



HAL
open science

Identification et caractérisation des cellules tumorales circulantes dans le cancer rénal à cellules claires

Basma Ben Njima Gloulou

► **To cite this version:**

Basma Ben Njima Gloulou. Identification et caractérisation des cellules tumorales circulantes dans le cancer rénal à cellules claires. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V; Université de Tunis El Manar, 2012. Français. NNT : 2012PA05T077 . tel-00806775

HAL Id: tel-00806775

<https://theses.hal.science/tel-00806775>

Submitted on 2 Apr 2013

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 Tunis el Manar

Université Paris Descartes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale : Gc2Id

Discipline : Génétique Humaine

Présentée et soutenue publiquement par :

Mme BEN NJIMA BASMA

27 MARS 2012

Identification et Caractérisation des Cellules Tumorales Circulantes dans le Cancer Rénal à Cellules Claires

Jury :

Pr. Michèle EL MAY

Président

Dr. Patricia DE CREMOUX

Rapporteur

Pr. Faiza FAKHFAKH

Rapporteur

Pr. Paul HOFMAN

Examineur

Pr. Habiba BOUHAMED- CHAABOUNI

Directeur de thèse

Pr. Patrizia PATERLINI- BRECHOT

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse fait suite à une collaboration entre le Laboratoire de Génétique Humaine (Faculté de Médecine de Tunis – Université Tunis El Manar) et l'Unité INSERM U807 (Faculté de Médecine Necker Enfants Malades – Université Paris Descartes), dans le cadre d'une cotutelle.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à mes deux directeurs de thèse, Professeur **Habiba BOUHAMED - CHAABOUNI** et Professeur **Patrizia PATERLINI- BRECHOT** pour avoir soutenu ce projet.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur **Habiba BOUHAMED - CHAABOUNI** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir accordée toute sa confiance, pour sa rigueur scientifique, ses conseils et pour la grande liberté qu'elle a su me laisser dans la gestion de ce projet.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse le Professeur **Patrizia PATERLINI- BRECHOT** pour son soutien tout au long de la thèse. Sa rigueur scientifique et ses remarquables compétences qui ont permis l'accomplissement de ce travail et ont facilité la progression de mes recherches.

Je tiens à remercier vivement les membres de mon jury en commençant par les rapporteurs, le Professeur **Faiza FAKHFAKH** et le Docteur **Patricia DE CREMOUX** pour leur lecture attentive de ce manuscrit et pour leurs remarques constructives et pertinentes.

Mes sincères remerciements vont également au Professeur **Michèle EL MAY** et au Professeur **Paul HOFMAN** pour l'intérêt que vous accordez à ce travail et pour avoir eu l'amabilité de l'examiner et le juger.

Je suis très honorée de vous compter parmi les membres du jury.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude aux membres du Laboratoire de Génétique Humaine, particulièrement au Pr. Ridha Mrad, Dr Maher KHARRAT, Mme Imen LARIANI, Mr Riadh Mokhtar et toute l'équipe du laboratoire, tant pour leurs qualités scientifiques que pour leur bonne humeur qui ont contribué à un quotidien captivant.

Par ailleurs, mes sincères remerciements vont aux membres de l'équipe INSERM U807 qui ont été d'un soutien constant au cours de la thèse. Je tiens à citer particulièrement Mme Colette DENOLF pour sa précieuse aide sur le plan administratif et sa grande gentillesse.

Je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de ces deux équipes, avec des collègues qui ont su maintenir une très bonne ambiance et qui m'ont supporté et épaulé pendant ces cinq années. J'en remercie ici tous les membres (Wided, Imen, Manel, Leila, Awatef, Raja, Oussema, Mariem, Mr Mustapha, Mme Néziha, Mme Hila, Hussein, Marouan, Wafa, Ali, Ingrid, Rachid, Médiha, Inés, Imen, Casper, Rachida, Eléonore ...)

Aucun mot ne pourra exprimer ma gratitude et tous mes remerciements à ma mère, sans qui tout cela n'aurait pas été possible.

Un grand merci à mon mari, qui a su faire preuve de patience, et de compréhension tout au long de ces années.

Je passe une dédicace spéciale à toute ma famille, à mes ami(e)s, et à toutes les personnes qui ont participé scientifiquement et humainement à la réalisation de mes travaux de thèse.



PLAN

REMERCIEMENTS -----	2
PLAN -----	5
LISTE DES FIGURES -----	11
LISTE DES TABLEAUX -----	15
LISTE DES ABREVIATIONS-----	17
RESUME -----	20
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -----	23
Partie I Les cellules tumorales circulantes CTC-----	24
A - Introduction générale-----	25
B - Historique de découverte des CTC-----	28
C - Caractéristiques des cellules tumorales circulantes -----	30
1) Caractéristiques biologiques -----	30
2) Caractéristiques morphologiques-----	30
3) Caractéristiques génétiques-----	31
D - Les différents types de cellules tumorales -----	32
1) Les cellules tumorales disséminées (CTD)-----	32
2) Les cellules tumorales circulantes (CTC)-----	33
E - Intérêt du dépistage précoce des CTC en oncologie -----	35
Partie II Le cancer rénal -----	38
A - Définition -----	39
B - Epidémiologie-----	40
C - Facteurs de risque -----	41
D - Classification -----	42
1) Classification anatomopathologique -----	42
2) Classification TNM des carcinomes rénaux -----	45
3) Classification cytologique de Fuhrman -----	47
E - Clinique-----	47
1) Circonstances de découvertes -----	47
2) Examens Para Clinique -----	49
F - Génétique du RCC-----	53
1) La maladie de Von Hippel Lindau -----	54

2)	Le gène <i>VHL</i> -----	59
3)	Mode de fonctionnement de la protéine pVHL-----	61
G -	Traitement-----	71
1)	La néphrectomie élargie -----	72
2)	La néphrectomie partielle -----	72
3)	Les traitements conservateurs -----	74
H -	La thérapie ciblée -----	75
Partie III	ISET nouvelle approche-----	78
A -	Historique-----	78
B -	But de la méthode -----	78
C -	Caractéristiques de L'ISET-----	79
D -	Les applications de l'ISET -----	80
E -	Les étapes de l'ISET-----	80
1)	Traitement du sang-----	80
2)	La microdissection (Système de NIKON®)-----	81
3)	La lyse de la cellule unique -----	84
4)	Expansion linéaire du génome d'une cellule unique (PEP)-----	84
5)	PCR sur cellule unique (PCR single cell)-----	84
6)	Analyse génétique des CTC-----	85
F -	Comparaison entre ISET et différentes méthodes de détection des CTC -----	86
1)	Les méthodes indirectes -----	86
a)	Les méthodes indirectes d'immuno-détection -----	86
b)	Les méthodes indirectes moléculaires-----	87
2)	Les méthodes directes-----	89
MATERIEL ET METHODES	-----	91
Partie I	Matériel -----	92
A -	Caractéristiques des patients -----	92
B -	Caractéristiques des cellules tumorales circulantes étudiées -----	93
C -	Caractéristiques des échantillons de tumeurs -----	94
D -	Cellules sanguines normales -----	95
Partie II	Méthodes-----	96
A -	Mise en évidence des CTC par la méthode ISET -----	96

1)	Prélèvement sanguin -----	96
2)	La microdissection laser par le système de NIKON® -----	97
3)	La lyse cellulaire -----	97
a)	Protocole de lyse -----	98
b)	Durée et température de la lyse -----	98
4)	Expansion linéaire du génome d'une cellule unique (PEP) -----	98
a)	Protocole de la PEP -----	99
b)	Programme de la PEP -----	99
B -	Extraction de l'ADN à partir de la tumeur -----	100
C -	Extraction de l'ADN à partir de cellules normales -----	100
D -	Etude du gène VHL au niveau des CTC -----	100
1)	Choix des amorces -----	101
2)	Mise au point des PCR -----	102
3)	Protocole des PCR nichées -----	103
4)	Purification des produits des PCR -----	105
5)	Séquençage de l'ADNctc -----	105
a)	Protocole de la réaction de séquence -----	106
b)	Programme de la réaction de séquence -----	106
E -	Etude du gène VHL au niveau de l'ADNt et de l'ADN génomique -----	107
RESULTATS -----		108
Partie I	Mise en évidence des CTC -----	109
A -	Microdissection des cellules -----	109
B -	Caractéristiques des cellules microdisséquées -----	110
C -	Densité moyenne des CTC/ml -----	113
D -	Classification anatomopathologique des cellules microdisséquées -----	115
Partie II	Etude du gène VHL -----	118
A -	Amplification du gène VHL -----	118
B -	Analyse moléculaire du gène VHL -----	120
1)	Les mutations -----	120
a)	Mutation c.27G>T -----	120
b)	Mutation c.53C>A -----	122
c)	Mutation c.183C>G -----	124

d)	Mutation c.194C>A-----	126
e)	Mutation c.205_206delCG -----	127
f)	Mutation c.263G>A-----	128
g)	Mutation c.275delA-----	130
h)	Mutation c.299delC-----	131
i)	Mutation c.327delC -----	132
j)	Mutation c.346C>G-----	133
k)	Mutation c.353T>C-----	134
l)	Mutation c.418delC -----	135
m)	Mutation c.435G>T-----	136
n)	Mutation c.472delC-----	137
o)	Mutation c.486delC-----	138
p)	Mutation c.526A>T-----	140
q)	Mutation c.548C>A-----	141
r)	Mutation c.620C>T -----	142
s)	Absence de mutations -----	143
2)	Répartition des mutations par patient-----	144
3)	Répartition des mutations par exon-----	146
4)	Corrélation entre l'analyse moléculaire et l'analyse cytopathologique -----	148
5)	Aspect cytomorphologique des CTC et CAC avec et sans mutation-----	153
6)	Classification des mutations selon les caractéristiques des patients et des tumeurs-----	156
DISCUSSION -----		158
Partie I	ISET et CTC : intérêts, avantages et inconvénients-----	159
A -	Importance de la détection des CTC-----	159
B -	Avantages de l'ISET-----	162
C -	Inconvénient de l'ISET -----	164
D -	Sensibilité et spécificité de l'ISET-----	165
E -	Conclusion -----	166
Partie II	Etude moléculaire du gène VHL-----	168
A -	Gène VHL et RCC-----	168
B -	Etude des mutations retrouvées -----	169

1)	Localisation des mutations -----	169
2)	Corrélation phénotype-génotype -----	170
a)	Les mutations Non-sens -----	170
b)	Les mutations Faux-sens -----	172
c)	Les doubles mutations -----	173
d)	Pas de mutations -----	173
e)	Conclusion -----	174
C -	Caractéristiques des patients et des tumeurs -----	175
D -	La pVHL -----	176
E -	Conclusion -----	176
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES -----	178
	ANNEXES -----	181
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	184

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Une cellule tumorale entourée de globules rouges.....	24
Figure 2: Processus de cancérisation et de métastases.....	27
Figure 3: Photos de CTC en 1962.	29
Figure 4: Caryotypes d'une cellule normale et d'une cellule tumorale.....	31
Figure 5: Aspect des cellules tumorales circulantes et des microembolus tumoraux.....	34
Figure 6: Représentation schématisée du rein et des structures qui le composent	38
Figure 7: Cancer du rein.	39
Figure 8: Principaux types histologiques de cancer du rein.....	43
Figure 9: Vision au microscope de deux tumeurs rénales à cellules claires	44
Figure 10: Classification TNM 2002 des tumeurs du rein.	46
Figure 11: Tomodensitométrie rénale avec injection de produit de contraste.....	51
Figure 12: Echographies rénales.	51
Figure 13: Urographie intraveineuse (UIV).	52
Figure 14: Fréquence des lésions VHL les plus fréquentes.....	56
Figure 15: Les lésions VHL les plus fréquentes.....	58
Figure 16: Localisation du gène <i>VHL</i> en position 3p25-26.....	59
Figure 17: Schéma du gène <i>VHL</i> et de la protéine pVHL.....	62
Figure 18: Schéma en 3D de la pVHL.....	63
Figure 19: Rôle de pVHL dans la réponse tissulaire à l'hypoxie.....	65
Figure 20: Néphrectomie partielle du rein.....	73
Figure 21: Appareil ISET Figure 22: Filtre ISET.....	81
Figure 23: Système de microdissection laser Nikon.....	83
Figure 24: Etape de microdissection	83
Figure 25: Comparaison de 3 techniques de détection des CTC.	88
Figure 26: Emplacement des amorces utilisées.....	101
Figure 27: Etapes de microdissection des CTC (X40).	109
Figure 28: Exemples de cellules suspectes (X40).	110
Figure 29: CTC de petites tailles appartenant au même patient (X40).....	111
Figure 30: CTC appartenant au même patient (X40).	111
Figure 31: Microembolus tumoral (X40).....	112
Figure 32: Cellules non tumorales (X40).	112
Figure 33: Amplification de l'exon 1 du gène <i>VHL</i> sur single cell.....	118

Figure 34: Amplification de l'exon 2 du gène <i>VHL</i> sur single cell.....	119
Figure 35: Amplification de l'exon 3 du gène <i>VHL</i> sur single cell.....	119
Figure 36: Mutation c.27G>T, codon 9/ Exon 1.	121
Figure 37: CTC portant la mutation c.27G>T.....	121
Figure 38: CTCs portant la mutation c.53C>A.	122
Figure 39: Mutation c.53C>A, codon 18/ Exon1.	123
Figure 40: CTC portant la mutation c.183C>G.	124
Figure 41: Mutation c.183C>G, Codon 61/ Exon 1.....	125
Figure 42: Mutation c.194C>A, codon 65/ Exon 1.	126
Figure 43: CTC portant la mutation c.194C>A.....	126
Figure 44: Mutation c.205_206delCG, codon 69/ Exon 1.....	127
Figure 45: CTC portant la mutation c.205_206delCG.	128
Figure 46: Mutation c.263G>A, codon 88/ Exon 1.....	129
Figure 47: CTCs portant la mutation c.263G>A.....	129
Figure 48: Mutation c.275delA, codon 92/ Exon 1.	130
Figure 49: CAC portant la mutation c.275delA.	130
Figure 50: Mutation c.299delC, codon 100/ Exon 1.	131
Figure 51: CAC portant la mutation c.299delC.....	131
Figure 52: Mutation c.327delC, codon 109/ Exon 1.	132
Figure 53: CACs portant la mutation c.327delC.	132
Figure 54: Mutation c.346C/G, codon 116/ Exon 2.	133
Figure 55: CAC portant la mutation c.346C/G.	133
Figure 56: Mutation c.353T>C, codon 118/ Exon 2.....	134
Figure 57: CTCS et CAC portant la mutation c.353T>C.	135
Figure 58: Mutation c.418delC, codon 140/ Exon 2.	135
Figure 59: CAC portant la mutation c.418delC.....	136
Figure 60: Mutation c.435G>T, codon 145/ Exon 2.	136
Figure 61: CAC portant la mutation c.435G>T	137
Figure 62: Mutation c.472delC, codon 158/ Exon 3.	137
Figure 63: CTC portant la mutation c. 472delC.....	138
Figure 64: Mutation c.486delC, codon 163 / Exon 3.....	139
Figure 65: CTCs et CAC portant la mutation c.486delC.....	139

Figure 66: Mutation c.526A>T, codon 176/ Exon 3.	140
Figure 67: CAC portant la mutation c.526A>T.	140
Figure 68: Mutation c.548C>A, codon 183/ Exon 3.	141
Figure 69: CTCs portant la mutation c.548C>A.	142
Figure 70: Mutation c.620C>T, codon 207/ Exon 3.....	142
Figure 71: CTC portant la mutation c.620C>T.	143
Figure 72: ADNt, insertion d'un T au niveau de l'intron 1.....	143
Figure 73: CTC et CAC sans mutations.	144
Figure 74: CTC confirmées par analyse moléculaire.	153
Figure 75: Aspect morphologique des CTC et CAC.	155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Tableau des mutations du gène <i>VHL</i>	60
Tableau 2: Corrélation génotype/ phénotype de la maladie VHL.....	69
Tableau 3: Type et nombre de filtres des patients	93
Tableau 4: Nombre de filtres colorés et analysés par patient.	94
Tableau 5: Caractéristiques invasives des tumeurs.	95
Tableau 6: Amorces du gène <i>VHL</i>	102
Tableau 7: Conditions de mise au point des PCR.....	102
Tableau 8: Nombre de cellules microdisséquées par patient.....	113
Tableau 9: Densité des CTC/ ml de sang selon la classification TNM.	114
Tableau 10: Densité des CTC/ ml de sang selon le grade de Fuhrman.	114
Tableau 11: Nombre des CTC PEP+	116
Tableau 12: Classification anatomopathologique des cellules microdisséquées.	117
Tableau 13: classification des mutations VHL retrouvées.	120
Tableau 14: Caractéristiques des mutations VHL par patient.	145
Tableau 15: Répartition des mutations VHL par patient.	146
Tableau 16: Caractéristiques des mutations VHL retrouvées.....	147
Tableau 17: Nombre et localisation des mutations VHL par cellule.....	148
Tableau 18: Validation moléculaire des CTC et CAC par patient.	152
Tableau 19: Classification des mutations selon les caractéristiques des patients et des tumeurs.	157

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Adénine	EMT : Epithelial to M esenchymal T ransition
a.a. : Acides aminés	EpCAM : Epithelial C ell A dhesion M olecule
ADN : Acide D ésoxyribo N ucléique	EPO : Erythropoïétin
ADNctc : ADN extrait à partir de CTC	F : Forward
ADNt : ADN extrait à partir du tissu tumoral	FGF : Fibroblast G rowth F actor
AhR : Récepteur Intracellulaire	FH : Fumarate H ydration
Ala :Alanine	FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence
Arg : Arginine	FNS : Formule N umération S anguine
ARN : Acide R ibo N ucléique	G : Guanine
ARNm : Acide Ribonucléique M essenger	Gln : Glutamine
ARNs : Acide Ribonucléique S imple brin	Glu : Acide G lutamique
ARNT : Acide Ribonucléique de T ransfert	Glu1 : Glutamate S ynthase 1
Asn : Asparagine	Gly : Glycine
Asp : Acide A spartique	HIF : Hypoxia I nducible F actor
ATG : Méthionine	HIFU : Ultrasons de H autes I ntensités F ocalisé
ATP : Adénosine T ri P hosphate	His : Histidine
BET : Bromure d' E thidium	HRE : Hypoxia R esponse E lement
BHD : Syndrome de B irt- H ogg- D ubé	HTA : Hypertension A rtérielle
bp : Paire de b ase	IRM : Imagerie par R ésonance M agnétique
C : Cytosine	Ile : Isoleucine
C1 : Complexe 1	ISET : Isolation by S ize of E pithelial
C2 : Complexe 2	Tumor/Trophoblastic Cells
CAC : Cellules A typiques C irculantes	Jun-β : Antagonist d ec- J un
CBP : C reb B inding P rotein	kb : Kilo B ase
CCRC : Carcinome à C ellules R énales C laires	Kcl : Chlorure de P otassium
CCRCH : Carcinome C hromophobe	kD : Kilo D alton
CCRTC : C ancer M édullaire du R ein	kHz : Kilohertz
CCRTP : Carcinome p apillaire	KOH : Hydroxyde de P otassium
CDK4 : C yclin D ependant K inase	LCM : L aser C apture M icrodissection
CDKN-2 : C yclin- D ependant K inase 2A I nhibitor	Leu : Leucine
CEC : Circulating E ndothelial C ell	Lys : Lysine
CGH : C omparative G enomic H ybridization	Met : M esenchymal- E pithelial T ransition F actor
CK : Cytokératine	Met : Méthionine
CTC : C ellule T umorale C irculante	Mgcl2 : Chlorure de M agnésium
CTD : C ellules T umorales D isséminées	ml : Millilitres
CTM : M icroembolies T umorales	MM : M asse M oléculaire
cul2 : Culline 2	mm : Millimètre
Cys : Cystéine	mTOR : M ammalian T arget O f R apamycin
Da : Dalton	NASBA : N ucleic A cid S equence B ased
DBD : D NA B inding D omain	Amplification
dNTP : D ésoxy N ucléotides T ri P hosphates	ODDD : O xygen D ependent D egradation
DO : D ensité O ptique	Domain
ECBU : E xamen C ytobactériologique des U rines	PBS : P hosphate B uffer S aline
EDTA : A cide E thylène D iamine T étraacétique	PCR : P olymerase C hain R eaction
EGF : E pidermal G rowth F actor	PDGF-β : P latelet- D erived G rowth F actor

Subunit β
PEP: Primer Extension Preamplification
PFS: Temps de Survie Sans Progression
PH : Pleckstrin Homology
Phe: Phenylalanine
PKC: Protéines Kinases C
Pro : Proline
pVHL: Proteine Von Hippel-Lindau
R : Reverse
Rbx1: Ring-Box Protein 1
RCC: Carcinomes à Cellules Rénales
RFA: Radio Fréquence
rpm: Rotations Par Minutes
RT-PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR: Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
sec: Seconde
Ser : Sérine
SNC: Système Nerveux Central
T : Thymine
TBE : Tris Borate EDTA
TD: PCR Touch-Down
TDM: Tomodensitométrie
TGF- α : Transforming Growth Factor α
TH ou TrX-His : Thiorédoxine-Histidine
Thr: Thréonine
Tm : Température de Fusion
TNE: Tumeur NeuroEndocrine
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
Trp : Tryptophane
TTP: Temps de Progression
TUNEL: Terminal Uridine Nick End Labeling
Tyr: Tyrosine
U.V. : Ultra Violets
UIV: Urographie Intraveineuse
Val : Valine
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
VEGFR-2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VEGFR-3: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
VGP : Vertical Growth Factor
VHL : Von Hippel-Lindau

VS: Vitesse de Sédimentation

RESUME

La diffusion dans le sang des cellules tumorales à partir de la tumeur primitive est le signe le plus important et le plus précoce de l'invasivité tumorale. Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont un indicateur de risque de développement de métastases, par conséquent, la capacité à les détecter de façon très sensible et spécifique est censée constituer un test cliniquement important pour le pronostic du cancer, le suivi des patients et la personnalisation de la thérapie. Les CTC sont extrêmement rares, et plusieurs techniques ont été mises en place pour les détecter. La difficulté réside dans le pouvoir d'isoler environ une CTC mélangée à approximativement 10 millions de leucocytes et à 5 milliards d'érythrocytes dans 1 ml de sang. La technique ISET (Isolation by size of Epithelial/Tumoral cell) est une technique de détection des CTC qui se base sur le principe de filtration par la taille des cellules. Cette technique a montré une très grande sensibilité et une spécificité dans 80% des tests effectués.

Le cancer du rein représente 3% des cancers de l'adulte, dans 75% des cas il s'agit d'un carcinome rénal à cellules claires (RCC). Sur le plan génétique, il est un des rarissimes cancers solides caractérisé par des variations de l'ADN au niveau du gène *VHL*.

Ce projet de recherche porte sur l'application de la technique ISET dans la recherche des CTC au niveau du cancer rénal à cellules claires et la démonstration moléculaire du caractère malin de ces CTC isolées à partir du sang de patients et préalablement identifiées par analyse cytopathologique. Cette démonstration a été effectuée par une étude du génome de ces CTC et sa comparaison au génome des tumeurs primaires. Notre étude a porté sur 30 patients ayant bénéficié d'un isolement de leur CTC par la technique ISET avant toute intervention chirurgicale afin d'identifier les CTC issues de la circulation spontanée. L'analyse génétique a portée sur la recherche des mutations du gène *VHL* au niveau de l'ADN de 205 cellules, de l'ADN issu du tissu tumoral et de l'ADN génomique de chaque patient.

Cent soixante et une cellules ont présenté des variations génétiques du gène *VHL* identiques à l'ADN issu du tissu tumoral. Il s'agit de 18 mutations différentes affectant les 3 exons du gène *VHL*. Nos résultats démontrent que 78.5% des cellules étudiées présentent des mutations identiques à celles retrouvées au niveau des tumeurs primaires, ce qui nous permet de valider la nature tumorale de ces cellules grâce à la double analyse cytopathologique et moléculaire. L'inactivation génique du gène *VHL* par mutations peut être considérée comme l'un des principaux mécanismes moléculaires dans le

développement de RCC humains sporadiques. Nos résultats indiquent que les CTC circulent fréquemment dans le sang des patients avec RCC et qu'elles sont souvent caractérisées par des mutations du gène *VHL*.

En effet, la détection et la caractérisation des CTC peut offrir une nouvelle approche pronostique chez les patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires. Elle est susceptible d'être utilisée pour l'estimation du risque de récurrence et/ou de métastases de différentes tumeurs et dans la stratification des patients en vue de leur traitement, pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le suivi de thérapies systémiques anticancéreuses. L'isolement et la caractérisation des CTC représentent un nouvel espoir en oncologie prédictive et non invasive.

Nos résultats apportent des éléments moléculaires au diagnostic cytopathologique des CTC. Ils peuvent ainsi contribuer à la mise au point d'un test prédictif et pronostic pour les patients avec RCC. Nous avons en effet exploité les caractéristiques moléculaires de ce cancer, les mutations *VHL*, pour l'identification des CTC par une approche innovante de cytopathologie moléculaire. Ce travail novateur permet de faire progresser le diagnostic cytopathologique des CTC. Les retombées sont susceptibles de dépasser le domaine du RCC et de s'appliquer aux CTC dans d'autres types de cancer. En effet, le marqueur CTC est un marqueur unique en oncologie prédictive. Son identification diagnostique, à laquelle nos résultats contribuent, pourra améliorer sa spécificité et son impact clinique.



***INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE***

Partie I Les cellules tumorales circulantes CTC

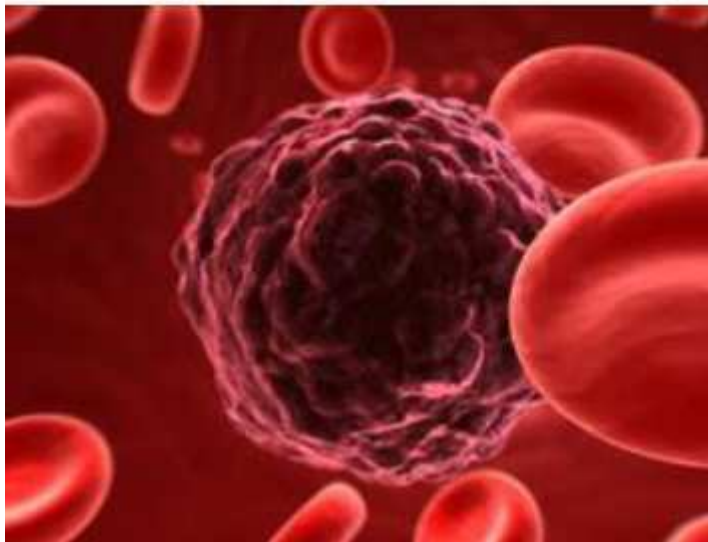


Figure 1: Une cellule tumorale entourée de globules rouges

<http://www.combattrelecancer.e-monsite.com>

A - Introduction générale

Lorsqu'on débute un manuscrit traitant du cancer, on est tout de suite assailli par une multitude de chiffres : 7,6 millions de décès dans le monde par cancer en 2008, première cause de mortalité chez l'homme, Certes que le nombre de malades par cancer ne cesse d'augmenter mais parallèlement la recherche ne cesse de progresser.

En effet, le cancer est un processus cellulaire qui conduit à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Il s'agit d'une transformation cellulaire avec acquisition de nouveaux caractères cellulaires transmissibles aux cellules filles. Cette transformation se caractérise par une prolifération cellulaire importante, monoclonale, autonome, capable de récidives après un traitement mais surtout capable de disséminer des sites métastatiques dans l'organisme. L'apparition de métastases constitue l'élément le plus spécifique du cancer.

L'aspect d'une cellule cancéreuse (Figure 1) est différent d'une cellule normale, tant sur le plan morphologique, génétique que biologique. La cellule tumorale a une durée de vie illimitée, elle effectue un nombre infini de divisions, elle est dépourvue de ses outils de contrôle habituels tel que la réparation de l'ADN ou l'entrée en apoptose lors de la survenue d'anomalies non réparables ou après un certain nombre de divisions.

Tous les types cellulaires peuvent donner naissance à une tumeur, ce qui explique l'existence de plusieurs types de tumeurs au sein d'un même organe.

Le processus de transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale nécessite l'intervention de plusieurs facteurs, ces derniers peuvent être endogènes comme la prédisposition génétique ou exogènes comme les facteurs environnementaux (Tabac, radiations, U.V, agents mutagènes, alcool, virus...). L'altération initiale (mutation, translocation, délétion...) est suivie par l'apparition d'autres anomalies génétiques ce qui va entraîner des gains ou des pertes de certaines fonctions de la cellule comme :

- Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, des systèmes de réparation de l'ADN, de l'apoptose.
- Stimulation des oncogènes et acquisition du caractère d'immortalité conféré par les télomérases.

Ces étapes vont entraîner des modifications des caractéristiques de prolifération, de différenciation, de sénescence et d'apoptose de la cellule. La cellule tumorale va ainsi échapper au contrôle du cycle cellulaire et aux systèmes de réparation de l'ADN.

La cellule tumorale va alors proliférer et donner lieu à une masse tumorale constituée des cellules cancéreuses et du stroma, tissu conjonctif néoformé, fourni par l'hôte, non tumoral, assurant le soutien et la nutrition des cellules tumorales (Figure 2). La tumeur induit ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux présents dans le tissu sain avoisinant afin de faciliter non seulement la croissance de la tumeur, mais aussi la dissémination de cellules cancéreuses vers d'autres organes distants, ce phénomène est appelé angiogénèse.

L'angiogénèse est donc un mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant, il est primordial pour la croissance des tumeurs et le développement des métastases. Lors de la tumorigénèse on distingue deux types de cancer, le cancer non invasif ou « in situ », qui grossit mais ne dépasse pas des limites histologiques précises ; et le cancer invasif qui dépasse ces limites histologiques et devient le siège de dissémination probable de métastases.

Dans le cancer invasif, le volume de la masse tumorale va permettre de rompre la membrane basale et favoriser l'invasion des vaisseaux par les cellules tumorales. Ces cellules tumorales vont passer soit dans la circulation lymphatique et provoquer des carcinomes, soit atteindre la circulation veineuse et provoquer des sarcomes. C'est le début du phénomène de dissémination.

La migration des cellules tumorales à travers les barrières biologiques constitue l'événement dynamique majeur de l'invasion tumorale. Cependant trois évolutions sont possibles lors de la migration dans la circulation sanguine. Ces cellules tumorales devenues circulantes (CTC) peuvent être soit le siège de micro-métastases en dormance jusqu'à un éventuel facteur activateur et se transformer en métastase, soit entrer de suite en extravasation (Figure 2), soit mourir par apoptose (fragilité mécanique des cellules anormales, attaque du système immunitaire...). Il est important de souligner que toutes les CTC ne donnent pas de métastases.

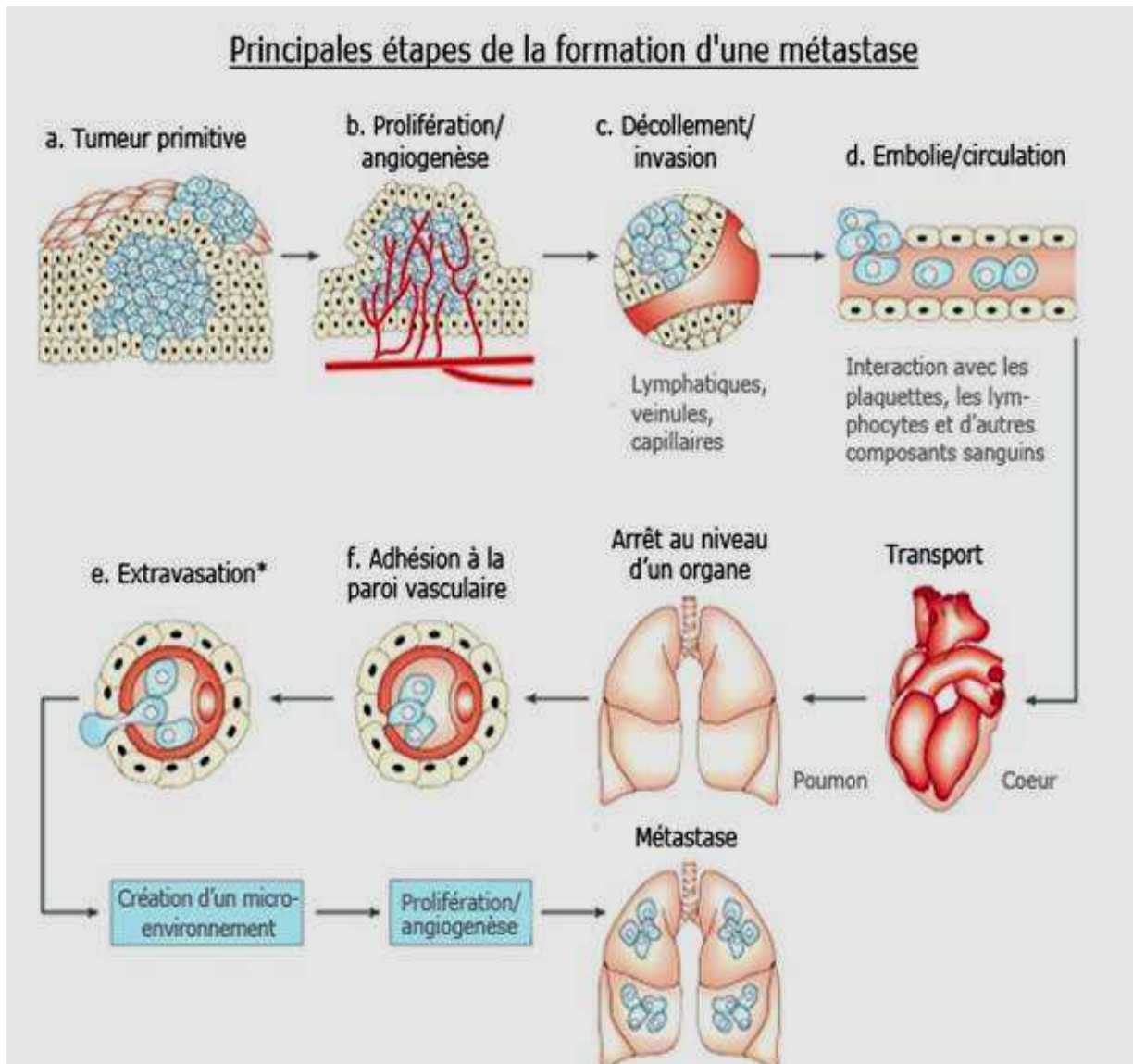


Figure 2: Processus de cancérisation et de métastases

http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_15009/siblings-les-armes-multifonctionnelles-du-cancer?part=1&printView=true

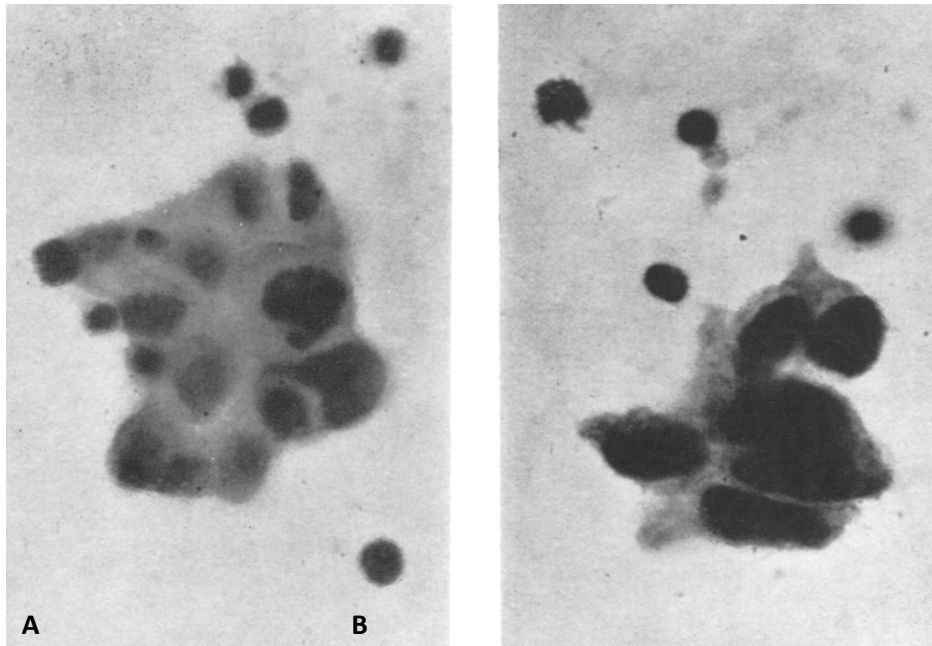
B - Historique de découverte des CTC

L'intérêt pour les CTC remonterait à 1869, où elles ont été trouvées dans la circulation sanguine. Par la suite, il y a eu de courtes périodes d'intérêt pour ce phénomène, mais dans la majorité des cas, les cellules présumées cancéreuses ont été isolées à partir de sang de patients en phase terminale ou lors d'autopsies.

En 1934, une autre étude (Pool et al., 1934) a été menée sur 40 patients avec un cancer avancé, mais l'étude la plus complète pour cette époque demeure celle d'Engell, un des premiers chercheurs à avoir fait une étude sur la démonstration des CTC dans le sang (Engell, 1955), il a pu trouver des CTC drainant le site de la tumeur dans 41 des 76 cas de cancer du rectum et dans 22 des 31 patients atteints d'un carcinome du côlon. D'après ses résultats, il n'y a pas de différence significative entre le nombre de cellules dans le sang avant et après chirurgie, et entre le taux de survie des patients avec présence ou absence de cellules tumorales.

Néanmoins, la dissémination des CTC a été dès le début suspectée d'être la source de développement de métastases, plusieurs études ont été menées dans le but de déterminer le rôle et l'importance des CTC dans le cancer métastatique (Sato, 1962). Plusieurs méthodes de détection ont alors été élaborées mais elles représentent toutes une capacité réduite à détecter les CTC (Figure 3) (Sandberg et al., 1957 ; Malmgren et al., 1958 ; Roberts et al., 1958 ; Seal, 1959).

Par la suite et depuis de nombreuses années, le rôle des CTC dans le développement des métastases ne cesse d'être étudié et corrélé à des résultats cliniques dans divers types de tumeurs malignes, notamment du sein, de l'œsophage, de l'estomac, et du cancer colorectal. Avec l'évolution des techniques d'identification des CTC à partir du sang périphérique, cette approche est en train de devenir un outil utile dans la détection de tumeurs malignes notamment dans la surveillance de la progression de la maladie, et pourrait être un moyen de mesure de la réponse à la thérapie.



A : Photo montrant un amas de cellules tumorales dans le sang d'un patient présentant un cancer du sein (x 1300).

B : Photo montrant un amas de cellules tumorales dans le sang d'un patient avec un cancer de l'estomac (x 1300). Coloration à l'hématoxyline-Eosine.

Figure 3: Photos de CTC en 1962.
(Nabar, 1962).

C - Caractéristiques des cellules tumorales circulantes

Les cellules tumorales circulantes possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules tumorales au sein d'une tumeur, elles présentent néanmoins des différences par rapport aux cellules normales tant sur le plan biologique, morphologique que génétique.

1) Caractéristiques biologiques :

Lors de la transformation tumorale une cellule va subir des modifications comportementales et biochimiques qui vont lui permettre d'infiltrer un tissu sain et de se disséminer à distance.

Les modifications du comportement de la cellule résident en :

- Acquisition d'une immortalité : division cellulaire à l'infini.
- Indépendance à l'ancrage : croissance en l'absence de support.
- Perte de l'inhibition de contact.
- Autoproduction de facteur de croissance.

Les modifications biochimiques et fonctionnelles se concrétisent en :

- Une grande mobilité.
- Modifications membranaires (protéines, phospholipides...) entraînant des modifications du comportement des cellules et des communications intercellulaires.
- Maintien, perte ou gain de certaines fonctions de la cellule normale comme la sécrétion accrue de substances produites par les cellules normales dont dérive la tumeur.

2) Caractéristiques morphologiques

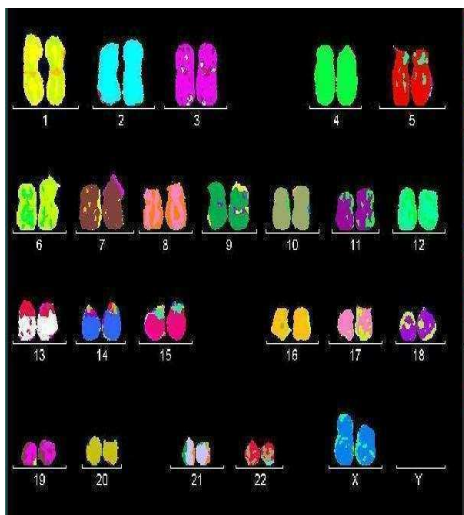
Elles se basent essentiellement sur des modifications nucléo-cytoplasmiques, des critères cytologiques de malignité et des anomalies de la mitose.

- Les cellules tumorales sont en général plus volumineuses que les cellules normales, mais souvent de taille inégale au sein d'un même tissu tumoral (Anisocytose).
- Une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique est observée.
- Les noyaux, généralement de formes irrégulières et hyper-chromatiques, sont de taille inégale entre eux (Anisocaryose).
- La membrane nucléaire est épaisse.
- Les nucléoles sont nombreux et volumineux.

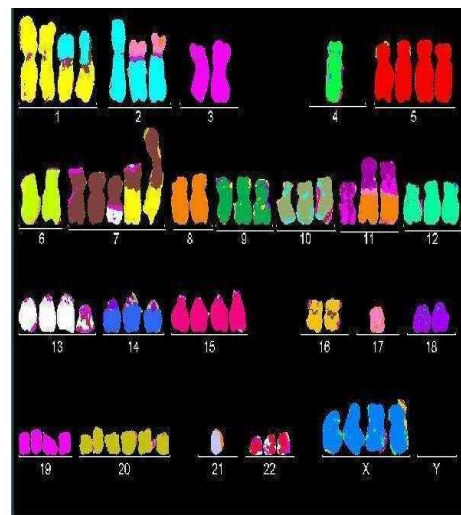
- Le cytoplasme est souvent de basophilie accentuée due à la richesse en ribosomes et à la synthèse accrue des protéines.
- Pour ce qui est des critères de malignité, aucun critère morphologique et/ou cytologique, n'est à lui seul spécifique de malignité, des modifications cytologiques identiques peuvent s'observer au cours de pathologies non tumorales (viroses, lésions post-radiques,...).
- En ce qui concerne les mitoses au niveau des cellules tumorales, elles sont souvent plus nombreuses, en situation anormale (épithéliums), de morphologie anormale (multipolaires,...).
- On observe également des "mitonécroses" par acquisition de mutations létales.

3) Caractéristiques génétiques

Au niveau des cellules tumorales, les anomalies chromosomiques sont très fréquentes, non spécifiques, nombreuses et instables au cours de l'évolution de la tumeur. Elles peuvent être quantitatives portant sur le nombre de chromosomes (Aneuploïdie ou Polyplôïdie) (Figure 4) mais aussi qualitatives portant sur la structure des chromosomes par perte d'un fragment de celui-ci (translocation, délétion...).



Caryotype d'une cellule normale



Caryotype d'une cellule tumorale

Figure 4: Caryotypes d'une cellule normale et d'une cellule tumorale.

<http://olivier.geoffroy.perso.neuf.fr/caryotype.html>

D - Les différents types de cellules tumorales

Le pronostic des patients atteints de cancer est déterminé par l'apparition de métastases à distance. Chez les patients atteints de tumeurs primaires, cette rechute est due principalement à des micro-métastases cliniquement occultes présentes dans les organes secondaires au moment du diagnostic primaire, mais que les techniques d'imagerie aussi avancées soient elles, ne permettent pas de détecter.

Il existe deux types de cellules tumorales liées à la survenue de métastases. Les cellules tumorales isolées dans le sang, ce sont les cellules tumorales circulantes (CTC), et les cellules isolées au niveau des ganglions lymphatiques ou de la moelle osseuse, ce sont des cellules tumorales disséminées (CTD).

1) Les cellules tumorales disséminées (CTD)

Elles furent les premières à être découvertes au niveau de la moelle osseuse de patients atteints par divers types de tumeurs solides.

Ces CTD, appelées ultérieurement micro-métastases médullaires, ont joué un rôle important dans le diagnostic des cancers non métastatiques essentiellement le cancer du sein (Braun et al., 2005), mais aussi le cancer du colon (Riethdorf et al., 2008).

Parmi les organes éloignés, la moelle osseuse joue un rôle important parce qu'elle est facilement accessible par ponction. La moelle osseuse pourrait être un organe commun de ralliement pour les CTD provenant de divers types de tumeurs épithéliales. On soupçonne des facteurs environnementaux inconnus et internes de promouvoir la recirculation des CTD de la moelle osseuse vers d'autres organes éloignés tel que le foie et les poumons où ces cellules vont trouver un terrain plus propice pour leur croissance (Pantel et al., 2004).

La concentration des CTD est extrêmement faible au niveau de la moelle osseuse, elle est généralement de 1×10^{-5} à 10^{-6} cellules (Riethdorf et al., 2008), ce qui rend impossible de procéder à la détection de ces cellules sans passer par une étape d'enrichissement.

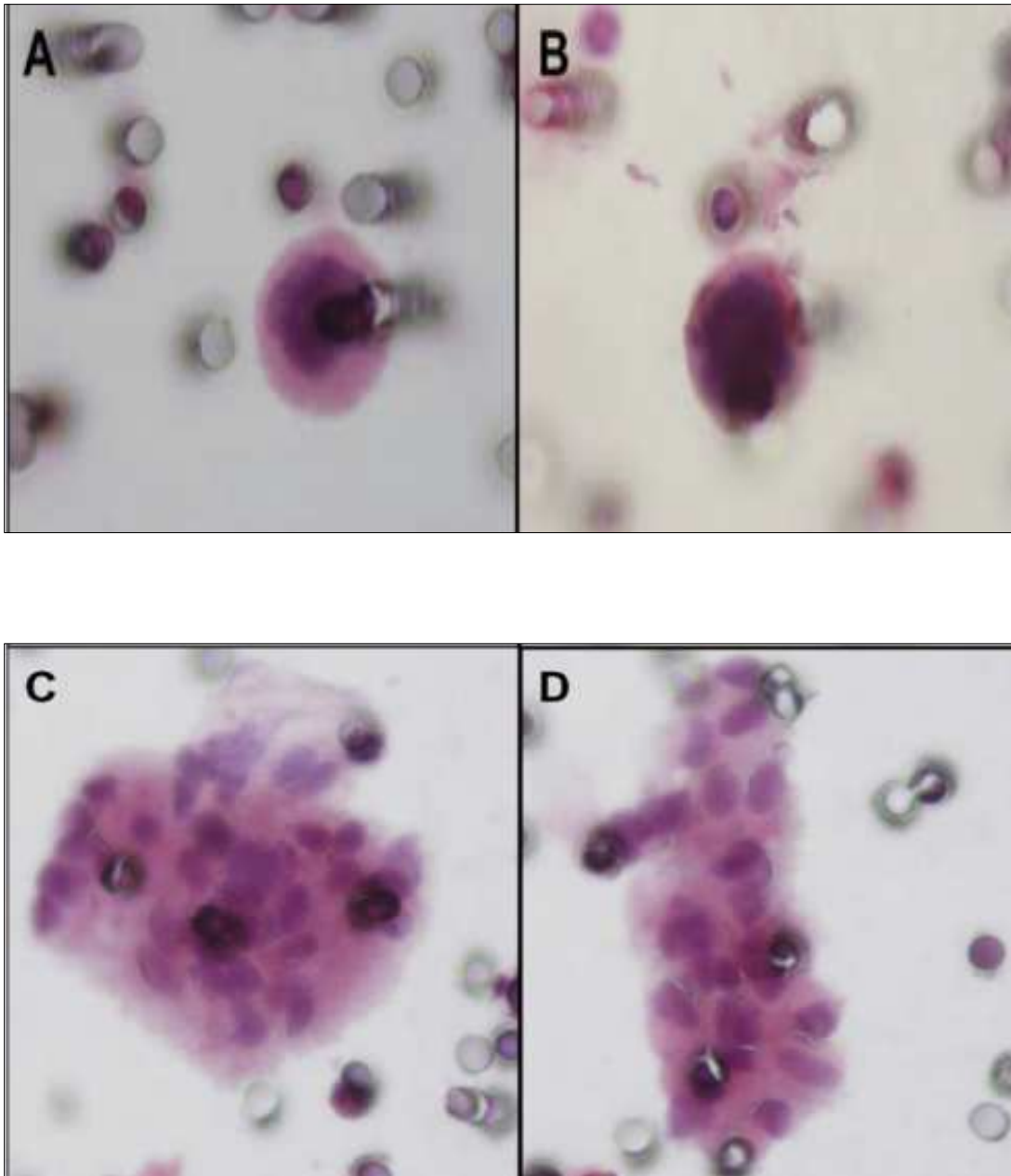
Après l'étape d'enrichissement, les méthodes de détection peuvent être classées en méthode de cytométrie/immunologie, il s'agit d'une technique d'immunocytomarquage, ou par analyse moléculaire (RT-qPCR) qui reste discutée à cause de l'absence de transcrit spécifique sauf pour certains cancers comme le sarcome d'Ewing, où l'analyse moléculaire

reste fiable du fait de l'existence d'un transcrit tumoral bien défini (EWS/Fli1). La présence de CTD chez un patient n'est pas forcément associée à la présence de CTC.

2) Les cellules tumorales circulantes (CTC)

Les cellules tumorales circulantes font depuis plusieurs années l'objet de beaucoup d'études de part le monde dans le but de déterminer leur importance dans le développement de métastases, mais aussi de spécifier leur rôle dans la classification du cancer et un éventuel pronostic sur la survie des patients. On peut classer toutes les cellules rares circulantes décelées dans le sang comme des cellules circulantes non hématologiques. Ces cellules incluent les CTC, exprimant ou pas des marqueurs épithéliaux, des cellules bénignes épithéliales normales ou atypiques et des cellules endothéliales circulantes soit matures soit précurseurs angioblastiques (Mancuso et al., 2001 ; Strijbos et al., 2008 ; Garmy-Susini et al., 2005).

Des microembolies tumorales (CTM) sont aussi détectés en circulation au niveau du sang périphérique. Ce sont des amas de cellules circulantes tumorales, leur détection est effectuée par la méthode ISET (Figure 5).



A et B : cellules tumorales circulantes détectées par la technique ISET chez des patients atteints d'un cancer de la prostate.

C et D : Microembolus tumoraux détectées par la technique ISET chez des patients atteints d'un cancer du rein.

Figure 5: Aspect des cellules tumorales circulantes et des microembolus tumoraux.
(Paterlini-Brechot et al., 2007).

E - Intérêt du dépistage précoce des CTC en oncologie

Dans le processus tumoral, le développement de métastases constitue une étape importante de la maladie. En effet, la tumeur initiale est dans la majorité des cas, réséquée localement soit par chirurgie soit par radiothérapie, ce n'est pas le cas des foyers métastatiques qui échappent souvent aux traitements systémiques (chimiothérapie et hormonothérapie). Les CTC apparaissent comme un intermédiaire obligatoire entre la tumeur initiale et les foyers métastatiques qu'elles génèrent, elles sont une cible thérapeutique essentielle et peuvent être un excellent marqueur de l'invasivité tumorale, en effet la probabilité d'apparition des métastases a directement été liée au nombre de CTC présentes dans la circulation (Cristofanilli et al., 2004 ; Georgakoudi et al., 2004). L'identification et la caractérisation des CTC peuvent représenter d'une part un bon marqueur de l'agressivité et du potentiel métastatique de la tumeur et d'autre part un moyen d'évaluation de la réponse thérapeutique et éventuellement un outil précoce pour détecter les récurrences. La technique idéale de détection des CTC doit présenter une très forte sensibilité et une spécificité diagnostique.

Le défi principal de la détection des CTC est constitué par la rareté de ces cellules dans le sang. Les rares CTC se trouvant dans 1ml de sang se trouvent mélangées à approximativement 5 milliards de globules rouges, et environ 10 millions de globules blancs.

Une des techniques primaires de visualisation des cellules tumorales, mise au point il y a de nombreuses années par les anatomo-pathologistes, est la cytométrie optique. Elle consiste à placer une goutte de sang sur une lame et à rechercher les cellules tumorales grâce à des caractéristiques morphologiques. Malheureusement cette technique ne peut pas être appliquée aux CTC à cause de leur rareté. Il a donc fallu élaborer de nouvelles techniques. L'un des premiers obstacles rencontrés était de faire le tri de ces cellules, ensuite de les enrichir pour avoir assez de matériel biologique pour élaborer un diagnostic.

Une approche se base sur l'enrichissement des CTC par différents moyens immunologiques. En effet, les cellules tumorales comme les cellules issues d'organes présentent des antigènes de surface épithéliaux (Goeminne et al., 2000). L'acquisition du caractère tumoral chez une cellule lui fait perdre certains antigènes au dépend d'autres, néanmoins, elle n'est pas ou presque pas reconnue comme corps étranger par l'organisme.

La plupart des essais décrits reposent sur l'utilisation d'anticorps fixés par des billes magnétiques « Immuno-beads ». Les antigènes (EpCAM, MUC1...) persistent chez les CTC et vont être reconnus par des anticorps dirigés contre eux. Cette étape permet l'élimination d'une partie des leucocytes mais aussi peut entraîner la perte de certaines CTC n'exprimant pas l'antigène de surface épithéliale.

Les cellules sélectionnées vont ensuite être étudiées par une technique d'analyse cytologique classique comme l'immuno-histochimie ou la cytométrie de flux grâce à un immunocytomarquage des antigènes épithéliaux (cytokératine...), cette étape est désormais automatisée. Les analyses moléculaires peuvent être effectuées, selon la méthode utilisée pour l'isolement, soit par RT-PCR, quantitative ou pas, qui permet de détecter la présence de transcrits d'ARNm épithéliaux ; soit par FISH, soit par CGH-arrays.

Une autre approche qui permet de rechercher les CTC se base sur la mise en évidence d'ARN messagers (ARNm) spécifiques de l'organe dont est issue la tumeur. Cette technique se base sur l'hypothèse non validée que toute cellule circulant dans le sang et exprimant le gène organe-spécifique est potentiellement tumorale. La recherche de CTC s'effectue par RT-PCR, quantitative (Straub et al., 2003) ou pas, ou par la NASBA (Burchill et al., 2002). Cette technique a montré une grande sensibilité (jusqu'à une cellule pour 10^6 à 10^7 cellules mononuclées) mais aussi certaines difficultés notamment à cause des ARNm recherchés. Ces ARNm sont bien spécifiques de l'organe dont est issue la tumeur mais pas des cellules tumorales elles-mêmes. Toutes les cellules libérées dans la circulation sanguine et exprimant le gène ne sont pas forcément cancéreuse (Heung et al., 2000). L'autre difficulté de cette méthode est l'impossibilité d'effectuer des recherches ultérieures sur les cellules prélevées. De plus, des résultats faux-positifs peuvent apparaître suite à une transcription illégitime de certains gènes par les leucocytes ou les cellules progénitrices hématopoïétiques.

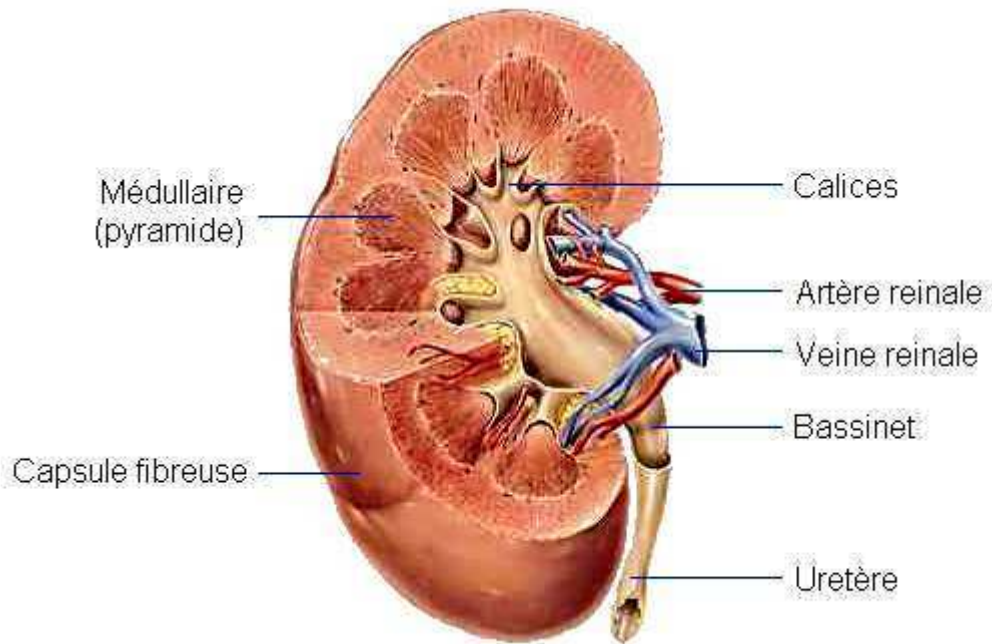
Des méthodes physiques d'enrichissement des CTC ont été élaborées, tel que la centrifugation par gradient de densité Ficoll, ou la méthode Oncoquik, les fractions enrichies peuvent être étudiées par immuno-histochimie, cytométrie de flux ou par biologie moléculaire.

La technique ISET est basée sur le fait que les cellules leucocytaires sont les plus petites cellules de l'organisme et qu'on peut les éliminer par la taille, elle permet donc le tri des CTC par la taille, grâce à un système de filtration du sang. Cette technique présente

l'avantage de garder la morphologie cellulaire intacte, elle garantit aussi une spécificité diagnostique par l'examen cytopathologique et une sensibilité inégalée. Les CTC retenues par le filtre vont être identifiées par analyse cytopathologique, elles peuvent subir diverses études immunologiques et/ou moléculaires.

L'application possible de la détection des CTC dans le diagnostic et le pronostic des patients atteints de cancer propulse cet axe de recherche dans l'espoir d'améliorer la prise en charge de ces derniers. La détection des CTC met l'accent sur la possibilité que les CTC deviennent un marqueur biologique prédictif en réponse à une thérapeutique ciblée. L'utilisation de la technique ISET dans l'identification et la caractérisation des CTC offre une excellente opportunité pour la détection des cellules tumorales et une méthode fiable pour l'application des analyses moléculaires aux CTCs. ISET peut être appliquée à tous les types de cancers solides. Notre choix lors de cette étude a été d'appliquer ISET au cancer rénal à cellules claires car ce cancer est un des seuls à être caractérisé par des mutations génétiques au niveau du gène *VHL*. L'étude des CTC issues du RCC va ainsi nous permettre de comparer l'analyse cytopathologique des CTC à leur analyse moléculaire, ce qui est susceptible de faire avancer les connaissances dans le domaine de la cytopathologie moléculaire des CTC.

Partie II Le cancer rénal



L'appareil urinaire comprend les deux reins (environ 300g) et un système de conduits excréteurs chargés de stocker puis d'évacuer l'urine. Les reins sont situés de part et d'autre de la colonne lombaire, dans la partie haute de l'abdomen. Chaque rein mesure 12 x 6 x 3 cm, coiffé par la glande surrénale et composé de centaines de milliers de néphrons, eux-mêmes composés chacun d'un glomérule et d'un tubule. Une capsule conjonctive tapisse les reins en plus, de l'enveloppe de graisse qui les protège. Au centre du rein se trouve une cavité : le hile, point d'entrée et de sortie des gros vaisseaux rénaux. A ce niveau se trouve le bassinet, portion dilatée de l'uretère d'où partent les voies excrétrices de l'urine.

Figure 6: Représentation schématique du rein et des structures qui le composent
<http://cyrilpoujoulat.over-blog.com/categorie-10102557.html>

A - Définition

Le cancer rénal est une tumeur primitive du parenchyme rénal, par cette définition on exclut les tumeurs des voies excrétrices hautes, les tumeurs de la capsule (Figure 6) et enfin les tumeurs métastasées du rein (Maalej, 1999).

L'adénocarcinome du rein, appelé encore tumeur de Grawitz, représente la forme prédominante du cancer rénal. Il représente entre 90% (Nese et al., 2009) et 97% (Maalej, 1999) des tumeurs du rein.

Sa fréquence augmente avec l'âge, elle atteint un maximum à l'âge de 60 ans, il peut être localisé aussi bien au rein gauche qu'au rein droit. Le cancer du rein reste exceptionnel chez l'enfant ; toutefois plusieurs observations du cancer du rein chez l'enfant ont été rapportées.

Le traitement est essentiellement chirurgical (Figure 7) et le pronostic de survie des cancers opérés est d'environ 50% à 5 ans ce qui représente un bon pronostic par rapport aux cancers de la voie excrétrice.

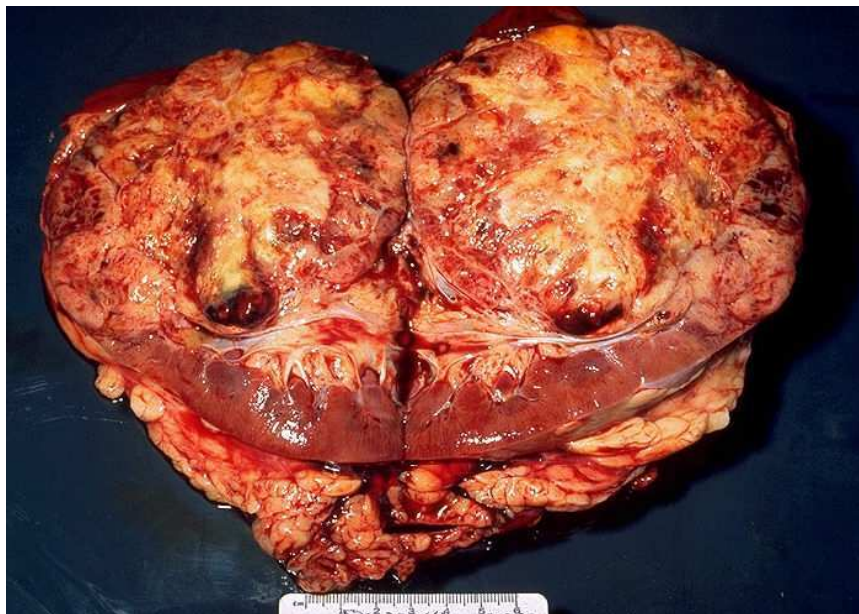


Photo d'un carcinome à cellules rénales, une grande partie du rein a été remplacée par du tissu tumoral gris et jaune.

Figure 7: Cancer du rein.

<http://www.cdc.gov/widgets/PHIL/alt/>

B - Epidémiologie

Le cancer du rein représente près de 3% des cancers de l'adulte (Cohen et al., 2005). Son incidence est d'environ 11/100 000 nouveaux cas par an dans les pays industrialisés et 150 000 nouveaux patients sont découverts chaque année dans le monde dont 7 000 en France (Cohen et al., 2005 ; Godley et al., 2002). Il se situe, par sa fréquence, au 7^{ème} rang des cancers chez l'homme et au 9^{ème} rang chez la femme (Méjean et al., 2004). Il est deux fois plus fréquent chez l'homme que chez la femme (sexe-ratio 2.1/1).

En France ce cancer se situe au 13^{ème} rang des décès par cancer (3607 décès dont 65% chez l'homme) ce qui représente 2.4 % de l'ensemble des décès par cancer. Les taux de mortalité standardisés sont de 4.6 chez l'homme et de 1.7 chez la femme (Velten et al., 2003). En 2003, son incidence était de 5.7 / 100.000 habitants chez la femme et 12.2 / 100.000 habitants chez l'homme. Elle est en constante augmentation dans les pays industrialisés, cela est dû à l'amélioration des techniques de diagnostic, mais probablement aussi du fait des changements de mode de vie. En effet l'incidence a augmenté chez l'homme au cours des deux dernières décennies, le taux annuel moyen d'évolution de l'incidence est de + 2.7% chez l'homme et de + 3.74% chez la femme entre 1978 et 2000. Parallèlement, la mortalité n'a que légèrement augmenté. Cet effet est principalement dû au vieillissement de la population comme le montre l'évolution pratiquement nulle de la mortalité standardisée (Velten et al., 2003).

En Tunisie, et selon le registre du cancer du Nord tunisien, le nombre de nouveaux cas de cancers est passé de 3744 en 1994 à 5091 en 2003, soit une augmentation de 36% en 10 ans. L'incidence standardisée selon une population mondiale de référence est passée de 121.5 en 1994 à 127.3 en 2003 chez l'homme ; et de 94.3 en 1994 à 95.3 en 2003 chez la femme. Soit une hausse de 5% pour le sexe masculin et de 1% pour le sexe féminin. Ce qui place la Tunisie dans une position intermédiaire entre les pays occidentaux pour lesquels le niveau dépasse 300 à 400 nouveaux cas pour 100 000 habitants, et les pays en voie de développement tel que l'Inde, qui enregistre autour de 80 nouveaux cas/100 000 habitants. Selon ce même registre, qui couvre 11 gouvernorats, seule une légère augmentation des cas de cancer rénal recensés est observée entre les périodes 1995-1998 et 1999-2003, avec un sexe ratio qui varie légèrement, de 1.47 à 1.4 respectivement pour chaque période. Le

cancer rénal a représenté en 2003, 1.6% et 1.5% de l'ensemble des cancers recensés sans inclure le cancer de la peau, respectivement chez l'homme et la femme.

Les enfants représentaient 13% des malades pour la première période de 1995 à 1998, ils ne sont plus que 11.7% pour la période s'étalant de 1999 à 2003. L'âge moyen du cancer rénal en Tunisie pour les 2 sexes est de 58.4 ans et les adénocarcinomes à cellules claires constituent de loin, les tumeurs les plus fréquentes avec un pourcentage égal à 45%.

L'incidence du cancer du rein est en augmentation sur les différents continents, quelles que soient les régions, les groupes ethniques ou le sexe. Entre 1973 et 1992, les régions scandinaves ont présenté l'augmentation la plus nette mais c'est au Japon que l'incidence a le plus augmenté pour les hommes (+ 171%) et en Italie pour les femmes (+ 107%) (Mathew et al., 2002). Une augmentation forte de l'incidence est également retrouvée aux Etats-Unis dans les résultats du « SEER program » (Chow et al., 1999). Cette augmentation s'accompagne toutefois d'une amélioration de la survie tant aux Etats-Unis que dans divers pays européens (Damhuis et al., 1998).

Les progrès de l'imagerie médicale peuvent expliquer ce type d'évolution mais il n'est pas montré aujourd'hui qu'il n'existe pas d'augmentation du risque.

Le traitement chirurgical est considéré comme curatif dans le cas de tumeurs localisées mais près de 30% des patients ont des métastases lors du diagnostic et le cancer du rein est responsable de 95 000 décès par an dans le monde (dont 3 500 en France) (Godley et al., 2002).

C - Facteurs de risque

En dehors de la maladie de Von Hippel-Lindau dont le caractère génétique est connu, les facteurs de risques les mieux identifiés restent la consommation de tabac, l'obésité et l'hypertension artérielle : 50% des cancers du rein seraient attribuables à ces trois facteurs (Benichou et al., 1998).

Certains facteurs représentent des risques encore discutés comme :

- Certaines expositions professionnelles : le trichloréthylène, l'exposition aux dérivés du pétrole, des métaux lourds, de l'amiante, du cadmium, le travail dans l'industrie sidérurgique (Bruning et al., 2003 ; Buzio et al., 2002 ; Hu et al., 2002 ; Mattioli et al., 2002 ; Zhang et al., 2004).
- L'absence d'activité physique (Mahabir et al., 2004 ; Menezes et al., 2003).

- Certaines habitudes alimentaires et procédés chimiques agroalimentaires (Handa et al., 2002 ; Mucci et al., 2004 ; Nicodemus et al., 2004).
- L'infection urinaire chronique (Parker et al., 2004).

Le rôle de l'environnement apparaît aujourd'hui de plus en plus probable.

D - Classification

1) Classification anatomopathologique :

La classification anatomo-pathologique des tumeurs du rein a été adoptée en 1997 suite à une proposition de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) après le déroulement du Workshop « Impact of Molecular Genetics on the Classification of Renal Cell Tumor » qui a eu lieu en Octobre 1996 à Heidelberg (Storkel et al., 1997).

Cette classification subdivise les tumeurs du rein en tumeurs bénignes et malignes du parenchyme rénal (Kovacs et al., 1997).

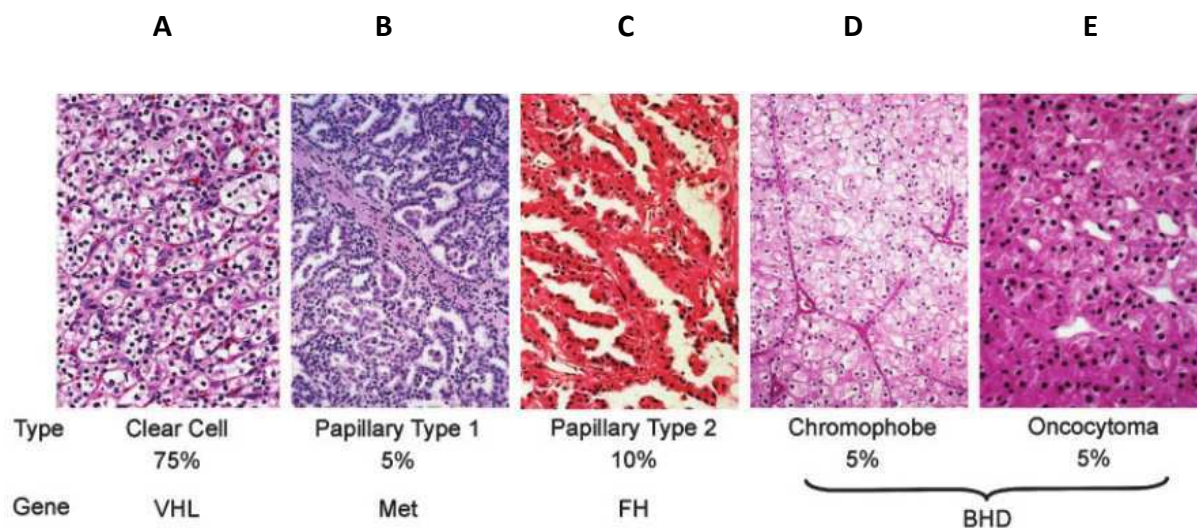
- Les tumeurs bénignes sont classées en :

- Adénome rénal papillaire.
- Oncocytome rénal (5%) (Kovacs et al., 1997), il comprend de grosses cellules au cytoplasme oxyphile et finement granuleux, munies d'un petit noyau, et groupées en foyer, en cordons ou en tubules dans un stroma souvent myxoïde (Wheater et al., 1992).
- Adénome métanéphrique et Adénofibrome, le plus souvent médullaire et dit fibrome des pyramides, mal limité.
- Angiomyolipome, il comprend un assemblage hétéroclite de tissu fibreux, de lobules adipeux adultes ou fœtaux, de faisceaux musculaires lisses et de vaisseaux sanguins autour desquels des cellules péricytaire fusiformes dessinent souvent des cercles centraux.
- Autres types de tumeur bénigne.

Ces tumeurs bénignes se voient surtout chez l'adulte.

- Les tumeurs malignes ou adénocarcinomes (Figure 8) sont subdivisées en plusieurs types, cette classification est basée sur les connaissances génétiques, corrélée aux caractéristiques histologiques et appliquée en routine :

- Carcinome à cellules rénales conventionnel ou à cellules claires (CCRC ou RCC) : il représente environ 75% des tumeurs du rein, et caractérisé génétiquement par une délétion spécifique au niveau du chromosome 3p. Ces tumeurs sont de taille variable et classiquement d'une coloration jaune chamois caractéristique. Sur le plan histologique, il s'agit d'un adénocarcinome constitué le plus souvent de cellules au cytoplasme clair, optiquement vide, avec parfois des foyers de cellules éosinophiles (Figure 9). Différentes formes sont observées : solides, papillaires ou plus rarement kystiques, elles peuvent poser des problèmes diagnostiques avec les kystes bénins car la population de cellules claires est faiblement représentée. Des formes sarcomatoïdes peuvent exister (5%) dans le CCRC mais elles existent aussi dans d'autres types du carcinome rénal (Velten et al., 2003).

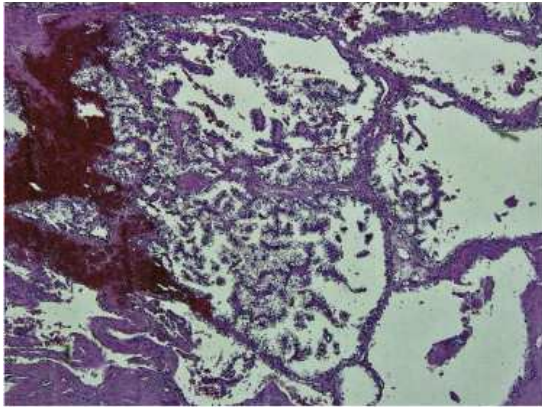


A : carcinome rénal à cellules claires : le cytoplasme des cellules tumorales est rempli de cholestérol, lipides et phospholipides. **B et C** : carcinome rénal papillaire : la tumeur est entourée par une capsule fibreuse et les cellules tumorales prolifèrent sur des conjonctivo-vasculaire (papillaire). **D** : carcinome rénal à cellules chromophobes : le cytoplasme des cellules tumorales contient des microvésicules de mucopolysaccharides particulièrement nombreuses autour du noyau (halo clair périnucléaire). **E** : Oncocytome.

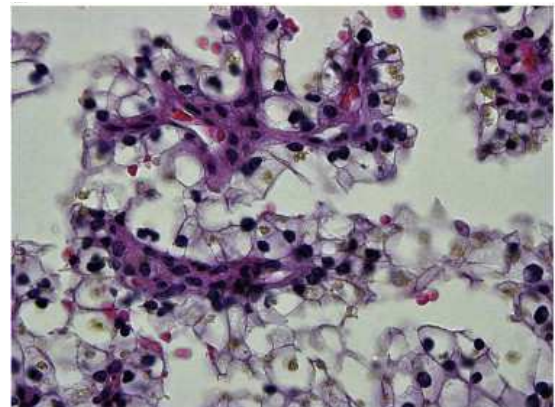
BHD: Birt-Hogg-Dubé; FH: Fumarate hydratase; Met: mesenchymal-epithelial transition factor; VHL: von Hippel Lindau.

Figure 8: Principaux types histologiques de cancer du rein.

(Linehan et al., 2007)



A



B

A : à faible grossissement : la tumeur montre le schéma de croissance papillaire avec des noyaux fibrovasculaire.

B : à fort grossissement : le cytoplasme des cellules tumorales montre tout à fait l'apparence claire.

Figure 9: Vision au microscope de deux tumeurs rénales à cellules claires
(Kuroda et al., 2010)

- Carcinome papillaire (CCRTP) : ce type de tumeur représente environ 15 % des cancers rénaux (Figure 8). On distingue deux types : le type 1 représentant 75 % de ces tumeurs, il est constitué de petites cellules basophiles, ce sont des tumeurs de bas grade et de faible stade et sont toujours corrélées à une multifocalité importante. Le type 2 est constitué de cellules éosinophiles de plus grande taille (Delahunt et al., 2001), ces tumeurs sont corrélées à un stade et un grade plus élevé, elles sont généralement unifocales et présentent un moins bon pronostic (Méjean et al., 2003). Le type 1 et 2 représentent respectivement 5 et 10% des cancers du rein.
- Carcinome chromophile (CCRCH) : il représente environ 5% des tumeurs du rein (Figure 8) (Velten et al., 2003). On y distingue deux formes morphologiques : la première est composée de cellules volumineuses au cytoplasme micro-vacuolaire présentant un épaissement de la limite cytoplasmique et la seconde composée de cellules éosinophiles pouvant prêter confusion avec un oncocytome. Ce type de tumeur est caractérisé sur le plan génétique par la combinaison d'une perte

d'hétérozygotie des chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 et 21 et la présence d'ADN hypodiploïde.

- Carcinome du canal collecteur (Bellini) : il représente approximativement 1% des cancers du rein.
- Cancer médullaire du rein (CCRTC).
- Carcinome à cellules rénales non classé. L'analyse morphologique ne suffit pas toujours pour classer toutes les tumeurs rénales, c'est pour cela qu'on peut intégrer au sein de ce groupe les carcinomes de forme sarcomatoïde dont le pronostic évolutif est particulièrement péjoratif mais aussi des formes muco-sécrétantes, des formes mixtes épithéliales et conjonctives ou des formes cellulaires méconnaissables (Velten et al., 2003).

D'autres types de tumeurs malignes sont retrouvés dans le rein comme les sarcomes, les lymphomes ou d'exceptionnelles métastases

2) Classification TNM des carcinomes rénaux

À l'issue du bilan initial, l'extension de la tumeur est évaluée selon la **Classification TNM** de 1997. La classification TNM est un système international, proposé par le chirurgien français Pierre Denoix dans les années 1940-1950, de façon à classer les cancers selon leur extension anatomique (Figure 10) (Denoix, 1946).

T- Tumeur primitive

Tx : Tumeur primitive non évaluable.

T0 : Pas de tumeur primitive décelable.

T1 : Tumeur inférieure à 7 cm dans sa plus grande dimension limitée au rein :

T1a : Tumeur de 4 cm ou moins dans sa plus grande dimension limitée au rein.

T1b : Tumeur de plus de 4 cm et de moins de 7 cm dans sa plus grande dimension limitée au rein. (Modification de la 6^e édition 2003).

T2 : Tumeur de plus de 7 cm dans sa plus grande dimension limitée au rein.

T3 : Tumeur étendue aux veines rénales ou envahissant la glande surrénale ou les tissus péri-rénaux mais sans franchissement du fascia de Gérota.

T3a : Tumeur envahissant la glande surrénale ou les tissus péri-rénaux mais sans franchissement du fascia de Gérota.

T3b : Tumeur avec extension macroscopique dans la ou les veine(s) rénale(s) ou dans la veine cave sous-diaphragmatique.

T3c : Tumeur avec extension macroscopique dans la veine cave sus-diaphragmatique.

T4 : Tumeur dépassant le fascia de Gérota.

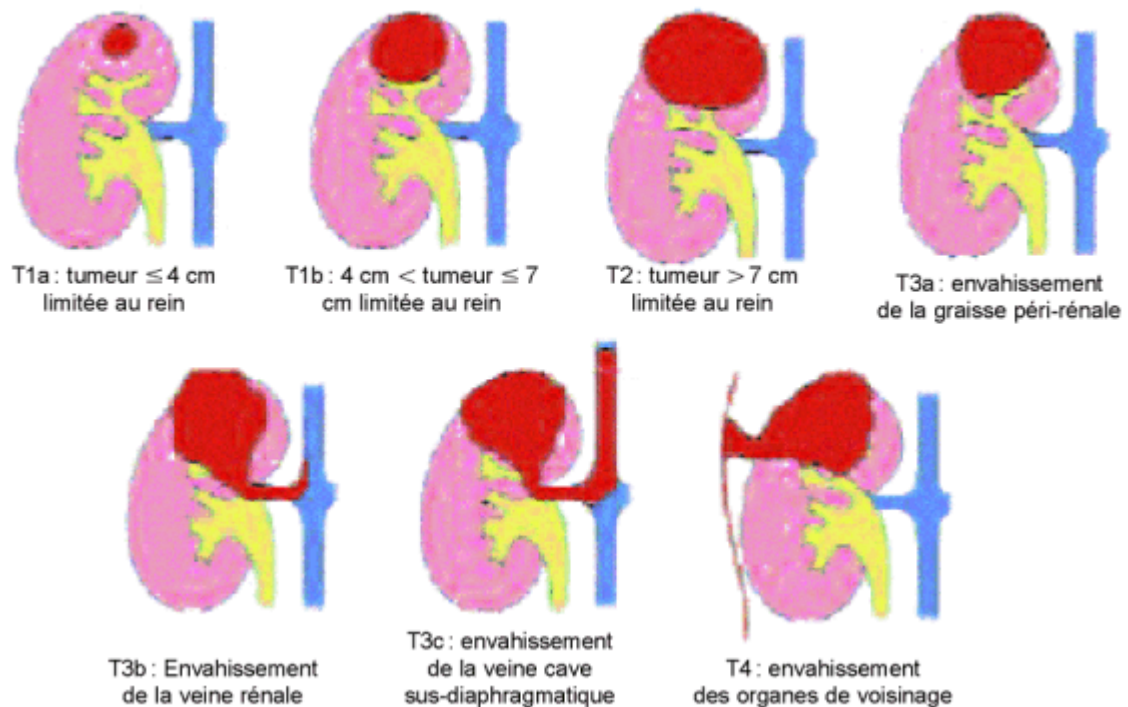


Figure 10: Classification TNM 2002 des tumeurs du rein.
(Treuthardt et al., 2008)

N - Adénopathies régionales

Nx : Adénopathies régionales non évaluables.

No : Pas d'adénopathie régionale métastatique.

N1 : Adénopathie métastatique unique.

N2 : Adénopathies métastatiques multiples.

M - Métastases

Mx : Métastases non évaluables.

M0 : Absence de métastase.

M1 : Présence de métastase(s).

3) Classification cytologique de Fuhrman

Cette classification se base sur la morphologie nucléaire à partir du contingent cellulaire le plus atypique. Elle a été adoptée en 1982 (Fuhrman et al., 1982), elle comporte quatre grades, c'est une technique de réalisation facile et reproductible quelque soit le milieu de conservation utilisé.

- Grade I : Noyaux ronds, de petites tailles (environ 10 microns), réguliers, avec des nucléoles imperceptibles ou très discrets.
- Grade II : Noyaux volumineux (15 microns) avec certaines irrégularités de contours ainsi que des nucléoles visibles au grossissement X 400.
- Grade III : Noyaux plus volumineux (20 microns), nettement irréguliers et les nucléoles sont visibles au grossissement X 100.
- Grade IV : Noyaux semblables au grade III avec présence de noyaux monstrueux multilobés dont la chromatine se dispose en amas (Maalej, 1999).

E - Clinique

1) Circonstances de découvertes

Il existe trois façon de découvrir le cancer du rein, il peut se manifester par des signes urologiques, des signes cliniques extra-urologiques ou fortuitement par un examen d'imagerie.

- Les signes urologiques :

Ils peuvent être isolés ou associés et ils sont les plus fréquents :

- L'hématurie : elle est la plus fréquente (50% des cas en Tunisie selon le rapport du Premier Congrès Tunisien d'Urologie de 1995) (Maalej, 1999), généralement isolée, totale, presque toujours macroscopique, indolore, capricieuse et récidivante. Une hématurie totale isolée doit faire évoquer un cancer du rein.

- Douleurs lombaires : elles sont rarement isolées, retrouvées dans un tiers des cas soit sous forme de coliques néphrétiques, le plus souvent due à une obstruction de la voie excrétrice par un hématome sanguin, soit sous forme de lombalgies siégeant dans l'angle costo-lombaire, permanentes, sourdes, liées à la distension de la capsule par la tumeur (Maalej, 1999).

- La tumeur : elle représente rarement un signe révélateur chez l'adulte, et elle est surtout palpable.

Cette triade n'est retrouvée que dans 10% des cas.

La varicocèle gauche qui est due à une volumineuse masse polaire inférieure qui comprime la veine spermatique, est retrouvée dans quelques cas mais elle est rarement révélatrice.

- Les signes non urologiques :

Ils peuvent être associé ou non à des signes urologiques, ils sont de plusieurs types :

➤ Signes classiques :

- HTA
- Fièvre au long court
- Anémie
- Vitesse de sédimentation (VS) élevée

➤ Signes d'extension locale vasculaire :

- HTA
- Œdèmes des membres inférieurs
- Varicocèle
- Circulations collatérales

➤ Signes d'altération de l'état générale :

- Asthénie
- Amaigrissement
- Anorexie

- Signes paranéoplasiques : elles sont dues à des sécrétions para-tumoraux d'hormone like.
 - Signes de pseudo parathyroïde.
 - Signes d'hirsutisme.

Tous ces signes inflammatoires et paranéoplasiques peuvent disparaître après l'acte chirurgical.

- Découvertes fortuites :

Elles sont de plus en plus fréquentes, généralement après un examen radiologique (Echographie, Scanner, UIV...) devant une symptomatologie abdominale banale, non urologique.

2) Examens Para Clinique :

- Examens radiologiques :

L'aspect du carcinome à cellules rénales en imagerie n'est pas univoque. Cet aspect varie d'une tumeur à l'autre en fonction de la taille, de l'architecture macro-histologique de la tumeur, de sa vascularisation et de la présence de remaniements nécrotico-hémorragiques au sein même de la tumeur. En imagerie une forme typique de RCC peut être identifiée en association avec de nombreuses formes atypiques (petit RCC, RCC kystique, RCC hypovasculaire, RCC infiltrant, RCC hémorragique, RCC multifocal) ; ce qui pose un réel problème de diagnostic, notamment avec certaines lésions bénignes (kystes remaniés, tumeurs bénignes) ou secondaires (métastases, lymphome) (Velten et al., 2003). Les examens radiologiques constituent donc un vrai support pour le diagnostic.

- La tomодensitométrie (TDM) ou Scanner est la méthode diagnostique de référence, elle consiste à réaliser des coupes transversales avant et après injection du produit de contraste (Figure 11). Il s'agit d'un examen fonctionnel morphologique, mais permet aussi de mesurer la densité du tissu tumoral. Elle permet la caractérisation des lésions et l'appréciation du bilan d'extension locale et lymphatique. Pour cet examen, trois acquisitions distinctes sont recommandées :

- Une acquisition avant toute injection de contraste, cette étape fournit des informations sur la densité spontanée de la masse indispensables à la caractérisation des tumeurs et notamment à la démonstration du rehaussement d'un tissu tumoral vascularisé.
- Une acquisition précoce appelée phase corticomédullaire ou artérielle après injection du produit de contraste, (entre 30 et 50 sec après le début de l'injection). Elle est importante pour le diagnostic d'extension, pour l'étude des vaisseaux et en particulier la veine rénale et la veine cave inférieure, elle sert notamment pour la recherche de métastases viscérales (pancréas, rate, surrénales, foie) ou musculaire dont le caractère le plus souvent hypervasculaire précoce facilite leur détection au sein d'un parenchyme (Scialpi et al., 2000).
- Une phase néphrographique ou tubulaire (entre 90 et 120 sec après injection), efficace pour la détection des petites tumeurs et la caractérisation des masses indéterminées (Birnbbaum et al., 1996 ; Helenon et al., 1997), elle permet aussi la mise en évidence d'un rehaussement tumoral parfois modeste et retardé.
- Une quatrième acquisition optionnelle et plus tardive, à la phase excrétoire, peut être envisagée (entre 3 et 4 min après injection).

Le scanner détecte une lésion sur deux parmi les masses rénales inférieures ou égales à 5mm de diamètre et 75% des masses de moins de 15 mm (Morettin et al., 1981).



Tumeur rénale gauche et adénopathies volumineuses latéro-aortiques et interaortico-caves.

Figure 11: Tomodensitométrie rénale avec injection de produit de contraste.
(Thibault et al., 2008)

- L'échographie joue essentiellement un rôle dans le dépistage du RCC occulte. Il s'agit d'un examen fiable, simple, anodin et facile à répéter (Figure 12).



A : Echographie rein droit. B : Echographie montrant une tumeur du rein (voir pointillé).

Figure 12: Echographies rénales.

<http://www.stop-tabac.ch/fra/risques-et-maladies-liees-au-tabac/cancer-des-reins-cancer-de-la-vessie.html>

- L'IRM peut être indiquée dans les cas de contre-indications sérieuses au scanner (insuffisance rénale, grossesse ou allergie sévère). Elle peut apporter des informations complémentaires dans certaines formes atypiques de diagnostic difficile en scanner grâce à sa meilleure résolution en contraste, elle peut être utile lors de la caractérisation d'une masse rénale (recherche d'une masse graisseuse occulte, masse hyper-vascularisée au scanner, masse kystique...); ou lors d'extension de la veine cave ou d'extension aux organes voisins (rate, foie, colon). Néanmoins l'IRM présente certains inconvénients (la compliance respiratoire, la claustrophobie, la durée de l'examen...) qui toute fois restent mineurs devant les bénéfices.
- L'urographie intraveineuse (UIV) est un examen radiologique qui permet l'exploration de l'arbre urinaire après injection en intraveineuse de produit radio-opaque iodé, elle permet d'apprécier la forme et la fonction rénale, elle traduit la présence de masse rénale caractérisée le plus souvent par la déformation du contour du rein, par la modification pyélocaliciel à type de renflement, étirement ou d'écrasement des tiges calices ou par la déformation de l'uretère refoulé en dedans par une volumineuse masse polaire inférieure (Figure 13). L'UIV et l'artériographie ne jouent actuellement aucun rôle diagnostique.



Grâce à l'injection du produit de contraste, on aperçoit vers le haut, de part et d'autre de la colonne vertébrale les reins desquels descendent les uretères qui conduisent l'urine à la vessie.

Figure 13: Urographie intraveineuse (UIV).

<http://www.hopital-dcss.org/actes/uiv.htm>

- Examens biologiques :
 - Dans les urines :
 - Examen cyto bactériologique des urines (ECBU).
 - Cytologie urinaire à la recherche des cellules malignes.
 - Dans le sang :
 - Vitesse de sédimentation (VS).
 - Formule Numération Sanguine (FNS).
 - Urée.
 - Créatinine.

- La biopsie percutanée des tumeurs du rein :

Les performances de l'imagerie pour le diagnostic histologique restent limitées surtout lorsque la masse est petite, c'est pour cette raison que la biopsie percutanée peut aider à établir un diagnostic thérapeutique difficile, tout en permettant aussi d'affirmer le caractère bénin d'une tumeur afin d'éviter la chirurgie.

Elle est réalisable, recommandée devant une lésion néoplasique infiltrante faisant envisager la possibilité d'une tumeur secondaire (métastase ou lymphome) ou devant l'existence de tumeurs multiples, bilatérales et synchrones en dehors d'un contexte de maladie héréditaire. Toutefois, elle ne peut être pratiquée de façon systématique. Le taux de sensibilité de la biopsie percutanée rénale reporté dans la littérature est de 70 à 90 % et ce taux atteint les 100% quant il s'agit de la spécificité de cette technique (Neuzillet et al 2004). Quant à la fiabilité elle atteint les 89% pour le type histo-pathologique, et 78 % pour le grade nucléaire de Fuhrman (Lechevallier et al 2000).

F - Génétique du RCC

Le cancer du rein présente de rares formes héréditaires (1 à 2%), ces formes possèdent des particularités cliniques et évolutives qui nécessitent une surveillance et un conseil génétique chez les apparentés. Certains gènes de prédisposition ont été identifiés et permettent le plus souvent de rechercher l'anomalie génétique afin de déterminer les individus à risque.

Les syndromes héréditaires dont la plus connue est la maladie de Von Hippel-Lindau (ou maladie VHL), la sclérose tubéreuse de Bourneville, le syndrome de Birt-Hogg-Dube associent des lésions touchant d'autres organes aux tumeurs rénales.

La nature histologique de la tumeur (adénocarcinomes à cellules claires, carcinomes tubulo-papillaires) et son association ou non à d'autres cancers, permet de classer les formes familiales en plusieurs entités, on peut donc distinguer les cancers du rein évoluant dans des syndromes tumoraux familiaux des cancers du rein familiaux ne s'intégrant dans aucun syndrome spécifique.

1) La maladie de Von Hippel Lindau

La maladie de Von Hippel Lindau est une affection héréditaire multisystémique à transmission autosomique dominante (MIM 193300), caractérisée sur le plan clinique par une prédisposition au développement de multiples tumeurs bénignes ou malignes richement vascularisées affectant plusieurs organes (Rocha et al., 2003).

Le nom de la maladie se compose de ceux de l'ophtalmologue allemand Eugen Von Hippel (1867–1939), qui a décrit les angiomes rétiniens, et du pathologiste suédois Arvid Vilhelm Lindau (1892–1958), qui a décrit quant à lui les hémangioblastomes et kystes cérébelleux. L'incidence à la naissance est d'environ 1 sur 36 000 et la pénétrance est quasi complète à 65 ans (90%).

La définition clinique de la maladie VHL repose sur la présence de deux lésions majeures dont un hémangioblastome en l'absence d'histoire familiale, ou d'une seule lésion en présence d'antécédents familiaux.

La maladie VHL est due à des mutations du gène *VHL*, gène suppresseur de tumeur. Chez les porteurs de cette prédisposition, le gène doit subir une 2^{ème} mutation pour que les tumeurs apparaissent. La seconde mutation peut se produire dans n'importe quelle cellule de l'organisme ce qui rend le spectre des lésions VHL extrêmement large au sein d'une même famille, dans laquelle il existe souvent une hétérogénéité phénotypique importante, au sein d'une même famille certains membres pourront présenter de multiples tumeurs nécessitant des interventions répétées tandis que d'autres membres auront seulement un petit nombre de lésions sans retentissement clinique.

On distingue deux types de la maladie VHL : le type 1 sans phéochromocytome et le type 2 avec phéochromocytome.

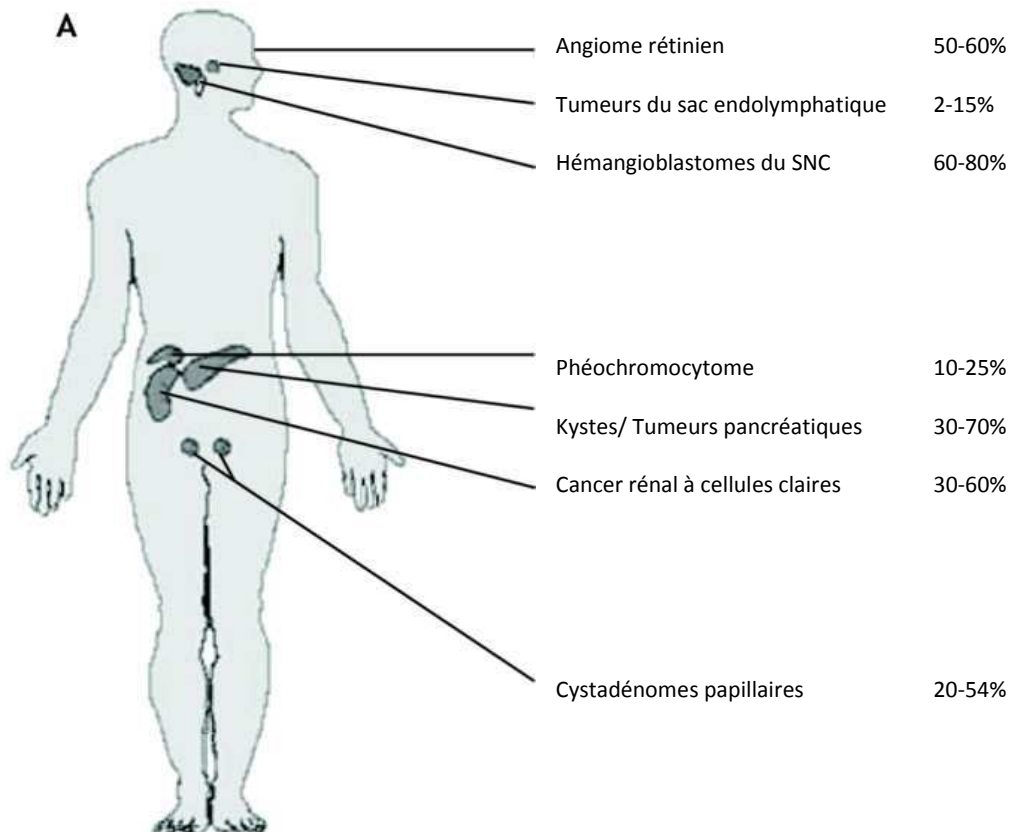
Dans le type 2, les malades présentent un grand risque de phéochromocytome car les mutations ne provoquant qu'un échange d'un seul acide aminé à une position bien précise de la protéine VHL, semblent être associées à des formes de maladies bien circonscrites. Le type 2 se subdivise en trois sous-types.

Dans le type 2A, le risque de carcinome rénal et de tumeurs pancréatiques est minime, contrairement au type 2B. Le type 2C ne présente qu'un risque pour le phéochromocytome, les hémangioblastomes de la rétine et du SNC peuvent être absents.

Les manifestations cliniques majeures de la maladie VHL (Figure 14) sont :

- L'hémangioblastome du système nerveux central (SNC) : il représente la lésion emblématique de la maladie, il touche préférentiellement le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière, généralement multifocal et s'observe dans 60 à 80% des cas. Il s'agit d'une tumeur vasculaire bénigne constituée d'une prolifération de capillaires sanguins dont les mailles renferment des éléments tumoraux riches en lipides (cellules stromales).
- L'hémangioblastome de la rétine ou « angiome rétinien », est extrêmement évocateur car il apparaît rarement en dehors de la maladie VHL (Figure 15). Les hémangioblastomes rétiniens sont souvent multiples et bilatéraux, ils surviennent chez la moitié des patients et révèlent la maladie dans 30 % des cas. Non traités, ils peuvent conduire à la cécité.
- Le cancer rénal à cellules claires et/ou les kystes rénaux, concerne 30 à 70% des patients. Découvert souvent tardivement, le RCC touche près de 75% des patients VHL à 60 ans et est responsable du décès de 30 à 50% d'entre eux, ceci est due aux multiples récurrences et à une dissémination métastatique pourtant semblable à celle du cancer rénal sporadique (Chauveau et al., 1996 ; Neumann et al., 1997 ; Richard et al., 1994). Chez les patients VHL, le RCC se déclare en moyenne à l'âge de 30 ans (dans 60% des cas avant l'âge de 40 ans), souvent bilatéral (parfois jusqu'à plusieurs dizaines de tumeurs) et multicentrique, il s'agit presque toujours d'un cancer rénal à cellules claires avec parfois des différences au niveau de l'aspect macroscopique (tumeurs solides, tumeurs kystiques cloisonnées...). Le traitement du RCC est assez délicat, cela est due à la fréquente apparence kystique (kystes atypiques, cloisonnés ou à parois épaissies, bordés par d'authentiques foyers de carcinome bien que fréquemment pris pour des kystes banals (Chrétien et al., 1997). Des kystes multiples d'allure bénigne s'observent

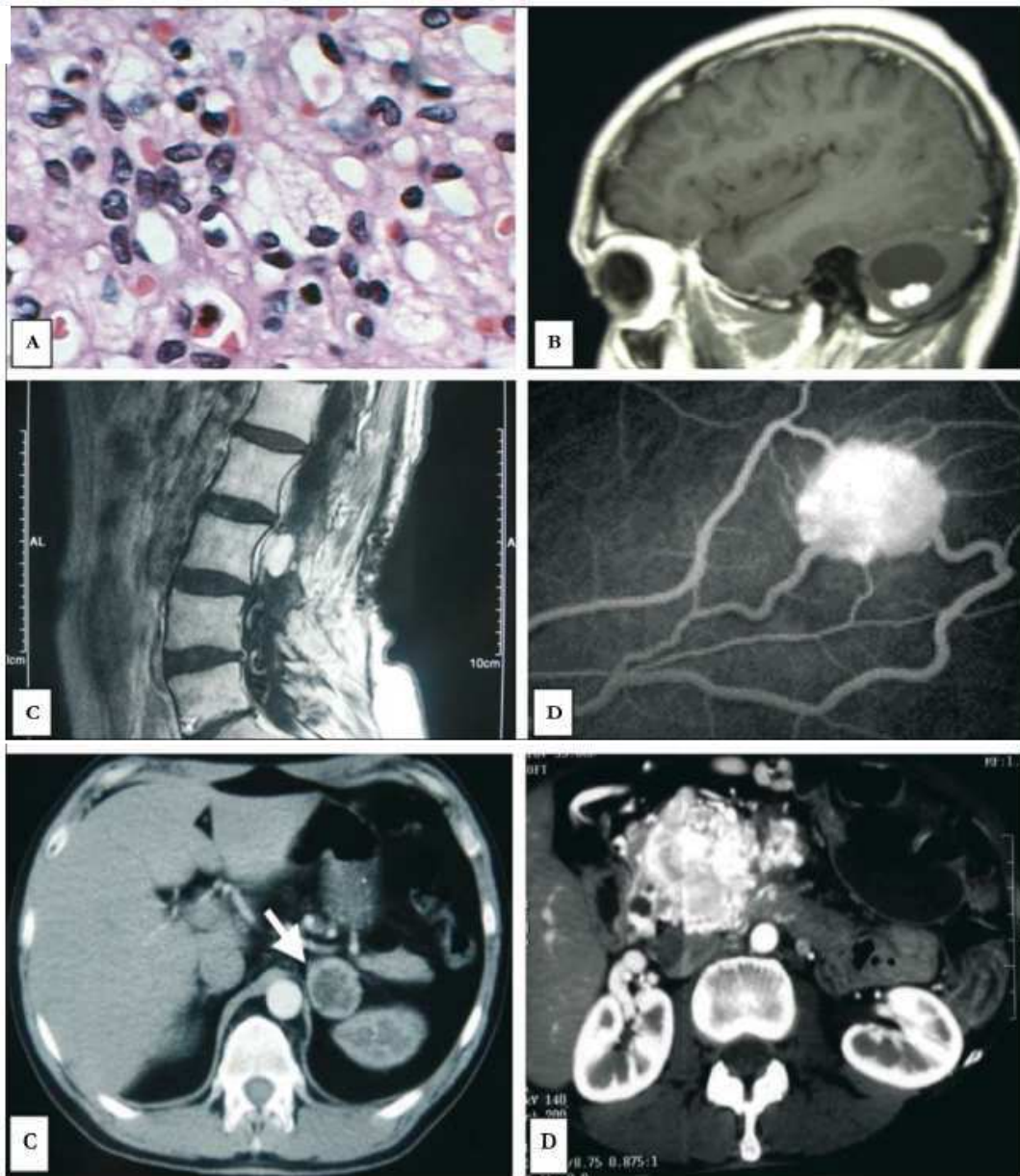
également, seuls ou associés aux lésions tumorales, parfois si nombreux qu'ils peuvent faire évoquer une polykystose rénale.



De grandes variations des incidences des manifestations de la maladie VHL existent dans la littérature médicale, expliquées par des différences nationales et même régionales.

Figure 14: Fréquence des lésions VHL les plus fréquentes.
(Adapté de Barry et al., 2004)

- Le phéochromocytome (Figure 15) est une affection tumorale rarement maligne, souvent bilatérale, se voit essentiellement chez les patients VHL de type 2A, elle survient dans 10 à 25% des cas, elle peut constituer la seule manifestation de la maladie. Cette tumeur se développe à partir des cellules chromaffines de la médullo-surrénale. Cette tumeur est exceptionnelle, mais touche des patients relativement jeunes (20-50 ans), elle peut provoquer des palpitations, des sueurs, des céphalées et de l'hypertension artérielle due à la production de catécholamines. Lorsque le caractère malin est prouvé, cette tumeur peut être le siège d'émission de métastases hépatiques et osseuses.
- Les kystes pancréatiques (Figure 15) présents dans 30 à 70% des cas, n'entraînent pratiquement pas de retentissement clinique majeur, sauf dans certains cas des problèmes digestifs et parfois de diabète par blocage des canaux pancréatiques entraînant l'arrêt de la sécrétion d'insuline. La tumeur pancréatique est sans doute la plus méconnue de toutes les manifestations de la maladie de VHL, peut-être parce qu'elle consiste habituellement en des kystes multiples, plus rarement en cystadénomes séreux ou kystes isolés. Par contre les tumeurs neuroendocrines (TNE), qui sont présentes chez près de 12% des cas et généralement multifocales, peuvent présenter un réel potentiel malin car elles sont le siège de métastases.
- La tumeur du sac endolymphatique (Figure 15), elle fut la dernière tumeur reconnue dans le cadre des manifestations de la maladie VHL, elle correspond à des adénocarcinomes de bas grade, parfois bilatérale, longtemps confondue avec des métastases de cancer thyroïdien ou rénal. Les symptômes sont souvent des vertiges, plus rarement des acouphènes, une sensation de pression et une paralysie faciale. Une surdité uni- ou bilatérale peut être la première manifestation d'une maladie VHL. La perte de l'audition peut être progressive ou brusque. Une étude datant de 1997 a montré que 15% des patients VHL présentaient une tumeur du sac endolymphatique et que 60% des patients diagnostiqués développaient une baisse de l'acuité auditive qui pourrait être attribuée à des lésions infraradiologiques (Manski et al., 1997).



A : Hémangioblastomes du SNC et de la rétine x400 (aspect histologique) (x 400) (Richard et al., 2007).

B : Hémangioblastome kystique du cervelet (IRM) (Richard et al., 2007).

C : Hémangioblastome rachidien (IRM) (Richard et al., 2005).

D : Hémangioblastome rétinien (angiographie) (Richard et al., 2005).

E : Phéochromocytome(TDM) (Richard et al., 2003).

F : Tumeur endocrine du pancréas (TDM) (Richard et al., 2003).

Figure 15: Les lésions VHL les plus fréquentes.

2) Le gène *VHL*

Le gène *VHL* est un gène suppresseur de tumeur. Il a été identifié par Latif en 1993 dans la maladie de VHL (Latif et al., 1993). La recherche de mutations du gène *VHL* a non seulement confirmé son implication dans la maladie de VHL, mais elle a également montré qu'il était impliqué dans les CCR sporadiques (Gnarra et al., 1994).

Le gène *VHL* est localisé sur le bras court du chromosome 3 en position 3p25-26 (figure 16), sa taille est de 20 kd (Soussi 2000), il est composé de trois exons et code pour deux ARNm de 4,5 et de 4,7Kb qui codent respectivement pour deux protéines alternatives ou isoformes de 159 (pVHL₁₉) et de 213 (pVHL₃₀) acides aminés et ceci suite à un épissage alternatif dû à la présence de deux sites de traduction au niveau de l'exon 1 (Figure 17).

Le gène *VHL* n'est pas seulement exprimé dans les organes touchés par la maladie VHL mais il est largement distribué à la fois dans les tissus humains foetaux et adultes (Iliopoulos et al. 1995; Kessler et al., 1995; Latif et al., 1993; Richards et al., 1996).

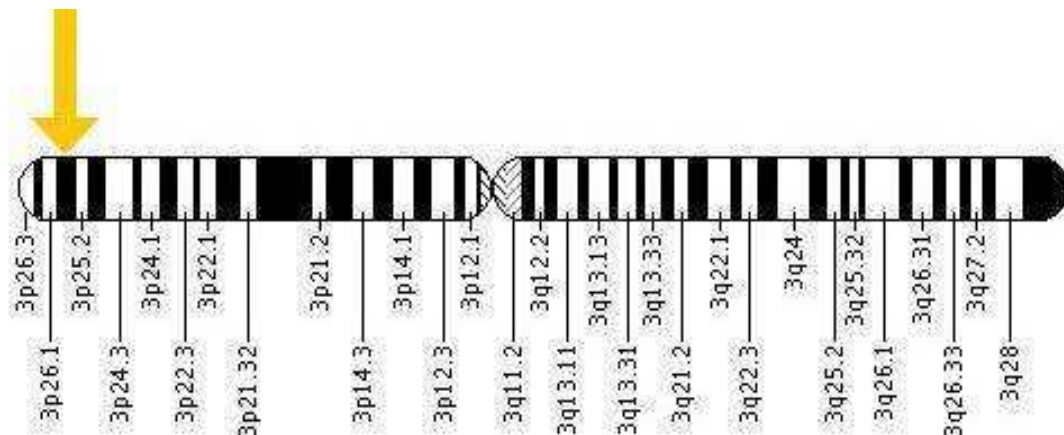


Figure 16: Localisation du gène *VHL* en position 3p25-26.

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/VHL>

Les mutations du gène *VHL* touchent les trois exons du gène. Dans plus des deux tiers des cas, il s'agit de permutations ou de délétions/insertions de paires de bases isolées. Pour le reste, il s'agit de grandes délétions ou de la disparition de tout le gène (Tableau 1). Le codon 167 constitue un «hot spot» dans lequel les mutations sont fréquentes.

	Mutations germinales du gène <i>VHL</i>	Mutations somatiques du gène <i>VHL</i>
Frameshifts	83	136
Délétions	56	113
Insertions	27	23
Mutations ponctuelles	302	85
Mi-sens	253	64
Non-sens	49	21
Mutation complexe	1	1
Transitions	64%	41%
Transversions	36%	59%
Total	386	222

Tableau 1: Tableau des mutations du gène *VHL*
(Bérout et al., 2000).

Le promoteur du gène est situé au sein d'un îlot CpG et ne contient ni boîte TATA ni boîte CCAAT mais plusieurs sites de liaison putatifs pour des facteurs transcriptionnels dont SP1 (Kuzmin et al., 1995).

Le gène *VHL* fonctionne selon le modèle de Knudson qui nécessite l'addition de deux événements mutagéniques successifs « two-hits ». La réintroduction du gène *VHL* dans des cellules tumorales *VHL*^{-/-} RCC, supprime la croissance de la tumeur *in vivo*. Il existe un tableau clinique suivant le type de mutations germinales du gène *VHL* :

- Les mutations provoquant une protéine VHL plus courte, ou empêchant sa configuration correcte sont impliquées dans la maladie de VHL de type 1. Cliniquement, ceci se caractérise par un risque de phéochromocytome moins important.
- Les mutations ne provoquant qu'un échange d'un seul acide aminé à une position bien précise de la protéine VHL, semblent être associées à des formes de la maladie de type 2.

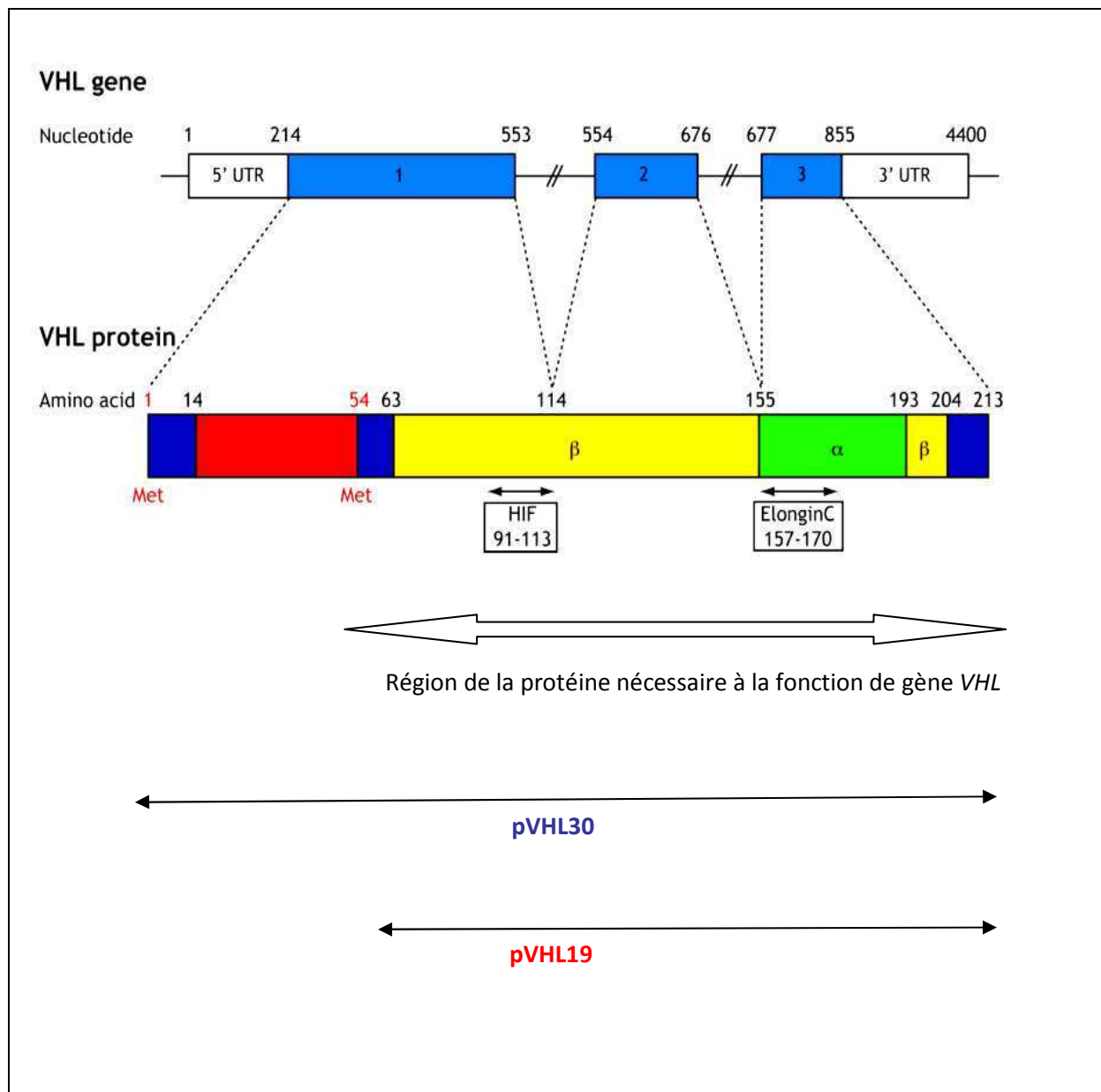
- La perte de tout le gène s'accompagne d'un moindre risque de carcinome rénal (Cybulski et al., 2002 ; Maranchie et al., 2004).

Des études ont prouvées que la délétion du gène *VHL* par perte d'hétérozygotie (LOH pour loss of heterozygoty) est retrouvée dans 84 à 98% des cas de cancer sporadique du rein ; et qu'une mutation de l'allèle restant est observée dans à peu près 50 % des cas (Gnarra et al., 1994 ; Shuin et al., 1994 ; Herman et al., 1994 ; Kondo et al., 2002). Ces mêmes études montrent qu'il existe dans 10 % des cas une inactivation du gène *VHL*.

Ce qui suggère que l'inactivation bi-allélique du gène *VHL* est présente dans la très grande majorité des tumeurs du rein essentiellement des carcinomes à cellules claires, laissant croire que cet événement pourrait être l'événement sentinelle initiateur fondamental dans la genèse de la tumeur du rein (Rini et al., 2007 ; Patel et al., 2006).

3) Mode de fonctionnement de la protéine pVHL

Le gène *VHL* produit deux protéines pVHL₃₀ et pVHL₁₉ communément appelées pVHL, la translation interne du codon 54 de l'ARNm conduit à la formation de pVHL₁₉ (Figure 17). Les deux isoformes ont en commun deux domaines fonctionnels majeurs α et β , mais leurs propriétés et leur localisation cellulaire seraient en partie différentes (Kaelin, 2002). La protéine *VHL* ou pVHL (Figure 18), exprimée dans tous les tissus, est localisée majoritairement dans le cytosol. La localisation subcellulaire de pVHL apparaît variable et très complexe, la protéine allant et venant du cytoplasme au noyau (Lee et al., 1996). La pVHL possède plusieurs rôles dont le plus important est son intervention dans la réponse tissulaire à l'hypoxie.



Le codon interne ATG (Met) en position 54 est responsable de la production de la pVHL₁₉. L' α -domaine se lie à Elongin C et le β -domaine agit comme un domaine de reconnaissance du substrat. Des mutations VHL sont également trouvées dans les domaines HIF et Elongin C.

Figure 17: Schéma du gène *VHL* et de la protéine pVHL.

Adapté de :

http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_08/S1462399401002654sup005.pdf

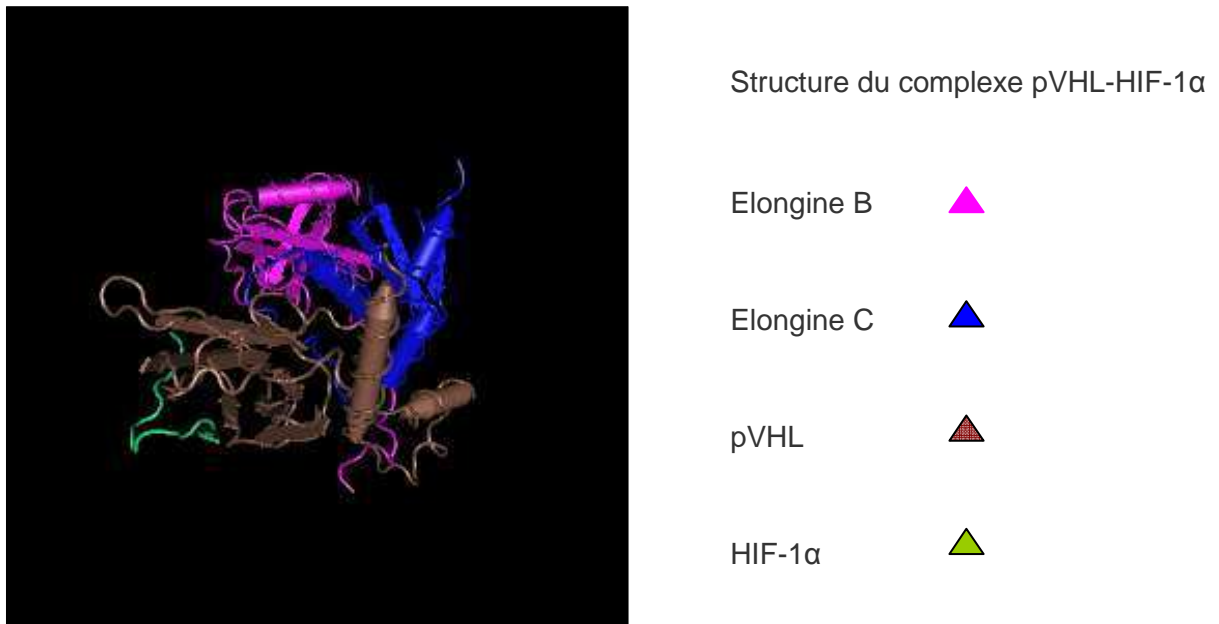


Figure 18: Schéma en 3D de la pVHL.
(Min et al., 2002).

➤ Rôle de pVHL dans la réponse tissulaire à l'hypoxie.

La pVHL fait partie d'un complexe multiprotéique E3 ubiquitine ligase comprenant les élongines C, B, la culline 2 (Cul2) et Rbx1.

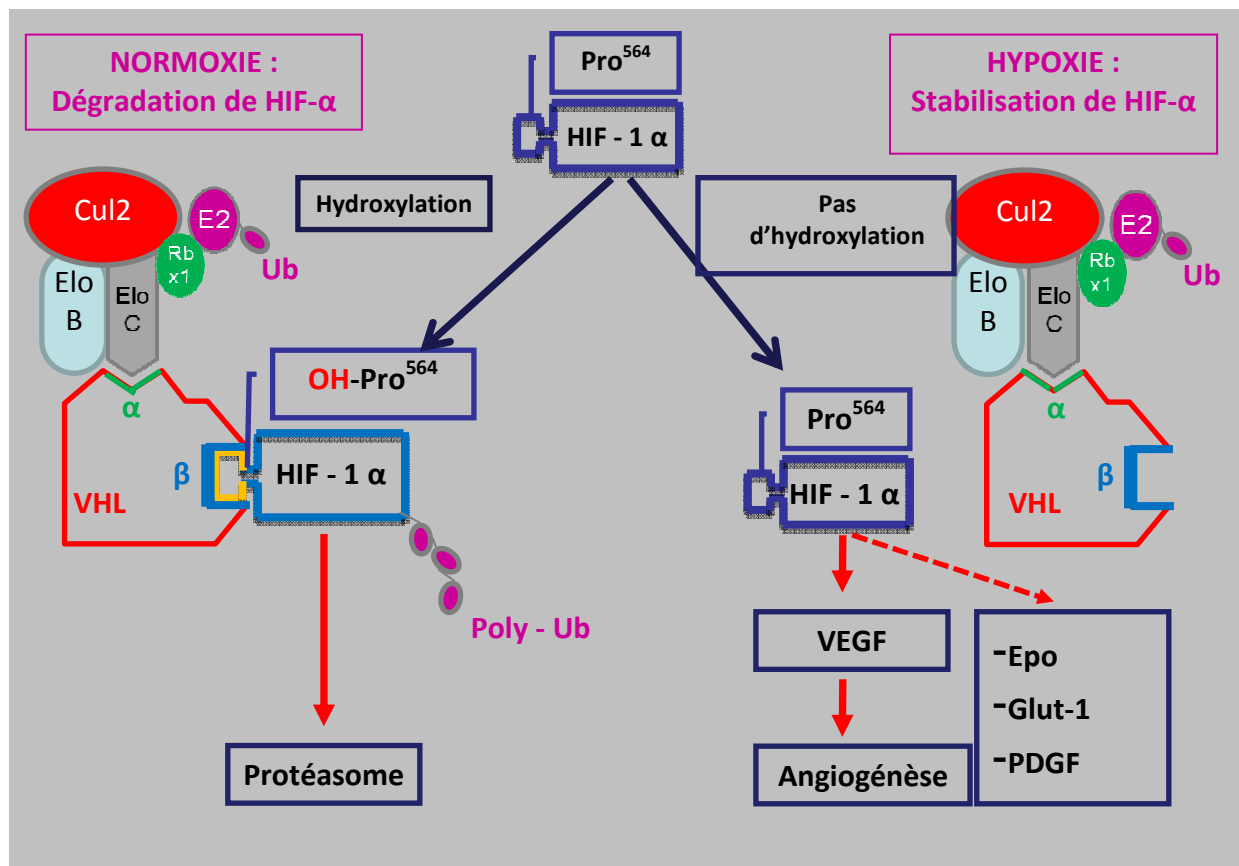
La pVHL non mutée et dans les conditions normales (normoxie) va se lier, au niveau des acides aminés 157 et 170 situés dans son domaine α , à l'élongine C et former un complexe avec l'élongine B et Cul2. Assisté par Rbx1 et éventuellement NEDD8, ce complexe va agir en tant que ubiquitine ligase E3, il va cibler et fixer le facteur HIF (Hypoxia inducible factor) au niveau de la région β entre les acides aminés 91 à 113 pour polyubiquitination et dégradation par la sous unité 26S du protéasome.

Le facteur de transcription HIF est un complexe protéique qui accroît l'expression de gènes spécifiques en présence de faibles concentrations d'oxygène (Wang et al., 1993), il a été isolé pour la première fois en 1993 et ses composantes protéiques ont été identifiées en 1995 (Wang et al., 1995) et il existe dans toutes les cellules.

Le facteur HIF1 constitue le facteur le plus connu et le plus important de la famille des HIF. Chaque complexe HIF est constitué de 2 unités : une sous-unité régulatrice alpha (HIF-1 α) régulée par l'oxygène et une sous-unité constitutive bêta (HIF-1 β) impliquée également dans la réponse aux xénobiotiques qui s'accompagne d'une hétérodimérisation avec le récepteur intracellulaire AhR. Ces deux sous-unités appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH/PAS. Trois gènes distincts codent pour la sous-unité HIF α : *HIF-1 α* , *HIF-2 α* et *HIF-3 α* .

En situation de normoxie (présence d'oxygène), HIF-1 α est très instable et il est hydroxylé par un mécanisme enzymatique sur ses deux résidus proline situés en 402 et 564 dans le domaine ODDD (oxygen dependent degradation domain). Le complexe VHL, qui opère comme l'élément de reconnaissance du complexe ubiquitine ligase E3 est alors dégradé dans le protéasome (Kaelin et al., 2002) (Figure 19).

En situation d'hypoxie (absence d'oxygène) et/ou dans le cas d'une anomalie du gène *VHL*, HIF α est stabilisé, non hydroxylé, incapable de se lier au complexe VHL qui en conséquence ne pourra être dégradé par protéolyse (Richard et al., 2007). HIF α passe alors dans le noyau où il se conjugue à la sous-unité HIF β . L'hétérodimère ainsi formé se fixe ensuite sur des séquences d'ADN spécifiques (HRE pour hypoxia response elements) et entraîne l'expression d'une soixantaine de gènes cibles qui sont impliqués en priorité dans l'angiogénèse (VEGF, PDGF- β) mais aussi dans la croissance cellulaire (TGF- α), le métabolisme du glucose (transporteur de glucose Glut1), l'érythropoïèse (EPO), l'équilibre acido basique (CA9, anhydrase carbonique IX) et la survie cellulaire (Kaelin et al., 2002 ; Lauzier et al., 2006) (Figure 19).



En situation de normoxie, HIF-α se lie à la pVHL afin d'être dégradé dans le protéasome. Lors d'une anomalie de la pVHL ou en cas d'hypoxie, HIF-α est stabilisé empêchant sa dégradation dans le protéasome, il s'accumule dans le noyau induisant l'expression de certains gènes (HRE) dont VEGF et PDGF.

Figure 19: Rôle de pVHL dans la réponse tissulaire à l'hypoxie.

Adapté de :

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/VHLID132.html>

➤ VHL, HIF, VEGF et angiogénèse :

La surexpression du facteur de croissance vasculaire VEGF (vascular endothelial growth factor) est la principale cause de l'hypervascularisation des tumeurs associées à la maladie VHL.

Il existe 6 glycoprotéines appartenant à la famille VEGF ayant un rôle majeur dans l'angiogénèse normale et pathologique. Pour accomplir ses fonctions le VEGF se lie à trois récepteurs situés sur les cellules endothéliales caractérisés par leur activité tyrosine-kinase : VEGFR-1 (appelés aussi FLT-1), VEGFR-2 (appelés aussi KDR) et VEGFR-3 (appelé aussi FLT-4).

Le VEGF est surexprimé dans les tumeurs liées à la maladie de VHL et notamment l'hémangioblastome (Wizigmann-Voos et al., 1995) et dans les cancers du rein, caractérisés par une riche vascularisation. En effet les cellules tumorales « stromales » dérivent de précurseurs mésenchymateux angioformateurs bloqués dans leur maturation (Glasker et al., 2006). L'inactivation des deux copies du gène *VHL* entraîne l'accumulation de HIF dans les cellules stromales et la surexpression de ses gènes cibles (Kaelin et al., 2002). Le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales et le PDGF- β (platelet-derived growth factor) agit sur les péricytes, aboutissant au développement des néocapillaires sanguins. Le VEGF agit également sur la perméabilité vasculaire et sa surexpression expliquerait la survenue des kystes. La production d'EPO par les cellules stromales est responsable de la polyglobulie secondaire qui accompagne certains hémangioblastomes du cervelet. Enfin, le TGF- α et son récepteur (EGF-R) sont également surexprimés par les cellules stromales, ce qui suggère l'existence d'une boucle autocrine stimulant leur prolifération.

Pour les kystes et cancers rénaux, le problème est plus complexe, car les cellules épithéliales jouxtant les tumeurs bénignes présentent déjà une inactivation des deux copies du gène *VHL*, entraînant une surexpression de HIF, qui à elle seule est insuffisante pour expliquer la transformation maligne, ce qui laisse à penser que d'autres remaniements chromosomiques interviennent lors des cancers rénaux.

Les cellules épithéliales rénales sont très sensibles aux effets mitogènes du TGF- α dont la surexpression expliquerait le développement des kystes en conjonction avec des anomalies dans la structure des cils primaires et dans l'assemblage de la matrice extracellulaire. Après la transformation maligne des cellules, la production anormale de

VEGF et de PDGF- β par les cellules tumorales est responsable, comme pour les hémangioblastomes, du développement important de la vascularisation.

La voie HIF ne semble pas intervenir dans le développement de phéochromocytomes, ceci a été constaté par la rareté des mutations somatiques dans les cas de phéochromocytomes sporadiques ainsi que les mutations associées à certains types cliniques de la maladie VHL. Des expériences ont montré que la perte de la pVHL est responsable d'une absence de dégradation des protéines kinases C (PKC) atypiques et d'une induction de Jun- β (antagonistec-Jun) qui serait à l'origine d'un défaut d'apoptose de ces précurseurs dont dérivent les phéochromocytomes. Rappelant que lors du développement embryonnaire un grand nombre de cellules, précurseurs des neurones, entrent en apoptose sous l'action de Jun- β et de prolyl-hydroxylase 3 (Lee et al., 2005).

➤ pVHL et régulation de la transcription

Le gène *VHL* joue un rôle crucial au niveau de la régulation de la transcription de l'ADN en ARN, étape dépendante de l'ARN polymérase. La pVHL diminue en effet l'élongation de la transcription par interaction avec le complexe d'élongine (ou SIII), protéine trimérique qui facilite l'action de l'ARN polymérase lorsqu'elle rencontre des régions du génome entraînant des « pauses » transitoires (Aso et al., 1996 ; Duan et al., 1995). La pVHL comporte une zone de forte homologie avec la sous-unité A (sous-unité catalytique) de l'élongine entre les acides aminés 157 et 168 par laquelle elle se lie au dimère B-C (sous-unité régulatrice) à l'état normal. Chez les patients où le gène *VHL* est muté, la protéine est absente, tronquée ou non fonctionnelle, et l'élongine A se lie donc préférentiellement au dimère B-C, ce qui induit une suppression des arrêts de l'ARN polymérase entraînant une élongation excessive. Certains oncogènes seront alors surexprimés, provoquant un dérèglement du cycle cellulaire (Duan et al., 1995).

➤ pVHL et prolifération cellulaire :

In vivo, la réintroduction du gène *VHL* dans des cellules tumorales rénales *VHL*^{-/-} RCC stoppe la croissance de la tumeur (Iliopoulos et al., 1995), ce qui suggère que le *VHL* joue un rôle de « gate-keeper » dans le contrôle de la prolifération cellulaire (ou dans celui de la mort cellulaire) (Kinzler et al., 1995). Plusieurs équipes ont focalisées leurs travaux sur cette

voix afin de rechercher au niveau de ces cellules les défauts de croissance susceptibles d'être corrigés par la réintroduction du gène *VHL*.

Une équipe a pu montrer, en 1998, que les cellules *VHL*^{-/-} RCC cultivées à faible confluence, ne s'arrêtent pas de croître en l'absence de sérum, ce qui représente une des caractéristiques typiques des cellules tumorales (Pause et al., 1998). La réintroduction du gène *VHL* a permis de rendre à nouveau la croissance cellulaire dépendante de la présence de sérum, suggérant que le gène *VHL* agit dans le contrôle du cycle cellulaire. Or, les cellules *VHL*^{-/-} RCC peuvent quand même croître dans des conditions d'inhibition par contact. Ce qui laisse à suggérer qu'un facteur secrété en abondance par ces cellules aurait un rôle sur les anomalies de croissance observées à faible densité cellulaire. Ce facteur secrété en excès dans les cellules RCC en culture et les tumeurs RCC *in vivo* est le facteur de croissance TGF- α dont le gène codant est sous le contrôle du gène *VHL* (Knebelmann et al., 1998) et de l'oxygène (De Paulsen et al., 2001). Le TGF- α , secrété en excès par les cellules *VHL*^{-/-} RCC, est capable de stimuler la prolifération des cellules épithéliales du tubule proximal du rein, probablement à l'origine des RCC. Effectivement, l'inhibition de la voie TGF- α / EGF-R (récepteur de l'EGF « epidermal growth factor »), est suffisante pour arrêter la prolifération des cellules *VHL*^{-/-} RCC en l'absence de sérum et à former des tumeurs lors d'injections à des souris immunodéficientes (Prewett et al., 1998).

Ceci permet de proposer un model de développement des RCC selon lequel la perte de fonction du gène *VHL*, en stabilisant HIF α , stimule la transcription de certains gènes, comme le TGF- α qui agit de façon autocrine en activant le récepteur de l'EGF provoquant ainsi la prolifération des cellules épithéliales rénales. Parallèlement, le VEGF activé par la perte de fonction du gène *VHL*, stimule l'angiogénèse.

➤ **Corrélations géotypes- phénotypes**

Un grand nombre des mutations germinales du gène *VHL* ont été identifiées, elles sont regroupées dans une base de données « <http://www.umd.be/VHL/> », crée par le Dr. Christophe Bérout (Bérout et al., 1998). Plus de 160 mutations distinctes dans 500 familles ont déjà été rapportées, dans la majorité des cas (70%) ce sont des mutations ponctuelles donnant lieu à une protéine non fonctionnelle (mutations faux-sens) ou tronquée (mutations

non-sens, micro-insertions et/ou délétions (Zbar et al., 1996). Dans les 30% restant ce sont des délétions étendues du gène responsables d'une absence partielle ou totale de pVHL.

Le tableau 2 présente l'étude de corrélations génotypes-phénotypes dans la maladie VHL, confirmées par la distinction clinique basée sur la présence ou pas du phéochromocytome.

Type de la maladie VHL	Résultats de la mutation	Hb	RCC	Phéo	Déficiência moléculaire
Type 1	Protéine tronquée	+	+	-	Surexpression du HIF et de ses gènes cibles
Type 2A	Substitution d'acides aminés	+	-	+	Surexpression du HIF et de ses gènes cibles
Type 2B	Substitution d'acides aminés	+	+	+	Surexpression du HIF et de ses gènes cibles
Type 2C	Substitution d'acides aminés	-	-	+	Déficiência de la matrice extracellulaire + dégradation du HIF maintenue

HB : hémangioblastome ; Pheo: phéochromocytome; ECM: matrice extracellulaire.

Tableau 2: Corrélation génotype/ phénotype de la maladie VHL.

Des mutations somatiques du gène *VHL* sont également observées avec une très grande fréquence, jusqu'à 75%, dans les cancers du rein à cellules claires sporadiques (kaelin et al., 2002 ; Richard et al., 2003 ; Gnarra et al., 1994). La répartition de ces mutations sur le gène est différente de celle des mutations germinales, elles touchent uniformément les 3 exons du gène sans jamais toucher la région de liaison avec l'élongine (Bailly et al., 1995 ; Gnarra et al., 1994).

➤ VHL et polyglobulies congénitales :

La polyglobulie congénitale (polyglobulie de Chuvash) est une affection héréditaire autosomique récessive (Ang et al., 2002) qui se caractérise par des mutations germinales touchant le gène *VHL* ; la mutation (R200W/R200W) en est la plus caractéristique, elle affecte un codon qui n'est pas touché au cours de la maladie VHL ni dans les cancers du rein sporadiques. Cette maladie se manifeste par un taux élevé d'érythropoïétine (EPO), l'existence de varices et d'angiomes vertébraux, la survenue d'accidents vasculaires cérébraux, l'absence de tumeur mais aussi par une conservation de la capacité à dégrader HIF de manière retardée. L'existence d'une voie de régulation de l'EPO indépendante de HIF est ainsi suggérée.

➤ Assemblage de la matrice extracellulaire :

La perte de fonction du gène *VHL* conduit à l'invasion cellulaire et est associée à un défaut de l'assemblage du réseau matriciel indépendant de HIF (Ohh et al., 1998). Il a été démontré que la pVHL interagissait avec le collagène IV α 2 avec lequel elle co-localise au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et non directement avec la fibronectine comme initialement supposé (Kurban, 2006). Cette interaction est induite par l'hydroxylation des prolines et des lysines de la pVHL.

➤ Maintien des jonctions cellulaires :

De précédentes études ont montrées que les cellules *VHL*^{-/-} RCC présentent une anomalie des jonctions adhérentes et serrées, cette anomalie s'associe à un aspect allongé des cellules, une perte de la polarité cellulaire et une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Calzada et al., 2006). Ces cellules retrouvent un phénotype normal lors de la réintroduction du gène *VHL* non muté dans ces cellules, ce qui en déduit que la pVHL joue un rôle important dans le maintien de l'architecture tissulaire (Richard et al., 2007).

➤ Stabilisation des microtubules et structure des cils primaires :

Au niveau de son domaine α , la pVHL se lie aux microtubules afin de les stabiliser en empêchant la dépolymérisation, elle contribue donc à la régulation de l'organisation du cytosquelette (Hergovich et al., 2003).

Chez les patients VHL, la présence de kystes rénaux est généralement un signe précurseur du cancer du rein (Pazour et al., 2004). Il a été démontré que la modification de la structure des cils joue un rôle important dans l'apparition des kystes rénaux. Parallèlement, on sait que l'inactivation du gène *VHL* entraîne une abrogation des cils dans les kystes rénaux et dans les lignées de cancer rénal chez les patients (Lutz et al., 2006 ; Esteban et al., 2006). Ce qui en déduit que la pVHL par son interaction avec la kinésine 2, qui joue le rôle de moteur le long des microtubules, régulerait la structure des cils (Mans et al., 2006).

➤ pVHL et p53 :

La pVHL aurait une action de stabilisation et d'activation de la p53, en réponse à des dommages de l'ADN. Lors d'un stress génotoxique, le domaine α de la pVHL interagit avec la p53 et forme un complexe qui se lie à la protéine ATM et l'acétyltransférase p300, ce qui entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 et induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Les cellules *VHL*^{-/-}RCC présentent une apoptose atténuée qui s'annule lors de la réintroduction du gène *VHL* normal.

G - Traitement

Il est actuellement largement démontré que l'incidence des tumeurs rénales est en nette augmentation. Parallèlement, le développement des moyens de diagnostic a permis de dépister précocement les tumeurs rénales ainsi que de spécifier leurs tailles et leurs stades.

Le traitement chirurgical est considéré jusqu'à ce jour comme le traitement curatif le plus efficace dans le cas de tumeurs localisées. Cependant plusieurs autres techniques ont été élaborées et constitue une vraie avancée dans le traitement des tumeurs rénales.

1) La néphrectomie élargie :

Elle a été pendant longtemps le traitement de référence des cancers du rein, elle comprend l'exérèse de la loge rénale et de la surrénale, elle est recommandée chez les patients métastatiques mais présentant un bon état général ou chez les patients ayant des tumeurs rénales ne répondant pas aux indications de la chirurgie conservatrice.

2) La néphrectomie partielle :

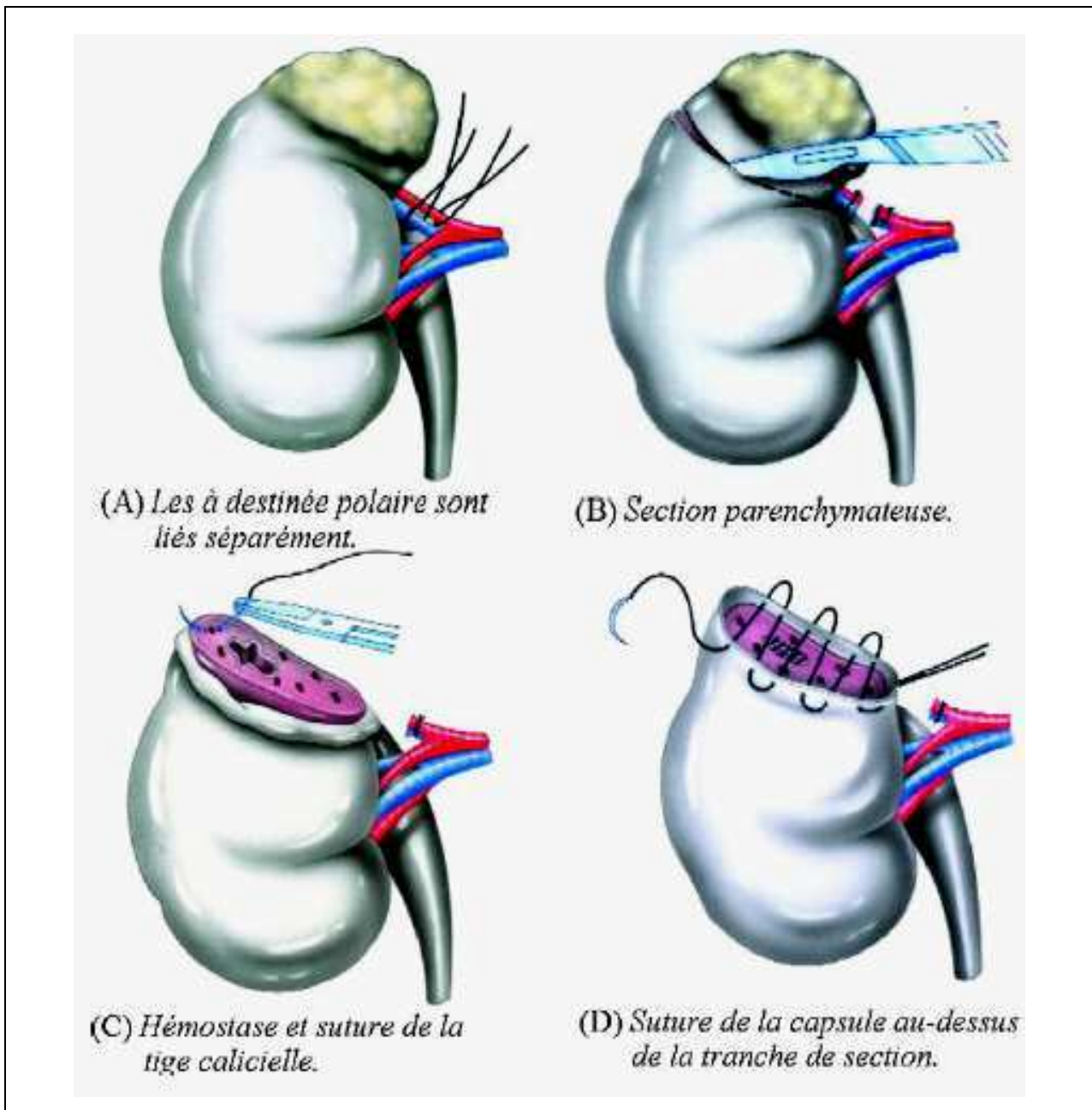
Cette intervention est de plus en plus pratiquée, elle permet une ablation de la tumeur rénale, tout en conservant la fonction rénale, elle permet ainsi de préserver le parenchyme rénal.

Elle peut être pratiquée soit par laparotomie (le plus souvent par lombotomie ou plus rarement par ouverture abdominale); soit par laparoscopie; soit récemment par Vagotomie (effectuée pour la première fois en Aout 2010 par l'équipe d'urologie des Hospices civils de Lyon sur une patiente obèse, chez laquelle, atteindre le rein par voie abdominale était très risqué).

La néphrectomie partielle (Figure 20) est recommandée dans :

- Les tumeurs inférieures ou égales à 4 cm de localisation corticale à développement exophytique avec rein controlatéral sain.
- Les tumeurs bilatérales, sur rein unique, chez les patients insuffisants rénaux ou à risque d'évolution vers une insuffisance rénale.
- Les formes héréditaires.

Les complications de la néphrectomie partielle sont plus fréquentes qu'une néphrectomie totale ou élargie, elles sont en général soit hémorragiques pouvant entraîner l'ablation totale du rein, soit urinaires comme la fistule urinaire ou les infections urinaires.



A, B, C et D : différents temps d'une néphrectomie partielle et vues per-opératoires.

Figure 20: Néphrectomie partielle du rein.
(Descotes, 2009).

3) Les traitements conservateurs :

La chirurgie conservatrice constitue la meilleure alternative car elle permet de préserver la fonction rénale, elle est recommandée chaque fois que cela est possible, surtout lorsque la néphrectomie partielle est risquée pour le patient.

Les patients pouvant bénéficier de la chirurgie conservatrice sont ceux qui présentent des tumeurs bilatérales, un rein unique, chez les insuffisants rénaux ou à risque d'une évolution vers une insuffisance rénale, dans les récurrences de tumeur rénale ou dans les formes héréditaires récidivantes.

La chirurgie conservatrice comporte des techniques dites mini-invasives, qui sont actuellement en cours de développement comme l'ablation par cryothérapie, par radiofréquence (RFA) ou par ultrasons de haute intensités focalisé (HIFU). Ces techniques permettent l'ablation des tumeurs rénales de petit volume et de bas grade et de diminuer les risques et la morbidité liés à la néphrectomie partielle ou élargie.

- La cryothérapie ou cryoablation :

Cette technique met en œuvre le refroidissement in situ du tissu tumoral par de la glace pilée stérile ce qui entraîne une congélation de la matrice extracellulaire puis du milieu intracellulaire avec éclatement de la membrane et mort cellulaire. Elle permet de faciliter l'exérèse tumorale, surtout des lésions centrales, qui s'effectuent soit sous microscope soit avec des lunettes grossissantes. Lors de la phase de réchauffement, une ischémie de la zone traitée consécutive à une vasoconstriction a lieu (Gill et al., 2003).

La cryoablation se termine généralement par une auto-transplantation du rein soit in situ soit le plus souvent sur les vaisseaux iliaques.

La cryothérapie est parmi les techniques mini-invasives les plus étudiées présentant des résultats très satisfaisants et celle qui bénéficie du plus grand recul.

- Ablation par radiofréquence RFA :

Les radiofréquences sont des rayonnements électromagnétiques non ionisants dont les longueurs d'onde s'étendent de 1 m à 30 km. Les ondes utilisées lors de l'ablation par radiofréquence sont de moyenne fréquence (400 à 500 kHz).

Les ondes appliquées par radiofréquence provoquent au sein du tissu cible une élévation de température variant de 50 à 100 degrés (Goldberg et al., 2000) ; une nécrose du tissu chauffé est alors observé (Gill, 2003). L'évolution de la tumeur traitée est contrôlée par TDM ou IRM.

Les critères pour bénéficier d'une RFA sont :

- Tumeur de faible volume (< 35 – 40mm), exophytique, à distance du hile chez un sujet présentant des signes de comorbidité importants ou âgé de plus de 75 ans ou ayant une espérance de vie courte.
- Récidive locale d'un cancer rénal de petite taille et de bas grade.
- Dans le cadre d'une maladie VHL lorsque le patient présente une nouvelle localisation tumorale de petite taille (< 35 – 40 mm).
- Tumeur sur rein unique.

Quelques études ont été effectuées sur l'ablation des tumeurs rénales par RFA mais les critères sont différents d'une étude à l'autre tant sur le matériel (électrodes, générateurs, puissances utilisées...) que sur le déroulement et le suivi des patients ; ceci rend les comparaisons impossibles. La RFA présente toutefois des complications plus au moins importantes selon le patient, mais peut être considérer comme une technique peu agressive surtout pour les patients âgés.

- Les ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU)

L'ablation par micro-ondes, la thémothérapie induite par laser (LITT) ou l'ablation par photon radiation sont d'autres sources d'énergie possibles.

H - La thérapie ciblée

Ces dernières années, un intérêt particulier est accordé à la thérapie ciblée dans le traitement du cancer du rein métastatique dont le traitement a longtemps été limité à l'immunothérapie par l'interféron alpha et/ou l'interleukine 2.

En effet, la thérapie ciblée met en jeu des molécules qui agissent sur les mécanismes de l'angiogénèse du cancer rénal, ce qui a permis de révolutionner la prise en charge des patients et une meilleure maîtrise des traitements par les cliniciens. Ces traitements ont permis d'obtenir une amélioration de la survie et constitue un nouvel espoir pour les patients.

Toutefois, ces nouvelles thérapeutiques suscitent de nombreuses questions actuelles concernant l'utilisation de ces antiangiogéniques. La mise en place d'une thérapie ciblée remet en question la place de la néphrectomie en situation métastatique, l'intérêt d'un traitement

adjuvant dans les situations à risque de récurrence, la nécessité d'un traitement néo-adjuvant dans les formes localement avancées, le choix de la première ligne de traitement, les différentes possibilités du schéma thérapeutique et leurs conséquences sur la qualité de vie et surtout l'apport éventuel de l'imagerie fonctionnelle dans l'évaluation de l'efficacité de ces nouveaux traitements.

Les cellules cancéreuses sont génétiquement instables ce qui rend difficile la conception de molécules ciblées. Néanmoins, des molécules antiangiogéniques ont vu le jour, notamment celles qui agissent sur les voies de signalisation des facteurs de croissance angiogéniques, principalement VEGF et PDGF.

Cinq molécules antiangiogéniques qui agissent sur trois effecteurs de l'angiogénèse tumorale sont actuellement disponibles et d'autres sont en développement :

- Le Bevacizumab :

Anticorps monoclonal qui inhibe l'angiogénèse tumorale en ciblant le VEGF. Cet anticorps est aussi utilisé dans le cancer du poumon, du colon et du sein au stade de métastase. Une étude américaine en 2003 a démontré que le bevacizumab a bien été toléré et a considérablement diminué le temps de progression (TTP) comparé à un placebo de 2,5 mois contre 4,8 mois (Yang et al., 2003).

En 2007, une autre étude sur des patients en métastase d'un cancer rénal à cellules claires, a comparé l'efficacité et l'innocuité du bevacizumab en association avec l'IFN- α -2a comparativement à l'IFN- α -2a administré seul et à un placebo. Les résultats montrent que le bevacizumab en association avec l'IFN- α -2a a été bien toléré et a sensiblement amélioré à la fois le taux de réponse objective (31% contre 13% ; $p < 0,001$) et le temps de survie sans progression (PFS) (10,2 contre 5,4 mois ; $p < 0,001$) (Escudier et al., 2007).

Le bévacizumab a obtenu son AMM dans le cancer du rein avancé et/ou métastatique le 14 décembre 2007.

- Le Sorafenib :

Inhibiteur de plusieurs Tyrosine kinases exemples : Raf, PDGFR, VEGFR2 & 3 et c-Kit. Beaucoup d'études effectuées sur des patients métastatiques avec un cancer rénal, démontrent sans équivoque que le Sorafenib a une action significative sur l'augmentation du temps de survie sans progression en comparaison avec un traitement par l'IFN- α -2a ou à un placebo, surtout chez des patients à un stade avancé chez lesquels une précédente thérapie a échoué (Escudier et al., 2007).

- Le Sunitinib :

Inhibiteur de différents récepteurs Tyrosine kinases comme le PDGFR, VEGFR, c-Kit, RET, CSF-1R, Flt3, il est destiné au traitement du cancer du rein avancé et/ou métastatique et des tumeurs stromales digestives. D'après une étude de 2007, il aurait un certain degré de toxicité pour le cœur (Chu et al., 2007). Son action dans le traitement du cancer rénal est toutefois très satisfaisante, car il entraîne un bon taux de réponses objectives en première ligne, une augmentation de la survie sans progression de la maladie et donc un gain de survie en comparaison des traitements antérieurs.

- Temsirolimus :

Inhibiteur de la mTOR (mammalian target of rapamycin) cible privilégiée de la voie intracellulaire conduisant à la prolifération cellulaire, l'invasion, la néoangiogénèse. La mTOR est une kinase intracellulaire qui régule la réponse cellulaire aux éléments nutritifs, à l'énergie et aux facteurs de croissance exogènes. L'inhibition de mTOR bloque à la fois le cycle cellulaire en phase G1-S, la croissance cellulaire et l'angiogénèse.

En comparaison avec l'interféron alfa, le temsirolimus améliorer la survie globale chez les patients atteints de carcinome rénal métastatique de mauvais pronostic. L'association du temsirolimus à l'interféron n'a pas d'effet sur la survie (Hudes et al., 2007).

- Everolimus :

Inhibiteur cible de l'activité sérine/thréonine kinase de la protéine mTOR, généralement recommandé en deuxième ligne de traitement chez les patients ayant subi un échec d'une précédente thérapie ciblée avec d'autres molécules.

Cependant, de nouvelles techniques et de nouvelles molécules sont en cours d'évaluation pour le cancer rénal, ils permettront sans doute d'améliorer la qualité et le mode de traitement administré aux patients et peut être d'augmenter le taux de survie.

Partie III ISET nouvelle approche

A - Historique

Depuis 1997, les études démontrent que la principale cause de décès des patients atteints d'un cancer est le développement de métastases. Ces dernières se développent généralement suite à la migration de CTC issus de la tumeur primitive, ces cellules vont circuler dans le sang, arriver dans des organes à distance, proliférer et créer des métastases. La diffusion dans le sang des cellules tumorales à partir de la tumeur primitive est le signe le plus important et le plus précoce de l'invasivité tumorale. Elaborer une technique capable de détecter les cellules tumorales circulantes (CTC) de façon très sensible et spécifique serait un outil important dans l'élaboration du pronostic du cancer, le suivi des patients et la personnalisation de la thérapie (Mocellin et al., 2006). Le but serait de rechercher et de trouver ces cellules très rares, de prouver leur nature tumorale afin de mettre en place une thérapie pour prévenir ou empêcher les métastases. La détection précoce des CTC dans la circulation sanguine pourrait diminuer le risque de développement de métastases ou de récurrence. Il s'agit précisément de pouvoir isoler environ une CTC mélangée à approximativement 10 millions de leucocytes et à 5 milliards d'érythrocytes en 1 ml de sang.

Depuis plus de vingt ans, l'unité INSERM U 807 a dirigé ses recherches sur les cellules circulantes, ce qui a abouti à la mise en place en l'an 2000 de la technique ISET (Vona et al., 2000).

La technique ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor/Trophoblastic cells) permet non seulement la détection des cellules tumorales chez les personnes atteintes de cancers mais aussi la détection des cellules fœtales circulantes chez des femmes enceintes ce qui peut constituer un test efficace pour le diagnostic prénatal (Vona et al., 2002). L'équipe s'est néanmoins confrontée à quelques problèmes techniques comme la rareté des cellules circulantes tumorales.

B - But de la méthode

L'objectif de l'ISET (Vona et al., 2000) s'inscrit dans la nécessité d'enrichir des échantillons sanguins contenant de rares cellules circulantes tumorales (CTC) tout en

maintenant leurs intégrités et en limitant leurs pertes. Le principe de la technique se base sur une filtration du sang, sélectivement les particules de grandes tailles (CTC et cellules épithéliales) seront retenues par le filtre (Vona et al., 2004). Une microdissection laser ciblée, permet d'accéder aux cellules d'intérêts qui seront ensuite soumises à des analyses moléculaires. Les résultats moléculaires permettront de connaître l'origine de chaque cellule.

C - Caractéristiques de L'ISET

La technique ISET est une technique directe de détection des CTC, elle est caractérisée par une très grande sensibilité : elle peut isoler une CTC mélangée à 10 ml de sang (mélangée donc à 100 millions de leucocytes et à 50 milliards d'érythrocytes) dans 80% des tests effectués. L'autre paramètre essentiel de cette technique est sa spécificité.

Des études récentes ont montré que les cellules tumorales les plus invasives répriment l'expression de leurs antigènes épithéliaux par le processus EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) (Paterlini-Brechot et al., 2007). Les méthodes qui se basent sur l'isolation et/ou la reconnaissance des CTC à l'aide d'anticorps dirigés contre des antigènes épithéliaux s'exposent donc au risque de perdre les cellules tumorales les plus invasives. Parallèlement, on sait que des cellules épithéliales non tumorales peuvent également être présentes dans le sang.

Des méthodes comme CellSearch ou les plus récentes comme « Microchip Technologies », qui visent l'isolement des CTC par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les antigènes épithéliaux, s'exposent par conséquent au risque d'obtenir à la fois des faux positifs et des faux négatifs (Paterlini-Brechot et al., 2007).

Par contre, la méthode ISET permet l'isolement des CTC en se basant sur leur taille sans endommager leur morphologie. Il est donc possible d'obtenir un diagnostic des CTC par une analyse cytopathologique, cependant des études moléculaires sont nécessaires pour démontrer la nature tumorale des CTC et permettre de confirmer le diagnostic cytopathologique. Cette technique est potentiellement beaucoup plus spécifique que les autres techniques disponibles actuellement (Paterlini-Brechot et al., 2007).

D - Les applications de l'ISET

La technique ISET a été développée dans le but précis d'améliorer la survie des patients atteints de cancer, elle est en effet valable pour tout type de cancer solide (les cancers du colon, du sein, du foie, du pancréas, du poumon, de l'estomac, les cancers ORL, des ovaires, de l'utérus...)

Le test ISET pourrait s'appliquer comme :

- Marqueur prédictif de récurrence et/ou de métastase et comme marqueur de réponse à la thérapie chez des patients atteints d'un cancer. En effet, lors de la résection d'un cancer, la recherche de CTC par la technique ISET pourra donner une indication sur la persistance de CTC au niveau de l'organisme qui pourra être le siège de futures métastases.
- Test de dépistage des cancers chez des personnes saines. Les connaissances actuelles indiquent que, pour certains cancers et chez certains patients, les CTC pourraient se trouver au niveau de la circulation sanguine avant même que le cancer ne soit détectable. Dans beaucoup de cancers, les patients présentent déjà des métastases lors du diagnostic, ce qui indique que les cellules tumorales ont circulé pendant des années avant l'apparition des symptômes.

La technique ISET n'est pas encore au point pour être validée cliniquement au dépistage des cancers ; des confirmations techniques des analyses sont nécessaires, pour démontrer de façon sûre que la cellule est vraiment tumorale. Par la suite, il faudra développer des analyses moléculaires pour démontrer l'origine des CTC et de quel organe elles dérivent. L'application de la technique ISET pourrait aussi soulever des problèmes éthiques majeurs.

E - Les étapes de l'ISET

1) Traitement du sang

Cinq à dix ml de sang périphérique est prélevé sur anticoagulant (EDTA) et acheminé au laboratoire dans les plus brefs délais (moins de 4h). L'échantillon est ensuite dilué au $1/10^{\text{ème}}$ avec un tampon de lyse des globules rouges, qui fixe également les cellules (ISET Buffer). Après incubation de 10 minutes à température ambiante (Bérout et al., 2003; Vona et al., 2002; Vona et al., 2000), le mélange est réparti dans 10 puits du module de filtration attenant au filtre, puis soumis à une aspiration douce (dépression = -0.1 à -0.2 bar) créée par

une pompe à vide (Figure 21). Le filtre est constitué d'une membrane polycarbonate, munie de pores cylindriques d'un diamètre calibré à 8 μm (Figure 22). Les cellules présentes dans 1ml de sang et dont le diamètre est supérieur à la taille des pores se retrouvent étalées sur la surface du filtre. Chaque puits génère ainsi un spot de 6mm de diamètre sur le filtre.

Lorsque la totalité de l'échantillon est passée à travers le filtre, la membrane est rincée avec un tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline) et séchée à l'air ambiant et enfin colorée par un mélange Hématoxyline (colorant des noyaux cellulaires) et Eosine 2% (colorant du cytoplasme). Cette coloration ou marquage permettent de visualiser en microscopie les cellules adhérentes sur la membrane. A l'issue de ces différents traitements, les filtres sont conservés individuellement à - 20°C.

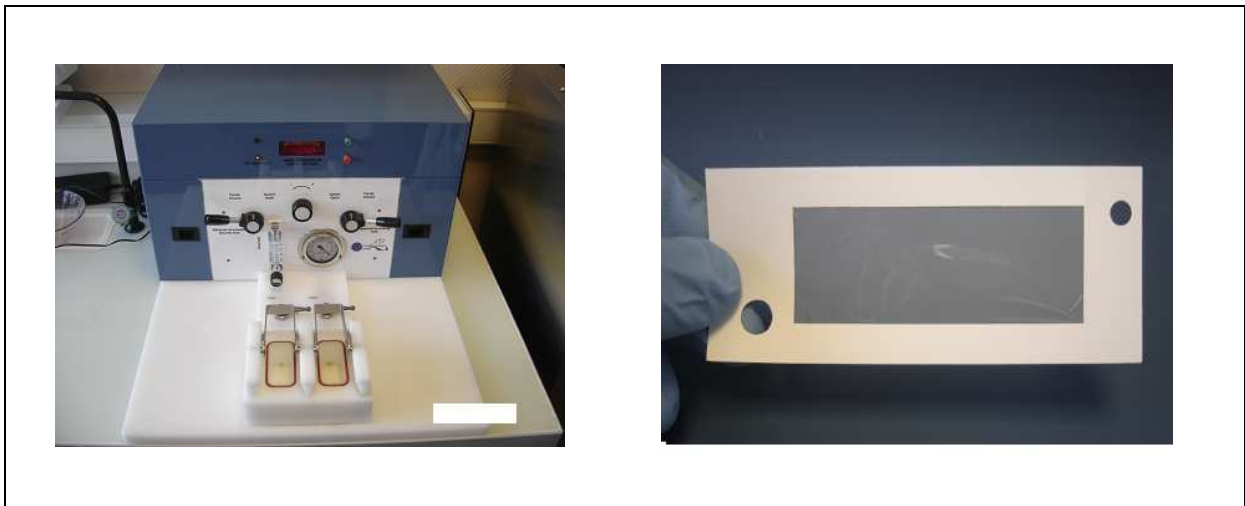


Figure 21: Appareil ISET

Figure 22: Filtre ISET

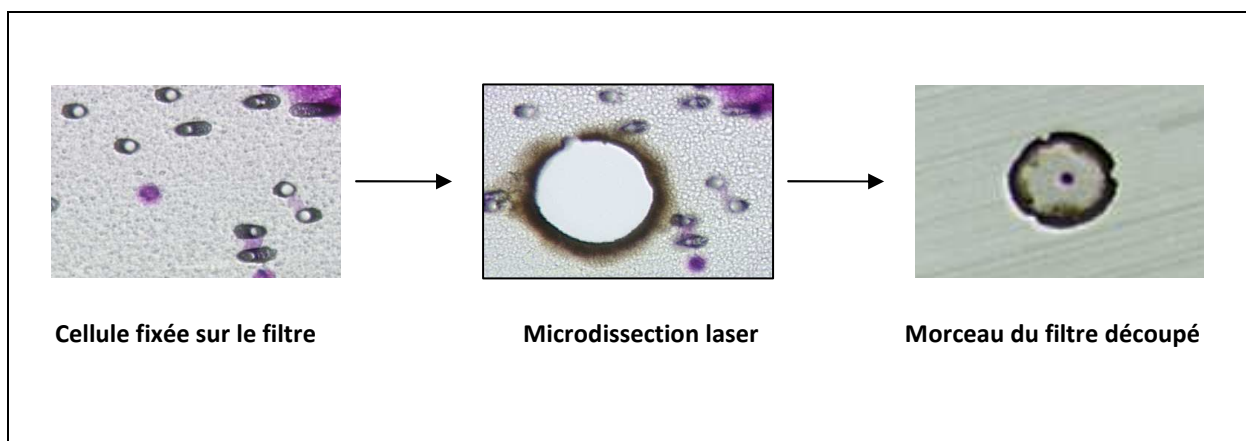
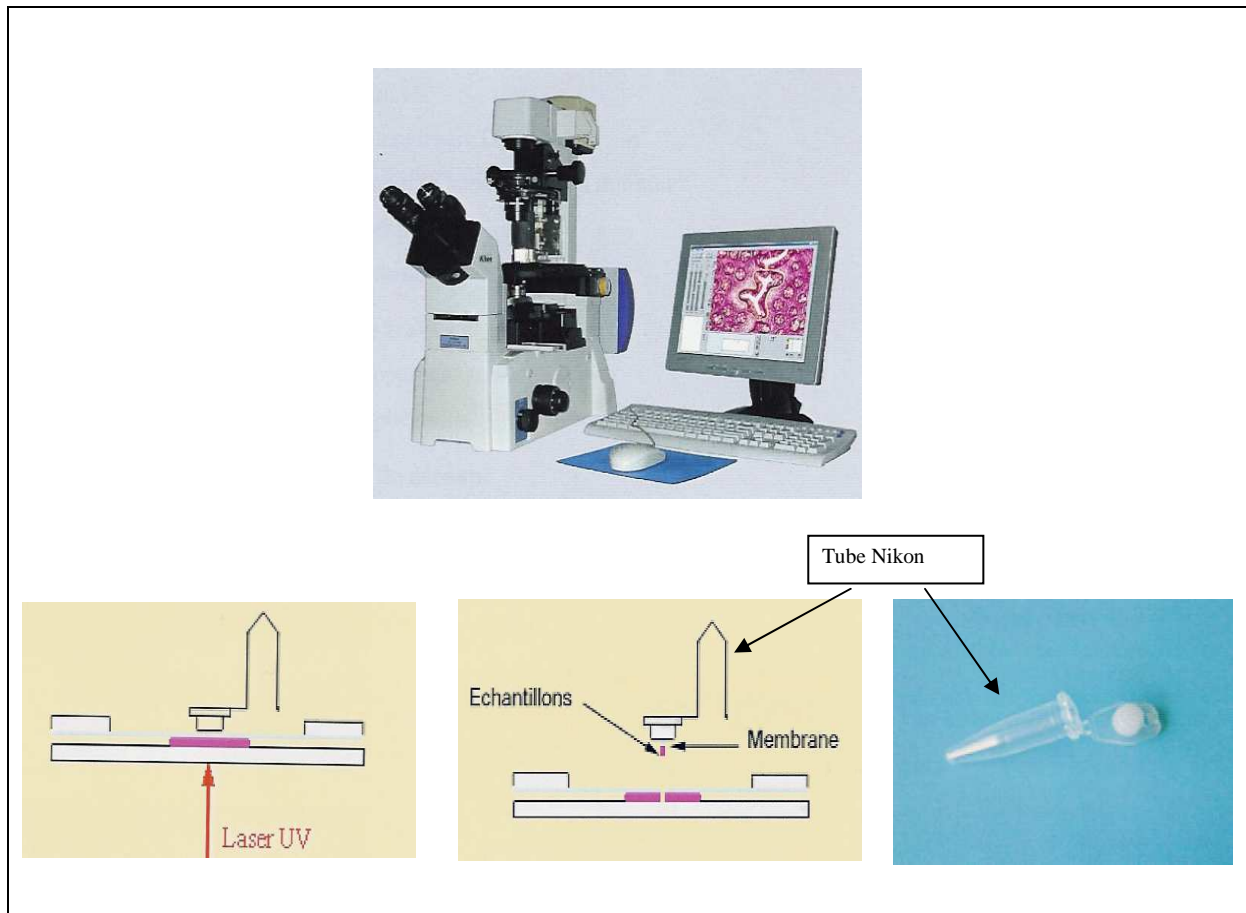
2) La microdissection (Système de NIKON®)

L'étape de microdissection est fondamentale dans l'approche de la technique, car la qualité des résultats en dépend très étroitement. L'étape de microdissection a fait l'objet d'une mise au point quant au système de microdissection le mieux adapté à la technique ISET.

L'unité INSERM U807 a eu la possibilité d'utiliser, au paravent trois systèmes de microdissection, le système Arcturus, le système Leica et le système Nikon qui a finalement présenté le meilleur rendement (Figure 23).

En effet, les cellules circulantes isolées par ISET doivent être traitées de manière très rigoureuse, à savoir qu'elles ne doivent pas être perdues au cours de la microdissection. De même, l'intégrité du génome de la cellule doit être préservée afin de pouvoir réaliser une analyse moléculaire fine de la cellule. Des précautions sont à prendre lors de la microdissection afin d'éviter une contamination, ce qui rendrait le diagnostic impossible. En effet, la recherche des CTC est effectuée par un premier balayage du spot (ou puits) à l'objectif X20. Tout élément suspect fait l'objet d'une analyse plus fine au X40, avec réalisation d'une photographie.

La découpe de petites zones contenant des cellules individuelles, s'effectue au moyen d'un laser à UV pulsé dont le rayon est dirigé sur le contour de la zone sélectionnée par déplacement de la platine motorisée (Figure 24). La surface découpée est collée au bouchon du tube stérile qui est recouvert d'un film adhésif (Figure 23). Le contrôle de la réussite se fait grâce à un déplacement de la focalisation de l'objectif du filtre vers le bouchon (Figure 24). Un logiciel informatique commande tous les composants du système tels que : activation laser, déplacement de coupe fonctions du microscope (déplacement du filtre, changement de grossissement, ouverture de l'éclairage).



3) La lyse de la cellule unique

Différents types de lyse cellulaire peuvent être appliqués :

- La lyse alcaline (Zhang et al., 1992), la cellule est mise au contact de 5µl d'une solution à 200 mM de KOH et 50 mM de dithiothreitol, l'ensemble est soumis à une incubation de 10 minutes à 65°C, le lysat est ensuite neutralisé par un tampon (900 mM Tris-HCl, 300 mM KCl).

- La lyse enzymatique, qui est la mieux adaptée dans le cas de l'ISET, donne de bons résultats. En effet, la lyse de la cellule unique doit s'effectuer sur le capuchon (membrane adhésive), les tubes sont ensuite placés à l'envers dans l'incubateur, d'où la nécessité d'utiliser un volume de tampon de lyse élevé. Le volume final est de 15 µl (100 mM Tris-HCl pH 8 et 1mg/ml de protéinase K).

Par ailleurs, les cellules isolées par ISET sont des cellules fixées (non fraîches) d'où un temps de lyse assez long pour assurer une lyse complète.

Après la lyse des protéines pendant 2 heures à 60°C, la protéinase K est inactivée à 90°C durant 15 minutes.

L'ADN est ensuite libéré de son environnement protéique, mais son extraction n'est pas effectuée afin de minimiser les pertes du génome.

4) Expansion linéaire du génome d'une cellule unique (PEP)

L'ADN de la cellule est amplifié de façon linéaire dans un volume final de 60 µl. Cette méthode est basée sur l'amplification globale du génome d'une cellule isolée par élongation de primers aléatoires, d'une taille de 15 nucléotides.

Cette étape d'expansion de l'ADN dénommée PEP (Primers Extension Preamplification) a été mise au point en 1992. (Dietmaier et al., 1999 ; Zhang et al., 1992).

5) PCR sur cellule unique (PCR single cell)

Si l'amplification de l'ADN extrait d'une quantité importante de cellules ne pose pas de problèmes, l'efficacité d'amplification d'ADN à partir d'une cellule unique est beaucoup plus variable. Plusieurs facteurs peuvent être évoqués pour expliquer un rendement limité.

Tout d'abord, la quantité d'ADN disponible comme matrice pour la PCR est extrêmement faible. En effet, avec deux molécules d'ADN et une ou deux séquences "cible" dans une cellule selon son état homozygote, hémizyote ou hétérozygote, la quantité d'ADN de départ (2 pg) est environ 100000 fois inférieure à celle dont on dispose habituellement (200 ng)

De plus, il faut considérer les problèmes liés aux difficultés de manipuler la cellule unique, après sa microdissection. A ce stade la cellule est invisible à l'œil nu, il y a donc le risque de la perdre ou de ne pas la mettre en contact avec le tampon de lyse cellulaire, d'où l'absence de l'amplification de son ADN. La composition du tampon ou la procédure de lyse ont été suspectés lors d'échecs de l'amplification sur cellule unique mais aucun consensus n'est établi pour cette étape préalable à la réaction de PCR (Thornhill et al., 2001).

Pour une amplification sur cellule unique, certaines précautions sont à mettre en œuvre afin d'optimiser les chances d'amplification de l'ADN. Tout d'abord, il est impératif de bien choisir la méthode de lyse cellulaire ; la qualité et la concentration du mélange réactionnel est aussi très importante. En effet la moindre variation de qualité et/ou de concentration d'amorces, de dNTP, de MgCl₂, ou une légère altération des paramètres du thermocycleur ; peuvent conduire à des échecs de l'amplification.

Les premiers essais de PCR sur cellule unique ont été effectués en 1988 (Jeffreys et al., 1988), suivis de peu par les premiers diagnostics préimplantatoires (Handyside et al., 1990). Les résultats de ces PCR et de leur spécificité n'étaient pas satisfaisants à cette époque, c'est pour cela que la mise en place de la nested-PCR ou PCR nichée a permis de résoudre ces problèmes (Handyside et al., 1990). Le principe est de générer des fragments comprenant la région d'intérêt lors d'une première réaction en utilisant des amorces externes et d'utiliser une partie du produit synthétisé comme matrice pour une seconde réaction à l'aide d'amorces internes afin d'amplifier le fragment désiré.

6) Analyse génétique des CTC

A partir du produit de PEP provenant des cellules identifiées tumorales ou suspectes par microscopie laser, l'analyse génétique est effectuée par une PCR spécifique suivi d'une analyse moléculaire des zones comportant les mutations mises en cause par CGH Array, FISH, génotypage ou séquençage. Cette analyse devrait permettre de confronter les résultats moléculaires aux résultats morphologiques des cellules.

Les résultats permettront la reconnaissance spécifique des CTC chez les patients atteints d'un cancer solide. Ces résultats sont donc susceptibles d'aider la mise au point d'un test prédictif en oncologie clinique avec impact très important sur la survie des patients avec cancer solide.

F - Comparaison entre ISET et différentes méthodes de détection des CTC

Plusieurs méthodes de détection des CTC ont été mises au point, certaines d'entre elles sont actuellement commercialisées (Mocellin et al., 2006 ; Schuler et al., 2006 ; Fehm et al., 2005 ; Smerage et al., 2006 ; Pantel et al., 2005 ; Ring et al., 2004). Ces techniques sont soit directes soit indirectes, elles présentent différentes approches dans le but de fournir des informations cliniques fiables.

1) Les méthodes indirectes

Les méthodes indirectes ne fournissent pas un diagnostic cytopathologique des CTC. La nature tumorale des cellules n'est pas démontrée, ces méthodes ciblent les cellules épithéliales et/ou utilisent des marqueurs spécifiques d'organes afin d'identifier les cellules épithéliales.

a) Les méthodes indirectes d'immuno-détection

Il s'agit d'effectuer un immuno-marquage sur des cellules enrichies par différentes approches, comme la séparation immunomagnétique (Allard et al., 2004).

La méthode CellSearch (Figure 25) permet la capture des cellules épithéliales, exprimant des antigènes épithéliaux (EpCAM), par EpCAM-ferrofluid. EpCAM est en effet le marqueur le plus utilisé. Les cellules récupérées pourront subir des analyses moléculaires ou être perméabilisées et soumises soit à une sélection positive avec des anticorps spécifiques aux cytokératines 8, 18, 19 liés aux ferrofluides pour capturer les cellules épithéliales, soit une sélection négative des anticorps CD-45 afin de capturer les leucocytes. Cette étape est suivie d'un lavage, les cellules exprimant les antigènes épithéliaux sont transformées par MagNest Chamber et comptées par CellSpotter. La sensibilité de cette méthode est d'une cellule par 0,5 ml de sang (Paterlini-Brechot et al., 2007). Le choix du marqueur membranaire pour l'immuno-sélection est déterminante et varie selon le type de cancer à

étudier ; en effet l'expression de ces antigènes par les CTC varie d'un type histologique à un autre, d'un patient à un autre et varie aussi au cours de l'évolution de la maladie chez un même patient.

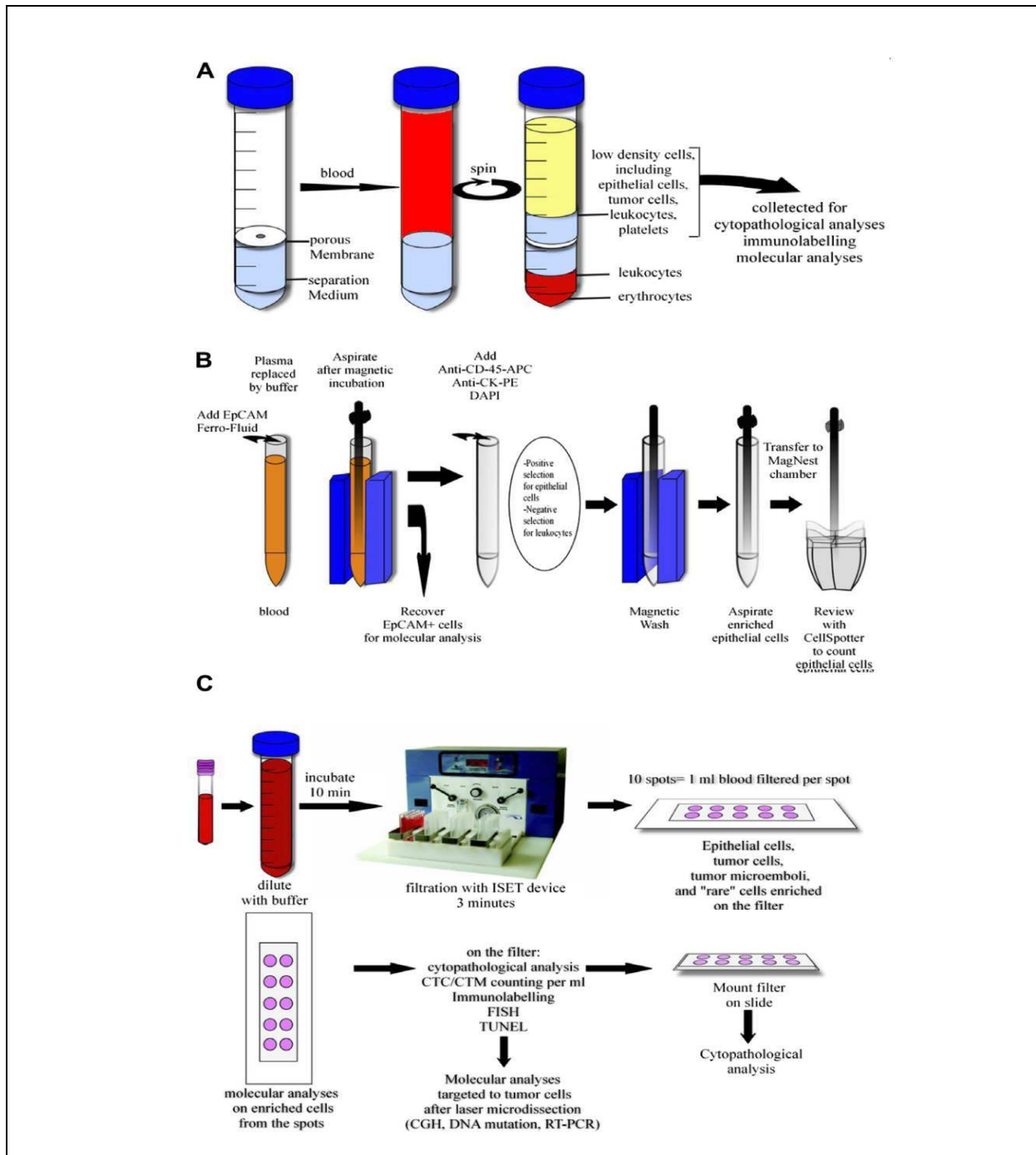
Les méthodes commercialisées comme la méthode immunomagnétique (MACS systèmes à base de perles macro-fer, de billes magnétiques, de ferrofluide (Fer colloïdal) permettent l'enrichissement des cellules, cependant, les antigènes spécifiques caractérisant les CTC ne sont pas encore connus. Les antigènes exprimés par toutes les cellules tumorales dans un type de tumeur solide, ne sont pas exprimés par les leucocytes, ni par les autres cellules circulantes non tumorales. Les chercheurs utilisent alors, pour isoler les CTC, des anticorps spécifiques aux antigènes épithéliaux (EpCAM, BerEP4, les cytokératines (CK)) ce qui peut donner des résultats de faux positifs.

b) Les méthodes indirectes moléculaires

La principale méthode moléculaire de détection des CTC est la RT-PCR. Elle permet d'analyser l'expression des gènes candidats spécifiques aux cellules épithéliales et/ou des tissus normaux à partir desquels les cellules tumorales sont originaires (Zieglschmid et al., 2005 ; Schuler et al., 2006 ; Goeminne et al., 2000 ; Bustin et al., 2005). Le principal avantage de cette approche est sa sensibilité qui est nettement supérieure à celle rapportée par la méthode d'immuno-détection et d'immuno-cytochimie (Zieglschmid et al., 2005), elle permet d'identifier approximativement une cellule dans 0.1 ml à 1 ml de sang.

Cependant, elle présente aussi des inconvénients, comme l'impossibilité de compter ou d'analyser individuellement les CTC car elles sont détruites lors de la manipulation.

Le choix très difficile de l'ARN représente une autre limite de cette méthode. En effet l'ARNt (ARN de transfert), détecté par le test, indique la présence de cellules tumorales dans le sang. Il faut donc utiliser un ARNt (ARN de transfert) exprimé dans toutes les cellules tumorales d'une tumeur donnée, sans être exprimé au niveau des lymphocytes du sang périphérique (PBL) ou dans les cellules épithéliales non tumorales. Enfin, la grande sensibilité des tests RT-PCR porte sur le risque des produits de PCR qui nécessite d'avoir des contrôles négatifs pour valider la PCR contrôle positive.



A: Oncoquick ; B : CellSearch ; C : ISET

Figure 25: Comparaison de 3 techniques de détection des CTC.
(Paterlini-Brechot et al., 2007)

2) Les méthodes directes

Les méthodes directes sont destinées à fournir un diagnostic par identification des CTC, cela ne peut être obtenu que par l'analyse cytopathologique des cellules isolées (Goeminne et al., 2000) et/ou par l'analyse du génome de ces cellules qui peut fournir des indices sur la nature tumorale de la cellule (Fehm et al., 2005 ; Fehm et al., 2002). L'analyse cytopathologique peut être réalisée d'une manière systématique, à condition que l'enrichissement des CTC ne provoque pas de dommages sur la morphologie des cellules.

En revanche, les analyses du génome par FISH, CGH ou analyse des mutations ne sont pas appliquées en routine pour la détection des CTC (Smirnov et al., 2005 ; Fehm et al., 2002 ; Vona et al., 2004). En effet, les sondes FISH présentent une grande limitation car elles ne pénètrent généralement pas dans toutes les cellules cibles ce qui rend difficile l'interprétation du signal. Quant à l'hybridation génomique comparative (CGH) et les analyses de mutation, elles sont coûteuses et présentent un temps de manipulation assez long et doivent être utilisées après une microdissection laser sur des cellules individuelles (Vona et al., 2004).

Dans la méthode Oncoquick (Figure 25), le volume sanguin collecté est entre 15 et 35 ml ; l'enrichissement des cellules tumorales, des cellules épithéliales et des leucocytes se fait selon leur gradient de densité. Elles sont enrichies à partir des leucocytes et des érythrocytes grâce à leur densité particulière. Les cellules collectées pourront subir une analyse cytopathologique et/ou un immuno-marquage et/ou des études moléculaires. La sensibilité de cette méthode est très basse, de l'ordre d'une cellule par 4,5 µl de sang (Gertler et al., 2003).

La méthode ISET (Figure 25) quant à elle se base sur la séparation des cellules selon leur taille ; la taille des CTC est généralement supérieure à 11µm. Les cellules tumorales des carcinomes sont isolées et enrichies. Les cellules enrichies sont ensuite colorées sur le filtre et les CTC sont comptées après un examen cytopathologique. Les cellules enrichies peuvent être étudiées par immunomarquage, FISH, TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling) ou par analyse moléculaire. Les filtres peuvent être stockés pour une longue période. La sensibilité de cette méthode est d'une cellule par 1ml de sang (Vona et al., 2000). Elle présente aussi l'avantage de pouvoir isoler les cellules sans endommager leur structure.

Cette méthode est potentiellement beaucoup plus spécifique que les méthodes citées précédemment (Deisboecke al., 2005). Toutefois, il n'existe pas beaucoup de connaissance sur la morphologie des cellules rares, il est donc nécessaire d'effectuer :

1. Des études multicentriques avec lecture des cellules isolées par ISET par plusieurs pathologistes.
2. Des études moléculaires qui démontrent la nature tumorale des CTC et permettent au cytopathologiste de confirmer son diagnostic par l'information moléculaire.

C'est en s'appuyant sur les connaissances déjà acquises des CTC et en utilisant la technique ISET que ce travail de thèse a porté sur la démonstration moléculaire de la nature tumorale des CTC isolées à partir de sang de patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires et identifiées par analyse cytopathologique. L'analyse moléculaire portera sur la recherche et l'identification des mutations du gène *VHL* chez 30 patients. Les spécificités morphologiques des CTC seront recherchées par le cytopathologiste, aussi bien que la corrélation entre les caractéristiques tumorales cliniques et les mutations retrouvées.



MATERIEL ET METHODES

Partie I Matériel

A - Caractéristiques des patients

Les deux principaux objectifs de ce travail ont porté sur la mise en évidence de la présence des CTC dans le sang de patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires par l'utilisation de la méthode ISET et la démonstration moléculaire du caractère malin des ces CTC par la recherche des mutations génétiques du gène *VHL* au niveau de l'ADN extrait à partir des CTC (ADNctc), de l'ADN extrait à partir du tissu tumoral issu de la tumeur primaire de chaque patient (ADNt) et de l'ADN génomique.

Pour cela, nous avons disposé d'un panel de 30 patients français atteints d'un cancer rénal à cellules claires non inscrit dans le cadre d'une maladie VHL. Il s'agit de 22 hommes et 8 femmes avec une moyenne d'âge de 68.5 ans (min : 46 ans, max : 93 ans). Deux patients seulement présentaient des foyers métastatiques, trois présentaient des antécédents de tumeurs rénales, un patient avait un antécédent d'une tumeur de la vessie et un autre présentait un antécédent d'une tumeur neuroendocrine du pancréas.

Nous disposons d'une bonne partie des données cliniques concernant les patients de notre étude, néanmoins, il nous manque certaines informations, notamment sur l'histoire clinique précédant l'intervention chirurgicale, les traitements non-chirurgicaux entrepris (chimiothérapie, radiothérapie....) et le statut actuel de ces patients (vivants ou décédés).

Un prélèvement sanguin de 10 ml sur anticoagulant EDTA a été effectué à tous les patients à un temps T1 avant l'opération chirurgicale. Un deuxième prélèvement à un temps T2 juste après l'opération chirurgicale a été effectué pour 24 patients de notre panel et seulement 9 patients ont subi un troisième prélèvement à un temps T3 ultérieur à l'intervention. Pour la mise en évidence de la présence des CTC chez ces patients, nous nous sommes exclusivement intéressés aux prélèvements effectués à un temps T1 avant toutes interventions chirurgicales, afin de travailler sur les CTC en circulation spontanée dans l'organisme. Ces prélèvements ont subi les différentes étapes de la technique ISET afin de filtrer le sang et fixer les éventuelles cellules tumorales sur les filtres ISET (Tableau 3). Ces filtres nous ont permis de rechercher les cellules suspectes. Des coupes de tissus issues de la tumeur primaire de chaque patient nous ont permis d'extraire l'ADN tumoral.

	Filtre T1	Filtre T2	Filtre T3	1 filtre	2 filtres	3 filtres
Nombre de patients	30	24	9	30	15	9

Tableau 3: Type et nombre de filtres des patients

B - Caractéristiques des cellules tumorales circulantes étudiées

Dans le but de caractériser les CTC et de démontrer leur origine tumorale, nous avons recherché au niveau des filtres ISET de chaque patient des cellules suspectes répondant aux critères morphologiques d'une cellule cancéreuse afin de les étudier et d'apporter une preuve moléculaire de leur nature maligne.

En effet, les CTC ont des particularités morphologiques, qui permettent de les différencier des autres types cellulaires. Le premier critère est la taille, elles se différencient par un volume cellulaire supérieur aux autres cellules (surface supérieur à 4 fois celle d'un pore du filtre ISET ; diamètre du pore du filtre = 8 μm). Le deuxième critère a été le rapport nucléo-cytoplasmique qui est très important au niveau des CTC (le noyau occupe la quasi-totalité de la cellule), une chromatine très fine et des contours nucléaires irréguliers. Le nombre de CTC détectées par filtre est variable d'un patient à un autre.

La caractérisation de ces cellules sur le plan génétique a porté sur la recherche des variations génétiques au niveau des 3 exons du gène *VHL* pour chaque cellule, et la confrontation des résultats à ceux obtenus par l'étude moléculaire de ce même gène au niveau de l'ADNt et de l'ADN génomique.

Nous avons choisi d'effectuer notre recherche sur l'ADNctc issu de cellule unique et de ne pas regrouper les CTC et ceci malgré la très faible quantité d'ADNctc fourni par une cellule et la difficulté de travailler en single-cell. En effet, plusieurs hypothèses suggèrent que les CTC ont une origine monoclonale, elles présenteraient donc des altérations similaires au sein de leur génome, d'où la possibilité de regrouper quelques CTC pour augmenter la quantité d'ADN et faciliter d'éventuels autres recherches.

Sur chaque filtre ISET, il existe 10 puits ou spectres dans lesquels les cellules suspectes sont regroupées. Pour chaque patient, le nombre de puits colorés et analysés est variable, certains puits n'ont pas été colorés en vue d'une utilisation ultérieure (Tableau 4).

L'examen cytopathologique réalisé en première lecture a été confirmé par le Dr. Raoudha Doghri du Service d'Anatomie Pathologique de l'Institut National de Cancérologie de Tunis (Institut Salah Azaiz). L'analyse cytopathologique nous a permis de classer les cellules étudiées en cellules tumorales circulantes (CTC) et en cellules atypiques circulantes (CAC).

Nombre de patients	Nombre de puits colorés et analysés par patient	Nombre de puits non colorés
2	12	0
1	11	1
3	10	2
14	8	4
1	7	0
1	6	6
1	4	8
2	4	0
4	2	0
1	1	0

Tableau 4: Nombre de filtres colorés et analysés par patient.

C - Caractéristiques des échantillons de tumeurs

Pour explorer les altérations moléculaires des tumeurs, nous avons récupéré un échantillon provenant de la tumeur primaire de chaque patient. Ces échantillons étaient exclusivement coupés à partir du tissu tumoral. Ils correspondaient à des coupes épaisses du tissu tumoral congelé, et ont été fournis par le Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'Hôpital Necker.

Ces échantillons des tumeurs ont été congelés suite aux opérations chirurgicales subies par les patients (Tableau 5) et présentent des caractéristiques invasives. L'ADN extrait de chaque échantillon tumoral (ADNt) a été comparé à l'ADN extrait à partir des CTC (ADNctc). Les cellules, présentant une concordance de leur ADNctc avec l'ADNt issus des

tumeurs primaires, et identifiées par analyse cytopathologique comme cellules cancéreuses circulantes (CTC) ou atypiques circulantes (CAC), ont été classées comme CTC. Nos résultats démontrent qu'il est actuellement possible de prouver la nature tumorale des CTC/CAC, sélectionnées par ISET, grâce à la combinaison des deux analyses cytologique et moléculaire.

Caractéristiques	Nb patient (%)	Caractéristiques	Nb patients (%)
Grade de Fuhrman		Classification TNM	
1	4 (10)	T1a No Mx	6
2	13 (27)	T1a Nx Mx	3
3	9 (27)	T1b No Mx	8
4	1 (3)	T2 No Mx	2
Inconnu	3 (10)	T3a No Mx	3
		T3b No Mx	2
		T3b Nx Mx	1
		T3b N2 Mx	1
		T3b N2 M1	1
		Tx Nx Mx	1
		Tx Nx M1	1
		Tx N1 Mx	1
Type de chirurgie rénal			
Néphrectomie élargie		21	
Néphrectomie partielle (Tumorectomie)		9	

Tableau 5: Caractéristiques invasives des tumeurs.

D - Cellules sanguines normales

Comme matériel non tumoral de référence, nous avons analysé de façon concomitante des cellules sanguines normales de chaque patient, en confrontant le profil ADN obtenu à celui de l'ADNctc et de l'ADNt.

Partie II Méthodes

L'identification et la caractérisation des CTC/CAC comme étant tumorales ont été effectuées par une mise en évidence de la présence de ces cellules par la méthode ISET puis par une analyse des altérations moléculaires du gène *VHL* chez des patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires.

A - Mise en évidence des CTC par la méthode ISET

Le sang collecté chez les patients sélectionnés pour cette étude a été acheminé à notre laboratoire dans un délai de 3h après la prise de sang, afin d'y subir les différentes étapes de la techniques ISET dans le but d'isoler les cellules circulantes suspectées d'être tumorales. Ces cellules ont ensuite suivies le protocole d'analyse cité ci-dessous.

1) Prélèvement sanguin

- Chaque patient a subit une prise de sang de 10 ml sur anticoagulant (EDTA).
- Le prélèvement est ensuite acheminé à l'Unité INSERM U807 dans un délai de 3h.
- L'échantillon est alors dilué au 1/10^e dans le tampon ISET « ISET Buffer».
- Le tampon va lyser les érythrocytes et fixer les cellules nucléés.
- Une incubation de 10 mn à température ambiante est nécessaire.
- Le mélange est réparti dans les 10 puits du module de filtration de la machine ISET afin d'être filtré.
- Les 10 puits du module de filtration sont attenants au filtre.
- Une aspiration douce (dépression= 0.1 à 0.2 bar) crée par la pompe à vide de l'appareil ISET est effectuée.
- Toutes les cellules ayant un diamètre supérieur à 8 µm seront retenues par le filtre, notamment les CTC et les cellules épithéliales.
- Chaque puits génère un spot de 6 mm de diamètre sur le filtre.
- On procède alors à un lavage du filtre avec un tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline).
- Le filtre est ensuite séché à l'air libre.
- Les filtres seront conservés à -20°C.

- Avant la lecture, 4 à 5 spots sont colorés individuellement par une technique classique à l'Hématoxyline-Eosine à 2%.

2) La microdissection laser par le système de NIKON®

- La recherche des CTC est effectuée par un premier balayage du spot à l'objectif X20.
- Toute cellule suspecte fait l'objet d'une analyse plus fine au X40.
- Toutes les cellules suspectes sont photographiées.

Les critères de malignité retenus pour l'identification des CTC sont les suivants :

- Cellule de très grande taille (surface supérieure à 4 fois celle d'un pore) constitue le critère majeur.
- Rapport nucléo-cytoplasmique très élevé.
- Irrégularités nucléaires.
- Noyau multilobé.
- Cette première lecture est ensuite confirmée par une seconde identification, effectuée par un anatomo-pathologiste.
- Les CTC identifiées sont microdisséquées sur un microscope Nikon ECLIPSE TE 2000-U, microscope inversé équipé d'un laser à diode UV à 355 nm et piloté par le logiciel Cellcut®.
- Les CTC sont découpé individuellement sur le filtre, puis récupérées sur le bouchon d'un tube CapSure HS, muni d'un film adhésif.
- Dans le cas où une cellule sanguine serait directement attenante à une CTC, celle-ci est préalablement détruite par un ou 2 passages du laser.
- Un certain nombre de CTC est prélevé par filtre et par patient, ce nombre est variable selon la présence de CTC en circulation spontanée chez le patient à l'instant du prélèvement.
- Tous les prélèvements ont été effectués à un instant T1 avant l'opération chirurgicale.

3) La lyse cellulaire

La lyse enzymatique par la protéinase K ne fait pas l'objet d'un consensus quant au meilleur protocole pouvant être appliqué aux cellules uniques. Ainsi, chaque laboratoire

adapte un protocole de lyse cellulaire à ses propres conditions. La mise au point comprend la composition du tampon de lyse, la durée de lyse et la température d'incubation.

a) Protocole de lyse :

Le protocole habituel de lyse au sein de notre laboratoire, est effectué dans 15 μ l de volume final du tampon de lyse pendant 2h à 60°C.

Malgré l'efficacité de ce protocole sur d'autres types cellulaires (cellules fœtales...), nous avons procédé à une mise au point de la lyse sur CTC afin d'optimiser le rendement.

La composition du tampon de lyse :

Réactif	Quantité
Protéinase K (1mg/ml)	8 μ l
Tris 1M pH8	2 μ l
H ₂ O	10 μ l
Total	20 μ l

- Mettre le tampon de lyse (20 μ l) (Tris-HCL, 100mM, pH 8, protéinase K 800 μ g/ml) directement sur la membrane du capuchon.
- Incubation du tube à l'envers (bouchon vers le bas).
- Centrifugation à 3500 rpm pendant 10 mn.
- Dénaturation de la protéinase K à 94°C pendant 10mn.
- Mettre les tubes à 4°C dans l'attente de la PEP.

Pour chaque lyse, un tube négatif de lyse est réalisé afin d'éliminer une potentielle contamination.

b) Durée et température de la lyse

Après plusieurs essais, les CTC/CAC sélectionnées issues de patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires ont subi une lyse cellulaire de 4h à 50°C.

4) Expansion linéaire du génome d'une cellule unique (PEP)

En raison de la faible quantité d'ADN_{ctc} recueilli au niveau des cellules isolées sur filtre, une étape de pré-amplification est nécessaire pour chaque cellule microdisséquée.

L'ADNctc subit tout d'abord une amplification globale selon le protocole PEP (Primer-Extension- Preamplification)

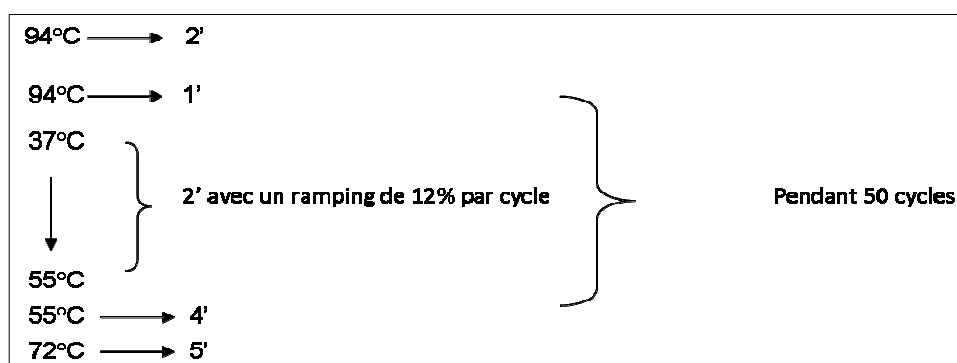
Il s'agit d'une amplification globale du génome d'une cellule isolée par l'élongation de primers aléatoires, d'une taille de 15 nucléotides (primers random marqués au N15).

a) Protocole de la PEP :

Réactifs	Quantités
Produit de lyse	15 μ l
Tampon K+ Free 10X	6 μ l
Primers N15 (400 μ M)	5 μ l
dNTP (10 mM)	0,6 μ l
Taq Polymérase Applied (5U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	32,4 μ l
Total	60 μ l

- Primers N15 : Kit genPEP_{tm} 75OD, Genetix, Boston, USA à une concentration de 400 μ M. La concentration des primers au final dans le tube de PCR est de 33,3 μ mol.
- Tampon 10 X PCR sans K⁺ composé de MgCl₂ 25 mM ; gélatine 1 mg/ml ; tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8).
- dNTP : mélange des quatre dNTP, chacun à 2 mM.
- Taq polymerase 5 U/ μ l (Applied-Biosystems).

b) Programme de la PEP :



- La pré-amplification est réalisée avec un thermocycleur de type Gene-amp® 9700 (Applied-Biosystems).
- L'amplification par PCR est ensuite effectuée à partir de 6 µl du produit de PEP. Ainsi, le nombre maximum de PCR pouvant être réalisé à partir de chaque produit de PEP issu d'une cellule unique est de 8 à 9 PCR.
- Chaque réaction de PEP est effectuée en parallèle avec un tube control positif PEP avec de l'ADN témoin, un control négatif de la PEP et un control négatif de la lyse.

B - Extraction de l'ADN à partir de la tumeur

Pour l'extraction de l'ADN issu des tumeurs (ADNt), les coupes histologiques congelées et récupérées vont d'abord subir une lyse cellulaire. Chaque échantillon est incubé avec 60 µl de tampon de lyse (Tris-HCL, 50 mmol/L, pH 8, protéinase K 800 µg/ml) pendant toute une nuit à 50°C. La protéinase K est ensuite dénaturée à 94°C pendant 10 mn. Ces échantillons ne subiront pas de PEP, en raison de leur concentration en ADN qui est nettement supérieure à celle obtenue par une cellule unique.

L'extraction d'ADN à partir des coupes de tissus a été effectuée par le kit QIAamp® DNA, QIAGEN. La recherche des mutations VHL peut alors être effectuée sur l'ADN tumoral.

C - Extraction de l'ADN à partir de cellules normales

L'extraction d'ADN à partir des cellules sanguines normales (lymphocytes) a été effectuée selon le même protocole utilisé pour l'extraction de l'ADNctc à partir de cellules tumorales. Nous avons cependant regroupé plusieurs lymphocytes dans le même tube ISET pour chaque patient afin d'avoir une plus grande concentration en ADN. Après la microdissection, ces cellules ont subi le même protocole d'analyse que les CTC.

D - Etude du gène VHL au niveau des CTC

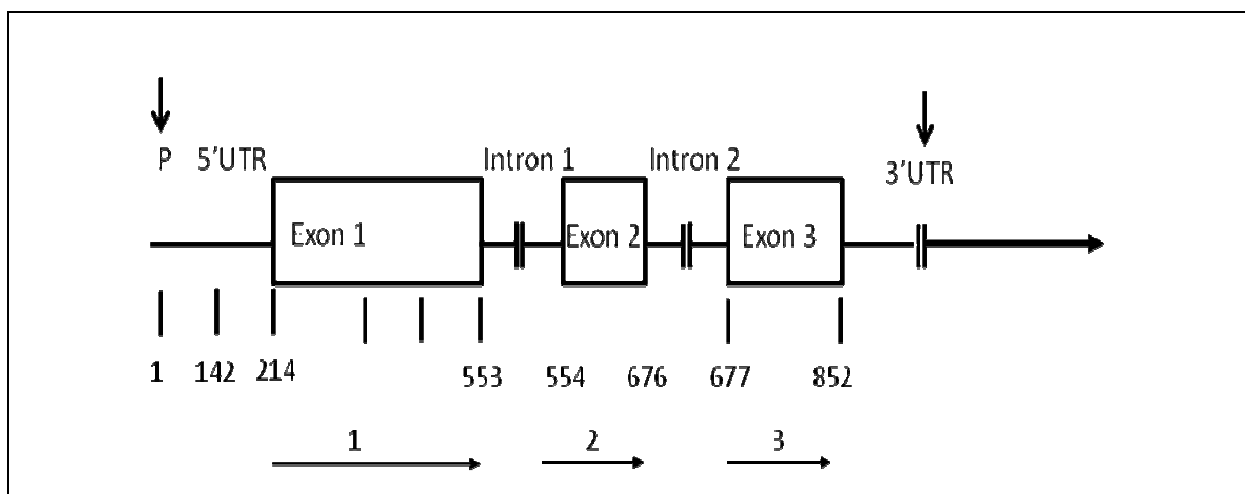
La caractérisation moléculaire des CTC se fait grâce à l'étude du gène VHL, par comparaison des profils ADNctc avec l'ADNt et l'ADN génomique pour chaque patient. Si les mutations des cellules suspectes sont identiques à celles de l'ADN tumoral, et en s'appuyant sur les résultats de l'analyse cytopathologique, on pourra conclure que la cellule analysée est bien tumorale.

La quantité d'ADN extrait en single-cell est très faible, c'est pour cela qu'on a opté pour une amplification en PCR nichées des différents exons du gène *VHL*.

1) Choix des amorces

En amont de la mise au point des PCR sur les cellules uniques, il est nécessaire de choisir une gamme d'amorces très informatives. A ce jour les mutations rapportées du gène *VHL* correspondent soit à des grands remaniements soit à des petits réarrangements localisés dans la séquence codante. Il n'y a pas de mutations pathogènes localisées dans les parties 3' et 5' UTR (Figure 26).

Pour ce qui est de l'amplification du gène *VHL* sur cellule unique, il est important de préciser que l'exon 1 est situé dans un îlot CpG ce qui le rend plus difficile à étudier, on a donc choisi de découper cet exon en 3 parties (Tableau 6). Les amorces choisies ont été dessinées avec l'aide du Dr Christophe Bérout (Unité INSERM 827 Montpellier).



1 : Amorces Exon 1 ; 2 : Amorces Exon 2 ; 3 : Amorces Exon 3

Figure 26: Emplacement des amorces utilisées.
(Adapté de Wen-Chung Wang et al 2009)

Exon	Produit	Amorces 5' 3'	Tm utilisée
Exon 1	300pb	F : GCGCGTTCCATCCTCTAC R : GGCCTCCATCTCCTCCTC	55°C
	215pb	F : GAGTACGGCCCTGAAGAAGA R : CCGTCGAAGTTGAGCCATAC	TD
	248pb	F : GCCGAGGAGGAGATGGAG R : GCTTCAGACCGTGCTATCGT	54°C
Exon 2	215pb	F : ACCGGTGTGGCTCTTTAACA R : TCCTGTACTIONTACCACAACAACCTT	56°C
Exon 3	215pb	F : GCCACTGAGGATTTGGTTTT R : CAAAAGCTGAGATGAAACAGTG	58°C

TD : PCR Touch Down, Tm : Température d'hybridation, pb : paire de bases.

Tableau 6: Amorces du gène *VHL*

2) Mise au point des PCR

Pour chaque amorce, on a procédé à des amplifications de 12 tubes selon les conditions résumées dans le Tableau 7, avec un gradient de température allant de 50 à 62°C. Le thermocycleur utilisé est un S1000™ Thermal Cycler (BIO RAD).

Condition A		Condition B	
Master Mix 2X	10 µl	Master Mix 2X	10 µl
Amorce F (16 µM)	1 µl	Amorce F (16 µM)	1 µl
Amorce R (16 µM)	1 µl	Amorce R (16 µM)	1 µl
ADN (2ng/µl)	1 µl	ADN (2ng/µl)	1 µl
H ₂ O	7 µl	H ₂ O	5,5 µl
		DMSO	1,5 µl

Tableau 7: Conditions de mise au point des PCR

Selon le programme suivant :

94°C	5'	
94°C	30"	
Tre x	30"	40 cycles
72°C	30"	
72°C	5'	
4°C (conservation)		

- Migration 10 µl du produit de PCR avec 3 µl de bromure d'éthyldium sur un gel d'agarose à 2%.
- Un marqueur de taille de type 100 bp a été utilisé pour confirmer la taille des bandes attendues.

3) Protocole des PCR nichées

En raison de la faible quantité d'ADNctc obtenue après la PEP, nous avons procédé à des PCR nichées pour l'amplification du gène *VHL* afin d'améliorer la séquence finale amplifiée. La PCR 1 est la première PCR effectuée à partir de 6 µl du produit de la PEP. La deuxième PCR (PCR2) est effectuée, quant à elle, à partir de 2 µl du produit de la PCR1.

Réactifs	PCR 1	PCR 2
Amorce F (16 µmol)	2 µl	1 µl
Amorce R (16 µmol)	2 µl	1 µl
dNTP (10 mM)	0,8 µl	0,4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	1,7 µl
Buffer 10X	4 µl	2 µl
Taq GOLD (5U/µl)	0,4 µl	0,25 µl
H ₂ O	20,8 µl	11,65 µl
Produit à amplifier	Produit PEP = 6 µl	Produit PCR1 = 2 µl
Total	40 µl	20 µl

Le thermocycleur utilisé pour ces PCR est un Gene-amp® 9700 (Applied-Biosystems).

- Programme d'amplification de la première partie de l'exon 1 :

94°C	5'	} 35 cycles
94°C	30''	
55°C	30''	
72°C	30''	
72°C	5'	
4°C (conservation)		

- Programme d'amplification de la deuxième partie de l'exon 1, PCR Touch-Down :

95 °C	4'	}	10 cycles
95 °C	30"		
*65 °C	30"		
72 °C	30"		
95 °C	30'	}	28 cycles
60 °C	30'		
72 °C	30"		
72 °C	7'		
4 °C (conservation)			

- Programme d'amplification de la troisième partie de l'exon 1 :

94 °C	5'	}	35 cycles
94 °C	30"		
54 °C	30"		
72 °C	30"		
72 °C	5'		
4 °C (conservation)			

- Programme d'amplification de l'exon 2 :

94 °C	5'	}	35 cycles
94 °C	30"		
56 °C	30"		
72 °C	30"		
72 °C	5'		
4 °C (conservation)			

- Programme d'amplification de l'exon 3 :

94 °C	5'	}	35 cycles
94 °C	30"		
58 °C	30"		
72 °C	30"		
72 °C	5'		
4 °C (conservation)			

- Le contrôle de la PCR a été effectué par migration de 6 µl du produit de PCR avec 2 µl de bromure d'éthidium sur un gel d'agarose à 2%.

- Utilisation d'un marqueur de taille de type 100 bp ladder.
- Les mises au point de l'analyse moléculaire du gène *VHL* ont été effectuées sur de l'ADN génomique très dilué et ensuite sur l'ADNctc.
- Aux échantillons des patients, on adjoint différents contrôles pour chacune des étapes :
 - 1 contrôle négatif de lyse,
 - 1 contrôle positif avec de l'ADN,
 - 1 contrôle positif de la PEP (+ ADN)
 - 1 contrôle négatif de la PEP (-ADN)
 - 1 à plusieurs contrôles négatifs pour chaque PCR (selon le nombre des échantillons).

4) Purification des produits des PCR

Afin d'éliminer tous les réactifs et les impuretés il faut procéder à une purification du produit de PCR avant de procéder à la réaction de séquence. Pour la purification des produits de PCR, on a utilisé le DNA Clean & ConcentratorTM -5 Kit ; ZYMO RESEARCH, selon le protocole :

- 1- Ajouter 2 volumes du DNA Binding Buffer au produit de PCR.
- 2- Transférer le mélange dans des micro-spins Zymo précédemment placés sur les colonnes.
- 3- Centrifuger à 16000 rpm pendant 30 secondes.
- 4- Ajouter 200 µl du Wash Buffer (Tampon de lavage) et centrifuger pendant 30 secondes à la même vitesse.
- 5- Refaire l'étape 4 à l'identique.
- 6- Transférer les micro-spins Zymo sur des tubes stériles de 1,5 ml.
- 7- Ajouter 10 µl d'H₂O.
- 8- Centrifuger à 16000 rpm pendant 30 secondes.

5) Séquençage de l'ADNctc

Le séquençage constitue l'étape finale de notre analyse moléculaire des CTC. Cette étape débute par la réaction de séquence. Habituellement, le produit de PCR purifié est

d'abord dilué au 1/10^{ème} ensuite 3 µl de ce produit sont ajoutés à la réaction de séquence mais en raison de la faible concentration de l'ADNctc issu de cellules uniques, nous n'avons pas effectués de dilution pour le séquençage du gène *VHL* des cellules microdisséquées.

a) Protocole de la réaction de séquence :

Réactifs	Quantités
Mix	2 µl
BigDye	3 µl
Amorce (16 pmoles/ µl)	0,2 µl
H ₂ O	11,8 µl
Total	17 µl

- Une seule amorce F ou R est utilisée à la fois pour une réaction.
- Le BigDye utilisé est le BigDye[®]Terminator v3.1, Cycle Sequencing Kit ; Applied Biosystems.

b) Programme de la réaction de séquence :

96°C	1'	
96 °C	10''	
50°C	5''	25 cycles
60 °C	4'	
4°C (conservation)		

- La réaction de séquence est effectuée sur un thermocycleur S1000[™] Thermal Cycler (BIO RAD).
- La purification de la réaction de séquence est effectuée selon un protocole utilisant le MagneSil[®] GREEN ; Promega.
- La réaction de séquence purifiée est ensuite analysée sur un séquenceur quatre capillaires 3130xl Genetic Analyser[®] ; Applied Biosystems.
- Les profils ADN ont été établis sur les logiciels Sequencing Analysis[®] et Seq Scape[®].

E - Etude du gène *VHL* au niveau de l'ADNt et de l'ADN génomique

Pour l'amplification du gène *VHL* au niveau de l'ADNt et de l'ADN génomique, nous avons utilisés les mêmes amorces et les mêmes conditions pour effectuer les PCR.

Cependant une dilution du produit de la deuxième PCR (PCR2) a été effectuée au $1/10^{\text{ème}}$ avant de procéder à la réaction de séquence. Le séquençage de l'ADNt et l'ADN génomique s'est déroulé dans les mêmes conditions que pour l'ADNctc.

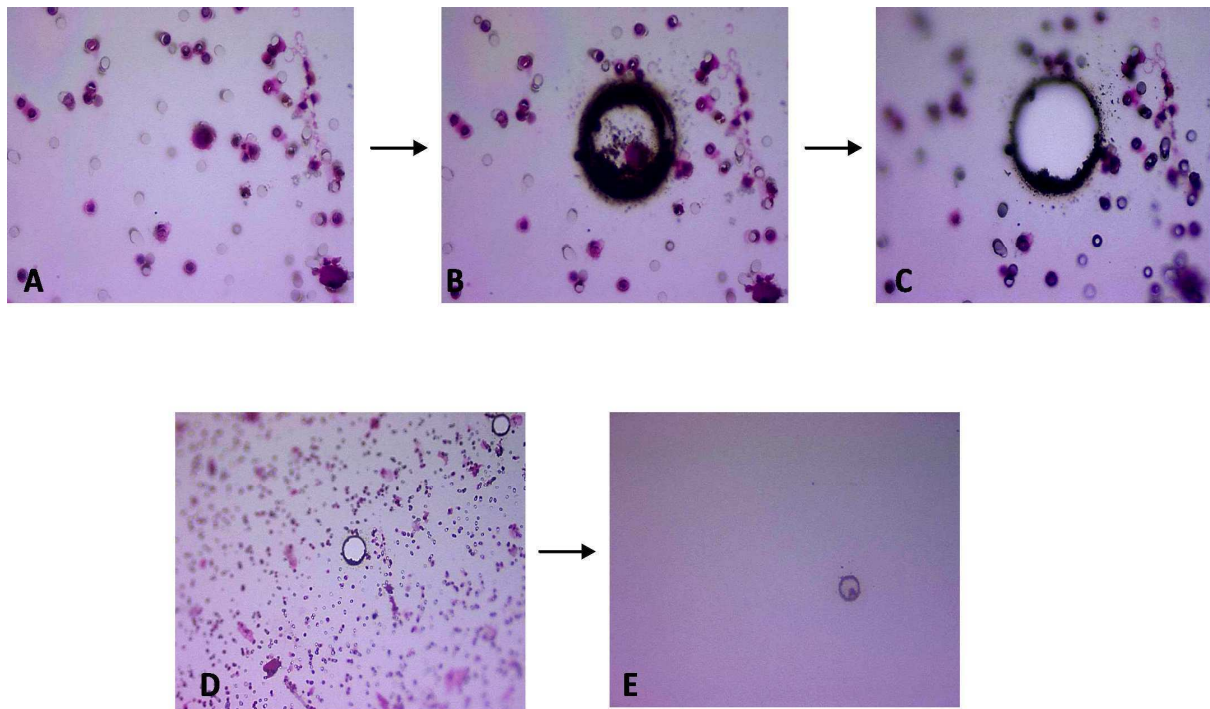


RESULTATS

Partie I Mise en évidence des CTC

A - Microdissection des cellules

L'étape de microdissection est une étape primordiale pour la réussite de l'analyse des CTC. En premier lieu, un balayage du filtre au faible grossissement est nécessaire. Une fois la cellule suspecte est détectée, la microdissection laser commence. Il est impératif de vérifier après la microdissection que la cellule est bel et bien sur le bouchon par balayage au microscope de la membrane de ce dernier (Figure 27).



A : Cellule suspecte (x40).

B : Microdissection de la cellule.

C : La cellule est aspirée par la membrane du bouchon.

D : Vérification que la cellule microdisséquée n'est plus sur le filtre.

E : Vérification que la cellule microdisséquée est collée sur la membrane du bouchon Nikon.

Figure 27: Etapes de microdissection des CTC (X40).

Pour sélectionner les cellules nous avons obéi aux critères morphologiques qui définissent une cellule tumorale, notamment la très grande taille et le rapport nucléocytoplasmique très important. Dans la majorité des cellules sélectionnées, le noyau occupe la quasi-totalité de la cellule (Figure 28).

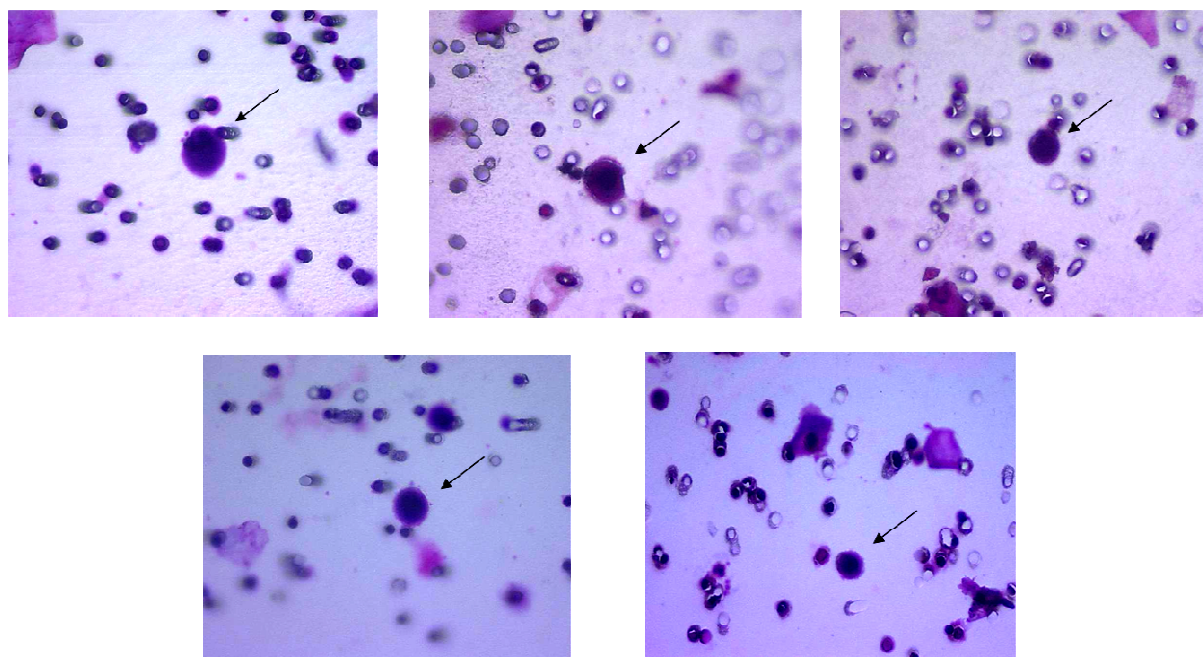


Figure 28: Exemples de cellules suspectes (X40).

B - Caractéristiques des cellules microdisséquées

Nous avons constaté lors de la microdissection que la taille des cellules suspectes répondant aux critères morphologiques des CTC était très variable, ce qui a posé parfois quelques difficultés pour les classifier, le critère de la taille étant pris en défaut pour les CTC les plus petites (Figure 29).

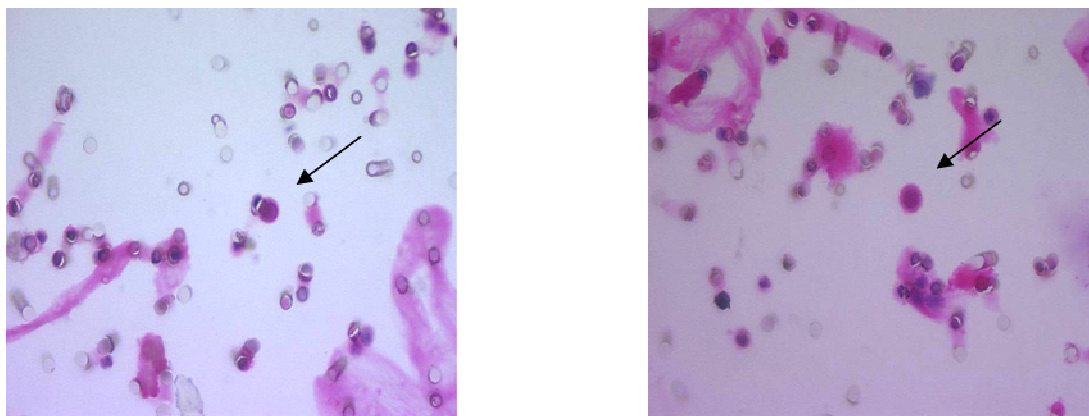


Figure 29: CTC de petites tailles appartenant au même patient (X40).

Certaines constatations ont également été observées lors du visionnage des cellules au microscope. En effet, nous avons constaté des similitudes de la morphologie des CTC chez un même patient. La figure 30 présente des photos de cellules microdisséquées appartenant au même filtre d'un patient, l'aspect et la taille des cellules présentent de grandes homologies.

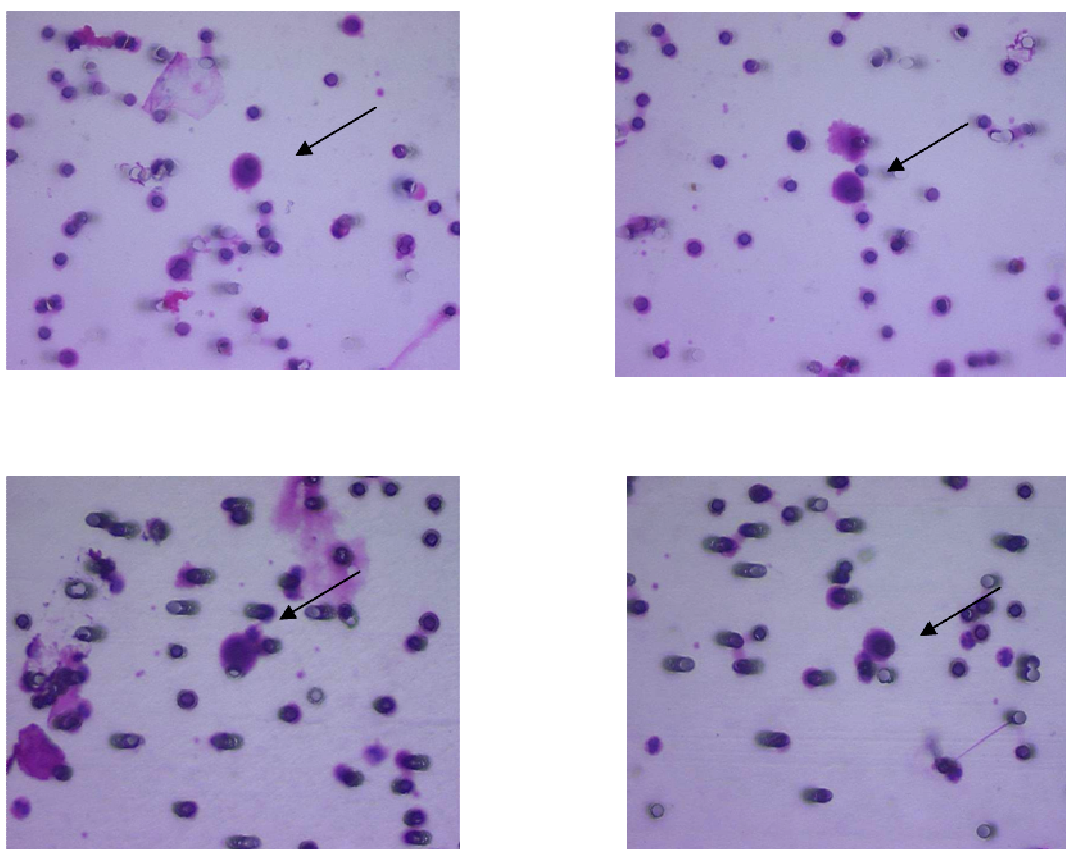


Figure 30: CTC appartenant au même patient (X40).

L'existence de microembolies (CTM), amas constitués de quelques CTC, a été observée chez un patient (Figure 31), sans qu'aucune signification clinique n'y soit rattachée. Ces éléments ne semblent pas avoir une nature artéfactuelle sur notre étude. En effet la technique ISET basée sur la filtration aurait tendance à dissocier les amas cellulaires.

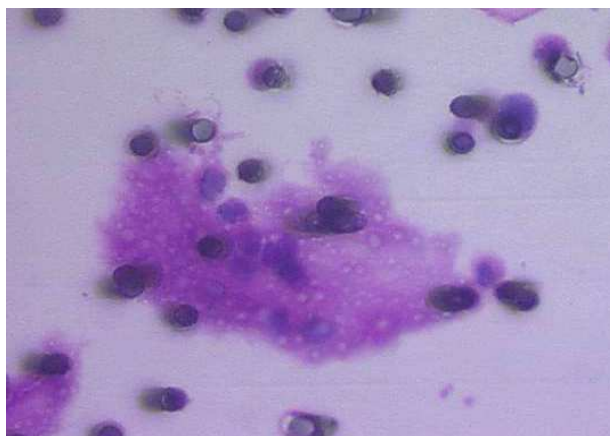


Figure 31: Microembolisme tumoral (X40).

Des cellules normales, larges, identifiées comme non-CTC par le pathologiste ont aussi été observées sur les filtres des patients (Figure 32). Des microdissections de ces cellules ont été effectuées.

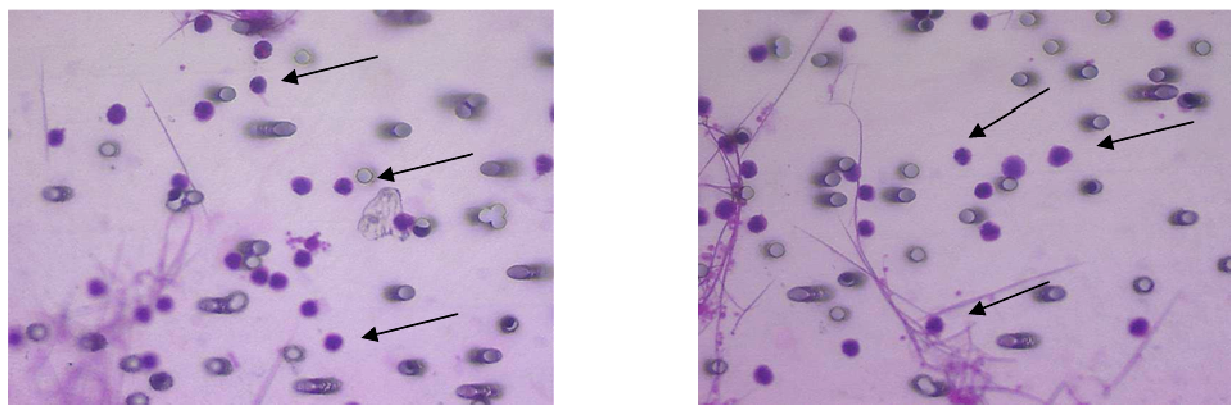


Figure 32: Cellules non tumorales (X40).

Sur les 30 patients analysés, un seul patient (FOS) n'a jamais présenté de CTC sur les filtres analysés, cela est peut être dû à un prélèvement sanguin insuffisant avant l'application de la technique ISET. Sur les 29 patients restants, 327 cellules ont été

microdisséquées, mais le nombre de CTC par patient est très variable allant d'une cellule à 20 cellules (Tableau 8).

Nombre de patients	Nombre de cellules microdisséquées par patient
5	20 cellules
1	17 cellules
1	16 cellules
1	15 cellules
2	13 cellules
1	12 cellules
2	11 cellules
8	10 cellules
1	8 cellules
1	7 cellules
4	5 cellules
1	3 cellules
1	1 cellule
Total= 29	Total= 327

Tableau 8: Nombre de cellules microdisséquées par patient

C - Densité moyenne des CTC/ml

La densité moyenne des CTC représente le nombre de CTC retrouvées par ml de sang chez un patient. Chaque patient a bénéficié d'un prélèvement sanguin de 10 ml et seulement 29 patients de notre panel ont révélé la présence d'au moins une CTC au niveau des filtres analysés. Ce qui représente une densité moyenne de 1,12 CTC / ml pour tous les prélèvements analysés.

Parmi les 29 cas explorés par ISET, on note que :

- Cinq patients présentent des densités moyennes importantes de 2 CTC/ml.
- Trois patients montrent un nombre de CTC variant de 15 à 17 CTC, ce qui révèle une densité de 1,6 CTC/ ml.

- Treize patients démontrent un nombre moyen de CTC entre 10 et 13 CTC par individu, donc une densité de 1,07 CTC /ml.
- Le dernier groupe composé de 8 patients présente un nombre de CTC variant de une à 8 cellules retrouvées par individu, ce qui révèle une densité très faible < 1 CTC /ml.

La comparaison de la densité de CTC/ml de sang aux caractéristiques invasives de la tumeur révèle que cette densité est comprise entre 0.75 CTC/ml à 1,36 CTC/ml selon la classification TNM (Tableau 9) ce qui ne démontre pas de réelles différences selon la classe de la tumeur. Il n'existe pas non plus de différence significative entre les patients au stade Mx et M1, ce qui ne nous permet pas de corréliser le taux de la densité de CTC/ml au stade métastatique du patient. Les deux patients (CME et DHR) métastatiques de notre panel ont présenté un nombre respectif de cellules microdisséquées égal à 10 et à 8 CTC, ces chiffres ne révèlent pas une quelconque différence avec le reste des patients étudiés.

En ce qui concerne la densité en CTC/ml de sang selon le grade de Fuhrman (Tableau 10), nous remarquons que le grade 1 présente la plus grande densité par ml en CTC. Néanmoins notre panel est très petit ce qui laisserait à suggérer qu'il est préférable d'agrandir le nombre d'échantillons avant de tirer des conclusions.

	Tx	T1	T2	T3	Nx	N0	N1	N2	Mx	M1
Nombre de patients	3	16	2	8	6	20	1	2	27	2
Densité (CTC/ml)	1,36	1,26	1	0,8	1,13	1,15	1,3	0,75	1,14	0,9

Tableau 9: Densité des CTC/ ml de sang selon la classification TNM.

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Inconnu
Nombre de patients	4	13	8	1	3
Densité (CTC/ml)	1,42	1,17	0,81	0,1	1,36

Tableau 10: Densité des CTC/ ml de sang selon le grade de Fuhrman.

D - Classification anatomopathologique des cellules microdisséquées

Une fois les cellules microdisséquées, elles ont subi une amplification de leur génome par la PEP, cependant il existe un risque d'échec lors de cette étape qui consiste en un résultat négatif de la pré-amplification du génome de ces cellules. Ce risque peut être dû à quelques facteurs comme la perte de la cellule lors de la fixation de cette dernière sur le bouchon du tube Nikon ou lors de la fermeture de ce dernier. Elle peut aussi être due à une défaillance de la lyse cellulaire au moment de mettre le tampon de lyse. En effet lors de cette étape la cellule est invisible à l'œil nu, le tampon de lyse peut dans ce cas ne pas être déposé directement sur la cellule qui ne sera pas lysée et donnera un résultat négatif lors de la PEP.

En définitif, toutes les cellules microdisséquées n'auront pas un résultat positif lors de l'amplification de leur génome (PEP+) et par la suite ne pourront pas subir de PCR.

Trois-cent-vingt-sept cellules ont été microdisséquées et seulement 205 cellules ont donné une PEP positive, ce qui représente un taux de réussite de la PEP de 62,7% des CTC microdisséquées (Tableau 11). Ce taux est variable individuellement, il varie de 20% pour un patient dans sa valeur la plus basse à 100% pour un autre. Seulement 5 patients ont présenté un taux de PEP+ de leurs cellules inférieur à 50%.

Patient	Nombre de cellules	Nombre de cellules PEP+
CHO	10	8
COL	15	10
COB	10	6
CME	10	5
CNS	20	13
CGN	20	17
CNL	20	9
CRX	10	7
DLL	20	18
DLM	11	8
DRX	13	8
DHR	8	2
DUM	12	7
FAU	3	1
FRI	7	4
GAY	1	1
GST	13	8
GRD	5	3
GRA	17	11
GUE	20	15
HAR	11	6
HOD	16	9
HAV	10	2
OUA	5	2
LAM	10	7
LBR	5	4
LAB	10	6
LEC	10	5
LVY	5	3
TOTAL	327	205

Tableau 11: Nombre des CTC PEP+

Une lecture anatomopathologique des cellules microdisséquées et ayant eu une pré-amplification positive de leurs génomes, a permis de les classer en cellules tumorales circulantes (CTC) et en cellules atypiques circulantes (CAC). Les critères morphologiques de la cellule ne laissent parfois aucun doute sur la nature tumorale de cette dernière, par contre chez un certain nombre de cellules, le doute persiste, c'est pour cela qu'elle a été classée "atypique" dans l'attente de la confirmation moléculaire (Tableau 12).

La classification cytomorphologique de ces cellules a été effectuée selon un certain nombre de critères correspondant aux caractéristiques des cellules tumorales circulantes (Hofman V et al., 2011). Cinq critères de malignité ont été pris en compte par le pathologiste lors de cette étude, le premier critère a été la taille de la cellule, suivi de la taille et de l'irrégularité du noyau, le quatrième critère correspond au rapport nucléo-cytoplasmique et enfin à la présence ou pas d'anisonucléose. Certaines études incluent d'autres critères comme l'hyperchromatisme nucléaire ou la taille et le nombre des nucléoles, ces critères n'ont pas été pris en compte lors de cette étude.

Les cellules étudiées et répondant à au moins trois critères des cinq sélectionnés ont été directement classées comme cellules tumorales (CTC). Si les cellules présentaient moins de trois caractéristiques morphologiques de malignité, elles ont été classées comme cellules atypiques circulantes (CAC). Des photographies ont été effectuées de toutes les cellules microdisséquées et elles ont été examinées par le cytopathologiste.

Soixante-quatre cellules ont été classées CTC et cent-quarante-et-une cellules comme CAC.

Classification	Cellules tumorales circulantes (CTC)	Cellules atypiques circulantes (CAC)
Nombre de cellules	64	141

Tableau 12: Classification anatomopathologique des cellules microdisséquées.

Partie II Etude du gène *VHL*

A - Amplification du gène *VHL*

Nous avons recherché les différentes variations génétiques du gène *VHL* au niveau des cellules isolées par ISET, afin de confronter les profils observés au niveau de l'ADNctc, de l'ADNt et de l'ADN génomique.

Les cellules microdisséquées sur chaque filtre ont été lysées par la protéinase K, puis elles ont subi une pré-amplification de leur génome selon le protocole PEP (Primer Extension Pre-amplification). Les 3 exons du gène *VHL* ont été amplifiés par PCR-nichées, l'électrophorèse de contrôle a révélé pour chaque partie amplifiée, une bande unique de la taille attendue.

Pour chaque PCR ; un témoin négatif de la lyse "lys⁻" (sans cellules), un témoin négatif de PEP "PEP⁻" (sans ADN), un témoin positif de PEP "PEP⁺" (avec de l'ADN), deux témoins positif et négatif de chaque PCR-nichée ont été effectués (Figure 33 /34/ 35).

Le même protocole d'analyse et de contrôle des PCR a été effectué pour les PCR à partir de l'ADNt issu des tumeurs et de l'ADN génomique.

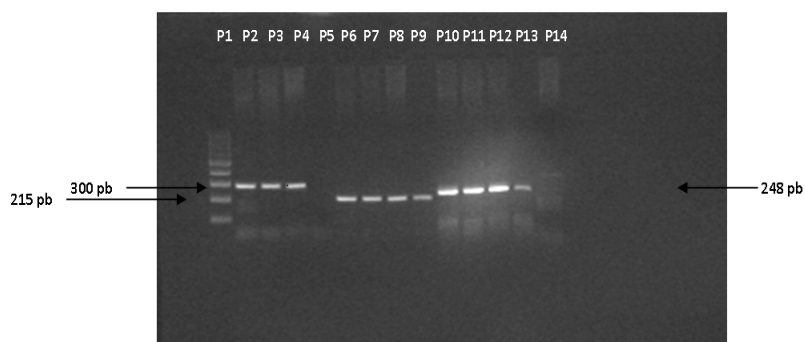


Figure 33: Amplification de l'exon 1 du gène *VHL* sur single cell.

P1 : Marqueur de taille (100 pb); **P2, P3** et **P4** : échantillons 1, 2 et 3 de la partie 1 de l'Exon 1 (300 pb) ; **P5** : Témoin négatif de lyse (Lys⁻) ; **P6, P7, P8** et **P9** : échantillons 4, 5, 6 et 7 de la partie 2 de l'Exon 1 (215 pb) ; **P10, P11, P12** et **P13** : échantillons 8, 9, 10 et 11 de la partie 3 de l'Exon 1 (248 pb) ; **P14** : témoin négatif de PEP (PEP⁻).

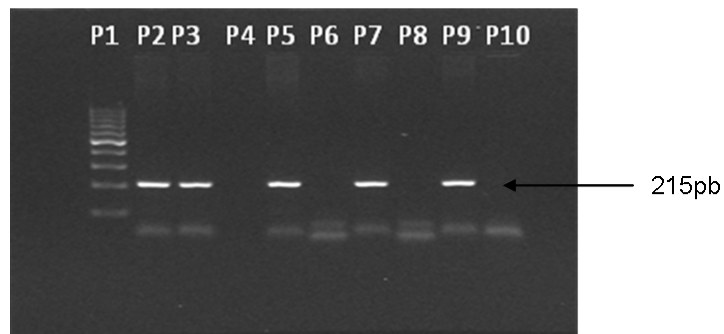


Figure 34: Amplification de l'exon 2 du gène *VHL* sur single cell.

P1 : Marqueur de taille (100 pb) ; **P2** et **P3** : échantillons 1 et 2 (215 pb), **P4** : Témoin négatif de lyse (Lys-) ; **P5** : échantillons 3 (215 pb) ; **P6** : Tube blanc ; **P7** : témoin positif de PEP (PEP+) ; **P8** : témoin négatif de PEP (PEP-) ; **P9** : Témoin positif de la PCR et **P10** : témoin négatif de la PCR.

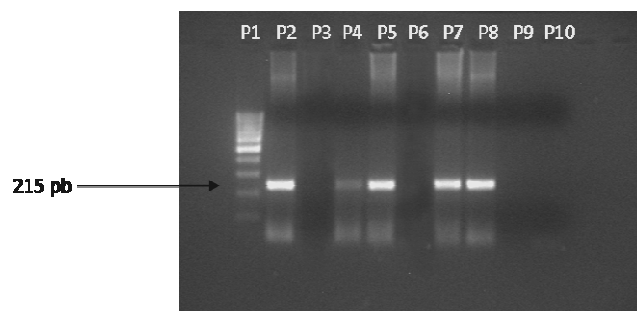


Figure 35: Amplification de l'exon 3 du gène *VHL* sur single cell.

P1 : Marqueur de taille ; **P2**, **P4**, **P5** et **P7** échantillons 1 et 2, 3 et 4 (215 pb), **P3** : Témoin négatif de lyse (Lys-); **P6** : témoin négatif de PEP (PEP-); **P8** : témoin positif de la PCR; **P9** et **P10** : témoins négatifs de la PCR.

B - Analyse moléculaire du gène *VHL*

L'analyse moléculaire des 3 exons du gène *VHL* au niveau des CTC/CAC et du tissu tumoral a révélé 18 types de mutations (Tableau 13). Elles sont répertoriées en tant que des mutations Frameshift ou des mutations ponctuelles. L'ADNctc et l'ADNt analysés présentent soit une ou deux mutations à la fois, touchant un ou deux exons. Quatre patients n'ont présenté aucune variation tant au niveau de l'ADN des cellules analysées qu'au niveau de l'ADN issu du tissu tumoral.

1) Les mutations

Les mutations retrouvées ont été classées en 7 délétions et 11 mutations ponctuelles. Ces mutations ponctuelles touchent la plupart du temps un seul nucléotide. Elles sont classées en 8 transversions et 3 transitions (Tableau 13). Aucune insertion ou autres types de variations génétiques n'ont été retrouvées au niveau des séquences analysées. Afin d'analyser les mutations retrouvées nous avons utilisé la base de données spécifique des mutations du gène *VHL*, www.umd.be/VHL (Bérout et al., 1998).

Mutations		Nombre de patient	%
Fameshift	Délétions	7	38,9
Mutations ponctuelles	Transversions	8	44,4
	Transitions	3	16,7

Tableau 13: classification des mutations *VHL* retrouvées.

a) Mutation c.27G>T

C'est une transversion qui touche l'exon 1 du gène *VHL*, elle se caractérise par la transformation d'une Guanine en Thymine (G>T) au niveau du codon 9. Cette mutation substitue le codon GAC qui code pour l'Acide Aspartique (Asp), en un codon TAC qui code pour la Tyrosine (Tyr). Elle est située au sein d'un îlot CpG et elle a été retrouvée chez un seul patient (COB) à l'état hétérozygote (Figure 36).

Pour ce patient, 10 cellules ont été microdisséquées, 6 d'entre elles ont donné une PEP+. Après l'analyse cytopathologique de ces 6 cellules, 2 ont été formellement classées comme

CTC selon leur aspect morphologique et 4 classées CAC (Figure 37). Ces cellules présentent toutes la mutation c.27 G>T au niveau de leur ADN, elle est également retrouvée au niveau de l'ADN issu du tissu tumoral (Figure 36). L'analyse moléculaire de l'exon 1 au niveau de l'ADN génomique de ce patient ne montre aucune mutation.

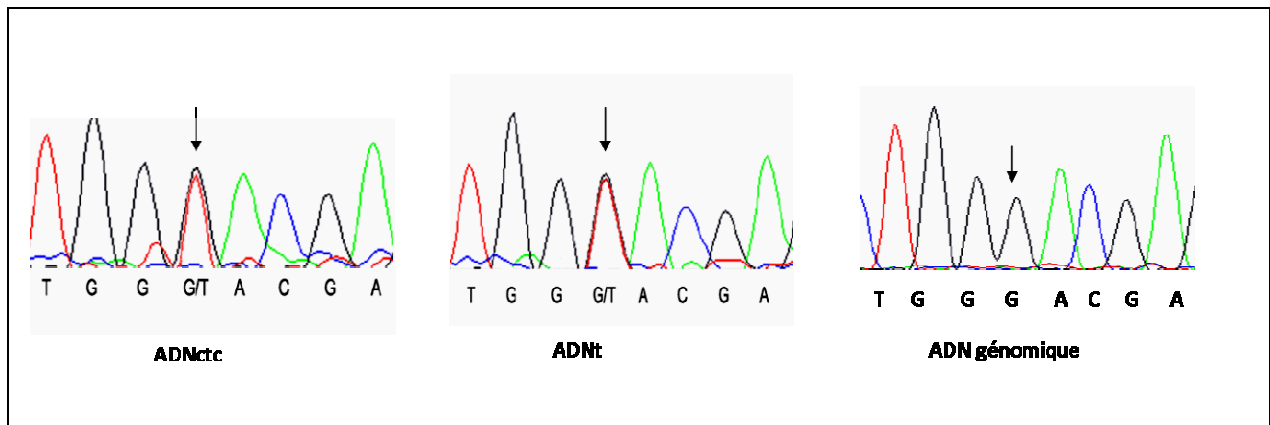
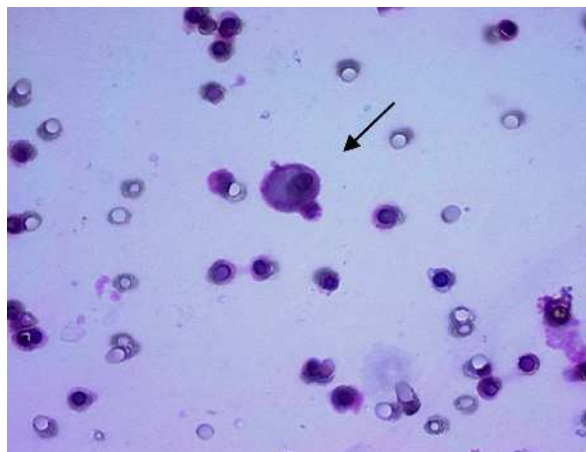


Figure 36: Mutation c.27G>T, codon 9/ Exon 1.



Cellule appartenant au patient (COB) et validée comme CTC par une double analyse cytopathologique et tumorale.

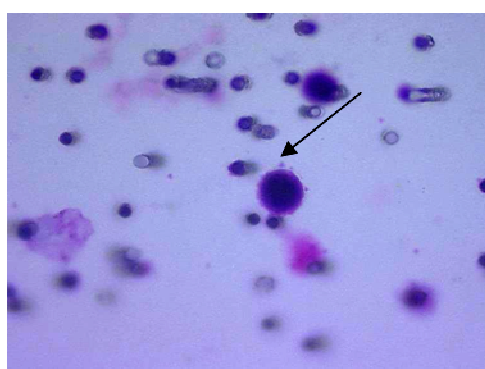
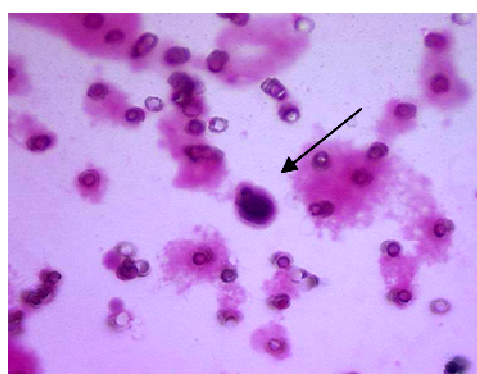
Figure 37: CTC portant la mutation c.27G>T.

b) Mutation c.53C>A

Il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau du codon 18, qui touche le nucléotide 53. Elle se caractérise au niveau de l'ADNc par une transversion d'un C en A. La mutation touche le codon GCA en le substituant en GAA. Elle se traduit au niveau de la protéine par une transformation de l'acide aminé initial, l'Alanine (Ala) en Glucine (Glu). Cette mutation est désignée sur le plan protéique par p.Ala18Glu. Elle n'est pas située au sein d'un îlot CpG et elle a été retrouvée chez deux patients (CHO et CNL) de notre panel.

Pour le premier patient (CHO), 10 cellules ont été microdisséquées, 8 d'entre elles ont donné une PEP+, elles présentent toutes cette mutation au niveau de leur ADNctc (Figure 39). Parmi ces cellules, cinq ont été classées CTC et 3 CAC selon le pathologiste (Figure 38).

Pour le deuxième patient (CNL), 20 cellules ont été microdisséquées, 9 d'entre elles ont donné une PEP+ et elles portent toutes la mutation au niveau de l'exon 1 (Figure 39). L'ADNt de ces patients présente aussi cette variation, contrairement à l'ADN génomique qui lui est normal (Figure 39). Pour ce patient (CNL) deux cellules analysées ont été classées en tant que CTC et sept CAC. L'analyse moléculaire a donc confirmé le caractère malin de ces cellules.

**CTC appartenant au patient CHO****CTC appartenant au patient CNL****Figure 38: CTCs portant la mutation c.53C>A.**

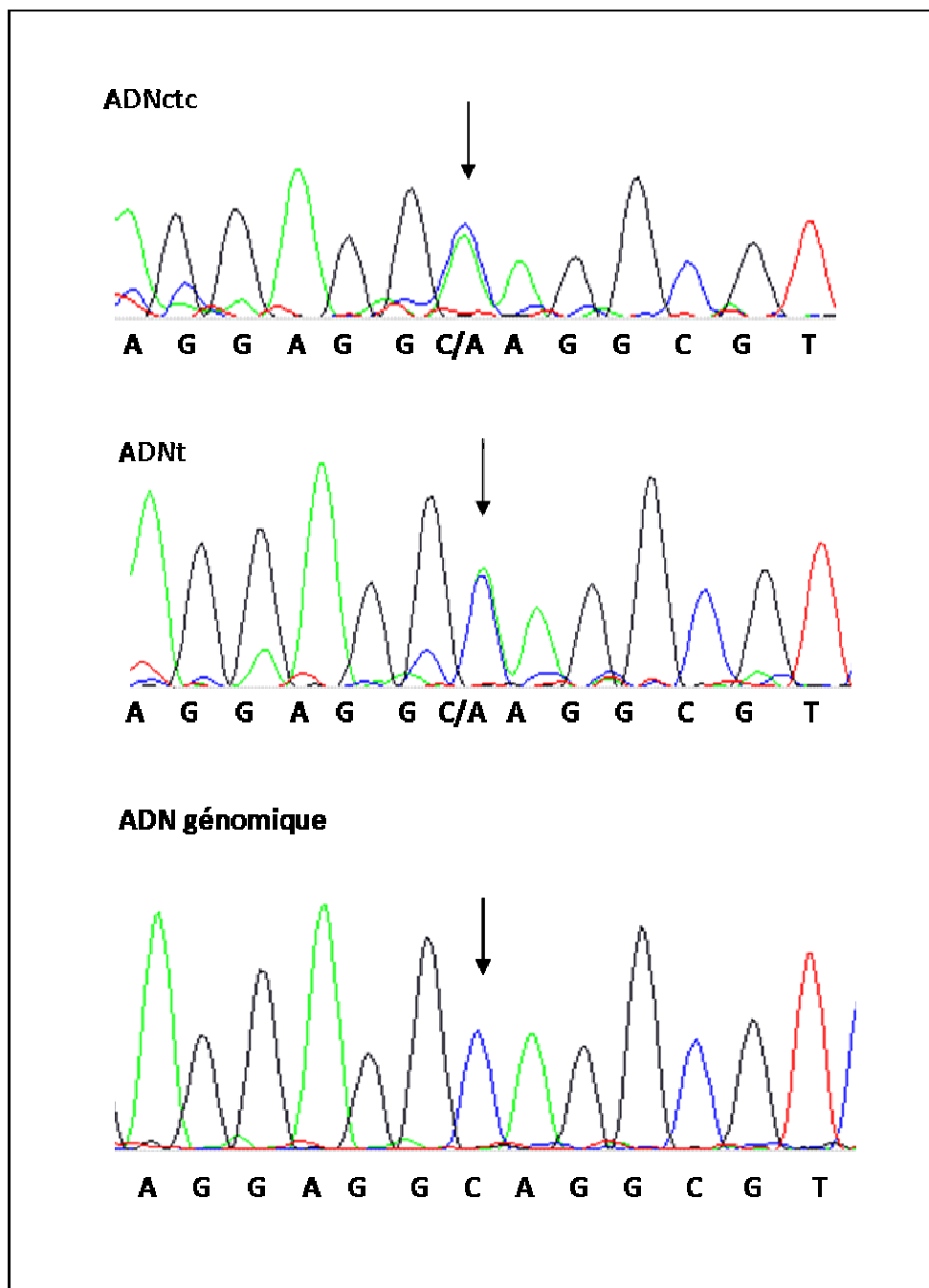


Figure 39: Mutation c.53C>A, codon 18/ Exon1.

c) Mutation c.183C>G

Cette mutation touche le codon 61 au niveau de l'exon 1. Il s'agit d'une transversion d'une Cytosine (C) en une Guanine (G), elle substitue le codon CCC en CCG mais ne modifie en rien la séquence protéique, les deux codons codent pour la Proline (Pro). Cette mutation p.Pro61Pro n'est pas située au niveau d'un îlot CpG.

Elle a été retrouvée au niveau de l'ADNctc d'un seul patient (DLL). Vingt cellules de ce patient ont été microdisséquées, dix-huit ont donné une PEP+ et dix-sept portent la mutation c.183C>G (Figure 41). Une seule cellule de ce patient n'a présenté aucune variation au niveau des 3 exons du gène *VHL*.

Sur le plan cytopathologique, 10 des cellules analysées ont été classées comme CTC (Figure 40) par l'anatomopathologiste et 8 cellules ont été classées CAC. La nature tumorale de 17 cellules a été validée par l'analyse moléculaire du gène *VHL* car ces cellules présentent un profil identique à celui de l'ADN tumoral. L'ADN génomique quant à lui est normal.

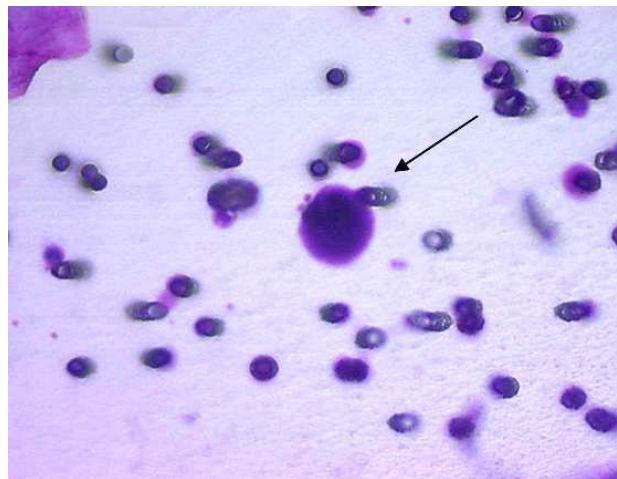


Figure 40: CTC portant la mutation c.183C>G.

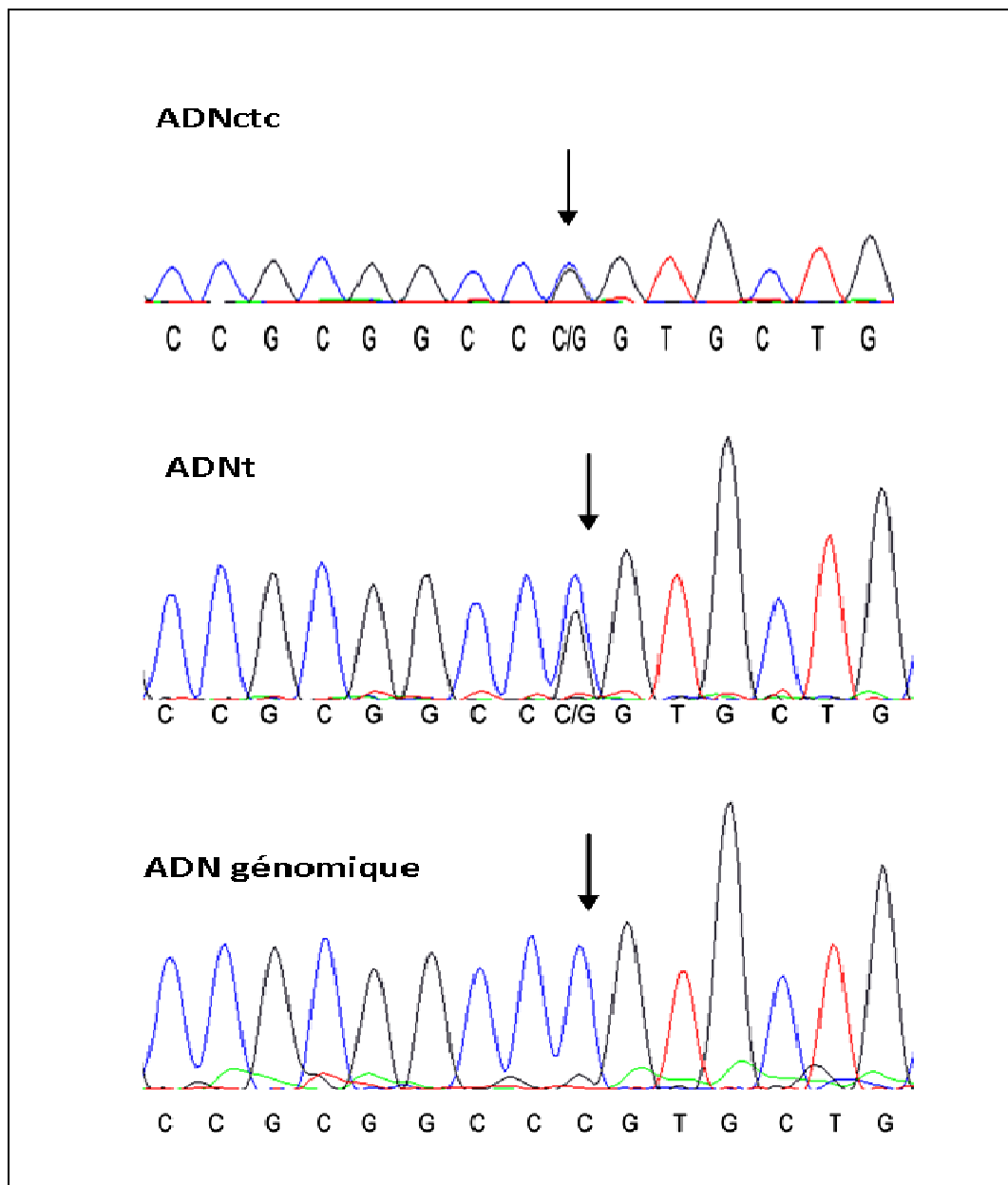


Figure 41: Mutation c.183C>G, Codon 61/ Exon 1.

d) Mutation c.194C>A

Il s'agit d'une transversion d'une Cytosine par une Arginine au niveau nucléotidique 194. Elle substitue le codon 65 de TCG en TAG (codon stop) ce qui classe cette mutation comme une mutation non-sens. Elle est désignée au niveau protéique par p.Ser65X et elle n'est pas située au sein d'un îlot CpG.

Cette mutation a été retrouvée chez le patient (GUE), au niveau des cellules analysées et au niveau du tissu tumoral. Elle a été retrouvée au niveau de l'ADNctc de 11 (figure 43) des 15 cellules analysées de ce patient et au niveau de l'exon 1 de l'ADNt (Figure 42). L'analyse pathologique de cellules les a classées comme suit : 3 cellules tumorales (CTC) et 12 cellules atypiques (CAC).

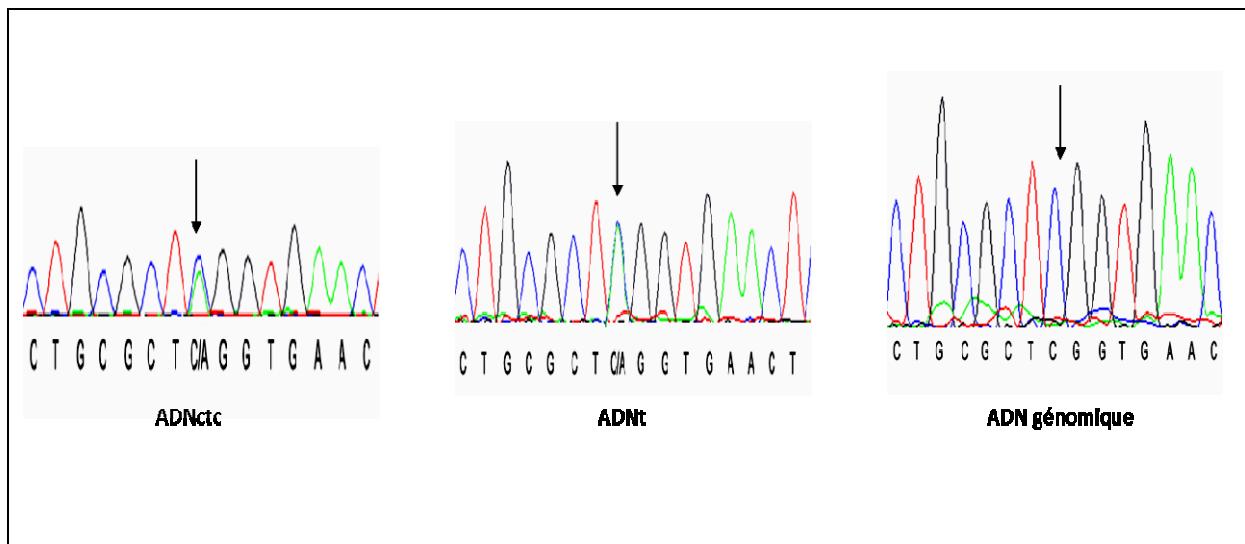


Figure 42: Mutation c.194C>A, codon 65/ Exon 1.

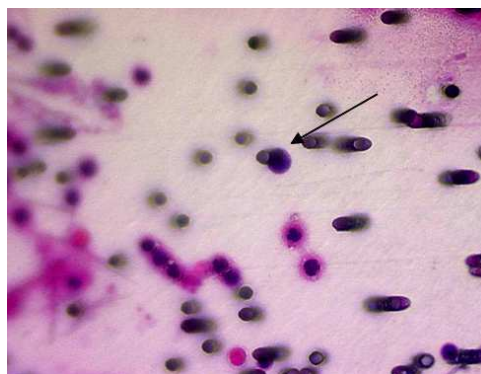


Figure 43: CTC portant la mutation c.194C>A.

e) Mutation c.205_206delCG

Il s'agit d'une délétion de deux nucléotides CG au niveau du codon 69 de l'exon 1, qui se traduit au niveau nucléotidique par la perte d'une partie du codon CGC qui codait initialement pour l'Arginine (Arg) et l'arrêt de la traduction au niveau du codon 130. C'est une mutation faux-sens.

Cette mutation a été retrouvée au niveau des 5 cellules PEP+ du patient (CME) (Figure 45) dont 4 ont été classées comme tumorales (CTC) et une comme cellule suspectée d'être tumorale (CAC). Cette délétion est également retrouvée au niveau de la séquence de l'ADNt et absente au niveau de l'ADN génomique (Figure 44).

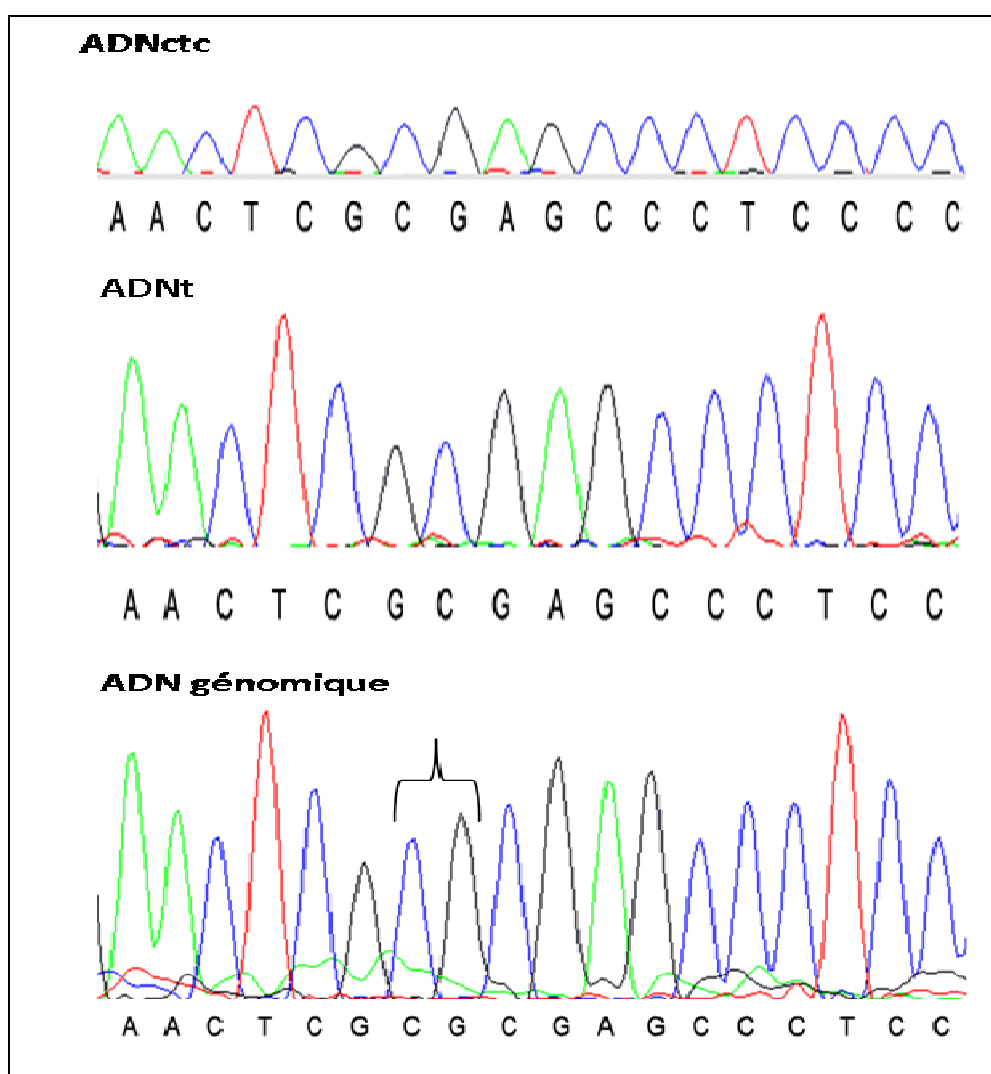


Figure 44: Mutation c.205_206delCG, codon 69/ Exon 1.

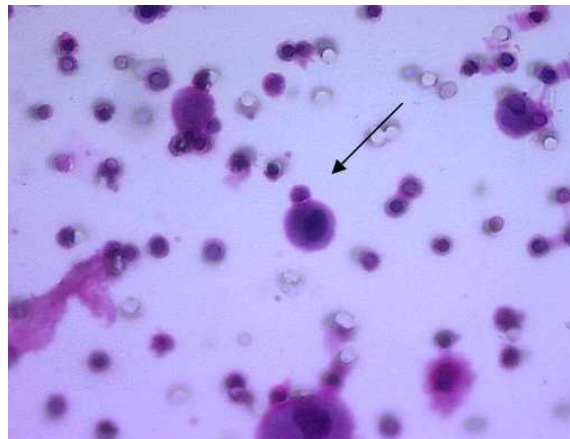


Figure 45: CTC portant la mutation c.205_206delCG.

f) Mutation c.263G>A

Il s'agit d'une transversion d'une Guanine (G) en une Arginine (A) au niveau du codon 88 de l'exon 1. Cette transversion se traduit par la substitution du codon TGG qui code pour le Tryptophane (Trp) en TAG (codon stop). Au niveau protéique cette mutation est appelée p.Trp88X et elle ne se situe pas au niveau d'un ilot CpG.

Cette mutation a été retrouvée chez deux patients (CGN et GRA). Ces deux patients ont eu respectivement 20 et 17 cellules microdisséquées dont seulement 17 et 11 ont données des PEP+.

Pour le patient (CGN), 15 des 17 cellules PEP+ ont présenté la mutation c.263G>A (Figure 46), deux d'entre elles n'ont révélé aucune mutations sur les trois exons. Pour ce patient, 15 cellules ont été classées CAC alors que 2 cellules ont été formellement classées comme tumorales (CTC).

Pour le patient (GRA), cette mutation a été retrouvée au niveau de l'ADNctc de toutes les cellules étudiées, seulement 3 d'entre elles ont été reconnues comme tumorales (CTC) par le pathologiste et 8 comme atypiques (CAC) (Figure 47).

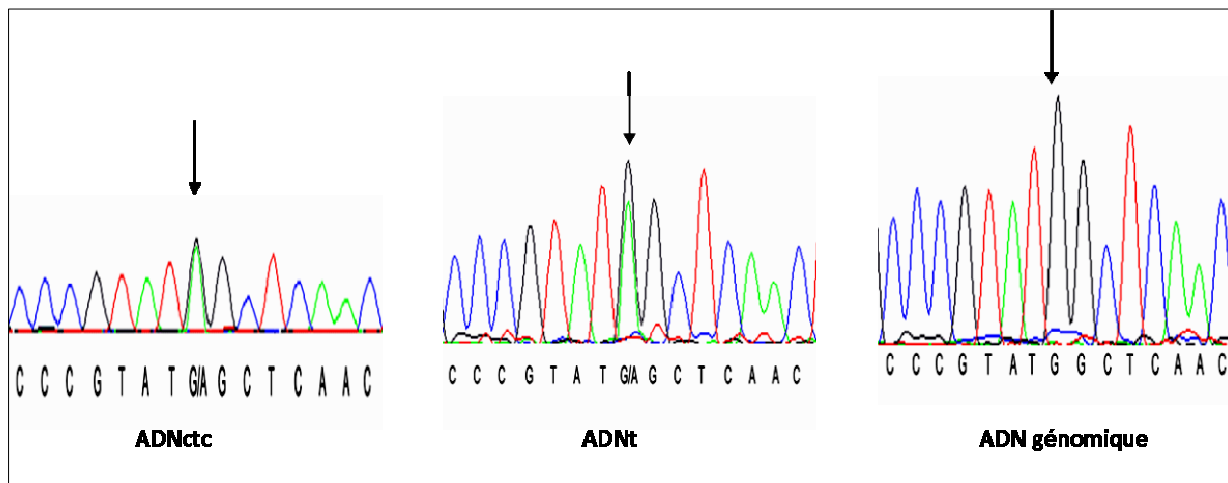
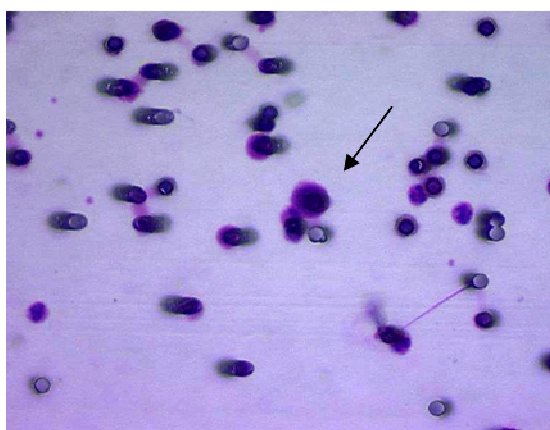
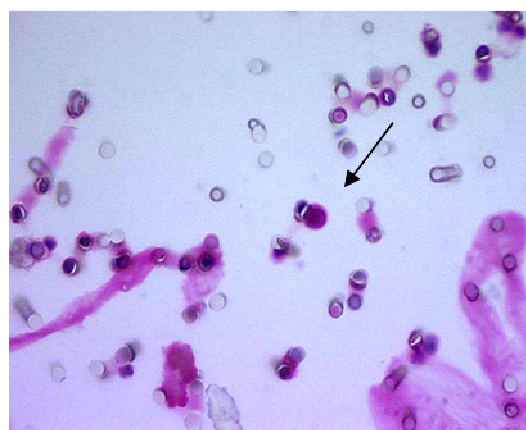


Figure 46: Mutation c.263G>A, codon 88/ Exon 1.



CTC appartenant au patient (CGN)



CTC appartenant au patient (GRA)

Figure 47: CTCs portant la mutation c.263G>A.

g) Mutation c.275delA

Il s'agit d'une délétion touchant le codon 92 de l'exon 1. La perte d'un A au niveau du codon GAC qui code pour l'Acide Aspartique (Asp) entraîne la formation d'un codon Stop et l'arrêt de la traduction au niveau du codon 158 de la séquence. Il s'agit d'une mutation faux-sens.

Cette mutation a été trouvée au niveau de deux cellules du patient (DHR) classées précédemment comme CAC (Figure 49). Elle est également présente au niveau de la séquence d'ADN issue de la tumeur (Figure 48).

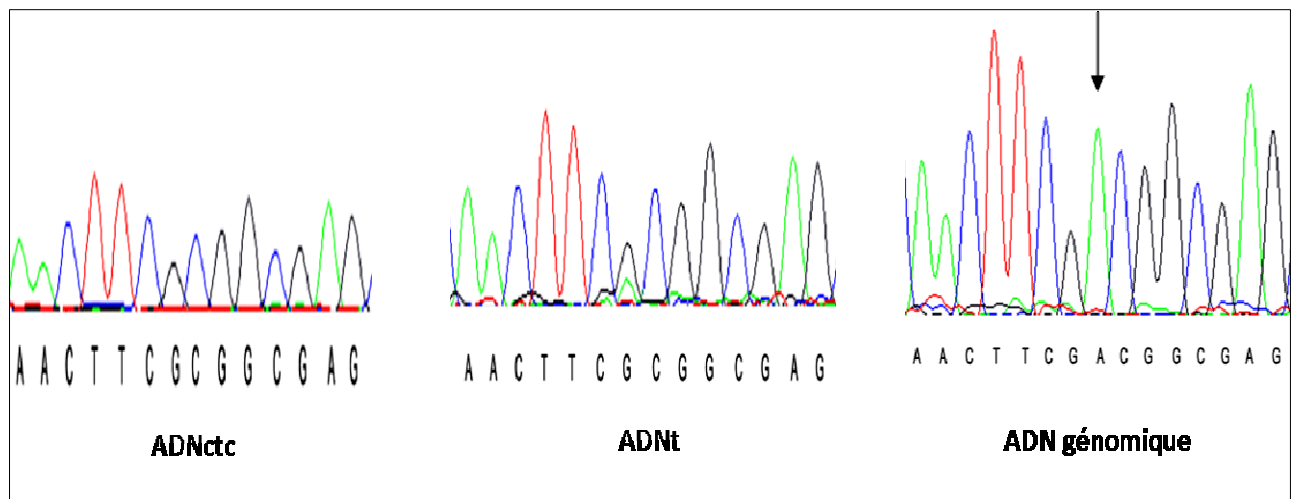


Figure 48: Mutation c.275delA, codon 92/ Exon 1.



Figure 49: CAC portant la mutation c.275delA.

h) Mutation c.299delC

La délétion touche le codon n°100 de l'exon 1, il s'agit également d'une mutation faux-sens qui se traduit par l'arrêt de la traduction au niveau du codon 158 de la séquence. Cette mutation se traduit par une délétion d'une Cytosine (C) au niveau du codon ACG (Thr), elle est nommée p.Thr100SerfsX59.

Cette mutation a été trouvée au niveau de 4 cellules analysées des 6 microdisséquées du patient (LAB), elle est identique à celle retrouvée au niveau de l'ADNt (Figure 50). Pour ce patient une seule cellule a été confirmée comme tumorale après analyse cytopathologique et 5 ont été classées comme CAC (Figure 51).

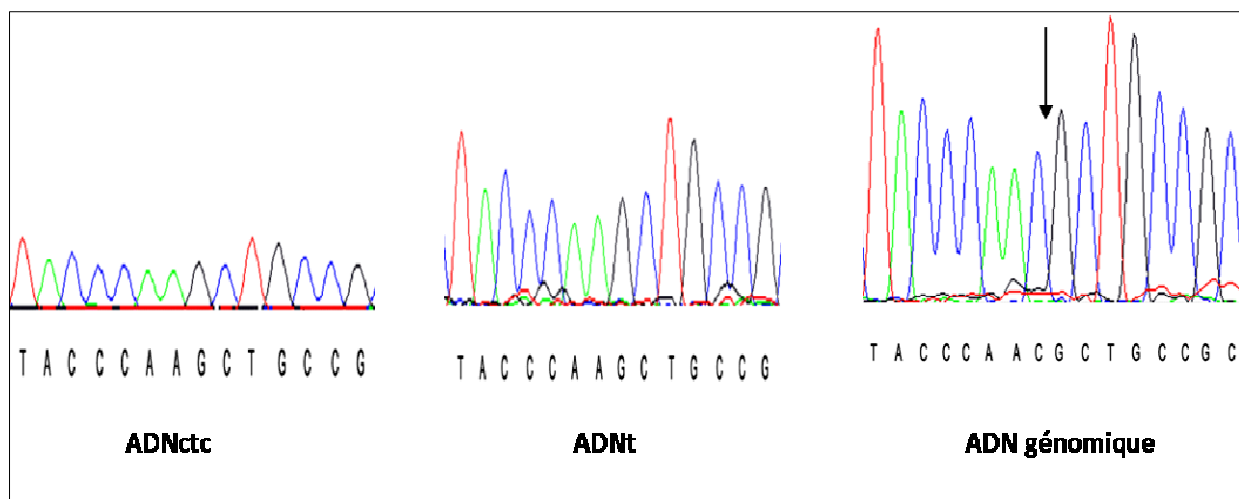


Figure 50: Mutation c.299delC, codon 100/ Exon 1.

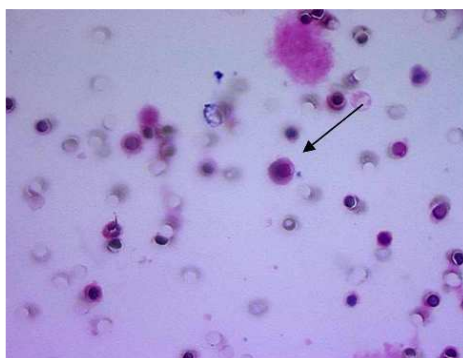


Figure 51: CAC portant la mutation c.299delC.

i) Mutation c.327delC

C'est une délétion d'une Cytosine (C) au niveau du codon 109 de l'exon 1. Elle touche le codon ATC qui code pour l'Isoleucine (Ile) en provoquant un arrêt de la traduction au niveau du codon 158.

Cette mutation a été retrouvée chez deux patients (CRX et LVY) de notre panel. Elle a été retrouvée au niveau de l'ADNctc de six cellules sur sept classées comme cellules atypiques (CAC) pour le premier patient et au niveau de l'ADNctc de trois cellules sur les trois classées comme CAC pour le deuxième patient (Figure 53). Les séquences trouvées sont respectivement identiques à celles de l'ADNt issu des tumeurs (Figure 52).

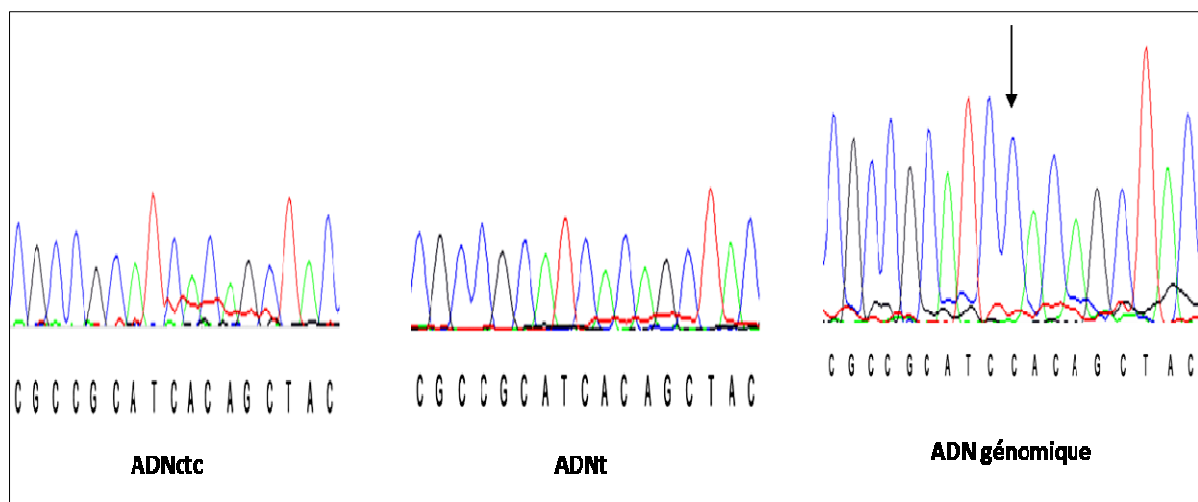
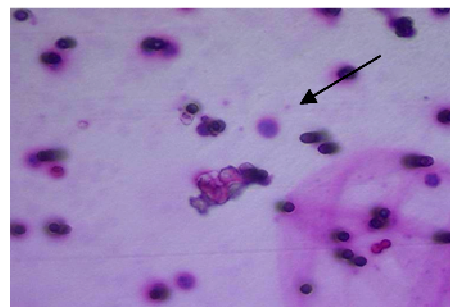


Figure 52: Mutation c.327delC, codon 109/ Exon 1.



CAC appartenant au patient (CRX)



CAC appartenant au patient (LVY)

Figure 53: CACs portant la mutation c.327delC.

j) Mutation c.346C>G

L'analyse moléculaire de l'exon 2 du patient (CHO) montre une mutation au niveau du codon 116. Il s'agit d'une transversion c.346C/G qui se traduit au niveau de la protéine par un changement de la Leucine en Valine (p.Leu116Val). Cette mutation (Figure 54) a été retrouvée au niveau de l'ADNctc de 8 cellules PEP+ analysées pour ce patient dont cinq ont été classées comme CTC et 3 comme CAC (Figure 55). Cette séquence n'est pas située au niveau d'un îlot CpG.

L'ADNctc de ce patient a déjà présenté une autre mutation c.53C>A au niveau de l'exon 1. Ce sont deux mutations ponctuelles affectant un seul nucléotide à la fois que l'on retrouve chez ce patient. D'après nos données nous ne pouvons conclure si ces deux mutations sont portées par le même allèle ou si elles touchent deux allèles différents.

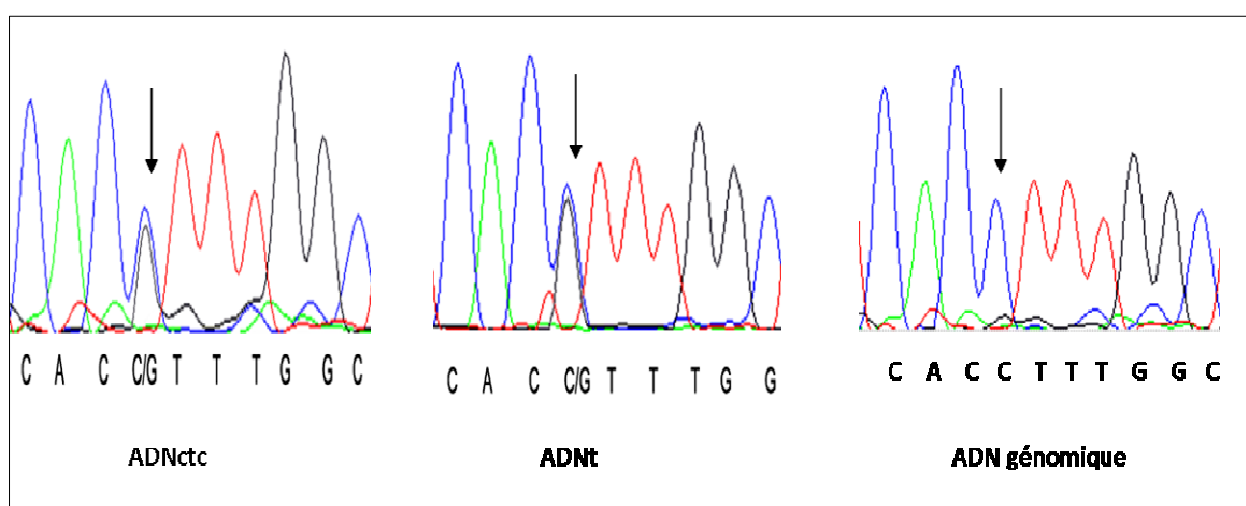


Figure 54: Mutation c.346C/G, codon 116/ Exon 2.

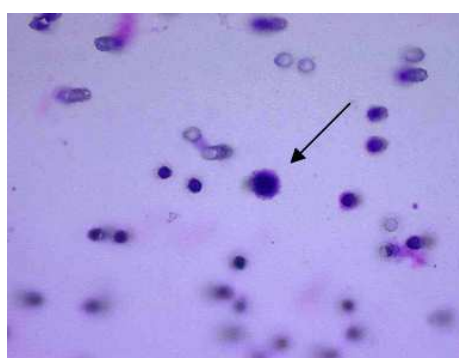


Figure 55: CAC portant la mutation c.346C/G.

k) Mutation c.353T>C

C'est la transition d'une Thymine (T) en une Cytosine (C) au niveau du codon 118 de l'exon 2. Elle se traduit par la substitution du codon CTC qui code pour la Leucine (Leu) en le codon CCC qui code pour la Proline (Pro). Cette mutation est désignée par p.Leu118Pro, et n'est pas située au sein d'un îlot CpG.

Elle a été identifiée chez trois patients de notre panel. Il s'agit des patients (CNS, DLM et GAY) (Figure 57).

Chez le patient (CNS), dix des treize cellules PEP+ présentent cette mutation, identique à celle retrouvée au niveau de l'ADNt. Ces treize cellules ont classées en 5 CTC présentant l'aspect morphologique d'une cellule tumorale et 8 cellules CAC.

Pour le patient (DLM), 7 cellules parmi 8 ont présenté cette mutation. Parmi ces cellules une seule a été classée comme CTC et les sept autres comme CAC.

Pour le patient (GAY), une seule CTC a été classée CAC et a démontré la présence de la mutation c.353T>C au niveau de son ADNctc, cette mutation a aussi été retrouvée au niveau de l'ADNt (Figure 56).

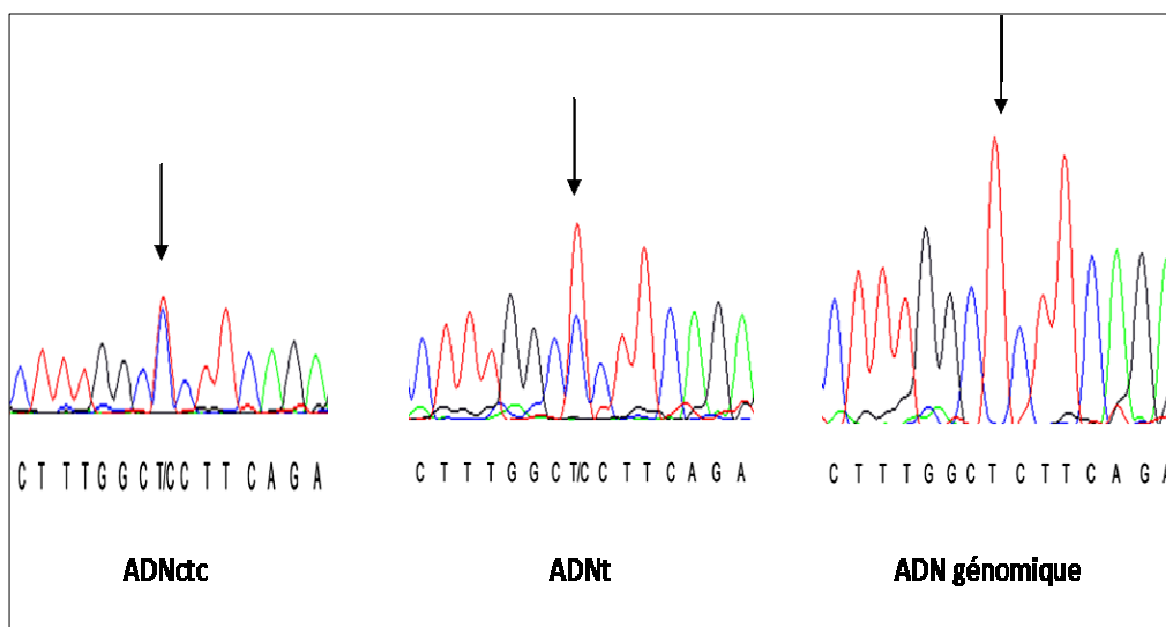


Figure 56: Mutation c.353T>C, codon 118/ Exon 2.

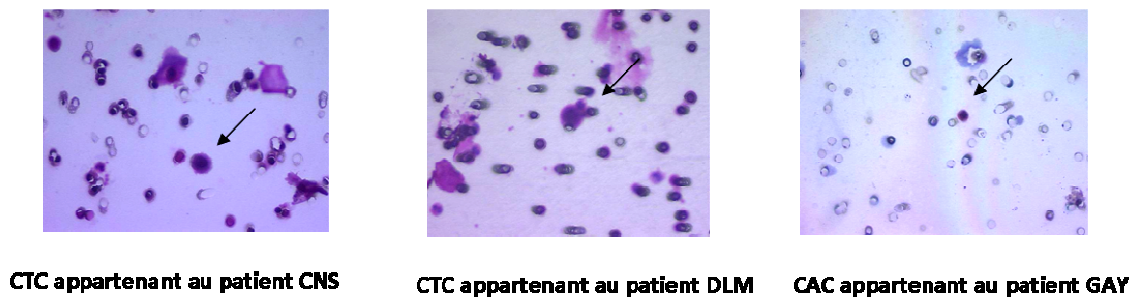


Figure 57: CTCS et CAC portant la mutation c.353T>C.

1) Mutation c.418delC

Cette mutation touche le codon 140, elle se caractérise par une délétion d'un C au niveau du codon CTC qui code pour la Leucine (Leu), elle se manifeste par l'apparition d'un codon stop au niveau du codon 158. C'est une mutation faux-sens.

Dans notre étude, elle a été retrouvée chez le patient (HAR), où quatre cellules des six CTC PEP+, ont présenté cette délétion (Figure 58). Les 6 cellules étudiées ont toutes été identifiées comme CAC par le cytopathologiste (Figure 59).

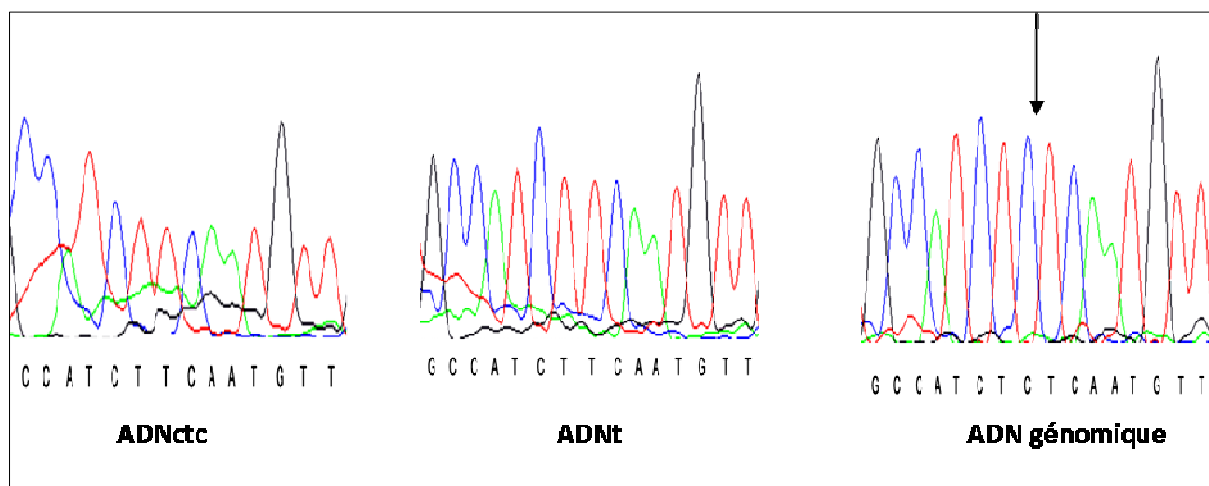


Figure 58: Mutation c.418delC, codon 140/ Exon 2.

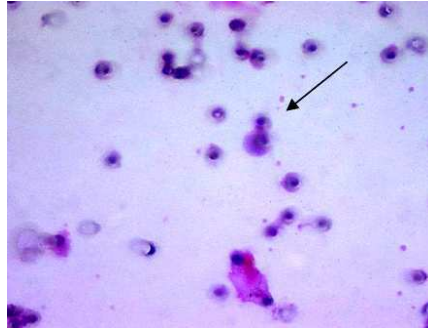


Figure 59: CAC portant la mutation c.418delC.

m) Mutation c.435G>T

C'est une transversion d'un G en T au niveau du codon 145 de l'exon 2. Au niveau de la protéine, cette mutation p.Gln145His entraîne une substitution du codon CAG qui code initialement pour la Glutamine (Gln) en CAT qui code pour l'Histidine (His). Cette mutation n'est pas située au niveau d'un îlot CpG.

Elle a été retrouvée au niveau des six cellules analysées du patient (COB), par contre cinq de ces six cellules ont la mutation à l'état hétérozygote et une cellule présente un profil homozygote pour la mutation (Figure 60). Aucune variation génétique n'a été remarquée au niveau de l'ADN génomique. Pourtant lors de l'analyse cytopathologique, deux cellules ont été identifiées comme CTC et 4 cellules en étant CAC (Figure 61).

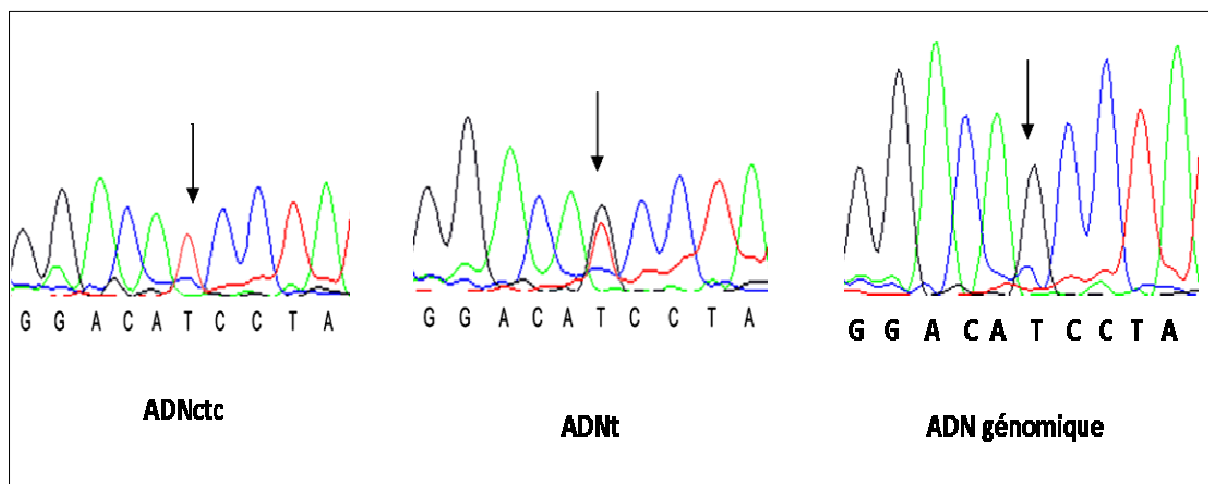


Figure 60: Mutation c.435G>T, codon 145/ Exon 2.

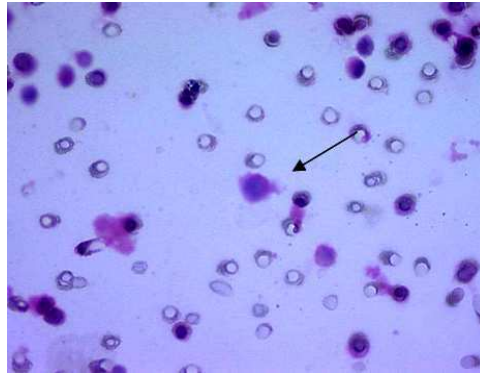


Figure 61: CAC portant la mutation c.435G>T

n) Mutation c.472delC

Il s'agit d'une délétion d'un C au niveau du codon CTG à la position 158. Cette mutation est située au niveau de l'exon 3 du gène *VHL* et se caractérise par l'apparition d'un codon stop au niveau du même codon. C'est une mutation faux-sens qui se traduit au niveau protéique par p.Leu158X.

Elle a été retrouvée au niveau des deux cellules PEP+ analysées du patient (HAV) (Figure 62). Pour ce patient, une cellule a été confirmée tumorale (CTC) par le pathologiste et l'autre a été classée CAC (Figure 63).

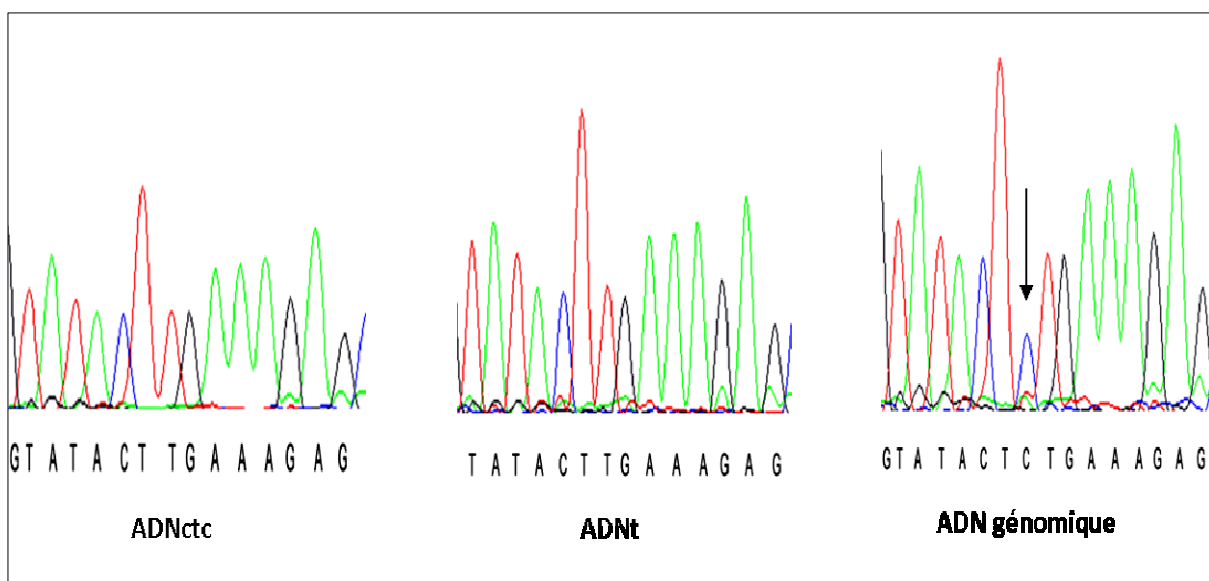


Figure 62: Mutation c.472delC, codon 158/ Exon 3.

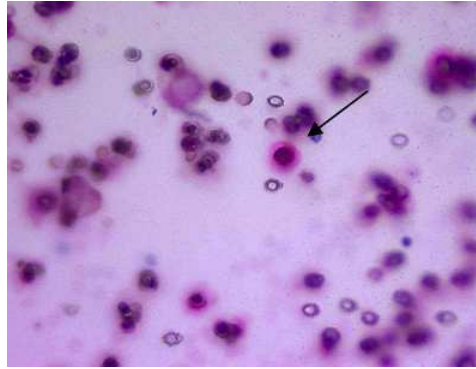


Figure 63: CTC portant la mutation c. 472delC.

o) Mutation c.486delC

Il s'agit d'une délétion d'une Cytosine au niveau du codon 163 de l'exon 3. C'est une mutation faux-sens qui engendre un codon stop au niveau du codon 169. Au niveau protéique la mutation est désignée par p.Leu163SerfsX7.

Cette mutation a été retrouvée chez 3 patients (COL, FAU et GST) (Figure 64). Elle a été retrouvée au niveau des séquences de l'ADNctc de 10 cellules du patient (COL) dont 7 ont été déjà classées comme CTC et 3 comme CAC par le pathologiste. Pour le patient (FAU), cette délétion a été retrouvée au niveau de la cellule unique de ce patient classée atypique. Les 8 cellules du patient (GST) portent cette mutation, parmi ces cellules une a été identifiée comme tumorale et les sept autres ont été classées comme cellules atypiques circulantes (Figure 65). La comparaison de l'ADNctc et de l'ADNt de chacun de ces trois patients démontre une similitude au niveau des profils étudiés.

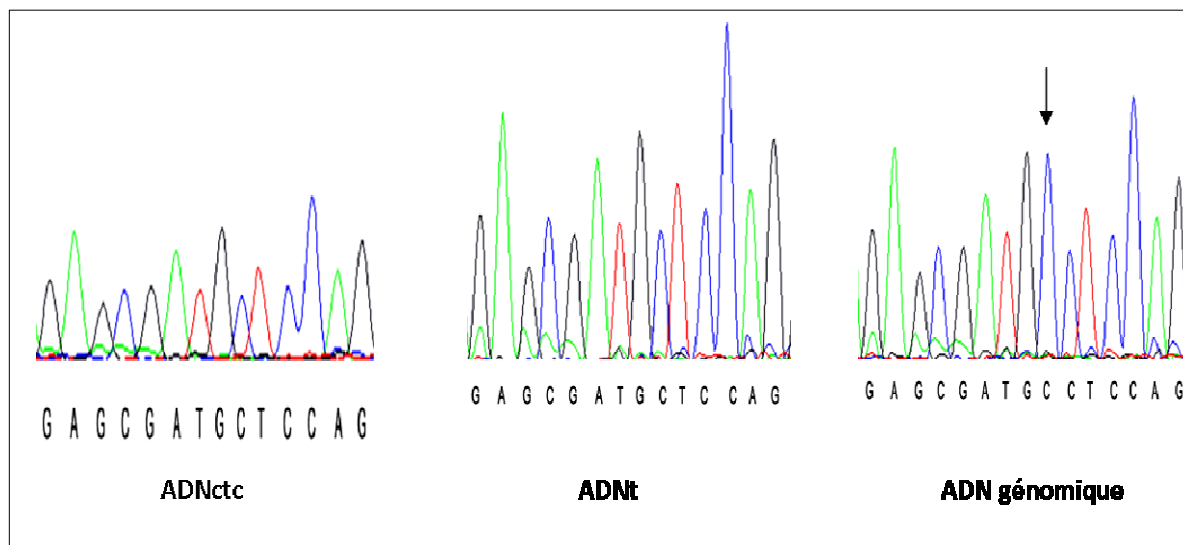


Figure 64: Mutation c.486delC, codon 163 / Exon 3.

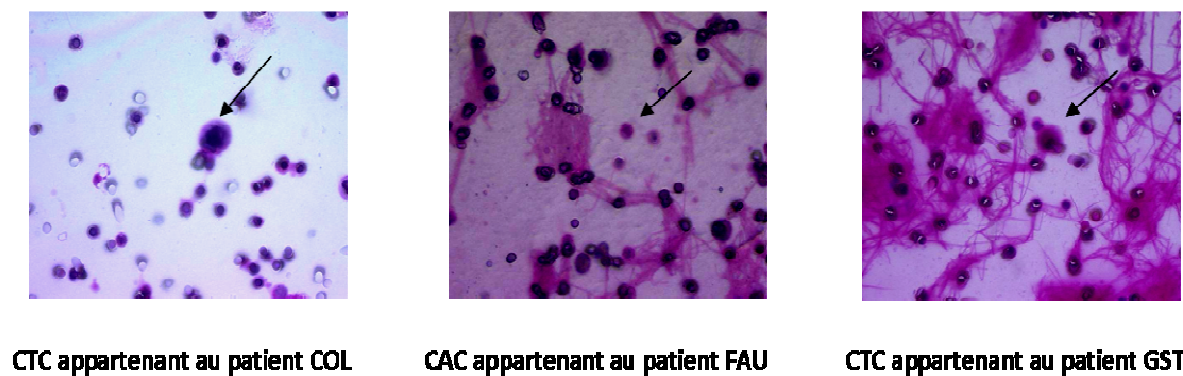


Figure 65: CTCs et CAC portant la mutation c.486delC

p) Mutation c.526A>T

C'est une transversion c.526A>T au niveau du codon 176 de l'exon 3. Le codon initial AGG est substitué par le codon TGG ce qui se traduit au niveau de la protéine par un changement de l'Arginine (Arg) en Tryptophane (Trp). La région contenant la mutation n'est pas une région riche en GC.

Cette mutation a été retrouvée au niveau des séquences ADNctc des deux cellules analysées du patient (OUA), classées toutes deux comme CAC (Figure 67). L'ADNt présente la même variation génétique que l'ADNctc mais qui est aussi absente de l'ADN génomique (Figure 66).

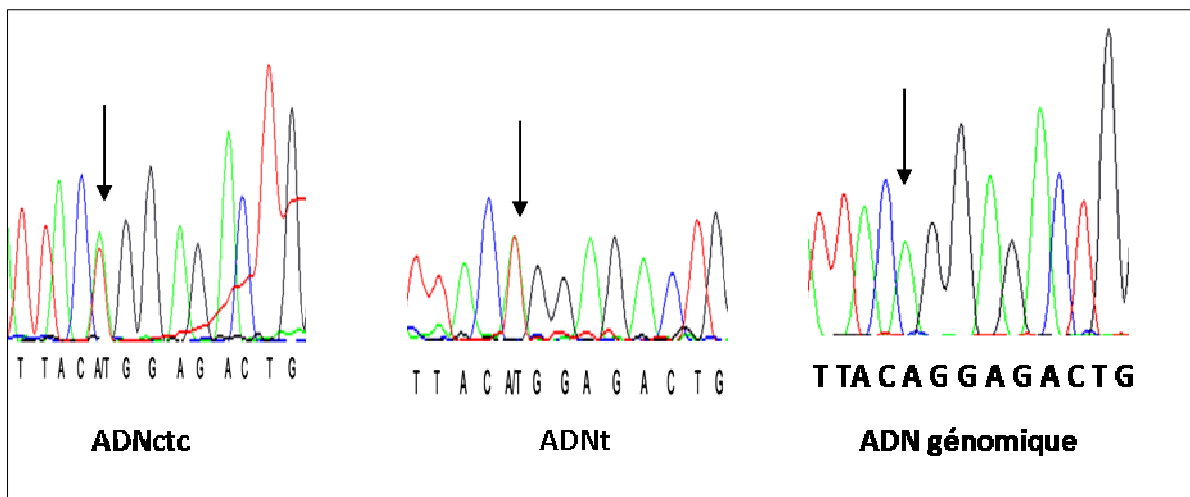


Figure 66: Mutation c.526A>T, codon 176/ Exon 3.

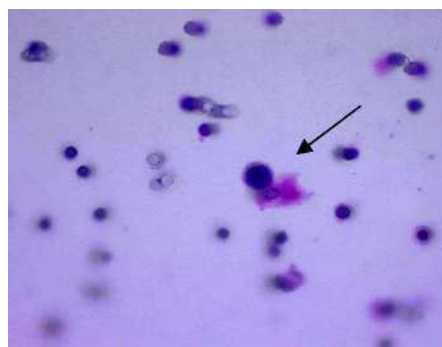


Figure 67: CAC portant la mutation c.526A>T.

q) Mutation c.548C>A

Il s'agit d'une mutation faux-sens qui touche le codon 183 de l'exon 3. Elle se caractérise par la substitution du codon TCG qui code pour la Serine en TAG (codon stop). La région comportant la mutation n'est pas une région riche en îlot CpG. Au niveau protéique, cette mutation est désignée par p.Ser183X et elle a été retrouvée chez 4 patients (CME, DRX, LBR, LEC) de notre panel.

On l'a retrouvée au niveau de l'ADNctc de 5 cellules étudiées du patient (CME) dont 4 ont été identifiées comme CTC, au niveau de l'ADNctc de 7 cellules pour le patient (DRX) dont 2 cellules ont été classées comme CTC selon le pathologiste, au niveau de l'ADNctc de 4 cellules pour le patient (LBR) dont 3 ont été classées tumorales selon leur aspect morphologique et au niveau de l'ADNctc de 3 cellules pour le patient (LEC) dont 2 sont classées comme tumorales (Figure 69). L'ADNt de chacun de ces patients a été analysé en parallèle, et le résultat des séquences confirme que ces ADN portent la même mutation (Figure 68).

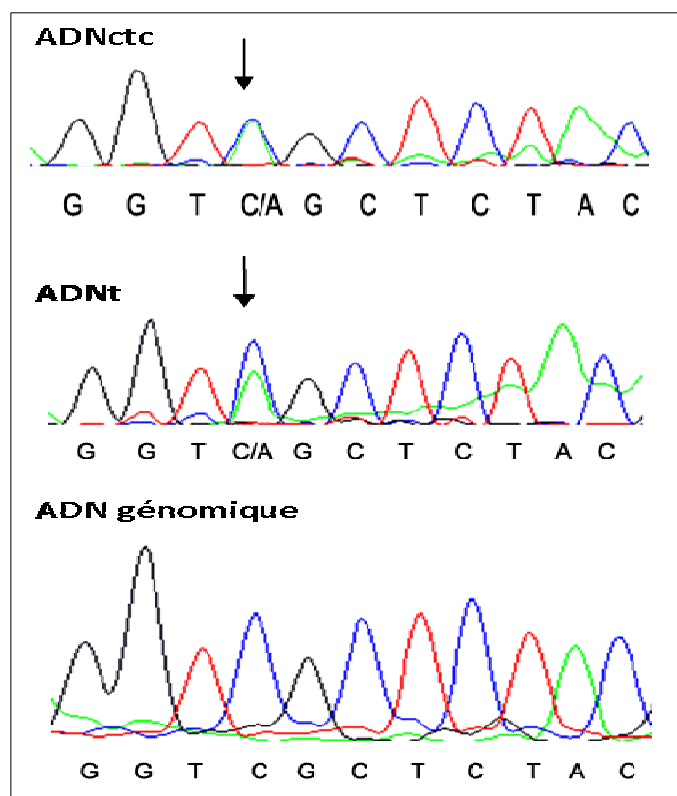
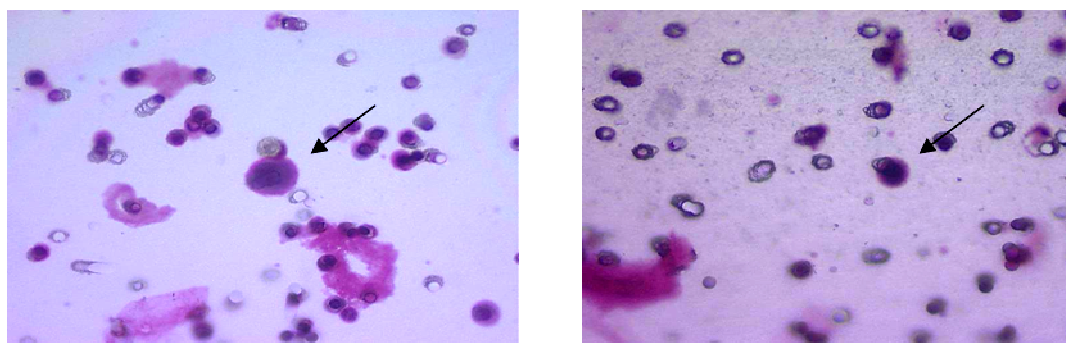


Figure 68: Mutation c.548C>A, codon 183/ Exon 3.



CTC appartenant au patient CME

CTC appartenant au patient DRX

Figure 69: CTCs portant la mutation c.548C>A.

r) Mutation c.620C>T

C'est une transition d'une Cytosine (C) en une Thymine (T) qui touche le codon 207 de l'exon 3 de la séquence du gène *VHL*. Elle touche le codon GCA qui code pour l'Alanine (Ala) pour le transformer en un codon GTA qui code pour la Valine (Val). Cette région ne contient pas d'îlot CpG.

Cette mutation a été retrouvée au niveau des séquences de l'ADNctc de 5 cellules des 7 analysées du patient (DUM). Trois des ces sept cellules ont été identifiées comme cellules circulantes tumorales par le cytopathologiste et quatre cellules ont été classées comme atypiques.

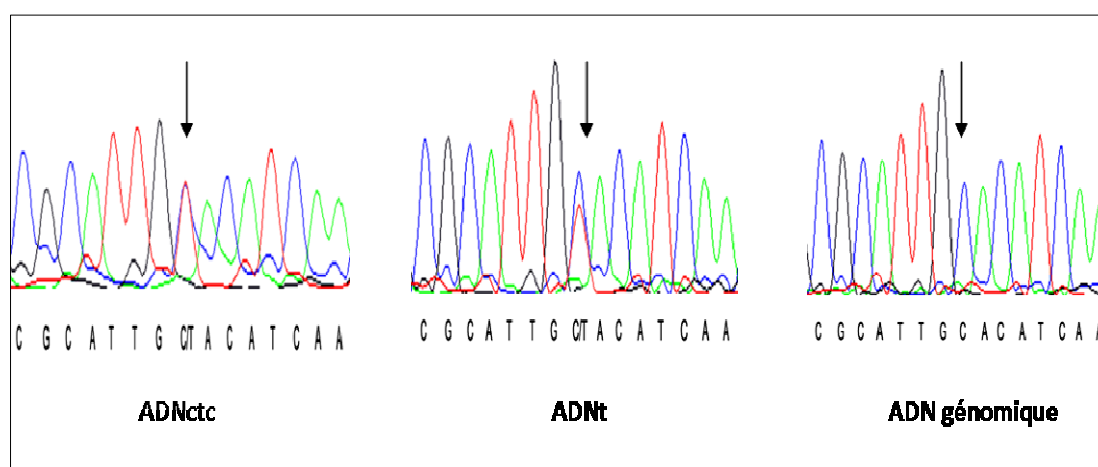


Figure 70: Mutation c.620C>T, codon 207/ Exon 3.

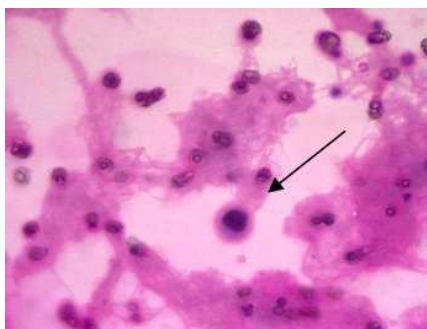


Figure 71: CTC portant la mutation c.620C>T.

s) Absence de mutations

Quatre patients (HOD, FRI, LAM, GRD) de notre panel n'ont présenté aucunes variations génétiques au niveau de l'ADNctc appartenant aux cellules sélectionnées. L'ADNt respectif de ces patients ne présente pas non plus de variations de la séquence codante.

Concernant le patient (HOD), 5 cellules des 9 analysées ont été classées comme CTC par le cytopathologiste ; de même pour le patient (FRI) qui présentait 4 CAC sur les 4 cellules analysées. Quant au patient (LAM) deux des sept cellules étudiées ont été classées comme tumorales (CTC) et 5 atypiques (CAC). Le patient (GRD) possède 3 cellules toutes classées comme CAC (Figure 73).

Certaines mutations ont été retrouvées au niveau des séquences ADNctc chez certains patients différentes des mutations retrouvées au niveau de l'ADNt exemple : une insertion d'un T a été trouvée au niveau de l'intron 1 de l'ADNctc de certaines cellules appartenant à un patient (Figure 72).

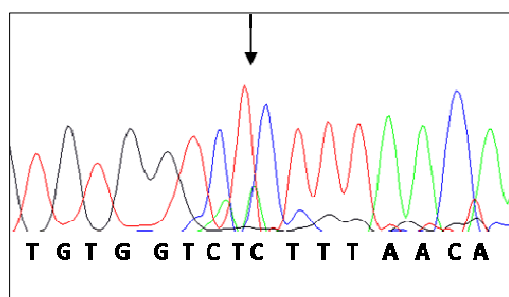
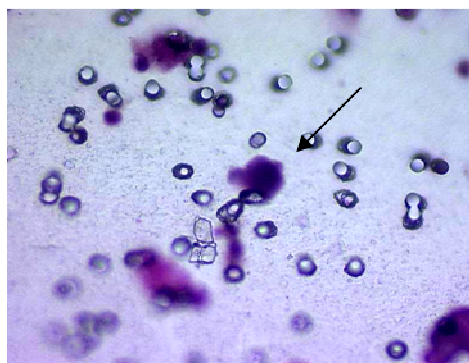
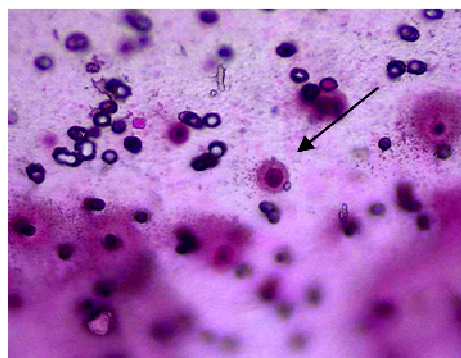


Figure 72: ADNt, insertion d'un T au niveau de l'intron 1

**CTC appartenant au patient Hod****CAC appartenant au patient Fri****Figure 73: CTC et CAC sans mutations.**

2) Répartition des mutations par patient

Il a été aussi démontré que trois patients ont présenté deux mutations à la fois sur l'ADNctc et l'ADNt. Pour les patients (CHO et COB) il s'agit de deux mutations ponctuelles entraînant à chaque fois un changement au niveau de l'acide aminé. Elles touchent à chaque fois 2 exons différents. Pour le patient (CME), la première mutation touche l'exon 1, il s'agit d'une délétion qui entraîne un codon stop au niveau du codon 130, loin de l'endroit initial de la délétion. Cette délétion a été retrouvée à l'état homozygote, ce qui laisse penser qu'elle touche les deux allèles. La deuxième mutation touche l'exon 3, c'est aussi une mutation faux-sens qui engendre un codon stop au niveau de la mutation. Cette mutation a également été retrouvée à l'état homozygote.

Aucun patient analysé n'a présenté trois mutations sur les trois exons simultanément. Par contre quatre patients n'ont présenté aucune mutation ni au niveau de leur l'ADNt ni au niveau de leur ADNctc (Tableau 14).

Patient	Exon	Codon	ADNc	protéine
CHO	Exon1 Exon2	18 116	c.53C>A c.346C>G	p.Ala18Glu p.Leu116Val
COL	Exon 3	163	c.486delC	p.Leu163SerfsX7
COB	Exon1 Exon 2	9 145	c.27G>T c.435G>T	p.Asp9Tyr p.Gln145His
CME	Exon1 Exon3	69 183	c.205-206delCG c.548C>A	p.Glu70AlafsX61 p.Ser183X
CNS	Exon 2	118	c.353T>C	p.Leu118Pro
CGN	Exon 1	88	c.263G>A	p.Trp88X
CNL	Exon 1	18	c.53C>A	p.Ala18Glu
CRX	Exon 1	109	c.327delC	p.His110ThrfsX49
DLL	Exon 1	61	c.183C>G	p.Pro61Pro
DLM	Exon 2	118	c.353T>C	p.Leu118Pro
DRX	Exon 3	183	c.548C>A	p.Ser183X
DHR	Exon 1	92	c.275delA	p.Asp92AlafsX67
DUM	Exon 3	207	c.620C>T	p.Ala207Val
FAU	Exon 3	163	c.486delC	p.Leu163SerfsX7
FRI	Pas de mutations			
GAY	Exon 2	118	c.353T>C	p.Leu118Pro
GST	Exon 3	163	c.486delC	p.Leu163SerfsX7
GRD	Pas de mutations			
GRA	Exon 1	88	c.263G>A	p.Trp88X
GUE	Exon 1	65	c.194C>A	p.Ser65X
HAR	Exon 2	140	c.418delC	p.Leu140SerfsX19
HOD	Pas de mutations			
HAV	Exon 3	158	c.472delC	p.Leu158X
OUA	Exon 3	176	c.526A>T	p.Arg176Trp
LAM	Pas de mutations			
LBR	Exon 3	183	c.548C>A	p.Ser183X
LAB	Exon 1	100	c.299delC	p.Thr100SerfsX59
LEC	Exon 3	183	c.548C>A	p.Ser183X
LVY	Exon 1	109	c.327delC	p.His110ThrfsX49

Tableau 14: Caractéristiques des mutations *VHL* par patient.

3) Répartition des mutations par exon

L'analyse moléculaire des trois exons du gène *VHL* nous a permis de répertorier neuf mutations au niveau de l'exon 1 ce qui représente un taux de 50% de l'ensemble des mutations retrouvées ; quatre mutations au niveau de l'exon 2 (22,2%) et 5 mutations (27,8%) au niveau de l'exon 3 (Tableau 15).

	1 mutation	2 mutations	Pas de mutations	Total
Nombre de patient	22	3	4	29
%	75,9	10,3	13,8	100

Tableau 15: Répartition des mutations VHL par patient.

Dix des dix-huit mutations trouvées sont des mutations faux-sens et engendrent un codon stop. La majorité des mutations ont été retrouvées à l'état hétérozygote (Tableau 16).

	CODON	MUTATION	TYPE DE LA MUTATION	CODON INITIAL	CODON MUTE	CpG	CHANGEMENT AU NIVEAU DE LA PROTEINE	
1	9	c.27G>T	Tr	GAC	TAC	Oui	D9Y	
1	18	c.53C>A	Tr	GCA	GAA	Non	A18E	
1	61	c.183C>G	Tr	CCC	CCG	Non	P61P	
1	65	c.194C>A	Tr	TCG	TAG	Non	S65Stop	Stop
1	69	c.205-206delCG	Fr	CGC	-	-	E69Stop	Stop at 130
1	88	c.263G>A	Ts	TGG	TAG	Non	W88Stop	Stop
1	92	c.275delA	Fr	GAC	-	-	D92Stop	Stop at 158
1	100	c.299delC	Fr	ACG	-	-	T100Stop	Stop at 158
1	109	c.327delC	Fr	ATC	-	-	H109Stop	Stop at 158
2	116	c.346C>G	Tr	CTT	GTT	Non	L116V	
2	118	c.353T>C	Ts	CTC	CCC	Non	L118P	
2	140	c.418delC	Fr	CTC	-	-	L140Stop	Stop at 158
2	145	c.435G>T	Tr	CAG	CAT	-	Q145H	
3	158	c.472delC	Fr	CTG	-	-	L158Stop	Stop at 158
3	163	c.486delC	Fr	TGC	-	-	L163Stop	Stop at 169
3	176	c.526A>T	Tr	AGG	TGG	Non	R176W	
3	183	c.548C>A	Tr	TCG	TAG	Non	S183X	Stop
3	207	c.620C>T	Ts	GCA	GTA	Non	A207V	

Tr : transversion ; Ts : transition ; Fr : Frameshift.

Tableau 16: Caractéristiques des mutations VHL retrouvées.

L'analyse moléculaire du gène *VHL* au niveau de l'ADNctc démontre que 161 cellules portent au moins une mutation au niveau de leurs ADNctc. Ce nombre correspond à 78.5% des cellules analysées (Tableau 17). Une majorité de ces mutations est localisée au niveau de l'exon 1 du gène. Les cellules comportant une double mutation ont été rajoutées deux fois au total des cellules mutées afin de calculer la localisation individuelle selon la cellule et l'endroit de la mutation. Ce qui ramène le nombre de cellules portant une mutation différente à 180 cellules (Tableau 17).

	VHL status (n=205)				Localisation (n= 180)		
	Mutées	1 mutation	2 mutations	0 mutation	Exon 1	Exon 2	Exon 3
n	161	119	19	23	97	36	47
%	78.5	58	9.3	11.2	53.9	20	26.1

Tableau 17: Nombre et localisation des mutations VHL par cellule.

4) Corrélation entre l'analyse moléculaire et l'analyse cytopathologique

L'analyse cytopathologique des 205 cellules étudiées a révélé que 64 cellules répondaient parfaitement aux caractéristiques morphologiques des cellules tumorales, elles ont donc été classées comme cellules tumorales circulantes (CTC). Le reste des cellules étudiées présentaient un aspect suspect pouvant invoquer à la morphologie d'une cellule tumorale, elles ont donc été classées comme cellules atypiques circulantes (CAC).

Nous avons réussi grâce à l'analyse moléculaire du gène *VHL* à confirmer le caractère malin de 57 des 64 cellules classées tumorales (CTC) par le cytopathologiste et de 125 des 141 cellules classées suspectes (CAC) (Tableau 18). Les 7 CTC et les 16 CAC sans mutation provenaient de tumeurs chez lesquelles nous n'avons pas détecté des mutations VHL et pour lesquelles il n'est pas possible d'effectuer une corrélation entre diagnostic cytopathologique et diagnostic moléculaire.

L'ADNctc des cellules étudiées a été confronté aux séquences de l'ADNt issu du tissu tumoral. Les cellules présentant le même profil ADN que celui de l'ADNt ont été validées par l'analyse moléculaire comme étant des cellules tumorales. Parmi les 64 classées en tant que CTC, 57 portent au niveau de leur ADNctc une mutation identique à l'ADNt, les 7 autres cellules ne portent aucune mutation au niveau de leur ADNctc, ce qui est également le cas de la tumeur primaire des deux patients auxquels appartiennent les cellules.

En ce qui concerne les CAC, un nombre total de 141 cellules ont été identifiées comme suspectes par l'analyse cytopathologique. Cependant, 104 cellules portent une mutation identique à celle retrouvée au niveau de l'ADNt, 21 cellules portent une mutation du gène *VHL* différente de celle retrouvée au niveau de la tumeur et 16 cellules ne portent aucune mutation au niveau de ce gène. Au total, 125 CAC présentent des variations génétiques au niveau de leur ADNctc. De ces 125 CAC, 104 ont les mêmes caractéristiques moléculaires que les CTC, elles sont donc à considérer comme CTC. Les 21 CAC ayant une mutation *VHL* différente par rapport à celle détectée dans la tumeur correspondent probablement à un clone variant dans la tumeur, en tout cas leur nature tumorale est fortement probable. Enfin, les 16 CAC sans mutation *VHL* détectable ont été isolées chez des patients avec une tumeur sans mutation *VHL* détectable et ne sont pas utiles pour l'analyse comparative du diagnostic cytopathologique et moléculaire.

La constatation, lors de l'étude du statut mutationnel du gène *VHL* au niveau des tumeurs et des CAC, que 21 cellules classées comme CAC ne portent pas de mutations identiques à la tumeur primaire, mais une mutation différente, cela pourrait s'expliquer, comme précédemment mentionné, par une hétérogénéité moléculaire au sein de l'ADNt. La diversité des mutations détectées pourrait être due au fait que nous avons travaillé sur de l'ADNt issu de coupes de tumeurs ; une analyse moléculaire de l'ADNt ciblée à des cellules tumorales isolées par microdissection pourrait donner des résultats plus précis et révéler des parallélismes entre aspect cytopathologique et le type de mutation *VHL* au niveau du tissu tumoral.

Pour les 23 cellules ne présentant pas de mutations génétiques au niveau de l'ADNctc lors de l'analyse moléculaire et appartenant à quatre patients de notre panel, nous ne pouvons tirer de conclusions car parallèlement, l'ADNt issu des tumeurs de ces mêmes patients, ne présente pas non plus de mutation du gène étudié. L'analyse cytopathologique de ces 23 cellules révèle que 16 d'entre elles ont été classées comme cellules atypiques

(CAC) et 7 comme cellules tumorales (CTC). Il est cependant impossible de confirmer le caractère malin de ces cellules sur le plan moléculaire, car l'ADNctc et l'ADNt de ces patients ne montrent pas de mutation du gène *VHL* (Tableau 18). Elles représentent 11,21% du nombre total des cellules analysées. Pour ces cellules, une confirmation de leur nature tumorale par l'analyse moléculaire, ne peut pas être avancé. Cependant, il est à noter que nous avons trouvé une correspondance d'absence de mutations dans le tissu tumoral et dans les CTC et CAC isolées à partir du sang de ces patients.

Patient	Type de la mutation	N° de cellules analysées PEP+	N° de CTC				N° de CAC				N° CTC avec mutation/ Total de CTC	N° CAC avec mutation/ Total de CAC
			Total	Mutations identiques à la tumeur	Mutations différentes de la tumeur	Sans mutations	Total	mutation identique à la tumeur	Mutation différente de la tumeur	Sans mutations		
CHO	c.53C>A c.346C>G	8	5	5	0	0	3	3	0	0	5/5	3/3
COL	c.486delC	10	7	7	0	0	3	3	0	0	7/7	3/3
COB	c.27G>T c.435G>T	6	2	2	0	0	4	4	0	0	2 /2	4/4
CME	c.205- 206delCG c.548C>A	5	4	4	0	0	1	1	0	0	4/4	1/1
CNS	c.353T>C	13	5	5	0	0	8	5	3	0	5/5	8/8
CGN	c.263G>A	17	2	2	0	0	15	13	2	0	2/2	15/15
CNL	c.53C>A	9	2	2	0	0	7	7	0	0	2/2	7/7
CRX	c.327delC	7	0	0	0	0	7	6	1	0	0	7/7
DLL	c.183C>G	18	10	10	0	0	8	7	1	0	10/10	8/8
DLM	c.353T>C	8	1	1	0	0	7	6	1	0	1/1	7/7
DRX	c.548C>A	8	2	2	0	0	6	5	1	0	2/2	6/6
DHR	c.275delA	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2/2
DUM	c.620C>T	7	3	3	0	0	4	2	2	0	3/3	4/4
FAU	c.486delC	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1/1
FRI	Pas de mutations	4	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0

GAY	c.353T>C	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1/1
GST	c.486delC	8	1	1	0	0	7	7	0	0	1/1	7/7
GRD	Pas de mutations	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
GRA	c.263G>A	11	3	3	0	0	8	8	0	0	3/3	8/8
GUE	c.194C>A	15	3	3	0	0	12	8	4	0	3/3	12/12
HAR	c.418delC	6	0	0	0	0	6	4	2	0	0	6/6
HOD	Pas de mutations	9	5	0	0	5	4	0	0	4	0	0
HAV	c.472delC	2	1	1	0	0	1	1	0	0	1/1	1/1
OUA	c.526A>T	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2/2
LAM	Pas de mutations	7	2	0	0	2	5	0	0	5	0	0
LBR	c.548C>A	4	3	3	0	0	1	1	0	0	3/3	1/1
LAB	c.299delC	6	1	1	0	0	5	3	2	0	1/1	5/5
LEC	c.548C>A	5	2	2	0	0	3	1	2	0	2/2	3/3
LVY	c.327delC	3	0	0	0	0	3	3	0	0	0	3/3
TOTAL		205	64	57	0	7	141	104	21	16	57	125

N° : Nombre ; CTC : Cellules tumorales circulantes ; CAC : Cellules atypiques circulantes.

Tableau 18: Validation moléculaire des CTC et CAC par patient.

Nous avons aussi constaté que nous n'avons pas pu obtenir l'analyse moléculaire du gène *VHL* à partir des toutes les cellules microdisséquées (Figure 74). Des 327 cellules microdisséquées, 205 cellules ont permis d'obtenir un produit de pré-amplification (PEP+) et par la suite un résultat de l'analyse moléculaire du gène *VHL*. Cette variation est due à plusieurs facteurs notamment techniques.

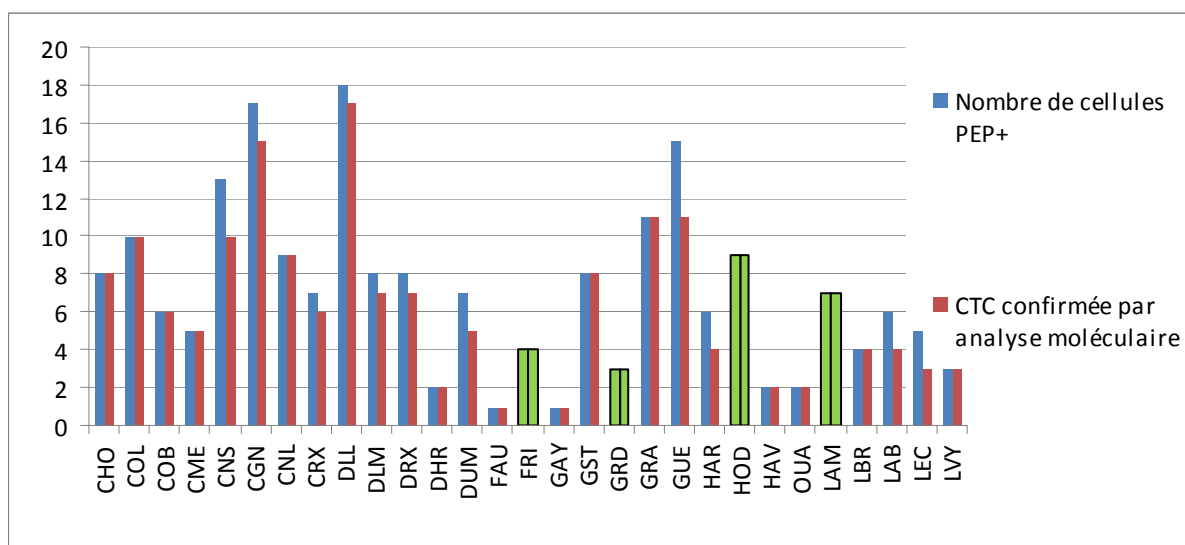


Figure 74: CTC confirmées par analyse moléculaire.

5) Aspect cytomorphologique des CTC et CAC avec et sans mutation

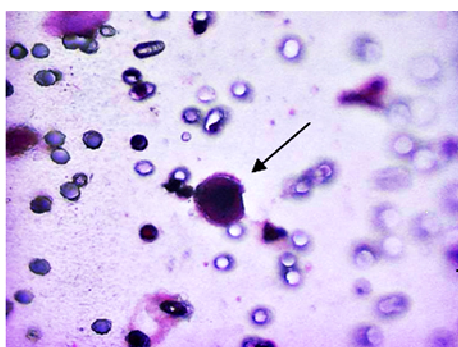
Plusieurs commentaires peuvent être faits suite à l'analyse comparative moléculaire et cytopathologique des CTC et CAC. Lorsqu'une cellule correspond parfaitement aux critères morphologiques de malignité des CTC, et qu'elle est classée comme tumorale, l'analyse moléculaire confirme ce diagnostic. Ceci a été le cas, dans notre étude, de toutes les CTC détectées chez les patients ayant une tumeur avec mutation *VHL*. Dans ces conditions, nous avons donc validé le diagnostic cytopathologique par l'analyse moléculaire dans 100% des CTC. Nous devons évidemment exclure de cette analyse les CTC issues des patients ayant une tumeur qui ne porte pas de mutation, car dans ces cas l'analyse moléculaire ne peut plus confirmer ou infirmer la nature tumorale de la cellule, et l'absence de mutation n'exclue pas le fait que la cellule étudiée soit tumorale.

L'analyse moléculaire permet d'affiner l'analyse cytopathologique, car elle démontre de façon irrévocable la nature maligne d'une cellule tumorale ou atypique.

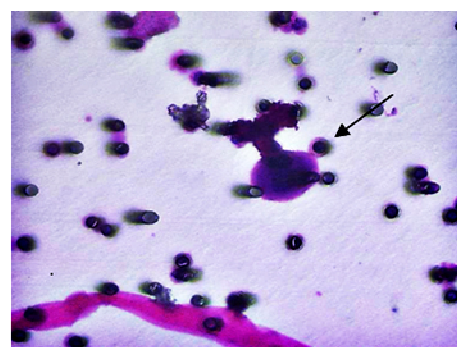
Nous avons réussi à mettre en évidence lors de cette étude la présence de CTC portant des variations génétiques du gène *VHL* issues de patients dont la tumeur présente les mêmes mutations au niveau de l'ADNt (Figure 75).

Le résultat le plus important de notre étude montre que certaines CAC portaient des mutations identiques à celles des CTC et à celles retrouvées dans le tissu tumoral. Elles sont donc à considérer comme des CTC, malgré le fait que l'analyse cytopathologique n'ait pas révélé le panel complet des modifications morphologiques requises pour le diagnostic cytopathologique des CTC. De façon intéressante, toutes les CAC issues de tumeurs avec des mutations *VHL* ont montré des mutations du gène *VHL* soit identique soit différente par rapport à celle de la tumeur. Pour les CAC ayant une mutation différente, la nature tumorale semble très probable même si elle ne peut pas être affirmée avec certitude (Figure 75).

Enfin, nous n'avons pas retrouvé au sein de notre panel de cellules étudiées, des CTC/CAC ne présentant pas de mutations issues de patients dont la tumeur présente une mutation. Ce point est cohérent avec les résultats obtenus pour les CTC/CAC issues des tumeurs avec mutation *VHL* et indique la spécificité de nos résultats. De plus, tout est en faveur du fait que les CAC ayant une mutation du gène *VHL* différente de celle de la tumeur pourraient être réellement des cellules de nature tumorale.

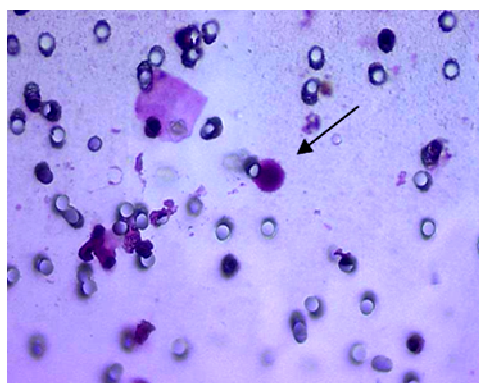


CTC portant la mutation c.353T>C.

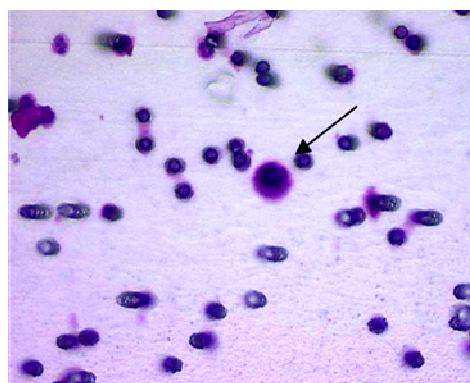


CTC portant la mutation c.183C>G

CTCs avec mutation issues de patient(s) dont la tumeur porte une mutation.

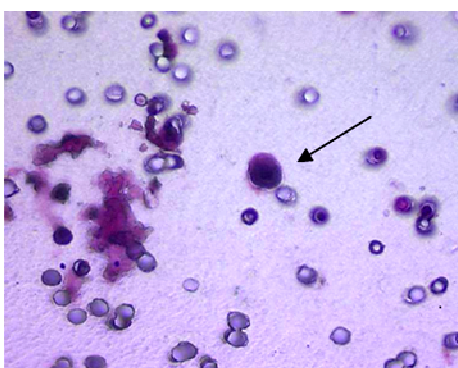


CAC portant la mutation c.353T>C.

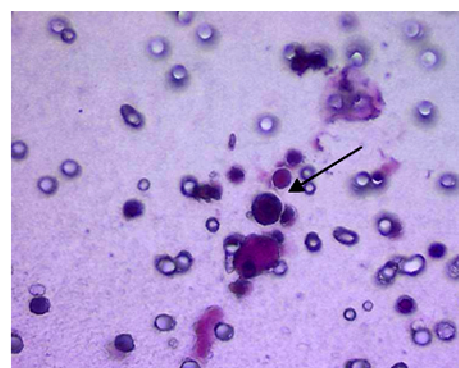


CAC portant la mutation c.183C>G

CACs avec mutation issues de patient(s) dont la tumeur porte une mutation.



CAC ne portant pas la mutation c.353T>C.



CAC ne portant pas la mutation c.183C>G

CACs sans mutation issues de patient(s) dont la tumeur porte une mutation.

Figure 75: Aspect morphologique des CTC et CAC.

6) Classification des mutations selon les caractéristiques des patients et des tumeurs.

La classification des mutations retrouvées au niveau des cellules selon les caractéristiques invasives des tumeurs et les caractéristiques des patients ont pu nous renseigner quant à la fréquence de ces mutations à différents stades de la tumeur.

Pour notre panel de 205 cellules, une majorité (60.4%) d'entre elles sont issues de tumeur de stade T1 de la classification TNM, on remarque que pour ces cellules près de 11% ne présentent aucune mutation. Les cellules issues de tumeur de stades T2 et T3 portent toutes une ou deux mutations.

Les cellules appartenant à des tumeurs N0, c'est-à-dire ne présentant pas d'adénopathies régionales métastatiques, sont plus fréquentes à ne pas présenter des mutations au niveau de leur ADN (10.8%).

Les patients métastatiques dans notre panel sont au nombre de 2, ce qui ne nous permet pas d'établir une corrélation significative entre le nombre de mutation et le stade M1 de la classification TNM. Le nombre de patient appartenant à la classe Mx étant trop important (93.1%) (Tableau 19).

La majorité des patients analysés ont présenté des tumeurs classées selon le grade II de Fuhrman, la plupart des cellules (71%) appartenant à ces patients ont présenté une mutation au niveau de leur ADNctc et très peu d'entre elles (6%) n'ont présenté aucune mutation au niveau de leur ADNctc.

Seulement 17.2% des patients étudiés ont un âge inférieur à 60 ans au moment du prélèvement sanguin, mais très peu de leurs cellules (1.6%) ne présentent pas de mutations au niveau de leur ADNctc. Ce qui ne diffère réellement pas des cellules détectées chez les patients âgés de plus de 60 ans.

La répartition des mutations au niveau de l'ADNctc des cellules analysées ne démontre pas non plus de différence quant aux pourcentages de ces mutations selon le sexe du patient. Ils demeurent proportionnels à l'effectif des patients dans les deux sexes.

Total	Panel (%)		1 mutation (%)		2 mutations (%)		No mutation (%)	
	Patients n=29	Cellules n=205	Patients n=29	Cellules n= 184	Patients n=29	Cellules n= 184	Patients n=29	Cellules n= 184
Caractéristiques de la tumeur								
Stade								
T1	17 (58.6)	124 (60.4)	13 (44.8)	82 (44.6)	1 (3.4)	6 (3.3)	3 (10.4)	20 (10.8)
T2	2 (6.9)	11 (5.4)	1 (3.4)	3 (1.6)	1 (3.4)	8 (4.3)	0	0
T3	7 (24.1)	52 (25.4)	6 (20.7)	45 (24.4)	1 (3.4)	5 (2.7)	0	0
Tx	3 (10.4)	18 (8.8)	2 (6.9)	12 (6.5)	0	0	1(3.4)	3 (1.6)
P			0.82	0.99	1	0.99	0.99	1
Adénopathies								
No	21 (72.4)	165 (80.5)	17 (58.6)	121 (65.7)	1 (3.4)	8 (4.4)	3 (10.4)	20 (10.8)
N1	1 (3.4)	3 (1.5)	0	0	0	0	1 (3.4)	3 (1.6)
N2	1 (3.4)	5 (2.4)	0	0	1 (3.4)	5(2.7)	0	0
Nx	6 (20.7)	32 (15.6)	5 (17.2)	21 (11.4)	1 (3.4)	6 (3.3)	0	0
P			0.82	0.99	1	0.99	0.99	1
Métastases								
M1	2 (6.9)	7 (3.4)	1 (3.4)	2 (1)	1 (3.4)	5 (2.7)	0	0
Mx	27 (93.1)	198 (96.6)	21 (72.4)	140 (76)	2 (6.9)	14 (7.6)	4 (13.8)	23 (12.5)
P			0.82	0.99	1	0.99	0.99	1
Grade nucléaire de Fuhrman								
I	4 (13.8)	47 (22.9)	3 (10.4)	33 (17.9)	1 (3.4)	6 (3.2)	0	0
II	13 (44.8)	91 (44.4)	11 (44.8)	71 (38.6)	0	0	2 (6.9)	11 (6)
III	8 (27.6)	41 (20)	5 (17.2)	18 (9.8)	2 (6.9)	13 (7)	1 (3.4)	9 (4.9)
IV	1 (3.4)	8 (3.9)	1 (3.4)	8 (4.3)	0	0	0	0
Inconnu	3 (10.4)	18 (8.8)	2 (6.9)	12 (6.5)	0	0	1 (3.4)	3 (1.6)
P			0.82	0.99	1	0.99	0.99	1
Caractéristiques des patients								
Age								
<60	5 (17.2)	29 (14.2)	3 (10.4)	15 (8.2)	1 (3.4)	8 (4.4)	1 (3.4)	3 (1.6)
>60	24 (82.8)	176 (85.8)	19 (65.5)	127 (69)	2 (6.9)	11 (5.9)	3 (10.4)	20 (10.8)
P			0.82	0.99	1	0.99	0.99	1
Sexe								
Homme	21 (72.4)	163 (79.5)	17 (58.6)	120 (65.2)	1 (3.4)	8 (4.4)	3 (10.4)	14 (7.6)
Femme	8 (27.6)	42 (20.5)	5 (17.3)	22 (11.9)	2 (6.9)	11 (5.9)	1(3.4)	9 (4.9)
P			0.82	0.99	1	0.99	0.99	1

Tableau 19: Classification des mutations selon les caractéristiques des patients et des tumeurs.

DISCUSSION

Partie I ISET et CTC : intérêts, avantages et inconvénients.

Le cancer du rein est souvent détecté à un stade tardif de son évolution. En dehors du cadre d'une maladie VHL où les patients sont minutieusement suivis, le cancer rénal sporadique est dans la majorité des cas découvert fortuitement suite à des complications d'ordre urologique.

La plupart des traitements disponibles sont inefficaces et les patients détectés à un stade avancé présentent un mauvais pronostic (Linehan et al., 2005). En tenant compte de l'importance d'un dépistage précoce et non invasif de ce type de cancer, et de la nécessité de l'élaboration d'un test clinique pour évaluer la réponse aux traitements, il est nécessaire de développer de nouvelles approches moléculaires de ce type de cancer. C'est pour cela et depuis de nombreuses années que beaucoup de chercheurs s'intéressent aux cellules tumorales circulantes.

A - Importance de la détection des CTC

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux cellules circulantes atypiques répondant aux critères anatomopathologiques des cellules tumorales dans le but de confirmer leur caractère malin par une étude génétique. Le caractère malin d'une cellule dans les études in vitro est identifié par les critères suivants : elle est immortalisée, transformée, tumorigène. In vivo, l'identification diagnostique des cellules tumorales est basée sur la cytopathologie. L'analyse dite « PAP test » et d'autres analyses cytopathologiques effectuées à partir de biopsies à l'aiguille fine ou d'aspirations sont diagnostiques pour la présence ou non d'un cancer. Le domaine des cellules tumorales circulantes est, néanmoins, un domaine complètement nouveau. Il est donc légitime de se demander si les critères cytopathologiques utilisés en cytopathologie classique sont encore valables et diagnostiques quand ils sont adressés à des cellules extraites à partir du sang.

Cette question a été posée par l'équipe du Pr. Paul Hofman qui a dirigé une étude réalisée par 10 pathologistes qui ont lu en aveugle un total de 569 frottements obtenus de patients avec cancer, 190 de patients avec pathologie bénigne et 49 de sujets normaux (Hofman V et al., 2011 Jan). Ces auteurs ont distingué les Cellules Non-Hématologiques Circulantes (CNHC) en différentes catégories, dont seulement une (CNHC-MF) correspond aux CTC. Les autres

cellules circulantes non hématologiques sont des cellules « suspectes » ou « atypiques » (CNHC-UMF) ayant une nature tumorale incertaine, ou des cellules bénignes comme les cellules endothéliales matures (CEC : circulating endothelial cell) (Strijbos et al., 2008) ou des précurseurs angioblastiques (cellules progénitrices endothéliales) (Garmy-Susini et al., 2005).

Hofman V et al., ont conclu que les mêmes critères en cytopathologie conventionnelle sont aussi applicables aux cellules isolées à partir du sang puisqu'ils ont pu identifier des CTC chez les patients atteints de cancer (49%) mais pas chez les sujets sains. De façon intéressante, un nombre très bas de CTC « faux positifs » ont été diagnostiquées chez des patients avec adénome parathyroïdien et adénome thyroïdien. Or, il est connu que ces deux pathologies ne peuvent pas être analysées en cytopathologie à cause du caractère non distinctif de leurs cellules. La conclusion de cette étude a été que les critères cytopathologiques classiques sont encore valables pour diagnostiquer les cellules extraites du sang par ISET, et identifier les CTC de façon diagnostique, et que la cytopathologie a, si elle est appliquée au niveau du sang, les mêmes avantages et les mêmes limitations que la cytopathologie classique, c'est-à-dire qu'elle est inutile pour diagnostiquer les cellules diffusées à partir d'adénomes thyroïdiens et parathyroïdiens.

Notre travail a voulu aller plus loin. Tirant profit du fait que le cancer du rein à cellules claires est un des rarissimes cancers solides caractérisés par des mutations récurrentes dans les cellules tumorales, nous avons voulu effectuer une analyse comparative « cytopathologie-génétique moléculaire » pour savoir si : 1) les cellules classées tumorales par l'analyse cytopathologique sont bien tumorales du point de vue génétique et si les cellules classées comme « atypiques » (CNHC-UMF) mais pas franchement tumorales par l'analyse cytopathologique le sont ou pas par l'analyse génétique.

La mise en évidence de ces cellules circulantes peut être effectuée avant, pendant ou après une intervention chirurgicale. Pour cette étude, nous avons travaillé sur des filtres ISET issus de prélèvements sanguins effectués avant l'intervention chirurgicale afin de travailler sur les cellules en circulation spontanée chez les patients. Il a été précédemment démontré dans de nombreuses études que la présence des CTC a été détectée chez des patients lors de la découverte de la tumeur primaire, lors d'une récurrence, ou après ablation de la tumeur initiale (Racila et al., 1998 ; Gomella et al., 1997 ; Ghossein et al., 1999 ; Jiang et al., 2002 ; Gaforio et al., 2003 ; Brugger et al., 1994 ; Ross et al., 1993 ; Moss et al., 1994 ; Molnar et al., 2001 ; Witzig et al., 2002 ; Wang et al., 2000 ; Méhes et al., 2001 ; Moreno et

al., 2001 ; Soria et al., 1999 ; Pierga et al., 2004 ; Hayes et al., 2002 ; O'Hara et al., 2004). Il a été suggéré que les CTC sont des clones issus de la tumeur (Fehm et al., 2002) et qu'elles peuvent refléter l'étendu des étapes de la progression tumorale.

Le domaine des CTC est caractérisé par des biais terminologiques substantiels. En effet, les chercheurs qui ont développé la méthode CellSearch, qui identifie les cellules circulantes exprimant des antigènes épithéliaux, ont appelé ces cellules « Cellules Tumorales Circulantes » ou CTC. Or, les antigènes épithéliaux ne sont pas des marqueurs tumoraux, si bien que, si certaines cellules tumorales circulantes peuvent exprimer les antigènes épithéliaux, il est impossible de diagnostiquer les CTC par la seule expression de ces antigènes. Ce point est fondamental car il a été démontré que des cellules épithéliales non tumorales circulent dans le sang de sujets avec et sans cancer (Hofman V et al., 2011 Jan). La terminologie appliquée aux résultats du test CellSearch est donc « misleading ».

Les études avec CellSearch ont démontré la rareté des « CTC » chez les sujets sains, mais le diagnostic de « vraies CTC » n'est pas du tout certain dans ce cas. En effet une étude effectuée pour énumérer les « CTC » dans 7.5 ml de sang afin d'établir la précision analytique, la reproductibilité et la linéarité de cette technique a aussi étudié la prévalence des « CTC » dans le sang de 199 patients atteints de maladies bénignes, 964 patients atteints de carcinomes métastatiques, et 145 donneurs sains. Seulement 1 des 344 (0,3%) sujets sains et sujets atteints de maladies non malignes avaient un nombre de « CTC » supérieur ou égal à 2 CTC par 7,5 ml de sang (Allard et al., 2004), ce qui suggère que les Cellules Epithéliales Circulantes détectées par CellSearch sont rares chez les sujets sains et les patients atteints de maladies bénignes, mais fortement présentes dans divers cancers métastatiques. Les études effectuées par ISET ont montré que les vraies CTC ne sont pas présentes chez les sujets sans cancer (Vona et al., 2004 ; Hofman V et al., 2011 Fev ; Hofman V et al., 2011 Jan).

L'intérêt des CTC n'est pas seulement au niveau du diagnostic et du pronostic du cancer mais également au niveau de la caractérisation génétique et immunologique non-invasive d'une tumeur dans le cadre d'une prise de décision vers un traitement ciblé (Hayes et al., 2002 ; O'Hara et al., 2004). Les CTC sont en effet de plus en plus utilisées pour la mise au point de tests « théranostiques » capables de guider le choix thérapeutique sur la base de mutations recherchées de façon non invasive dans l'ADN des CTC. Dans cette application toutefois, il est fondamental que l'analyse génétique soit adressée à des cellules dont la

nature tumorale a été diagnostiquée de façon certaine, d'où l'importance de l'analyse diagnostique cytopathologique et de ce travail de cytopathologie moléculaire.

L'identification cytopathologique des cellules étudiées lors de ce travail a été effectuée en aveugle des résultats moléculaires et sans aucune connaissance des données clinicopathologiques mis à part le type de cancer rénal diagnostiqué et le grade de Fuhrman. Nous avons constaté qu'un cytopathologiste expérimenté peut identifier de manière fiable les CTC en appliquant les critères cytopathologiques classiques, néanmoins il est vivement recommandé de rester prudent car pour d'autres pathologies autre que le cancer rénal à cellules claires comme certaines pathologies bénignes (adénomes thyroïdiens et parathyroïdiens), il est extrêmement difficile de classer ces cellules ce qui pourrait engendrer des résultats de faux positifs.

Cependant nous avons été confrontés à deux principales difficultés lors de la recherche de ces CTC : la rareté et la variabilité de la taille de ces cellules.

L'identification et le comptage des cellules ont constitué le défi majeur, car ces cellules sont très rares (quelques CTC mélangées à environ 100 millions de leucocytes et 50 milliards de globules rouges). La détection d'une CTC par ml de sang pourrait signifier que 5000 CTC sont présentes au niveau de la circulation sanguine. Nous avons pour cela utilisé la technique ISET qui permet d'enrichir de plusieurs millions de fois les CTC et de détecter des CTC rarissimes à partir du sang.

Le deuxième défi a été de distinguer les cellules non-tumorales (exemple : les cellules épithéliales non tumorales) des cellules tumorales. Pour cela nous avons appliqué les critères cytopathologiques décrits en littérature (Hofman V et al., 2011 Jan).

B - Avantages de l'ISET

Il existe différentes techniques pour isoler et caractériser les CTC, elles présentent différentes caractéristiques quant à leur sensibilité, leur reproductibilité et leur spécificité.

La filtration du sang périphérique par le dispositif ISET permet de faire une première sélection des cellules sanguines et de ne garder que les cellules circulantes non hématologiques de grande taille. L'isolement ultrasensible et l'observation directe de ces cellules sont les principaux avantages de cette technique, qui permet de classer les cellules en cellules tumorales (CTC) et cellules suspectes ou atypiques (CAC) et ceci en fonction de

leur taille, de leur regroupement et de la présence ou non de caractères cytopathologiques bien définis (voir partie « résultats »).

La fixation des cellules sur les filtres ISET présente un autre avantage. En effet les cellules sont fixées et ne sont pas sujettes aux variations temporelles et spatiales si l'on respecte des conditions de traitement et de stockage bien précises, donc en théorie aucune modification du patrimoine génétique ne pourra affecter les cellules, ce qui représente une avancée majeure quant à la possibilité du choix des tests moléculaires appliqués comme le génotypage, le séquençage, la CGH (Comparative Génomique Hybridation sur puce à ADN) ou la FISH.

Le coût du traitement du sang par ISET est relativement bas, le temps de la préparation de l'échantillon sanguin à l'analyse est aussi très court, ce qui représente un gain de temps important en cas d'urgence. Néanmoins l'échantillon sanguin doit parvenir au laboratoire dans un délai ne dépassant pas les 4h.

La technique ISET permet donc l'analyse directe sur le plan cytomorphologique des CTC, mais elle permet aussi l'application de différents examens immunologiques sur ces cellules en effectuant directement un marquage par différents anticorps directement sur les filtres. Néanmoins, la reconnaissance des CTC sur une base uniquement immunologique est à discuter car certaines CTC peuvent perdre un certain nombre d'antigènes, par exemple épithéliaux, normalement exprimés dans la tumeur primaire (Taube et al., 2010).

Nous avons privilégié le choix d'effectuer une étude moléculaire des CTC sélectionnées par rapport à une étude immunologique. Nous pensons que les examens moléculaires fournissent un outil exceptionnel pour mieux caractériser et confirmer le potentiel malin de ces cellules.

ISET constitue alors une excellente approche pour la détection des CTC chez les patients atteints d'un cancer. Ceci est principalement dû à la non invasivité du test et à la possibilité de répéter aisément le test sanguin, contrairement aux biopsies et aux prélèvements de la moelle osseuse.

Dans notre panel, un seul patient sur 30 n'a pas présenté de CTC lors de la microdissection, ce qui représente un taux de 3,4%. Pour les 29 autres patients, 205 cellules ont été analysées, elles ont été classées en 64 CTC et 141 CAC selon les critères morphologiques. De façon surprenante, toutes les cellules classées tumorales (100%) et toutes les cellules atypiques (100%) ont été validées comme CTC par l'analyse moléculaire

du gène *VHL*. Une première constatation s'impose quant à la combinaison des critères morphologiques et génétiques lors de la détection des CTC, qui peut constituer une nouvelle approche prometteuse en oncologie clinique : 1) nous validons par analyse moléculaire le diagnostic cytopathologique des CTC dans 100% des cellules informatives ; 2) notre étude révèle que les cellules classées atypiques ou suspectées d'être tumorales ont les mêmes caractéristiques moléculaires que les CTC. Ces données sont confirmées par le fait que nous n'avons pas trouvé de mutations dans les CTC et CAC dérivées de tumeurs sans mutation *VHL*. Notre étude doit être complétée par la lecture en aveugle par plusieurs pathologistes des images cellulaires. Toutefois, elle a le mérite de soulever la question si, au moins chez les patients avec cancer du rein à cellules claires, la « prudence diagnostique » du cytopathologiste, qui est guidée par l'usage classique des critères pathologiques, ne fait pas sous-estimer le comptage du nombre des CTC. Or, il a été établi depuis longtemps par des études chez l'animal que le nombre de CTC circulant dans le sang est un facteur de risque pour le développement des métastases (Kohn et al., 1995 ; Fidler et al., 2003). Le doute susmentionné, suite à nos résultats, est légitime. Notre étude ouvre également la voie à la cytopathologie moléculaire, qui demain sera complémentaire de l'analyse moléculaire théranostique des CTC. On voit très bien comment l'avancée des analyses moléculaires toujours plus étendues, moins chères et applicables à des quantités infimes d'ADN pourrait conduire au fait que le diagnostic des CTC pourrait un jour être « génétique », après séquençage de l'exome, et associé au même temps à la recherche de mutations théranostiques.

C - Inconvénient de l'ISET

L'analyse visuelle est un des principaux avantages de cette technique mais il peut aussi constituer un inconvénient quant à la différence d'interprétation des cellules entre les observateurs, comme toujours en cytopathologie. L'autre inconvénient est que le sang doit être traité dans les 3 à 4 heures après le prélèvement. Cet aspect permet toutefois à la technique ISET d'être actuellement l'approche la plus sensible pour isoler les CTC, ce qui a été publié par 3 groupes indépendants, qui ont comparé ISET et Cell Search (Hofman V et al., 2011 Oct; Farace et al., 2011; Krebs et al., 2011).

D - Sensibilité et spécificité de l'ISET

La comparaison de la technique ISET avec d'autres techniques de détection des CTC, nous permet d'évaluer sa spécificité et sa sensibilité dans la caractérisation des CTC.

L'une des techniques les plus utilisées dans la détection des « CTC » est la technique CellSearch (CellSearch Assay TM). Cette technique a été approuvée par la « Food and Drug Administration in the United States » pour le suivi des patients atteints d'un cancer du sein, du côlon ou de la prostate métastatique (Pantel et al., 2008). En effet, la FDA a reconnu l'impact pronostique de la présence de « cellules épithéliales circulantes ». Elle permet un enrichissement des CTC par capture à l'aide d'un anticorps anti-EpCam, un antigène épithélial. Elle a été principalement utilisée dans la détection des CTC chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules métastatique (Allard et al., 2004) mais récemment elle a été utilisée dans la détection des CTC dans le cancer primaire du poumon avant la chirurgie (Okumura et al., 2009).

La comparaison des deux techniques CellSearch et ISET montre des différences quant à leur approche et leur évaluation de la cellule potentiellement tumorale. Une récente étude (Hofman et al., 2011 Fev) a porté sur la comparaison de ces deux techniques dans la détection des CTC comme un facteur pronostic chez les patients ayant subi une chirurgie radicale pour un cancer du poumon. Les chercheurs ont effectué une comparaison entre l'efficacité du dosage CellSearch et l'isolement par la taille de la technique ISET dans la détection des cellules épithéliales tumorales et ont conclu que ces deux méthodes présentent des sensibilités similaires pour la détection des CTC si cette détection est seulement basée sur la détection par les antigènes épithéliaux. Par contre le taux moyen des CTC détectées par ISET était plus élevé que celui par CellSearch. Par ailleurs le nombre de patients présentant des CTC était plus élevé lorsque les deux méthodes ont été utilisées parallèlement que lorsqu'elles ont été utilisées indépendamment. Des cellules circulantes non hématologiques exprimant le marqueur immunologique, et présentant des critères cytologiques de malignité, ont été observées par ISET chez des patients n'ayant présenté aucune CTC par CellSearch.

Néanmoins, il existe des limitations de la comparaison de ces deux techniques, en effet la détection par la méthode CellSearch est essentiellement basée sur une détection immunologique des cellules, ce qui n'est pas le cas pour ISET. Dans la littérature toutes les

cellules circulantes dans le sang périphérique et exprimant l'antigène EpCAM et les cytokératines seraient tumorales, c'est-à-dire que toutes les cellules isolées par CellSearch et positives aux anti-EpCAM sont classées comme CTC. Ceci peut biaiser le nombre de CTC car certains monocytes peuvent également exprimer les cytokératines et les cellules épithéliales non tumorales expriment les antigènes épithéliaux. Parallèlement, les cellules tumorales les plus malignes n'expriment plus les antigènes épithéliaux car elles sont en transition épithéliaux-mésenchymateuse. Ces cellules sont donc non détectées par la méthode CellSearch alors qu'elles sont particulièrement fréquentes dans certains cancers (Krebs et al., 2011).

D'autres approches de détection des CTC existent comme la RT-PCR qui constitue une méthode indirecte de détection. Cette technique d'identification des CTC se base sur l'amplification de marqueurs de l'ARN avec ou sans capture préalable de cellules à partir d'antigènes, l'inconvénient majeur de cette technique est son manque de spécificité (Paterlini-Bréchet et al., 2007).

L'analyse par puce représente une autre approche dans la détection des CTC, elle est possible mais présente également un inconvénient. En effet, il faut une sélection préalable des cellules à analyser et une quantité suffisante d'ADN extrait des cellules pour pouvoir réaliser une hybridation sur puce. Les méthodes sur puce amplifient généralement l'ADN à partir des cellules épithéliales circulantes, ce qui expose ces approches aux mêmes biais que CellSearch. Cette étape d'amplification peut en plus générer des biais, en créant des artefacts. Des profils d'expression génique sur puce ont été obtenus dans le carcinome in-situ du sein à partir de fragments congelés (Luzzi et al., 2001) : 15000 cellules microdisséquées par Laser Capture Microdissection (LCM) permettent d'obtenir jusqu'à 80ng d'ARN dont 50ng d'ARN seront ensuite amplifiés avant l'hybridation sur la puce. L'application de ces approches aux CTC est encore en cours de développement à cause de la faible quantité d'acides nucléiques à analyser.

E - Conclusion

L'isolement et l'analyse morphologique des CTC par ISET nous a permis de démontrer la présence de ces cellules circulantes au niveau du sang périphérique chez des patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires, ce qui constitue un signe de la progression tumorale de ce type de cancer. Pourtant le cancer rénal est un cancer qui est identifié

comme un cancer localisé dans la majorité des cas et à faible taux de développement de métastases, en effet seulement 30% des patients présentent des métastases lors du diagnostic (Godley et al., 2002). Seuls deux patients de notre panel avaient des métastases lors de cette étude. Par conséquent, nos résultats sont conformes à l'idée que chez les patients avec ce type de cancer, la présence de CTC peut être un marqueur intéressant de la propagation tumorale. La comparaison du nombre des cellules retrouvées chez les patients avec les caractéristiques cliniques de ces derniers ne démontre pas d'association significative avec ces variables. Nous n'avons pas eu accès au suivi de ces patients ce qui aurait été très intéressant.

Il faut néanmoins prendre en compte le fait que cette étude a été effectuée sur un nombre réduit de patients et que l'évaluation de l'impact clinique de la détection des CTC par ISET n'était pas le but principal de l'étude. Le but principal, que nous avons atteint, était d'établir pour la première fois une corrélation entre analyse cytopathologique et génétique moléculaire dans le domaine des CTC.

Nos résultats montrent que toutes les CTC identifiées par diagnostic cytopathologique sont des CTC par l'analyse moléculaire car on retrouve les mêmes mutations présentes dans la tumeur primitive. De plus, nos résultats ont montré qu'au moins la majorité des CAC sont aussi, du point de vue moléculaire, des CTC car elles présentent le même profil génétique de la tumeur et des CTC. Ce résultat obtenu par une approche en aveugle semble indiquer que le nombre de CTC dans le sang des patients étudiés avec RCC est plus élevé que celui identifié par cytopathologie et que le domaine des CTC nécessite un niveau très important de caractérisation morphologique et moléculaire pour que son potentiel de test prédictif en oncologie clinique soit complètement exploité au bénéfice des patients.

Nous avons démontré que la caractérisation diagnostique par cytopathologie moléculaire des CTC est possible et informative. Nos résultats ouvrent la voie à un nouveau domaine qui est celui de la cytopathologie moléculaire appliquée aux CTC. Dans le futur, ce nouveau domaine, associé au domaine de la théranostique moléculaire appliquée aux CTC, pourrait révolutionner l'oncologie prédictive au bénéfice des patients avec cancer.

Partie II Etude moléculaire du gène *VHL*

Le problème majeur en oncologie moléculaire est l'identification des mutations génétiques sporadiques au niveau des CTC qui potentiellement jouent un rôle important dès les premières étapes de l'invasion tumorale. Afin d'étudier les variations génétiques de ces CTC issues de la tumeur primaire chez des patients atteints d'un cancer rénal à cellules claires, nous avons choisi le gène *VHL* qui est un gène suppresseur de tumeur, et dont l'implication dans les RCC sporadiques a été formellement démontrée (Gnarra et al., 1994).

A - Gène *VHL* et RCC

Dans la maladie VHL, les individus atteints possèdent généralement un allèle sauvage du gène *VHL* et un allèle muté, donc dans la majorité des cas ce sont des individus hétérozygotes pour ce gène. Le développement des tumeurs ou des kystes dans cette maladie est lié à l'inactivation somatique ou à la perte de l'allèle sauvage restant.

Dans les cas sporadiques de cancers rénaux à cellules claires, et selon le modèle de Knudson (Knudson et al., 1973), il existe une inactivation biallélique du gène *VHL* à la suite d'une mutation ou d'une hyperméthylation. En moyenne, le gène *VHL* semble présenter des mutations somatiques dans 50% des cas, et une hyperméthylation dans 10% à 20% des cas sporadiques des carcinomes rénaux à cellules claires. Toutefois, le taux de mutations du gène *VHL* dans le RCC diffère d'une étude à une autre, il varie de 42% (Foster et al., 1994 ; Hamano et al., 2002) à 56% ou 57% (Gnarra et al., 1994 ; Shuin et al., 1994 ; Gallou et al., 1999) et atteint même les 66% (Igarashi et al., 2002) à 75% des cas (Kaelin et al., 2002 ; Richard et al., 2003) voir même les 80% (Brauch et al., 2000).

Ces différences dans la prévalence des mutations somatiques VHL peuvent être dues à plusieurs facteurs, notamment aux caractéristiques de la population étudiée, à l'histopathologie des tumeurs, à la proportion de l'ADN tumoral par rapport à l'ADN normal dans un échantillon, et aussi aux différentes méthodes utilisées pour la détection des mutations. Les mutations ou l'hyperméthylation du gène *VHL* sont rarement détectées dans les autres sous-types histologiques du carcinome rénal, une inclusion de ces autres types histologiques au sein d'une étude pourrait diminuer la fréquence des mutations *VHL* observées. Il a aussi été démontré qu'une méthylation anormale des îlots CpG est associée à

l'inactivation du gène *VHL* chez un nombre significatif de carcinomes rénaux à cellules claires et lorsque ce gène n'est pas muté au niveau de sa région codante.

Les deux événements mutationnels lors des tumeurs sporadiques ont généralement lieu après la conception de l'individu et très rarement au niveau des lignées germinales. Parallèlement, les mutations germinales du gène *VHL* sont très rarement découvertes à l'occasion d'adénocarcinome sporadique du rein à cellules claires.

Les mutations somatiques du gène *VHL* sont rares dans les types de tumeurs histologiques non observés lors d'une maladie VHL comme le cancer du sein, du colon, du poumon ou de la prostate (Gnarra et al., 1994 ; Whaley et al., 1994 ; Foster et al., 1995 ; Zhuang et al., 1996).

B - Etude des mutations retrouvées

1) Localisation des mutations

La recherche de mutations au sein de notre panel a permis l'identification de 18 types de mutations différentes, ces mutations sont en majorité localisées au niveau de l'exon 1, elles représentent 50% des mutations retrouvées.

Les 9 mutations touchant l'exon 1 sont réparties en 4 transversions qui affectent 51 cellules appartenant à 5 patients différents ; en 4 délétions différentes touchant 20 cellules appartenant à 5 patients également et en une seule transition qui a été identifiée dans 26 cellules appartenant à 2 patients. Au total 97 cellules présentent des mutations au niveau de l'exon 1, ce qui représente 53,9% de l'ensemble des cellules mutées (180 cellules).

Pour l'exon 2, quatre mutations différentes ont été retrouvées, elles se répartissent en 2 transversions touchant 14 cellules appartenant à 2 patients ; une délétion identifiée au niveau de 4 cellules d'un même patient et une transition retrouvée au niveau de 18 cellules appartenant à 3 patients différents. Le total des cellules présentant une mutation au niveau de l'exon 2 est de 36 cellules soit 20% de l'ensemble des cellules mutées.

L'analyse de l'exon 3 a révélé 5 types de mutations touchant le gène *VHL* et qui se répartissent en 2 transversions retrouvées au niveau de 21 cellules appartenant à 5 patients différents ; 2 délétions identifiées au niveau de 21 cellules appartenant à 4 patients et une transition retrouvée au niveau de 5 cellules chez un seul patient.

Bien que la plupart des mutations déjà décrites du gène *VHL* semblent être distribuées uniformément sur les trois exons, certaines études révèlent des différences

quant aux fréquences retrouvées. En comparaison avec nos résultats, une étude effectuée en 2006 qui a porté sur 115 patients atteints d'un RCC, a démontré que 50% des mutations du gène *VHL* ont été retrouvées dans la deuxième moitié de l'exon 1, 31% des mutations au niveau de l'exon 2 et seulement 19% dans l'exon 3 (Banks et al., 2006) ; d'autres études attribuent aussi de fortes fréquences aux mutations de ce gène au niveau de l'exon 1 (Konko et al., 2002) et de l'exon 2 (Banks et al., 2006). Par contre, certaines études révèlent des prévalences similaires entre les 3 exons et précisent que la répartition des mutations, précisément les mutations faux sens, est établie de façon égale au niveau des trois exons du gène *VHL* (Kishida et al., 1995) et présentent des fréquences de mutations très proches entre les 3 exons du gène : 37% des mutations se trouveraient sur l'exon 1, 34% sur l'exon 2 et 30% sur l'exon 3 (Nickerson et al., 2008).

2) Corrélation phénotype-génotype

Pour rechercher les corrélations entre les mutations du gène *VHL* et les différents phénotypes engendrés nous avons utilisé la base de données des mutations *VHL* www.umd.be/VHL/ (Bérout et al. 1998), qui regroupe la plupart des mutations germinales et somatiques déjà décrites (Brauch et al., 1995 ; Chen et al., 1995; Crossey et al., 1994; Glavac et al., 1996; Kanno et al., 1996; Latif et al., 1993; Maher et al., 1996; Richards et al., 1995; Whaley et al., 1994; Zbar et al., 1996).

a) Les mutations Non-sens

Dans cette étude, 18 types de mutations ont été identifiées comprenant 8 transversions (47.8%, n=180) ; 3 transitions (27.2%, n=180) et 7 délétions (25%, n=180). L'analyse de ces mutations démontre que 10 (55.6%) des 18 types de mutations retrouvées sont des mutations non-sens et entraîneraient un codon stop. Sept de ces dix mutations non-sens sont des délétions entraînant pour la plupart la perte d'un seul nucléotide sauf pour la délétion au niveau du codon 69 qui touche deux nucléotides.

Les trois mutations non-sens restantes se présentent sous forme d'une substitution d'un seul nucléotide au niveau de la séquence codante, il s'agit des mutations touchant le codon 65, le codon 88 et le codon 183.

- La mutation retrouvée au niveau du codon 65 a été retrouvée au niveau de 11 (6.1%) cellules appartenant au même patient, il s'agit d'une mutation non-sens qui a été décrite précédemment (Gnarra et al., 1994 et Gallou et al., 1999).

- La mutation touchant le codon 88 (Gallou et al., 2001) donne une protéine tronquée, elle est retrouvée chez 26 (14.4%) cellules appartenant à 2 patients de notre panel. Cette mutation a aussi montré une forte fréquence lors d'une étude antérieure effectuée sur un échantillon de la population française, néanmoins il est nécessaire de rechercher de nouveau cette fréquence sur un plus grand nombre de patients atteints d'un RCC afin d'aider à mieux déterminer le potentiel pathogénique de cette mutation (Gallou et al., 2001).
- La troisième substitution entraînant un codon stop touche le codon 183 et a été précédemment rapportée (Whaley 1994 ; Bailly et al., 1995 ; Sekido et al., 1994), elle est retrouvée chez 4 patients de notre panel, touchant au total 19 cellules (10.6%).

Concernant les délétions retrouvées, elles engendrent toutes un codon stop au niveau de la séquence du gène *VHL*, elles ont été retrouvées au niveau des codons 69 (Gallou 1999) ; 92 (Gallou 1999) ; 100 (Gallou 1999) ; 109 (Gallou 1999) ; 140 (Zuang et al., 1996 Aug) ; 158 (Gallou 1999) et 163. Elles sont respectivement présentes au sein de notre panel au niveau de 5 cellules (2.8%), de 2 cellules (1.1%), de 4 cellules (2.2%), de 9 cellules (5%), de 4 cellules (2.2%), de 2 cellules (1.1%) et de 19 cellules (10.6%).

Toutes les délétions identifiées dans notre étude, ont été retrouvées à l'état homozygote, ce qui laisserait à penser qu'il y a eu au sein de la tumeur primaire une perte d'un des deux allèles. Cette perte allélique a été retrouvée au niveau de l'ADNctc issu des cellules tumorales circulantes étant elles mêmes des clones de la tumeur primaire, elles porteraient les mêmes variations génétiques. En effet, une étude menée en 1994 par Gnarra (Gnarra et al., 1994) a démontré que le gène *VHL* a été muté dans 57% des cas sporadiques analysés et qu'il y avait une perte d'un allèle *VHL* dans 98% des carcinomes rénaux. Dans une autre étude (Gallou et al., 1999), la perte du deuxième allèle appelée aussi perte d'hétérozygotie (LOH) a été retrouvée dans 83% des tumeurs où une mutation du gène *VHL* a déjà été identifiée ; ils en conclurent que les mutations donnant une protéine inactive ou tronquée participent au développement des RCC. Selon le modèle de Knudson, nous pouvons conclure que l'inactivation par mutation d'un des deux allèles du gène *VHL* (dans ce cas une délétion) couplée à la délétion du second allèle démontre la perte de fonction de ce gène et donc son implication dans la carcinogenèse du rein. Ces données suggèrent que la nature de la mutation elle-même peut être considérée comme un facteur de risque pour le développement de tumeurs spécifiques pour les patients. Pour confirmer cela une recherche

des LOH au niveau des CTC par Southern-blot ou PCR-SSCP est nécessaire afin de confirmer cette perte allélique.

b) Les mutations Faux-sens

Huit mutations ponctuelles ont été retrouvées au sein de notre panel, elles se présentent sous forme de substitutions d'un seul nucléotide, elles ont déjà été décrites et elles ont été retrouvées au niveau des codons 9 (Gallou et al., 1999); 18 (Kishida et al., 1995) ; 61 (Bailly et al., 1995); 116 (Maher et al., 1996),; 118 (Gnarra et al., 1994 ; Crossey et al., 1994 ; Zbar et al., 1996) ; 145 (Gallou et al., 1999) ; 176 (Gallou et al. 1999) et 207 (Kanno et al., 1997).

La mutation touchant le codon 116 (L116V) a été décrite comme un polymorphisme (Gallou et al., 1999) avec LOH. La plupart de ces mutations sont des mutations faux-sens qui entraînent un changement au niveau de la séquence d'acides aminés, elles sont présentes au niveau de notre panel respectivement selon les proportions suivantes :

- La mutation au niveau du codon 9 est retrouvée chez 6 cellules d'un même patient (3.3%).
- Pour le codon 18, la mutation a été retrouvée chez 17 cellules (9.4%) appartenant à 2 patients.
- Pour la transversion au niveau du codon 61, elle a été détectée au niveau de 17 (9.4%) cellules appartenant toutes au même patient.
- La mutation au niveau du codon 116 est retrouvée à une fréquence de 4.4% (8 cellules).
- La substitution au niveau du codon 118 touche quant à elle 18 cellules (10%) de trois patients différents.
- La mutation au niveau du codon 145 présente une fréquence de 3.3% (6 cellules d'un même patient).
- Les deux dernières mutations au niveau des codons 176 et 207 sont retrouvées à des fréquences respectives de 1.1% (2 cellules) et 2.8% (5 cellules). La mutation P61P est décrite comme un polymorphisme.

c) Les doubles mutations

Trois patients de notre série ont présenté une double mutation au niveau de leurs cellules. Le premier patient a présenté deux transversions touchant les codons 18 (A18E) et 116 (L116V), induisant des changements d'acides aminés au niveau des séquences protéiques. Le deuxième patient a aussi présenté deux transversions au niveau des codons 9 (D9Y) et 145 (Q145H). Chez ces deux patients la séquence codante du gène *VHL* est modifiée, il en découlera un changement au niveau de la séquence d'acides aminés et donc au niveau de la configuration finale de la protéine. Ces deux variations peuvent être portées par le même allèle et là on parle de mutations multiples touchant un seul allèle ou appartenir aux deux allèles du gène *VHL* et là on parlera alors d'hétérozygotes composites. Dans le cadre de notre étude, il est impossible de déterminer si ces mutations sont portées par le même allèle ou pas car il faudra rechercher ces mutations au niveau des parents.

Pour le troisième patient deux mutations non-sens, engendrant chacune un codon stop, ont été retrouvées au niveau de l'ADNt et de l'ADNctc. La première mutation est une délétion de deux nucléotides qui touche le codon 69 au niveau de l'exon 1 et entraîne un arrêt de la traduction au niveau du codon 130 ; la deuxième mutation est une transversion qui touche le codon 183 au niveau de l'exon 3 et entraîne un codon stop. Ces deux délétions ont été retrouvées à l'état homozygote, ce qui privilégierait l'hypothèse d'une perte d'hétérozygotie touchant le deuxième allèle. La première délétion entraîne un arrêt de la transcription au niveau du codon 130 de l'ADN (ADNt et ADNctc), la deuxième délétion touche le codon 183, cette délétion existe au niveau de l'ADN mais elle ne sera jamais transcrite au niveau de l'ARN car elle est localisée bien loin du premier codon stop engendré par la première délétion.

En définitive, la mutation identifiée au niveau du codon 88 est la plus fréquente dans notre série avec un taux de 14.4% (n=180) elle entraîne une protéine tronquée, suivie de 5 autres mutations au niveau des codons 18, 61, 118, 183 et 163 avec des taux variant de 9.4% à 10.6%. Le reste des mutations ne présente pas de fortes fréquences.

d) Pas de mutations

Quatre patients n'ont présenté aucune mutation ni au niveau de leur ADNt ni au niveau de l'ADNctc des 23 cellules analysées. Pourtant l'analyse cytopathologique identifie 7 de ces cellules comme répondant aux critères morphologiques de malignité des CTC et

classe 16 d'entre elles comme des cellules atypiques circulantes (CAC). Ces patients avaient une tumeur sans mutation *VHL* détectable et peuvent représenter un témoin négatif pour cette étude.

Il a été démontré que le gène *VHL* était muté au niveau des cancers rénaux sporadiques à un taux variant de 50% (Gnarra et al., 1994) à 80% (Brauch et al., 2000), ce taux peut en effet expliquer l'absence de mutations au niveau de l'ADNt et l'ADNctc de ces patients.

Les cellules étudiées de ces patients représentent 11.21% de l'ensemble des cellules analysées (n=205), elles peuvent néanmoins être issues de la tumeur primaire mais l'analyse moléculaire du gène *VHL* ne peut pas le prouver. Il est probable que d'autres gènes soient impliqués dans le développement du RCC et il serait donc judicieux de rechercher d'autres gènes candidats pour ce type de cancer.

e) Conclusion

Nous pouvons ainsi conclure que le gène *VHL* a présenté des variations génétiques dans 88.8% des cellules identifiées par ISET. Cette fréquence élevée peut être expliquée par la précision des choix des cellules ainsi que l'efficacité des méthodes utilisées (ISET et séquençage direct). De ce fait, les mutations *VHL* observées sont toutes susceptibles de causer la perte de fonction du produit protéique, car elles entraînent toutes des changements d'acides aminés et donc des modifications au niveau de la protéine ; ce qui est en accord avec les résultats d'études antérieures (Beroud et al., 1998; Gallou et al., 1999; Brauch et al., 2000) qui semblent indiquer que la plupart des mutations acquises dans le gène *VHL* et distribuées de façon aléatoire, entraînent souvent des protéines tronquées.

Le spectre des mutations *VHL* observé dans le RCC sporadique serait différent de celui observé dans le cadre d'une maladie *VHL*. La principale différence semble porter sur le nombre d'événements mutationnels dans les deux cas. En effet, dans la maladie *VHL*, le gène *VHL* est dominant donc une seule copie du gène muté suffit pour développer la maladie. Dans les cas sporadiques deux événements mutationnels sont nécessaires, ce qui laisserait supposer l'implication de facteurs environnementaux conduisant à des mutations de la séquence initiale du gène et entrainer des tumeurs. Il peut s'agir de substances néphrocarcinogènes, ce qui appuierait l'hypothèse de l'implication des facteurs toxiques environnementaux dans l'étiologie du RCC sporadique dans les pays industrialisés (La

Vecchia et al., 1990; Malker , 1984; Yu et al., 1986). La nécessité de récolter des données complémentaires concernant le mode de vie des patients atteints d'un RCC comme le tabagisme ou les conditions de travail sera très importante dans de futures études.

Parmi les facteurs environnementaux, le rôle du trichloréthylène (TCE) dans le développement de RCC sporadique est très étudié mais reste discutable (Shiao, 2009). Des études combinées portant sur une soixantaine de patients exposés au TCE et atteints d'un RCC sporadique démontrent un taux élevé de mutations du gène *VHL* (Brauch et al., 1999; Bruning et al., 1997; Wells et al., 2009).

En effet, l'exposition au TCE a fait l'objet de plusieurs études dont les résultats sont cependant contradictoires. Certaines révèlent la présence de mutations somatiques du gène *VHL* atteignant les 83% des cas étudiés et jusqu'à 47% de mutations multiples de ce gène (Brauch et al., 2004), en revanche, d'autres études n'ont trouvé aucune différence au niveau des fréquence des mutations chez des individus exposés et non exposés au TCE (Charbotel et al., 2007 ; Shiao, 2009).

C - Caractéristiques des patients et des tumeurs

Nous avons essayé de démontrer au sein de notre étude une éventuelle association entre les mutations retrouvées chez nos patients et les caractéristiques de leurs tumeurs comme le grade de Fuhrman et la classification TNM. Cette association n'a malheureusement pas pu être démontrée à cause du faible effectif de notre panel, d'ailleurs beaucoup d'études n'ont également pas prouvé cette association (Gallou et al., 1999 ; Gallou et al., 2001; Van Houwelingen et al, 2005]. Nous avons tenté d'analyser la corrélation entre les tumeurs et le grade pathologique ou les caractéristiques des patients, mais en considérant le faible nombre des tumeurs analysées, nos résultats ont montré que les mutations du gène *VHL* ont été observées indépendamment du grade pathologique ou de la classe TNM. Cette constatation peut suggérer que les mutations du gène *VHL* peuvent être un événement précoce dans le développement du carcinome rénal à cellules claires. Les échantillons examinés sont peu nombreux, une étude à plus grande échelle serait nécessaire pour valider cette hypothèse.

D - La pVHL

La protéine pVHL est impliquée dans le processus d'élongation de la transcription en le diminuant par son interaction avec le complexe d'élongine SIII (Duan et al., 1995 ; Kibel et al., 1995). Elle intervient également grâce au complexe qu'elle forme avec l'élongine B, C et Cul2, sur l'expression de plusieurs gènes impliqués principalement dans l'angiogénèse (VEGF), dans la croissance cellulaire (TGF- α), dans le métabolisme du glucose, dans l'érythropoïèse, dans l'équilibre acido-basique et dans la survie cellulaire (Kaelin et al., 2002 ; Lauzier et al., 2006).

En raison de l'interaction de la pVHL avec ces nombreuses protéines, il est possible que l'inactivation d'une ou de plusieurs de ces interactions conduit à des phénotypes spécifiques. Et comme la majorité des mutations impliquées dans le RCC sporadique donnent des protéines tronquées, il est possible que la survenue d'au moins deux mutations soit nécessaire afin d'observer ce phénotype. Selon cette hypothèse, les mutations faux-sens retrouvées dans notre étude et impliquées dans le RCC doivent considérablement perturber la structure tertiaire de la pVHL et donc affecter la localisation cellulaire et /ou la fonction de la protéine. Ainsi, une dysrégulation de la pVHL, qui intervient au niveau des voies cellulaires, peut jouer un rôle critique dans la tumorigénèse.

E - Conclusion

Nos résultats suggèrent que l'inactivation génique du gène *VHL* par mutation peut être l'un des principaux mécanismes moléculaires dans le développement du RCC humain sporadique, et que les CTC peuvent représenter un excellent marqueur de l'invasion tumorale. Cette considération a aussi été adoptée par Gnarra en 1994 (Gnarra et al., 1994). Néanmoins, nous supposons que les expositions aux facteurs environnementaux, le mode de vie, la susceptibilité individuelle de chaque patient peut contribuer à une augmentation des effets mutationnels somatiques du gène *VHL*. Des études confirment notre hypothèse, selon ces études les altérations du gène *VHL* constitueraient un événement précoce de la tumorigénèse rénale (Van den Berg et al., 1997; Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1999).

Toutefois, selon une autre hypothèse, le gène *VHL* ne peut pas être l'unique gène suppresseur de tumeur impliqué dans la tumorigénèse du rein, il serait un gène parmi un ensemble de gènes intervenant de façon simultanée au développement d'un RCC

sporadique. Cette hypothèse est appuyée par des études portant sur l'analyse de la perte d'hétérozygotie (LOH), de cartographie génique et également d'analyse des mutations somatiques de gène *VHL* au niveau de tumeurs de différents stades. Cette hypothèse conclut à la pléiotropie du gène *VHL* (Pause et al., 1997; Gorospe et al., 1999; Siemeister et al., 1996; Maxwell et al., 1999; Ivanov et al., 1998; Ohh et al., 1998). Par conséquent, le phénotype induit par une mutation de ce gène n'est pas le reflet de l'effet sur une seule et unique fonction induite par ce gène, mais la combinaison des effets sur plusieurs de ces fonctions.

Néanmoins, il est probable que l'initiation de la tumorigenèse rénale soit une combinaison mutuelle entre l'initiation de la croissance tumorale provoquée par les altérations du gène *VHL*, et l'interaction avec d'autres gènes dont l'implication n'a pas encore été prouvée dans le RCC sporadique.

Cependant, de nombreuses interrogations persistent quant au rôle exact du gène *VHL* au niveau de la tumorigenèse, car il est certain actuellement que les mutations touchant ce gène n'apparaissent qu'au niveau des cancers rénaux à cellules claires. On ignore également pourquoi certaines mutations spécifiques sont associées à des risques différents de développement de tumeurs, ces risques sont propres à chaque site mutationnel. Il est actuellement important d'effectuer davantage d'études sur le fonctionnement de la pVHL et d'identifier l'interaction possible entre le gène *VHL* et d'autres gènes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'identification et la caractérisation des cellules tumorales circulantes peuvent constituer une nouvelle approche non seulement dans le diagnostic et le pronostic du cancer rénal à cellules claires, mais aussi dans l'estimation du risque de récurrence chez les patients, la stratification de ces derniers à une chimiothérapie, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le suivi des thérapies systémiques anticancéreuses. La présence des CTC lors de ces différentes étapes peut constituer un excellent marqueur de l'évolution de la maladie, du traitement et des éventuelles récurrences.

Cette identification des CTC est désormais possible grâce à la technique ISET qui constitue une méthode simple, peu coûteuse, reproductible, présentant une grande sensibilité et une bonne spécificité dans la détection cytomorphologique des cellules au niveau du sang périphérique. Cette approche offre également la possibilité d'effectuer un large choix de techniques d'analyses moléculaires et immunologiques aux cellules sélectionnées.

Néanmoins, il en advient qu'à l'heure actuelle, la progression de ce type de cancers dépend de nombreuses voies complexes, et que l'utilisation des CTC comme un marqueur de l'évolution de la maladie est susceptible de dépendre de la spécificité diagnostique appliquée pour les identifier et de la capacité à définir leur potentiel invasif et métastatique. La présence des CTC à différents stades et types de cancers a été largement démontrée, néanmoins, les techniques utilisées ont des niveaux de sensibilité et spécificité variables car il n'y a pas à l'heure actuelle une méthode reconnue comme méthode de référence. Par conséquent, l'apport exact de la présence de ces CTC au niveau du diagnostic, du pronostic et des investigations théranostiques reste encore à déterminer avec précision.

Dans ce travail préliminaire nous avons démontré que l'identification spécifique et le comptage des CTC peuvent constituer potentiellement un test intéressant pour la caractérisation génétique des cellules tumorales circulantes et des tumeurs primaires. Nous avons pu démontrer également grâce à l'approche par ISET, que les CTC pouvaient être identifiées et caractérisées sur le plan moléculaire mais surtout nous avons pu prouver que ces CTC étaient bien issues de la tumeur primaire et que désormais les études moléculaires sur les CTC peuvent être abordées. Néanmoins nous recommandons dans de futures études d'inclure un plus grand nombre de patients atteints de RCC, d'effectuer un suivi de ces patients et d'intégrer, en plus de l'analyse cytopathologique et moléculaire des CTC, les données d'analyses de microdissections ciblées effectuées au niveau de la tumeur primitive.

Plusieurs perspectives s'offrent à ce travail, notamment celles d'effectuer des études complémentaires basées sur la technique ISET afin de développer des marqueurs moléculaires qui à l'avenir pourraient aider à mieux identifier et caractériser les CTC pour chaque type de cancer.

La combinaison de la reconnaissance cytomorphologique des cellules, de la caractérisation moléculaire et de la recherche immunologique possible dans le cadre de l'application de l'ISET devrait améliorer la détection des CTC et apporter de nouvelles approches pour le suivi des patients atteints de cancers solides. Une étude sur un plus grand nombre de patients permettra également de faire une meilleure corrélation entre les variables pathologiques et moléculaires et les résultats cliniques. Elle permettra aussi d'évaluer précisément la valeur prédictive de l'ISET dans différents cancers solides. Les résultats obtenus pourront prédire les implications potentielles lors de choix thérapeutiques.

La combinaison de deux ou plusieurs techniques de détection des CTC parallèlement, serait une autre perspective à cette étude, en effet cela pourrait enrichir l'étude comparative déjà effectuée par d'autres équipes sur ce sujet.

En conclusion, nos résultats montrent que l'analyse génétique moléculaire appliquée aux CTC et CAC identifiées par analyse cytopathologique permet d'élargir de façon fiable le nombre de cellules que nous devons considérer comme CTC. Ce résultat est très innovant et ouvre plusieurs perspectives nouvelles. Entre autre, il nous permet d'avancer l'hypothèse que demain le diagnostic des CTC réalisé par cytopathologie moléculaire sera plus complet et plus sensible qu'à l'heure actuelle. Ceci représenterait une avancée spectaculaire dans le domaine de la médecine personnalisée et de l'oncologie prédictive et non invasive.

Ce travail constitue une approche ciblée réalisée dans le but de contribuer modestement à une meilleure compréhension et traitement du cancer par l'identification plus spécifique des CTC et CAC grâce à une approche innovante de cytopathologie moléculaire. L'élaboration d'un test prédictif non invasif et fiable en oncologie constitue une espérance pour de nombreux patients, chercheurs et cliniciens afin d'aider à la mise au point de nouvelles stratégies de suivi thérapeutique.



ANNEXES

Séquences des 3 exons du gène *VHL*

EXON 1

CGCACGCAGCTCCGCCCGCGTCCGACCCGCGGATCCCGCGGCGTCCGGCCCGGGTGGTCTGGATC
GCGGAGGGAATGCCCGGAGGGCGGAGAACTGGGACGAGGCCGAGGTAGGCGCGGAGGAGGCA
GGCGTCGAAGAGTACGGCCCTGAAGAAGACGGCGGGGAGGAGTCCGGCCGCCGAGGAGTCCGGCC
CGGAAGAGTCCGGCCCGGAGGAACTGGGCGCCGAGGAGGAGATGGAGGCCGGCGCGCCGCGGCC
CGTGCTGCGCTCGGTGAACTCGCGCGAGCCCTCCAGGTCATCTTCTGCAATCGCAGTCCGCGCGTC
GTGCTGCCCGTATGGCTCAACTTCGACGGCGAGCCGCAGCCCTACCCAACGCTGCCGCTGGCACGG
GCCGCCGCATCCACAGCTACCGAGGTACGGGCCCGGCGCTTAGGCCCGACCCAGCAGGGACGATAG
CACGGTCTGAAGCCCCTCTACCGCCCCGGGGT

EXON 2

GCTGGGATTACAGGTGTGGGCCACCGTGCCAGCCACCGGTGTGGCTCTTTAACAACTTTGCTTGT
CCCGATAGGTCACCTTTGGCTCTTCAGAGATGCAGGGACACACGATGGGCTTCTGGTTAACCAA
CTGAATTATTTGTGCCATCTCTCAATGTTGACGGACAGCCTATTTTTGCCAATATCACACTGCCAGG
TACTGACGTTTTACTTTTTAAAAAGATAAGGTTGTTGTGGTAAGTACAGGATAGACCACTTGAAAA
ATTAA
GC

EXON 3

TTGGCAAAGCCTCTTGTTTCGTTCTTGACTGAGACCCTAGTCTGCCACTGAGGATTTGGTTTTGCCC
TTCCAGTGTATACTCTGAAAGAGCGATGCCTCCAGGTTGTCCGGAGCCTAGTCAAGCCTGAGAATTA
CAGGAGACTGGACATCGTCAGGTCGCTCTACGAAGATCTGGAAGACCACCAAATGTGCAGAAAGA
CCTGGAGCGGCTGACACAGGAGCGCATTGCACATCAACGGATGGGAGATTGAAGATTTCTGTTGAA
ACTTACACTGTTTCATCTCAGCTTTTGATGGTACTGATGAGTCTTGATCTAGATACA

Séquence des Acides Aminés du gène *VHL*

1	ATG Met	CCC Pro	CGG Arg	AGG Arg	GCG Ala	GAG Glu	AAC Asn	TGG Trp	GAC Asp	GAG Glu	GCC Ala	GAG Glu	GTA Val	GGC Gly	GCG Ala	15
16	GAG Glu	GAG Glu	GCA Ala	GGC Gly	GTC Val	GAA Glu	GAG Glu	TAC Tyr	GGC Gly	CCT Pro	GAA Glu	GAA Glu	GAC Asp	GGC Gly	GGG Gly	30
31	GAG Glu	GAG Glu	TCG Ser	GGC Gly	GCC Ala	GAG Glu	GAG Glu	TCC Ser	GGC Gly	CCG Pro	GAA Glu	GAG Glu	TCC Ser	GGC Gly	CCG Pro	45
46	GAG Glu	GAA Glu	CTG Leu	GGC Gly	GCC Ala	GAG Glu	GAG Glu	GAG Glu	ATG Met	GAG Glu	GCC Ala	GGG Gly	CGG Arg	CCG Pro	CGG Arg	60
61	CCC Pro	GTG Val	CTG Leu	CGC Arg	TCG Ser	GTG Val	AAC Asn	TCG Ser	CGC Arg	GAG Glu	CCC Pro	TCC Ser	CAG Gln	GTC Val	ATC Ile	75
76	TTC Phe	TGC Cys	AAT Asn	CGC Arg	AGT Ser	CCG Pro	CGC Arg	GTC Val	GTG Val	CTG Leu	CCC Pro	GTA Val	TGG Trp	CTC Leu	AAC Asn	90
91	TTC Phe	GAC Asp	GGC Gly	GAG Glu	CCG Pro	CAG Gln	CCC Pro	TAC Tyr	CCA Pro	ACG Thr	CTG Leu	CCG Pro	CCT Pro	GGC Gly	ACG Thr	105
106	GGC Gly	CGC Arg	CGC Arg	ATC Ile	CAC His	AGC Ser	TAC Tyr	CGA Arg	GGT Gly	CAC His	CTT Leu	TGG Trp	CTC Leu	TTC Phe	AGA Arg	120
121	GAT Asp	GCA Ala	GGG Gly	ACA Thr	CAC His	GAT Asp	GGG Gly	CTT Leu	CTG Leu	GTT Val	AAC Asn	CAA Gln	ACT Thr	GAA Glu	TTA Leu	135
136	TTT Phe	GTG Val	CCA Pro	TCT Ser	CTC Leu	AAT Asn	GTT Val	GAC Asp	GGA Gly	CAG Gln	CCT Pro	ATT Ile	TTT Phe	GCC Ala	AAT Asn	150
151	ATC Ile	ACA Thr	CTG Leu	CCA Pro	GTG Val	TAT Tyr	ACT Thr	CTG Leu	AAA Lys	GAG Glu	CGA Arg	TGC Cys	CTC Leu	CAG Gln	GTT Val	165
166	GTC Val	CGG Arg	AGC Ser	CTA Leu	GTC Val	AAG Lys	CCT Pro	GAG Glu	AAT Asn	TAC Tyr	AGG Arg	AGA Arg	CTG Leu	GAC Asp	ATC Ile	180
181	GTC Val	AGG Arg	TCG Ser	CTC Leu	TAC Tyr	GAA Glu	GAT Asp	CTG Leu	GAA Glu	GAC Asp	CAC His	CCA Pro	AAT Asn	GTG Val	CAG Gln	195
196	AAA Lys	GAC Asp	CTG Leu	GAG Glu	CGG Arg	CTG Leu	ACA Thr	CAG Gln	GAG Glu	CGC Arg	ATT Ile	GCA Ala	CAT His	CAA Gln	CGG Arg	210
211	ATG Met	GGA Gly	GAT Asp	TGA Ter												



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- 1- Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with non-malignant diseases. *Clin Cancer Res*, **2004**, 10(20) : 6897–6904.
- 2- Ang SO, Chen H, Hirota K, Gordeuk VR, Jelinek J, Guan Y, Liu E, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Mole D, Maxwell PH, Stockton DW, Semenza GL, Prchal JT. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet*, **2002**, 32(4): 614-21.
- 3- Aso T, Haque D, Barstead RJ, Conaway RC, Conaway JW. The inducible elongin A elongation activation domain: structure, function and interaction with the elongin BC complex. *EMBO J*, **1996**, 15(20) : 5557-66.

-B-

- 4- Bailly M, Bain C, Favrot MC, Ozturk M. Somatic mutations of Von-Hippel-Lindau (VHL) tumor- suppressor gene in European kidney cancer. *Int J Cancer*, **1995**, 63: 660-664.
- 5- Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, Maher ER, Stanley AJ, Harnden P, Joyce A, Knowles M, Selby PJ. Genetic and epigenetic analysis of Von-Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res*, **2006** Feb 15, 66(4):2000-11.
- 6- Barry RE, Krek W. The von Hippel-Lindau tumour suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumourigenesis. *Trends Mol Med*, **2004** Sep, 10(9): 466-72.
- 7- Benichou J, Chow WH, McLaughlin JK, Mandel JS, Fraumeni JF JR. Population attributable risk of renal cell cancer in Minnesota. *Am J Epidemiol*, **1998**, 148: 424-30.
- 8- Bérout C, Collod-Bérout G, Boileau C, Soussi T, Junien C. UMD (Universal Mutation Database): A generic software to build and analyse locus specific database. *Human Mutation*, **2000**; 15: 86-94.
- 9- Bérout C, Joly D, Gallou C, Staroz F, Orfanelli MT, Junien C. Software and database for the analysis of mutations in the VHL gene. *Nucleic Acids Res*, **1998**, 26 : 256-8.
- 10- Bérout C, Karliova M, Bonnefont JP, Benachi A, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Bréchet P. Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by genetic analysis of circulating fetal cells. *Lancet*, **2003**, 22, 361(9362): 1013-4.
- 11- Birnbaum BA, Jacobs JE, Ramchandani P. Multiphasic renal CT: comparison of renal mass enhancement during the corticomedullary and nephrographic phases. *Radiology*, **1996**, 200: 753-758.

- 12- Brauch H, Kishida T, Glavac D. Von-Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet*, **1995** May, 95 (5): 551–556.
- 13- Brauch H, Weirich G, Hornauer MA, Störkel S, Wöhl T, Brüning T. Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **1999** May 19; 91(10): 854-61.
- 14- Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rödl H, Eichinger M, Feurer M, Weidt E, Puranakanittha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Störkel S, Rotter M, Masera A, Gugeler N, Decker HJ. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: Association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res*, **2000** Apr 1, 60(7): 1942-8.
- 15- Brauch H, Weirich G, Klein B, Rabstein S, Bolt HM, Brüning T. VHL mutations in renal cell cancer: does occupational exposure to trichloroethylene make a difference? *Toxicol Lett*, **2004** Jun 15, 151(1): 301-10.
- 16- 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**, 353(8) : 793-802.
- 17- Brugger W, Bross K, Glatt M, et al. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood*, **1994**, 83: 636–40.
- 18- Brüning T, Pesch B, Wiesenhutter B, Rabstein S, Lammert M, Baumüller A, Bolt HM. Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: results of a consecutive case-control study in Arnsberg, Germany. *Am J Ind Med*, **2003**, 43: 274-85.
- 19- Brüning T, Weirich G, Hornauer MA, Höfler H, Brauch H. Renal cell carcinomas in trichloroethene (TRI) exposed persons are associated with somatic mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene. *Arch Toxicol*, **1997**, 71(5) : 332-5.
- 20- Burchill SA, Perebolte L, Johnston C, Top B, Selby P. Comparison of the RNA-amplification based methods RT-PCR and NASBA for the detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer*, **2002** Jan 7, 86(1) : 102-9.
- 21- Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*, **2005**, 109(4) : 365-79.
- 22- Buzio L, Tondel M, De Palma G, Buzio C, Franchini I, Mutti A, Axel O. Occupational risk factors for renal cell cancer. An Italian case-control study. *Med Lav*, **2002**, 93 : 303-9.

-C-

- 23-** Calzada MJ, Esteban MA, Feijoo-Cuaresma M, Castellanos MC, Naranjo-Suárez S, Temes E, Méndez F, Yáñez-Mo M, Ohh M, Landázuri MO. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Res*, **2006**, 66 (3) : 1553-60.
- 24-** Charbotel B, Gad S, Caïola D, Bérout C, Fevotte J, Bergeret A, Ferlicot S, Richard S. Trichloroethylene exposure and somatic mutations of the VHL gene in patients with Renal Cell Carcinoma. *J Occup Med Toxicol*, **2007** Nov, 12 ; 2:13.
- 25-** Chauveau D, Duvic C, Chrétien Y, Paraf F, Droz D, Melki P, Hélénon O, Richard S, Grünfeld JP. Renal involvement in von Hippel-Lindau disease. *Kidney Int*, **1996**, 50: 944-951.
- 26-** Chen F, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean D, Gnarr JR, Orcutt ML, Duh FM, Glenn GM, Green J, Hsia YE, Lamiell J, Li H, Wei MH, Schmidt L, Tory K, Kuzmin I, Stackhouse T, Latif F, Linehan WM, Lerman MI, Zbar B. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat*, **1995**, 5: 66–75.
- 27-** Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA*, **1999**, 281(17): 1628-31.
- 28-** Chrétien Y, Chauveau D, Richard S, Droz D, Correas JM, Mejean A, Dufour B, Grünfeld JP. Treatment of von Hippel-Lindau disease with renal involvement. *Prog Urol*, **1997**, 7(6): 939-47.
- 29-** Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, Dallabrida SM, Zurakowski D, Nguyen L, Woulfe K, Pravda E, Cassiola F, Desai J, George S, Morgan JA, Harris DM, Ismail NS, Chen JH, Schoen FJ, Van den Abbeele AD, Demetri GD, Force T, Chen MH. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet*, **2007**, 370(9604) : 2011–2019.
- 30-** Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **2005**, 353 : 2477-2490.
- 31-** Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, **2004** Aug 19, 351(8): 781-91.
- 32-** Crossey P.A, Richards F.M, Foster K, Green J.S, Prowse A, Latif F, Lerman M.I, Zbar B, Affara N.A, Ferguson-Smith M.A, Maher E.R. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet*, **1994** Aug, 3(8): 1303-8.

- 33- Cybulski C, Krzystolik K, Murgia A, Górski B, Debniak T, Jakubowska A, Martella M, Kurzawski G, Prost M, Kojder I, Limon J, Nowacki P, Sagan L, Białas B, Kałuza J, Zdunek M, Omulecka A, Jaskólski D, Kostyk E, Koraszewska-Matuszewska B, Haus O, Janiszewska H, Pecold K, Starzycka M, Słomski R, Cwirko M, Sikorski A, Gliniewicz B, Cyryłowski L, Fiszer-Maliszewska Ł, Gronwald J, Tołoczko-Grabarek A, Zajaczek S, Lubiński J. Germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire VHL gene. *J Med Genet*, **2002**, 39(7): E38.

-D-

- 34- Damhuis RA, Kirkels WJ. Improvement in survival of patients with cancer of the kidney in Europe. *Eur J Cancer*, **1998**, 34: 2232-5.
- 35- De Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, Klausner RD, Gnarr JR, Pause A, Lee S. Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL) -/- clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**, 98: 1387-92.
- 36- Deisboeck TS, Mansury Y, Guiot C, Degiorgis PG, Delsanto PP. Insights from a novel tumor model: Indications for a quantitative link between tumor growth and invasion. *Med. Hypotheses Med Hypotheses*, **2005**, 65(4): 785-90.
- 37- Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol*, **2001**, 32(6) : 590-5.
- 38- Denoix P. Enquête permanent dans les centres anticancéreux. *Bull Inst Natl Hyg*, **1946**, 1: 12-7.
- 39- Descotes JL. Open partial nephrectomy techniques for cancer of the kidney. *Progrès en urologie*, **2009**, 19: 234—237.
- 40- Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmoller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstadter F, Ruschoff J. Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol*, **1999**, 154(1) : 83-95.
- 41- Duan DR, Pause A, Burgess WH, Aso T, Chen DY, Garrett KP, Conaway RC, Conaway JW, Linehan WM, Klausner RD. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science*, **1995**, 269(5229): 1402-6.

-E-

- 42- Engell HC. Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. *Ugeskr Laeger*, **1955**, 117(25) : 822-3.

- 43-** Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM; TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **2007**, 356(2): 125-34.
- 44-** Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N; AVOREN Trial investigators. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*, **2007**, 370(9605) : 2103-11.
- 45-** Esteban MA, Harten SK, Tran MG, Maxwell PH. Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Am Soc Nephrol*, **2006**, 17: 1801-6.
- 46-** Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res*, **2002**, 8(7) : 2073-84.
- F-**
- 47-** Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, Laplanche A, Chauchereau A, Lacroix L, Planchard D, Le Moulec S, André F, Fizazi K, Soria JC, Vielh P. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* **2011** Sep 6, 105(6) : 847-53.
- 48-** Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, Gebauer G. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*, **2005**, 7(2): 171-85.
- 49-** Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, **2003** Jun, 3(6): 453-8.
- 50-** Foster K, Osborne RJ, Huddart RA, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Maher ER. Molecular genetic analysis of the von Hippel- Lindau disease (VHL) tumour suppressor gene in gonadal tumours. *Eur J Cancer*, **1995** Dec, 31 A (13-14) : 2392-5.
- 51-** Foster K, Prowse A, van den Berg A, Fleming S, Hulsbeek MM, Crossey PA, Richards FM, Cairns P, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Buys CHCM, Maher ER. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet*, **1994** Dec, 3(12): 2169-73.
- 52-** Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, **1982**, 6: 655-663.

-G-

- 53-** Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, de la Torre N, Algarra I, Dueñas R, Lozano A. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer*, **2003**, 107: 984 –90.
- 54-** Gallou C, Joly D, Méjean A, Staroz F, Martin N, Tarlet G, Orfanelli MT, Bouvier R, Droz D, Chrétien Y, Maréchal JM, Richard S, Junien C, Bérout C. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat*, **1999**, 13(6): 464-75.
- 55-** Gallou C, Longuemaux S, Deloménie C, Méjean A, Martin N, Martinet S, Palais G, Bouvier R, Droz D, Krishnamoorthy R, Junien C, Bérout C, Dupret JM. Association of GSTT1 non-null and NAT1 slow/rapid genotypes with von Hippel-Lindau tumour suppressor gene transversions in sporadic renal cell carcinoma. *Pharmacogenetics*, **2001** Aug, 11(6): 521-35.
- 56-** Garmy-Susini B, Varner JA. Circulating endothelial progenitor cells. *Br J Cancer*, **2005**, 17(93) : 855—8.
- 57-** Georgakoudi I, Solban N, Novak J, Rice WL, Wei X, Hasan T, Lin CP. In vivo flow cytometry: a new method for enumerating circulating cancer cells. *Cancer Res*, **2004** Aug 1, 64(15): 5044-7.
- 58-** Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res*, **2003**, 162: 149-55.
- 59-** Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*, **1999**, 5: 1950–60.
- 60-** Gill I.S. Minimally invasive nephron-sparing surgery. *Urol Clin N. Am*, **2003**, 30: 551-579.
- 61-** Gill I.S., Matin S.F., Desai M.M., Kaouk J.H., Steinberg A., Mascha E., Thornton J., Sherief M.H., Strzempkowski B., Novick A.C. Comparative analysis of laparoscopic versus open partial nephrectomy for renal tumors in 200 patients. *J Urol*, **2003**, 170: 64-8.
- 62-** Gläsker S, Li J, Xia JB, Okamoto H, Zeng W, Lonser RR, Zhuang Z, Oldfield EH, Vortmeyer AO. Hemangioblastomas share protein expression with embryonal hemangioblast progenitor cell. *Cancer Res*, **2006**, 66(8) : 4167-72.
- 63-** Glavac D, Neumann H, Wittke C, Jaenig H, Masek O, Streicher T, Pausch F, Engelhardt D, Plate K, Hofler H, Chen F, Zbar B, Brauch H. Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. *Hum Genet*, **1996**, 98:271–280.

- 64- Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*, **1994**, 7(1): 85-90.
- 65- Godley P, Kim SW. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*, **2002**, 14: 280-285.
- 66- Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann Oncol*, **2000**, 11(7) : 785-92
- 67- Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal ablation therapy for focal malignancy: a unified approach to underlying principles, techniques, and diagnostic imaging guidance. *AJR Am J Roentgenol*, **2000**, 174(2): 323-31.
- 68- Gomella LG, Raj GV, Moreno JG. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen in the management of prostate cancer. *J Urol*, **1997**, 158: 326 –37.
- 69- Gorospe M, Egan JM, Zbar B., Lerman MI, Geil L, Kuzmin I, and Holbrook NJ. Protective function of the von Hippel-Lindau protein against impaired protein processing in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, **1999**, 19: 1289–1300.
- H-**
- 70- Hamano K, Esumi M, Igarashi H, Chino K, Mochida J, Ishida and H, Okada K. Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. *J Urol*, **2002** Feb, 167(2 Pt 1): 713-7.
- 71- Handa K, Kreiger N. Diet patterns and the risk of renal cell carcinoma. *Public Health Nutr*, **2002**, 5 : 757-67.
- 72- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, **1990**, 344(6268): 768-70.
- 73- Hayes DF, Walker TM, Singh B, Vitetta ES, Uhr JW, Gross S, Rao C, Doyle GV, Terstappen LW. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol*, **2002**, 21:1111– 8.
- 74- Hélénon O, Merran S, Paraf F, Melki P, Correas JM, Chrétien Y, Moreau JF. Unusual fatcontaining tumors of the kidney: a diagnostic dilemma. *Radiographics*, **1997**, 17: 129-144.
- 75- Hergovich A, Lisztwan J, Barry R, Ballschmieter P, Krek W. Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol*, **2003**, 5 : 64-70.
- 76- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**, 91(21) : 9700-4.

- 77-** Herts BR, Baker ME. The current role of percutaneous biopsy in the evaluation of renal masses. *Semin Urol Oncol*, **1995**, 13 : 254-261.
- 78-** Heung YM, Walsh K, Sriprasad S, Mulvin D, Sherwood RA. The detection of prostate cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction in the circulation of patients undergoing transurethral resection of the prostate. *BJU Int*, **2000** Jan, 85(1) : 65-9.
- 79-** Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Mourad N, Butori C, Selva E, Poudenx M, Sibon S, Kelhef S, Vénissac N, Jais JP, Mouroux J, Molina TJ, Hofman P. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*, **2011** Feb 15, 17(4) : 827-35.
- 80-** Hofman V, Long E, Ilie M, Bonnetaud C, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Mourad N, Butori C, Selva E, Marquette CH, Poudenx M, Sibon S, Kelhef S, Vénissac N, Jais JP, Mouroux J, Molina TJ, Vielh P, Hofman P. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer*, **2011** Oct 1, 129(7) : 1651-60.
- 81-** Hofman VJ, Ilie MI, Bonnetaud C, Selva E, Long E, Molina T, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Butori C, Mourad N, Poudenx M, Bahadoran P, Sibon S, Guevara N, Santini J, Vénissac N, Mouroux J, Vielh P, Hofman PM. Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method: promises and pitfalls. *Am J Clin Pathol*, **2011** Jan, 135(1) : 146-56.
- 82-** Hu J, Mao Y, White K. Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada. *Occup Med*, **2002**, 52 : 157-64.
- 83-** Hudes G ; M. CarducciP. Tomczak ; J. Dutcher ; R. Figlin ; Al.Kapoor ;E. Staroslawska ; J. Sosman ;D. McDermott; I. Bodrogi; Z. Kovacevic; V. Lesovoy; IGH. Schmidt-Wolf; O. Barbarash; E. Gokmen; T. O’Toole; S. Lustgarten; L. Moore; and RJ. Motzer. Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, **2007**, 356: 2271-81.
- |-
- 84-** Igarashi H, Esumi M, Ishida H, and Okada K. Vascular endothelial growth factor overexpression is correlated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inactivation in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer*, **2002**, 95: 47-53.
- 85-** Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG. Tumor suppression by the human von-Hippel Lindau gene product. *Nat Med*, **1995**, 1: 822-6.

- 86- Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wei, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J., and Lerman, M. I. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**, 95: 12596–12601.

-J-

- 87- Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res*, **1988**,16(23) : 10953-71.
- 88- Jiang WG, Martin TA, Mansel RE. Molecular detection of micrometastasis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2002**, 43: 13–31.

-K-

- 89- Kaelin Jr. WG. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer*, **2002**, 2: 673-82.
- 90- Kanno H, Shuin T, Kondo K, Ito S, Hosaka M, Torigoe S, Fujii S, Tanaka Y, Yamamoto I, Kim I, Yao M. Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease: analysis of five Japanese families. *Jpn J Cancer Res*, **1996**, 87: 423–428.
- 91- Kanno H, Shuin T, Kondo K, Yamamoto I, Ito S, Shinonaga M, Yoshida M, Yao M. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and loss of heterozygosity on chromosome 3p in human glial tumors. *Cancer Res*, **1997** Mar 15, 57(6): 1035-8 .
- 92- Kessler PM, Vasavada SP, Rackley RR, Stackhouse T, Duh FM, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Williams BR. Expression of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene, VHL, in human fetal kidney and during mouse embryogenesis. *Mol Med*, **1995**, 1(4): 457–466.
- 93- Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WGJ. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to elongin B and C. *Science*, **1995**, 269: 1444–1446.
- 94- Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, **1995**, 386: 761-3.
- 95- Kishida T, Stackhouse TM, Chen F, Lerman MI, Zbar B. Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res*, **1995** Oct 15, 55(20) : 4544-8.
- 96- Knebelmann B, Ananth S, Cohen H, Sukhatme V. Transforming growth factor α is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res*, **1998**, 58: 226-31.
- 97- Knudson AG Jr, Strong LC, Anderson DE. Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet*, **1973**, 9: 113-158.

- 98-** Kohn EC, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*, **1995** May 1, 55(9): 1856-62.
- 99-** Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell*, **2002**, 1(3): 237-46.
- 100-** Kondo K, Yao M, Yoshida M, Kishida T, Shuin T, Miura T, Moriyama M, Kobayashi K, Sakai N, Kaneko S, Kawakami S, Baba M, Nakaigawa N, Nagashima Y, Nakatani Y, Hosaka M. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer*, **2002** May, 34(1) : 58-68.
- 101-** Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Störkel S, Van Den Berg E, Zbar B. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol*, **1997**, 183(2) : 131-3.
- 102-** Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, Ward TH, Backen A, Clack G, Hughes A, Ranson M, Blackhall FH, Dive C. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *J Thorac Oncol* **2011** Dec 14.
- 103-** Kurban G, Hudon V, Duplan E, Ohh M, Pause A. Characterisation of a von Hippel-Lindau pathway involved in extra cellular matrix remodeling, cell invasion and angiogenesis. *Cancer Res*, **2006**, 66(3) : 1313-9.
- 104-** Kuroda N, Shiotsu T, Kawada C, Shuin T, Hes O, Michal M, Ohe C, Mikami S, Pan CC. Clear cell papillary renal cell carcinoma and clear cell renal cell carcinoma arising in acquired cystic disease of the kidney: an immunohistochemical and genetic study. *Ann Diagn Pathol*, **2011** Aug, 15(4): 282-5.
- 105-** Kuzmin I, Duh FM, Latif F, Geil L, Zbar B, Lerman MI. Identification of the promotor of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Oncogene*, **1995**, 10(11): 2185-94.
- L-**
- 106-** La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, Franceschi S. Smoking and renal cell carcinoma. *cancer Res*, **1990**, 50: 5231-5233.
- 107-** Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, **1993**, 260(5112): 1317-20.
- 108-** Lauzier MC, Michaud MD, Déry MA, Richard DE. Activation de HIF1 dans le cancer : implications et conséquences. *Bull Cancer*, **2006**, 93 : 349-56.

- 109-** Lechevallier E, André M, Barriol D, Daniel L, Eghazarian C, De Fromont M, Rossi D, Coulange C. Fine-needle percutaneous biopsy of renal masses with helical guidance. *Radiology*, **2000**, 216 : 506-10.
- 110-** Lee S, Chen DY, Humphrey JS, Gnarr JR, Linehan WM, Klausner RD. Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**, 93, 1770-1775.
- 111-** Lee S, Nakamura E, Yang H, Wei W, Linggi MS, Sajan MP, Farese RV, Freeman RS, Carter BD, Kaelin WG Jr, Schlisio S. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes : developmental culling and cancer. *Cancer Cell*, **2005**, 8 :155-67.
- 112-** Linehan WM, Grubb RL, Coleman JA, Zbar B, Walther MM. The genetic basis of cancer of kidney cancer: implications for gene-specific clinical management. *BJU Int*, **2005** Mar 95, Suppl 2:2-7.
- 113-** Linehan WM, Pinto PA, Srinivasan R, Merino M, Choyke P, Choyke L, Coleman J, Toro J, Glenn G, Vocke C, Zbar B, Schmidt LS, Bottaro D, Neckers L. Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clin Cancer Res*, **2007** Jan 15, 13(2 Pt 2):671s-679s.
- 114-** Lutz MS, Burk RD. Primary cilium formation requires von Hippel Lindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res*, **2006**, 66: 6903-7.
- 115-** Luzzi V, Holtschlag V, Watson MA. Expression profiling of ductal carcinoma in situ by laser capture microdissection and high-density oligonucleotide arrays. *Am J Pathol*, **2001** Jun, 158(6): 2005-10.

-M-

- 116-** Maalej M. *Cancérologie Pratique*. Collection M/ Sciences Médicales **1999**.
- 117-** Mahabir S, Leitzmann MF, Pietinen P, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR. Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers. *Int J Cancer*, **2004**, 108(4): 600-5.
- 118-** Maher ER, Webster AR, Richards FM, Green JS, Crossey PA, Payne SJ, Moore AT. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J Med Genet*, **1996** Apr, 33(4): 328-32.
- 119-** Malaker H, Malaker B. Kidney cancer among leather workers. *Lancet*, **1984**, 1: 56–57.
- 120-** Malmgren RA, Pruitt JC, Del Vecchio PR, Potter JF. A method for the cytologic detection of tumor cells in whole blood. *J Natl Cancer Inst*, **1958**, 20(6) : 1203-13.
- 121-** Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*, **2001**, 97: 3658—61.

- 122-** Mans D, Lolkema M, Van Noort M, Van Beest I, Voest E, Giles R. The von Hippel Lindau tumor suppressor regulates primary cilia through kinesin-2 interaction. 7th international Symposium on VHL and hereditary kidney cancers. London, Ontario, **2006**, October 26-28.
- 123-** Manski TJ, Heffner DK, Glenn GM, Patronas NJ, Pikus AT, Katz D, Lebovics R, Sledjeski K, Choyke PL, Zbar B, Linehan WM, Oldfield EH. Endolymphatic sac tumors. A source of hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA*, **1997**, 277(18) : 1461-6.
- 124-** Maranchie JK, Afonso A, Albert PS, Kalyandrug S, Phillips JL, Zhou S, Peterson J, Ghadimi BM, Hurley K, Riss J, Vasselli JR, Ried T, Zbar B, Choyke P, Walther MM, Klausner RD, Linehan WM. Solid renal tumor severity in von Hippel-Lindau disease is related to germline deletion length and location. *Hum Mutat*, **2004**, 23: 40–6.
- 125-** Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Global increase in kidney cancer incidence, 1973-1992. *Eur J Cancer Prev*, **2002**, 11: 171-8.
- 126-** Mattioli S, Truffelli D, Baldasseroni A, Risi A, Marchesini B, Giacomini C, Bacchini P, Violante FS, Buiatti E. Occupational risk factors for renal cell cancer: a case-control study in northern Italy. *J. Occup. Environ. Med*, **2002**, 44 : 1028-36.
- 127-** Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, and Ratcliffe PJ. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **1999** May 20, 399 (6733): 271-5.
- 128-** Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol*, **2001**, 159: 17–20.
- 129-** Méjean A, André M, Doublet JD, Fendler JP, De Fromont M, Hélénon O, Lang H, Négrier S, Patard JJ, Piéchaud T. Tumeurs du rein. *Progrès en Urologie*, **2004**, 1402: 997-1036.
- 130-** Méjean A, Hopirtean V, Bazin JP, Larousserie F, Benoit H, Chrétien Y, Thiounn N, Dufour B. Prognostic factors for survival of patients with papillary renal cell carcinoma: meaning of histological typing and multifocality. *J Urol*, **2003**, 170: 764-7.
- 131-** Menezes RJ, Tomlinson G, Kreiger N. Physical activity and risk of renal cell carcinoma. *Int J Cancer*, **2003**, 107 : 642-6.
- 132-** Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin Jr WG, Pavletich NP. Structure of an hif-1 α -pvhl complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, **2002** Jun7, 296 (5574) : 1886-9.
- 133-** Mocellin S, Keilholz U, Rossi C.R, Nitti D. Circulating tumor cells: the "leukemic phase" of solid cancers, *Trends Mol. Med*, **2006**, 12, 130-139.

- 134-** Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sre´ter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, **2001**, 7: 4080 – 5.
- 135-** Moreno JG, O’Hara SM, Gross S, et al. Changes in circulating carcinoma cells in metastatic prostate cancer patients correlates with disease status. *Urology*, **2001**, 58: 386 –92.
- 136-** Morettin L.B, Kumar R. Small renal carcinoma with large retroperitoneal hemorrhage: diagnostic considerations. *Urol Radiol*, **1981**, 3: 143-145.
- 137-** Moss TJ, To LB, Pantel K. Evaluation of grafts for occult tumor cells. *J Hematother*, **1994**, 3: 163– 4.
- 138-** Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **1996**, 335(12) : 865-75.
- 139-** Mucci LA, Lindblad P, Steineck G, Adami HO. Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int J Cancer*, **2004**, 109: 774-76.

-N-

- 140-** Nabar BV. A study in isolating circulating cancer cells from blood. *J clin Path*, **1962**, 15: 380.
- 141-** Nese N, Paner GP, Mallin K, Ritchey J, Stewart A, Amin MB. Renal cell carcinoma: assessment of key pathologic prognostic parameters and patients characteristics in 47909 cases using the National Cancer Data Base. *Annals of Diagnostic Pathology*, **2009**, 13: 1-8.
- 142-** Neumann HPH, Zbar B. Renal cysts, renal cancer and von Hippel-Lindau disease. *Kidney Int*, **1997**, 51: 16-26.
- 143-** Neuzillet Y, Lechevallier E, Andre M, Daniel L, Coulange C. Accuracy and clinical role of fine needle percutaneous biopsy with computerized tomography guidance of small (less than 4.0 cm) renal masses. *J Urol*, **2004**, 171 : 1802-5.
- 144-** Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Mukeria A, Holcatova I, Schmidt LS, Toro JR, Karami S, Hung R, Gerard GF, Linehan WM, Merino M, Zbar B, Boffetta P, Brennan P, Rothman N, Chow WH, Waldman FM, Moore LE. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res*, **2008** Aug 1, 14(15) : 4726-34.
- 145-** Nicodemus KK, Sweeney C, Folsom AR. Evaluation of dietary, medical and lifestyle risk factors for incident kidney cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer*, **2004**, 108(1): 115-21.

-O-

- 146-** O'Hara SM, Moreno JG, Zweitzig DR, Gross S, Gomella LG, Terstappen LW. Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormonerefractory prostate cancer. *Clin Chem*, **2004**, 50: 826–35.
- 147-** Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG Jr, Iliopoulos O. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell*, **1998**, 1: 959-68.
- 148-** Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, Hashimoto M, Takuwa T, Kondo N, Hasegawa S. Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients. *Ann Thorac Surg*, **2009**, 87: 1669–75.

-P-

- 149-** Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, **2008**, 8: 329–40.
- 150-** Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, **2004**, 4: 448–56.
- 151-** Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anticancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, **2005**, 1756: 53–64.
- 152-** Parker AS, Cerhan JR, Lynch CF, Leibovich BC, Cantor KP. History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol*, **2004**, 159(1) : 42-8.
- 153-** Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **2006**, 12(24) : 7215-20.
- 154-** Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*, **2007**, 18; 253(2): 180-204.
- 155-** Pause A, Lee S, Lonergan KM, Klausner RD. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95(3) : 993-8.
- 156-** Pause, A., Lee, S., Worrell, R., Chen, D. Y. T., Burgess, W. H., Linehan, W. M., and Klausner, R. D. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**, 94: 2156–2161.
- 157-** Pazour GJ. Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, **2004**, 10 : 2528-36.

- 158-** 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 patients. *Clin Cancer Res*, **2004** Feb 15, 10(4): 1392-400.
- 159-** Pool EH, and Dunlop GR. Cancer Cells in the Blood Stream. *Am J Cancer*, **1934**, 21: 99.
- 160-** Prewett M, Rothman M, Waksal H, Feldman M, Bander NH, Hicklin DJ. Mousse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor anti-body C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res*, **1998**, 4: 2957-66.

-R-

- 161-** Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**, 95: 4589–94.
- 162-** Richard S, Chauveau D, Chrétien Y, Beigelman C, Denys A, Fendler JP, Fromont G, Paraf F, Hélénon O, Nizard S, et al. Renal lesions and pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease . *Adv Nephrol Necker Hosp*, **1994**, 23: 1-27.
- 163-** Richard S, French VHL Study Group. von Hippel-Lindau disease: recent advances and therapeutic perspectives. *Expert Rev Anticancer Ther*, **2003**, 3(2) : 215-33.
- 164-** Richard S, Ladroue C, Gad S, Giraud S, Gardie B. Genetics and angiogenesis: the example of von Hippel-Lindau disease. *Bull Cancer*, **2007**, 94(spec) :S170-9.
- 165-** Richard S, Parker F, Aghakhani N, Allegre G, Portier F, David P, Marsot-Dupuch K. Maladie de Von Hippel-Lindau: Progrés Génétiques et Cliniques Récents. *J Neuroradiol*, **2005**, 32: 157-167.
- 166-** Richards FM, Schofield PN, Fleming S, Maher ER. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet*, **1996**, 5(5) : 639-44.
- 167-** Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*, **2008**, 123(9) : 1991-2006.
- 168-** Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol*, **2004**, 5(2) : 79–88.
- 169-** Rini BI, Rathmell WK. Biological aspects and binding strategies of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **2007**, 13(2 Pt 2) : 741s-6s.
- 170-** Roberts S, Watne A, McGrath R, McGrew E, Cole WH. Technique and results of isolation of cancer cells from the circulating blood. *AMA Arch Surg*, **1958**, 76(3) : 334-46.

- 171-** Rocha JC, Silva RL, Mendonça BB, Marui S, Simpson AJ, Camargo AA. High frequency of novel germline mutations in the VHL gene in the heterogeneous population of Brazil. *J Med Genet*, **2003** Mar, 40(3): e31.
- 172-** Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE and Sweet D. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunohistochemical and clonogenic assay techniques. *Blood*, **1993**, 82: 2605–10.
- S-**
- 173-** Sandberg AA, Moore GE. Examination of blood for tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, **1957**, 19(1) : 1-11.
- 174-** Sato H. Cancer cells in the circulating blood, with reference to cancer metastasis. *Bull World Health Organ*, **1962**, 26: 675-81.
- 175-** Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U. F., Feltis, J. T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C. J. M., Walther, M. M., Tsui, L. C., Geil, L., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Lipan, J., Slife, L., Brauch, H., Decker, J., Niehans, G., Hughson, M. D., Moch, H., Stoerckel, S., Lerman, M. I., Linehan, W. M., and Zbar, B. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet*, **1997**, 16: 68–73.
- 176-** Schmidt, L., Junker, K., Nakaigawa, N., Kinjerski, T., Weirich, G., Miller, M., Lubensky, I., Neumann, H. P. H., Brauch, H., Decker, J., Vocke, C., Brown, J. A., Jenkins, R., Richard, S., Bergerheim, U., Gerrard, B., Dean, M., Linehan, W. M., and Zbar, B. Novel mutations in the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene*, **1999**, 18: 2343–2350.
- 177-** Schuler F, Dolken G. Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR. *Clin Chim Acta*, **2006**, 363: 147–156.
- 178-** Scialpi M, Di Maggio A, Midiri M, Loperfido A, Angelelli G, Rotondo A. Small renal masses : assessment of lesion characterization and vascularity on dynamic contrast-enhanced MR imaging with fat suppression. *AJR Am J Roentgenol*, **2000**, 175(3) : 751-7.
- 179-** Seal SH. Silicone flotation: a simple quantitative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood. *Cancer*, **1959**, 12(3) : 590-5.
- 180-** Sekido Y, Bader S, Latif F, Gnarr JR, Gazdar AF, Linehan WN, Zbar B, Lerman MI, Minna JD. Molecular analysis of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. *Oncogene*, **1994**, 9: 1599–1604.
- 181-** Shiao YH. Genetic signature for human risk assessment: lessons from trichloroethylene. *Environ Mol Mutagen*, **2009** Jan, 50(1): 68-77.

- 182-** Shuin T, Kondo K, Torigoe S, Kishida T, Kubota Y, Hosaka M, Nagashima Y, Kitamura H, Latif F, Zbar B, Lerman MI, Yao M. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res*, **1994**, 54(11): 2852-5.
- 183-** Siemeister, G., Weindel, K., Mohrs, K., Barleon, B., Martiny-Baron, G., and Marme, D. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal cell carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res*, **1996**, 56: 2299–2301.
- 184-** Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer*, **2006**, 94(1): 8-12.
- 185-** Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ, Meropol NJ, Weiner LM, Cohen SJ, Moreno JG, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res*, **2005**, 65(12) : 4993-7.
- 186-** Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, et al. Molecular detection of telomerase positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **1999**, 5: 971–5.
- 187-** Soussi T. Gène : VHL (von Hippel-Lindau). *Bulletin du Cancer*. Volume 87, Numéro 11, 771-2, Novembre **2000**, Gènes et Cancers.
- 188-** Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. Classification of renal cell carcinoma : Workshop n° 1. Union internationale contre le cancer (UICC) and the american joint committee on cancer (AJCC). *Cancer*, **1997**, 80(5) : 987-9.
- 189-** Straub B, Müller M, Krause H, Schrader M, Miller K. Quantitative real-time rt-PCR for detection of circulating prostate-specific antigen mRNA using sequence-specific oligonucleotide hybridization probes in prostate cancer patients. *Oncology*, **2003**, 65 Suppl 1: 12-7.
- 190-** Strijbos MH, Gratama JW, Kraan J, Lamers CH, den Bakker MA, Sleijfer S. Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises. *Br J Cancer*, 2008, 98: 1731–5.
- T-**
- 191-** Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, Rosen JM, Weinberg RA, Mani SA. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2010** Aug 31; 107(35): 15449-54.

- 192-** Thibault F, O. Rixe, J.-B. Meric, R. Renard-Penna, H. Boostan, P. Mozer, E. Comperat, F. Richard, M.-O. Bitker. Traitement néoadjuvant du cancer du rein. *Prog Urol*, **2008**, 18(4) : 256-258.
- 193-** Thornhill AR, McGrath JA, Eady RA, Braude PR, Handyside AH. . A comparison of different lysis buffers to assess allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*, **2001**, 21(6) : 490-7.
- 194-** Treuthardt C, Doerfler A, Jichlinski P. Néphrectomie par laparoscopie : aspects techniques. *Rev Med Suisse*, **2008** Dec 3, 4(182): 2636-40. <http://revue.medhyg.ch/article.php3?sid=33686#top>.

-V-

- 195-** Van den Berg A, and Buys CH. Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. *Genes Chromosomes Cancer*, **1997**, 19: 59–79.
- 196-** Van Houwelingen KP, Van Dijk BA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Schouten LJ, Gorissen HJ, Schalken JA, van den Brandt PA, Oosterwijk E. Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands cohort study. *BMC Cancer*, **2005** Jun 2, 5: 57.
- 197-** Velten M, Grosclaude P. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1978 et 2000. Réseau Français des Registres du Cancer, Francim Hôpitaux de Lyon, INSERM, Institut de Veille Sanitaire. Octobre **2003**. www.invs-sante.fr
- 198-** Vona G, Bérout C, Benachi A, Quenette A, Bonnefont JP, Romana S, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Bréchet P. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am J Pathol*, **2002**, 160(1) : 51-8.
- 199-** Vona G, Estepa L, Bérout C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, Mineur A, Franco D, Lacour B, Pol S, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology*, **2004**, 39(3) : 792-797.
- 200-** Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, **2000**, 156(1): 57-63.

-W-

- 201-** Wang GL, Jiang B-H, Rue EA et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**, 92 : 5510-5514.

- 202-** Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, **1993**, 268 : 21513-21518.
- 203-** Wang ZP, Eisenberger MA, Carducci MA, Partin AW, Scher HI, Ts'o PO. Identification and characterization of circulating prostate carcinoma cells. *Cancer*, **2000** Jun 15, 88(12): 2787-95.
- 204-** Wells GM, Schroth W, Brauch H, Ross EA. Bilateral renal-cell carcinoma associated with an acquired VHL mutation and long-term trichloroethylene exposure. *Clin Nephrol*, **2009** Jun, 71(6): 708-13.
- 205-** Wen-Chung Wang, Hui-Ju Chen, Yu-Hua Tseng, Yen-Chein Lai. Identification of Somatic Mutations in the von Hippel–Lindau (VHL) Gene in a Patient with Renal Cell Carcinoma. *J Formos Med Assoc*, **2009**, 108(11): 886–893.
- 206-** Whaley JM, Naglich J, Gelbert L, Hsia YE, Lamiell JM, Green JS, Collins D, Neumann HP, Laidlaw J, Li FP, Klein-szanto AJP, Seizinger BR, Kley N. Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am J Hum Genet*, **1994**, 55: 1092-1102.
- 207-** Wheeler P.R, Burkitt H.G, Stevens A, Lowe J.S. Anatomie pathologique générale et spéciale- Manuel et atlas **1992**- 2^{ème} édition.
- 208-** Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C, Donohue J, Suman VJ, Harrington D, Torre-Bueno J, Bauer KD. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res*, **2002** May, 8(5): 1085-91.
- 209-** Wizigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Upregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastoma. *Cancer Res*, **1995**, 55: 1358-1364.

-Y-

- 210-** Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*, **2003**, 349(5) : 427-34.
- 211-** Yu MC, Mack TM, Hanisch R, Cicioni C, Henderson BE. Cigarette smoking, obesity, diuretic use and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **1986**, 77: 351.

-Z-

- 212-** Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, Crossey PA, Webster AR, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Brauch H, Glavac D, Neumann HP, Tisherman S, Mulvihill JJ, Gross DJ, Shuin T, Whaley J, Seizinger B, Kley N, Olschwang S, Boisson C, Richard S, Lips CH and Lerman M. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe and Japan. *Hum Mutat*, **1996**, 8: 348-57.
- 213-** Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1992**, 89(13) : 5847-51.
- 214-** Zhang Y, Cantor KP, Lynch CF, Zheng T. A population-based case-control study of occupation and renal cell carcinoma risk in Iowa. *J Occup Environ Med*, **2004**, 46: 235-40.
- 215-** Zhuang Z, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Gnarr J, Linehan WM, Liotta LA, Lubensky IA. Von Hippel-Lindau disease gene deletion detected in microdissected sporadic human colon carcinoma specimens. *Hum Pathol*, **1996**, 27: 152-156.
- 216-** Zhuang Z, Gnarr JR, Dudley CF, Zbar B, Linehan WM, Lubensky IA. Detection of von Hippel-Lindau disease gene mutations in paraffin-embedded sporadic renal cell carcinoma specimens. *Mod Pathol*, **1996** Aug, 9(8): 838-42.
- 217-** Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2005**, 42: 155–196.