 Study Group. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Jun 20 ;93(12) :913-20.
- Janneau JL, Maldonado-Estrada J, Tachdjian G, Miran I, Motté N, Saulnier P, Sabourin JC, Coté JF, Simon B, Frydman R, Chaouat G, Bellet D. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov ;87(11) :5336-9.
- Janni W, Gastroph S, Hepp F, Kentenich C, Rjosk D, Schindlbeck C, Dimpfl T, Sommer H, Braun S. Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma. *Cancer.* 2000 May 15 ;88(10) :2252-9.
- Jeon JH, Lee KN, Hwang CY, Kwon KS, You KH, Choi I. Tumor suppressor VDUP1 increases p27(kip1) stability by inhibiting JAB1. *Cancer Res.* 2005 Jun 1 ;65(11) :4485-9.
- Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L. Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene.* 2007 Nov 22 ;26(53) :7445-56.
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001 May 28 ;153(5) :893-904.
- Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen CR, Manova-Todorova K, Blasberg R, Gerald WL, Massagué J. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27 ;102(39) :13909-14.



- Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions : twist in development and metastasis. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3) :277-9.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003 Jun ;3(6) :537-49.
- Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the « soil » : the premetastatic niche. *Cancer Res*. 2006 Dec 1 ;66(23) :11089-93.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggiero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005 Dec 8 ;438(7069) :820-7.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4 ;449(7162) :557-63.
- Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R. Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int J Cancer*. 1995 Nov 27 ;63(5) :680-7.
- Kerbel RS, Waghorne C, Korczak B, Lagarde A, Breitman ML. Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells : genetic analysis and biological implications. *Cancer Surv*. 1988 ;7(4) :597-629.
- Khatib AM, Fallavollita L, Wancewicz EV, Monia BP, Brodt P. Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Res*. 2002 Oct 1 ;62(19) :5393-8.
- Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet*. 2002 Aug 31 ;360(9334) :683-9.
- Koop S, MacDonald IC, Luzzi K, Schmidt EE, Morris VL, Grattan M, Khokha R, Chambers AF, Groom AC. Fate of melanoma cells entering the microcirculation : over 80 percents survive and extravasate. *Cancer Res*. 1995 Jun 15 ;55(12) :2520-3.
- Koop S, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Khokha R, Grattan M, Leone J, Chambers AF, Groom AC. Independence of metastatic ability and extravasation : metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1 ;93(20) :11080-4.
- Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhae MR, Sato S, Miyauchi M, Takata T. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15 ;10(16) :5455-63.
- Küstners B, Kats G, Roodink I, Verrijp K, Wesseling P, Ruiter DJ, de Waal RM, Leenders WP. Micronodular transformation as a novel mechanism of VEGF-A-induced metastasis. *Oncogene*. 2007 Aug 23 ;26(39) :5808-15.
- Kuukasjärvi T, Karhu R, Tanner M, Kähkönen M, Schäffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res*. 1997 Apr 15 ;57(8) :1597-604.
- Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, Chua CW, Chan KW, Chan FL, Glackin C, Wong YC, Wang X. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res*. 2005 Jun 15 ;65(12) :5153-62.
- Lara PN Jr, Stadler WM, Longmate J, Quinn DI, Wexler J, Van Loan M, Twardowski P, Gumerlock PH, Vogelzang NJ, Vokes EE, Lenz HJ, Doroshow JH, Gandara DR. A randomized phase II trial of the matrix metalloproteinase inhibitor BMS-275291 in hormone-refractory prostate cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1 ;12(5) :1556-63.
- Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res*. 1997 Jun 15 ;57(12) :2384-7.
- Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Chau KL, Fan ST. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15 ;12(18) :5369-76.
- Leivonen SK, Kähäri VM. Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. *Int J Cancer*. 2007 Nov 15 ;121(10) :2119-24.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep ;7(9) :678-89.
- Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis : cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*. 2007 Jan ;17(1) :3-14.
- Lin WC, Pretlow TP, Pretlow TG 3rd, Culp LA. Development of micrometastases : earliest events detected with bacterial lacZ gene-tagged tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Sep 19 ;82(18) :1497-503.
- Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001 May 17 ;411(6835) :375-9.
- Liotta LA, Saidel MG, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res*. 1976 Mar ;36(3) :889-94.
- Liotta LA, Vembu D, Saini RK, Boone C. In vivo monitoring of the death rate of artificial murine pulmonary micrometastases. *Cancer Res*. 1978 May ;38(5) :1231-6.

- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency : dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998 Sep ;153(3) :865-73.
- Ma C, Rong Y, Radiloff DR, Datto MB, Centeno B, Bao S, Cheng AW, Lin F, Jiang S, Yeatman TJ, Wang XF. Extracellular matrix protein betaig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes Dev*. 2008 Feb 1 ;22(3) :308-21.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007 Oct 11 ;449(7163) :682-8.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008 May 16 ;133(4) :704-15.
- Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12 ;104(24) :10069-74.
- Marcellini M, De Luca N, Riccioni T, Ciucci A, Orecchia A, Lacal PM, Ruffini F, Pesce M, Cianfarani F, Zambruno G, Orlandi A, Failla CM. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *Am J Pathol*. 2006 Aug ;169(2) :643-54.
- Mareel M, Boterberg T, Noë V, Van Hoorde L, Vermeulen S, Bruyneel E, Bracke M. E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex : a regulator of cancer invasion. *J Cell Physiol*. 1997 Nov ;173(2) :271-4.
- Mareel M, Bracke M, Van Roy F. Invasion promoter versus invasion suppressor molecules : the paradigm of E-cadherin. *Mol Biol Rep*. 1994 Jan ;19(1) :45-67.
- Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005 Jun ;12(6) :488-96.
- Maruyama Y, Ono M, Kawahara A, Yokoyama T, Basaki Y, Kage M, Aoyagi S, Kinoshita H, Kuwano M. Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis. *Cancer Res*. 2006 Jun 15 ;66(12) :6233-42.
- Mbalaviele G, Dunstan CR, Sasaki A, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T. E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer Res*. 1996 Sep 1 ;56(17) :4063-70.
- Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE, Carrozza MJ, Shevde LA, Workman JL, Eckert KA, Verderame MF, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem*. 2004 Jan 9 ;279(2) :1562-9.
- Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol*. 2001 Jul ;159(1) :17-20.
- Mehlen P, Puisieux A. Metastasis : a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jun ;6(6) :449-58.
- Mendes O, Kim HT, Lungu G, Stoica G. MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. *Clin Exp Metastasis*. 2007 ;24(5) :341-51.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15 ;10(24) :8152-62.
- Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, Foekens JA, van de Vijver M, Massagué J. Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 17 ;104(16) :6740-5.
- Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, Miyazaki K. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2005 Jan 31 ;92(2) :252-8.
- Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov ;4(11) :839-49.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar 1 ;410(6824) :50-6.
- Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernández-Contreras ME, Gamallo C. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity : an indicator of poor prognosis. *Cancer*. 2005 Mar 1 ;103(5) :960-9.
- Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res*. 2002 Dec 15 ;62(24) :7328-34.
- Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15 ;10(12 Pt 1) :4125-33.
- Nash KT, Welch DR. The KISS1 metastasis suppressor : mechanistic insights and clinical utility. *Front Biosci*. 2006 Jan 1 ;11 :647-59.

- Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, Watnick RS, Straume O, Akslen LA, Folkman J, Almog N. A model of human tumor dormancy : an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Mar 1 ;98(5) :316-25.
- Naumov GN, MacDonald IC, Weinmeister PM, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Wilson SM, Morris VL, Groom AC, Chambers AF. Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site : a possible contributor to dormancy. *Cancer Res.* 2002 Apr 1 ;62(7) :2162-8.
- Naumov GN, Wilson SM, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC, Hoffman RM, Chambers AF. Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy, to monitor steps in tumor metastasis. *J Cell Sci.* 1999 Jun ;112 ( Pt 12) :1835-42.
- Neil JR, Schiemann WP. Altered TAB1 :I kappaB kinase interaction promotes transforming growth factor beta-mediated nuclear factor-kappaB activation during breast cancer progression. *Cancer Res.* 2008 Mar 1 ;68(5) :1462-70.
- Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet.* 2007 May ;8(5) :341-52.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* 1999 Nov 1 ;147(3) :631-44.
- Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis : Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell.* 2006 Nov ;10(5) :355-62.
- Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol.* 2000 Aug 24 ;10(16) :1009-12.
- Oft M, Akhurst RJ, Balmain A. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat Cell Biol.* 2002 Jul ;4(7) :487-94.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2001 May 31 ;411(6837) :613-7.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994 Oct 21 ;79(2) :315-28.
- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jörke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Höffken K. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 10 ;26(8) :1208-15.
- Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massagué J. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 2008 Apr 4 ;133(1) :66-77.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989 Aug ;8(2) :98-101.
- Palacios J, Benito N, Pizarro A, Suárez A, Espada J, Cano A, Gamallo C. Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Am J Pathol.* 1995 Mar ;146(3) :605-12.
- Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O, Thetter O, Riethmüller G. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1993 Mar 1 ;53(5) :1027-31.
- Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA, Cano A. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci.* 2004 Jun 1 ;117(Pt 13) :2827-39.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression : an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007 Jun ;7(6) :415-28.
- Perrais M, Chen X, Perez-Moreno M, Gumbiner BM. E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. *Mol Biol Cell.* 2007 Jun ;18(6) :2013-25.
- Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Rønnev-Jessen L. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol.* 2003 Feb ;162(2) :391-402.
- Pierga JY, Bidard FC, Denis MG, de Cremoux P. Prognostic value of peripheral blood double detection of CK19 and MUC1 mRNA positive cells detected by RT-quantitative PCR in 94 breast cancer patients with a follow up of 9 years. *Mol Oncol.* 2007 Dec ;1(3) :267-268.
- Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloue S, Giachetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vincent-Salomon A, Marty M. Circulating tumor cell detection predicts early relapse after neoadjuvant chemotherapy in operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res.* 2008 in press.
- Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelénat H. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Feb 15 ;10(4) :1392-400.
- Pocard M, Chevillard S, Villaudy J, Poupon MF, Dutrillaux B, Remvikos Y. Different p53 mutations produce distinct effects on the ability of colon carcinoma cells to become blocked at the G1/S boundary after irradiation.

- Oncogene. 1996 Feb 15;12(4) :875-82.
- Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmüller G, Pantel K. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors : establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res.* 1999 Jan 1 ;59(1) :241-8.
- Ramachandra M, Atencio I, Rahman A, Vaillancourt M, Zou A, Avanzini J, Wills K, Bookstein R, Shabram P. Restoration of transforming growth factor Beta signaling by functional expression of smad4 induces anoikis. *Cancer Res.* 2002 Nov 1 ;62(21) :6045-51.
- Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ, et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet.* 1983 Dec 3 ;2(8362) :1271-4.
- Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IM, King CR, Liotta LA, Steeg PS. Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature.* 1989 Nov 9 ;342(6246) :177-80.
- Ruiter DJ, van Krieken JH, van Muijen GN, de Waal RM. Tumour metastasis : is tissue an issue? *Lancet Oncol.* 2001 Feb ;2(2) :109-12.
- Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct ;7(10) :737-49.
- Samant RS, Clark DW, Fillmore RA, Cicek M, Metge BJ, Chandramouli KH, Chambers AF, Casey G, Welch DR, Shevde LA. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF-kappaB activation. *Mol Cancer.* 2007 Jan 16 ;6 :6.
- Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, Zhou Z, Winter CR, Welch DR, Donahue HJ. Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospesific and heterospesific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res.* 2001 Mar 1 ;61(5) :1765-7.
- Schlimok G, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Witte J, Riethmüller G. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer : immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance. *J Clin Oncol.* 1990 May ;8(5) :831-7.
- Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow : in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec ;84(23) :8672-6.
- Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmüller G. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer : methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer.* 1991 ;27(11) :1461-5.
- Schlüter K, Gassmann P, Enns A, Korb T, Hemping-Bovenkerk A, Hölzen J, Haier J. Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. *Am J Pathol.* 2006 Sep ;169(3) :1064-73.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmüller G, Eils R, Klein CA. From latent disseminated cells to overt metastasis : genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24 ;100(13) :7737-42.
- Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A. E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2004 Jul 15 ;23(32) :5532-42.
- Seraj MJ, Harding MA, Gildea JJ, Welch DR, Theodorescu D. The relationship of BRMS1 and RhoGDI2 gene expression to metastatic potential in lineage related human bladder cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis.* 2000 ;18(6) :519-25.
- Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, Welch DR. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res.* 2000 Jun 1 ;60(11) :2764-9.
- Serrati S, Margheri F, Fibbi G, Di Cara G, Minafra L, Pucci-Minafra I, Liotta F, Annunziato F, Pucci M, Del Rosso M. Endothelial cells and normal breast epithelial cells enhance invasion of breast carcinoma cells by CXCR-4-dependent up-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR, CD87) expression. *J Pathol.* 2008 Apr ;214(5) :545-54.
- Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling : a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 8 ;102(6) :2129-34.
- Shekhar MP, Santner S, Carolin KA, Tait L. Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *Am J Pathol.* 2007 May ;170(5) :1546-60.
- Sherley JL. Metastasis : objections to the same-gene model. *Nature.* 2002 Oct 10 ;419(6907) :560.
- Smid M, Wang Y, Klijn JG, Sieuwerts AM, Zhang Y, Atkins D, Martens JW, Foekens JA. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J Clin Oncol.* 2006 May 20 ;24(15) :2261-7.
- Stasinopoulos I, O'Brien DR, Wildes F, Glunde K, Bhujwala ZM. Silencing of cyclooxygenase-2 inhibits metastasis and delays tumor onset of poorly differentiated metastatic breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2007 May ;5(5) :435-42.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst.* 1988 Apr 6 ;80(3) :200-4.

- Steege PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jan ;3(1) :55-63.
- Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol*. 2001 Sep 17 ;154(6) :1185-96.
- Sugino T, Kusakabe T, Hoshi N, Yamaguchi T, Kawaguchi T, Goodison S, Sekimata M, Homma Y, Suzuki T. An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis : a new murine mammary tumor model. *Am J Pathol*. 2002 Jun ;160(6) :1973-80.
- Takahashi M, Sugiura T, Abe M, Ishii K, Shirasuna K. Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *Int J Cancer*. 2007 Nov 1 ;121(9) :1919-29.
- Talmadge JE, Benedict K, Madsen J, Fidler IJ. Development of biological diversity and susceptibility to chemotherapy in murine cancer metastases. *Cancer Res*. 1984 Sep ;44(9) :3801-5.
- Talmadge JE, Wolman SR, Fidler IJ. Evidence for the clonal origin of spontaneous metastases. *Science*. 1982 Jul 23 ;217(4557) :361-3.
- Talmadge JE. Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res*. 2007 Dec 15 ;67(24) :11471-5.
- Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, Souter RG, Vass AC, Crossley B. Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res*. 1984 Aug ;44(8) :3584-92.
- Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, Oxford G, Hampton GM, Frierson HF Jr. Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 1 ;10(11) :3800-6.
- Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb ;7(2) :131-42.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun ;2(6) :442-54.
- Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis : a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*. 2005 Jul 15 ;65(14) :5991-5.
- Titus B, Frierson HF Jr, Conaway M, Ching K, Guise T, Chirgwin J, Hampton G, Theodorescu D. Endothelin axis is a target of the lung metastasis suppressor gene RhoGDI2. *Cancer Res*. 2005 Aug 15 ;65(16) :7320-7.
- Tomlinson JS, Alpaugh ML, Barsky SH. An intact overexpressed E-cadherin/alpha,beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma. *Cancer Res*. 2001 Jul 1 ;61(13) :5231-41.
- Tran NL, Nagle RB, Cress AE, Heimark RL. N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with Stromal cells. *Am J Pathol*. 1999 Sep ;155(3) :787-98.
- Tselepis C, Chidgey M, North A, Garrod D. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7 ;95(14) :8064-9.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19 ;347(25) :1999-2009.
- van Golen KL, Bao L, DiVito MM, Wu Z, Prendergast GC, Merajver SD. Reversion of RhoC GTPase-induced inflammatory breast cancer phenotype by treatment with a farnesyl transferase inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2002 Jun ;1(8) :575-83.
- Varghese HJ, Davidson MT, MacDonald IC, Wilson SM, Nadkarni KV, Groom AC, Chambers AF. Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. *Cancer Res*. 2002 Feb 1 ;62(3) :887-91.
- Vincent-Salomon A, Pierga JY, Couturier J, d'Enghien CD, Nos C, Sigal-Zafrani B, Lae M, Fréneaux P, Diéras V, Thiéry JP, Sastre-Garau X. HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases : a possible tool for anti-HER2 therapy management? *Br J Cancer*. 2007 Feb 26 ;96(4) :654-9.
- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 1991 Jul 12 ;66(1) :107-19.
- Wang W, Mounieimne G, Sidani M, Wyckoff J, Chen X, Makris A, Goswami S, Bresnick AR, Condeelis JS. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol*. 2006 May 8 ;173(3) :395-404.
- Wang X, Belguise K, Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, Galtier F, Chalbos D, Sonenshein GE. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol*. 2007 Apr ;9(4) :470-8.
- Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder ME, Yu J, Jatkoet T, Berns EM, Atkins D, Foekens JA. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005 Feb 19-25 ;365(9460) :671-9.
- Wei M, Tai G, Gao Y, Li N, Huang B, Zhou Y, Hao S, Zeng X. Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized platelets under dynamic flow conditions. *J Biol Chem*. 2004 Jul 9 ;279(28) :29202-10.
- Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Oct 15 ;65(20) :9155-8.

- Weinhold KJ, Miller DA, Wheelock EF. The tumor dormant state. Comparison of L5178Y cells used to establish dormancy with those that emerge after its termination. *J Exp Med*. 1979 Mar 1;149(3) :745-57.
- Weiss L, Dimitrov DS, Angelova M. The hemodynamic destruction of intravascular cancer cells in relation to myocardial metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Sep;82(17) :5737-41.
- Weiss L, Elkin G, Barbera-Guillem E. The differential resistance of B16 wild-type and F10 cells to mechanical trauma in vitro. *Invasion Metastasis*. 1993;13(2) :92-101.
- Welch DR. Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? *Breast Dis*. 2006-2007;26 :3-12.
- Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15;21(18) :3469-78.
- Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*. 2007 Aug;9(8) :893-904.
- Wong AS, Gumbiner BM. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol*. 2003 Jun 23;161(6) :1191-203.
- Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK, Molavi DW, Taylor ME, Teo WW, Griffin C, Fetting J, Davidson NE, De Marzo AM, Hicks JL, Chitale D, Ladanyi M, Sukumar S, Argani P. Heterogeneity of breast cancer metastases : comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res*. 2008 Apr 1;14(7) :1938-46.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19) :7022-9.
- Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE. A critical step in metastasis : in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res*. 2000 May 1;60(9) :2504-11.
- Xia W, Unger P, Miller L, Nelson J, Gelman IH. The Src-suppressed C kinase substrate, SSeCKS, is a potential metastasis inhibitor in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001 Jul 15;61(14) :5644-51.
- Xin W, Yun KJ, Ricci F, Zahurak M, Qiu W, Su GH, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA. MAP2K4/MKK4 expression in pancreatic cancer : genetic validation of immunohistochemistry and relationship to disease course. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24) :8516-20.
- Yamada SD, Hickson JA, Hrobowski Y, Vander Griend DJ, Benson D, Montag A, Karrison T, Huo D, Rutgers J, Adams S, Rinker-Schaeffer CW. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) acts as a metastasis suppressor gene in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22) :6717-23.
- Yamashiro S, Urano T, Shiku H, Furukawa K. Alteration of nm23 gene expression during the induced differentiation of human leukemia cell lines. *Oncogene*. 1994 Sep;9(9) :2461-8.
- Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci*. 2005 Jul;96(7) :379-86.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004 Jun 25;117(7) :927-39.
- Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Li Z, Broglio K, Berry DA, Hung MC. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol*. 2006 Oct;26(19) :7269-82.
- Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13) :5284-8.
- Yoshida BA, Dubauskas Z, Chekmareva MA, Christiano TR, Stadler WM, Rinker-Schaeffer CW. Mitogen-activated protein kinase kinase 4/stress-activated protein/Erk kinase 1 (MKK4/SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17. *Cancer Res*. 1999 Nov 1;59(21) :5483-7.
- Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005 Aug 29;24(37) :5764-74.

# Abbréviations

Les noms « historiques » (ex : « *non metastatic clone 23* » pour nm23) des gènes ou des protéines ne sont pas rapportés ici, ces noms n'étant pas utilisés de manière courante. Les abbréviations utilisées correspondent à des abbréviations françaises, mais les termes anglais (« CGH ») utilisés quotidiennement ont été maintenus.

ADN : Acide désoxyribonucléique  
ATCC : American type cell collection  
CGH : Comparative genomic hybridization  
COX2 : Cyclo-oxygénase 2  
CTC : Cellules tumorales circulantes  
DTC : Cellules tumorales disséminées  
EMT : Epithelio-mésenchymateuse transition  
FACS : Fluorescence activated cell sorting  
HSV-TK : Thymidine kinase de l'herpes simplex virus  
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell  
LPA : Lysophosphatidic acid  
MAPK : Mitogen-activated protein kinases  
MEC : Matrice extra-cellulaire  
MET : Mésenchymateuse-épithéliale transition  
MM : Micrométastases médullaires  
MSI : Microsatellite instability  
PCR : Polymerase chain reaction  
PGE2 : Prostaglandine E2  
PHRC : Programme hospitalier de recherche clinique  
PI3K : Phosphatidil-inositol 3 phosphate kinase  
RNA microarray : Ribonucléic acid microarray  
RT-PCR : Reverse transcription - polymerase chain reaction  
SAM : Significance analysis of microarrays

# Remerciements

Ces travaux de DEA et thèse se sont déroulés, parfois entre, parfois en parallèle de mes années d'étude de Médecine, dans la suite d'un double cursus entre le CHU Pitié-Salpêtrière et l'Ecole Normale Supérieure. **Le docteur Marie-France Poupon** m'a donc supporté depuis mes 21 ans ; je la remercie particulièrement de m'avoir fait bénéficier de sa confiance, de son expérience et de son pragmatisme optimiste multi-résistant et me souviens de la devise accrochée dans son bureau en 2000/2001 :

« Quand le seul outil que l'on a est un marteau, tout ressemble à un clou. »

J'ai essayé de persévérer dans cette voie là ! Le domaine de la dissémination métastatique est réellement passionnant, peut-être en partie car il ne correspond souvent plus à des mécanismes génétiques précisément définis, et permet de ré-envisager la notion de population cellulaire. Par la suite, j'ai pu découvrir tout l'intérêt des micrométases médullaires, tout aussi « *anti-switch* » (pour ne pas détailler), auprès du **Professeur Jean-Yves Pierga** et du **Docteur Anne Vincent-Salomon**. C'est aussi grâce à eux que j'ai pu participer à l'élaboration des projets micrométastases et cellules tumorales circulantes envisagés à l'Institut Curie.

Je tiens par ailleurs à exprimer de sincères remerciements aux **membres du Jury** qui ont accepté de juger ce travail :

**Monsieur le Professeur Jean-Charles Soria**, qui a accepté de présider le jury

**Messieurs les Professeurs Dominique Bellet** et **Marc Mareel**, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Dernier du « Groupe » à soutenir ma thèse, je salue ici très bas les docteurs ès Sciences Josselin Noirel, Olivier Crauk et *Il Professore* Julien Gabelli. Au laboratoire, je ne peux que souligner l'excellente tenue de Franck Assayag dans son rôle « Allo, Dakopen-service, j'écoute ? »... Enfin, je remercie, outre tous les amis qui pourraient être cités ici, Florence Huguet qui n'a jamais complètement perdu de vue l'avancée de ces travaux.



## Résumé

La formation de métastases est un processus comportant de multiples étapes, présentées par le paradigme actuel comme devant être franchies séquentiellement par une (des) cellule(s) possédant l'ensemble des capacités génétiques et phénotypiques requises par ce processus sélectif. Les déterminants génétiques responsables de l'acquisition du phénotype métastatique restent cependant incomplètement déterminés à ce jour.

Une première approche, dans un modèle *in vivo* de cancer colo-rectal humain, démontre qu'il existe une coopération entre cellules tumorales métastatiques et non métastatiques. Nous rapportons l'existence d'une colonisation spécifique des métastases (établies par des cellules caractérisées par leur potentiel métastatique) par des cellules tumorales incapables de métastaser seules. Cette colonisation des métastases n'est pas due à l'existence d'embols tumoraux mixtes (qui seraient faits de cellules métastatiques et non métastatiques), ni à l'induction d'un switch métastatique pérenne au sein des cellules tumorales non métastatiques. Cette observation remet fortement en cause le modèle actuel selon lequel les métastases ne seraient formées que par un sous-clone précis de la tumeur primitive et introduit la notion nouvelle de coopération intercellulaire.

Une deuxième approche concerne les cellules tumorales disséminées (DTC) dans la moelle hématopoïétique (micrométastases médullaires) dans une cohorte de plus de 800 patientes présentant un cancer du sein. L'existence des DTC, génétiquement hétérogènes et ne donnant pas obligatoirement lieu à une croissance tumorale secondaire, reste en effet inexplicée par la théorie prévalente de la « sélection clonale ». En situation adjuvante (n=621), nous rapportons que les DTC ont un impact pronostique fort et indépendant sur la survie sans métastase et la survie globale, mais aussi sur la survie sans récurrence loco-régionale. Une analyse complémentaire des récurrences loco-régionales suggère que l'existence de DTC est associée à une dissémination ganglionnaire nécessitant un traitement par radiothérapie étendu aux aires ganglionnaires sus-claviculaires et mammaires internes. En situation métastatique (n=138), nous montrons que les DTC n'ont plus d'impact pronostique, au contraire des cellules tumorales circulantes. Nous rapportons par ailleurs que l'existence de ces cellules disséminées (et potentiellement dormantes) sont associées à un temps jusqu'à la rechute métastatique plus long, suggérant l'existence d'un processus alternatif à la dissémination/dormance, potentiellement plus rapide.

Nos travaux montrent donc les limites de la théorie de la sélection clonale et suggèrent l'existence d'une coopération intercellulaire ainsi que de possibles voies alternatives de dissémination micrométastatique. Les progrès futurs nécessiteront probablement l'analyse intégrée des différentes étapes du processus métastatique qui sont devenues récemment accessibles : tumeur primitive, cellules tumorales circulantes, DTC et macrométastases finales.