



Expansion ex vivo des Cellules Tumorales Circulantes comme modele de pharmacologie predictive des cancers

Jessica Groult

► To cite this version:

Jessica Groult. Expansion ex vivo des Cellules Tumorales Circulantes comme modele de pharmacologie predictive des cancers. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS236 . tel-02441343

HAL Id: tel-02441343

<https://theses.hal.science/tel-02441343>

Submitted on 15 Jan 2020

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.

Expansion *ex vivo* des Cellules Tumorales Circulantes comme modèle de pharmacologie prédictive des cancers

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Hôpital Paul Brousse et à ScreenCell

École doctorale n°582 **Cancérologie : biologie - médecine - santé
(CBMS)**

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 20 Septembre 2019, par

Jessica Groult

Composition du Jury :

Pr Armand BENSUSSAN
Hôpital Saint Louis (Inserm U976)

Président

Dr Catherine ALIX-PANABIERES
CHU et Université de Montpellier (LCCRH)

Rapporteur

Dr Émilie MAMESSIER
CRCM (Inserm U1068, UMR 7258, UM105)

Rapporteur

Pr Jean-Marc LACORTE
Hôpital Pitié-Salpêtrière

Examineur

Dr Georges UZAN
Hôpital Paul Brousse (Inserm U1197)

Directeur de thèse

Pr Céleste LEBBE
Hôpital Saint-Louis (Inserm U976)

Invité

A Rémy,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury : Mesdames **Catherine Alix-Panabières** et **Émilie Mamessier** ainsi que Messieurs **Armand Bensussan** et **Jean-Marc Lacorte**, pour m'avoir fait l'honneur de lire et de juger mon travail de thèse.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Dr **Georges Uzan** pour m'avoir encadré durant ces 4 ans et m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat. J'ai grâce à vous développé mon indépendance scientifique.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à Madame **Naoual Benali-Furet** pour m'avoir supervisé tout au long de mon projet de thèse. Ton encadrement m'a permis de mener à bien ce projet, initié pendant mon stage de fin d'étude. Tu as su m'accompagner et me soutenir tout au long de ces 4 années.

J'ai pu au cours de ces travaux rencontrer et travailler avec de nombreuses personnes passionnantes et passionnées. Je remercie notamment toute l'équipe du centre d'oncodermatologie de l'**Hôpital Saint Louis** : Pr Céleste Lebbé, Pr Samia Mourah, Matthieu Resche-Rigon, Laetitia Da Meda et Aurélie Sadoux pour leur contribution à l'accomplissement de ce travail. Je remercie également toute l'équipe d'**IMSTAR** : Madame et Monsieur Soussaline ainsi que Charles Hosmy. Ainsi que l'unité **Inserm U1197** et notamment : Richard Proust pour son aide au FACS et au confocal et Anne-Charlotte Ponsen pour sa grande expertise *in vivo*.

Je fini par remercier toute l'équipe **ScreenCell** sans qui tout cela n'aurait pas pu être possible. Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur David Znaty pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de sa société. Je tiens également à remercier chaleureusement et individuellement chacun des membres de l'équipe : Dr Janine Wechsler, Claude Chemla, Philippe Bouttin, Cyril Marghieri, Cécile Aucant et Lydie Azoulay. Ainsi que toute l'équipe R&D : Anaëlle Znaty, Fanny De Tores et Dr Fei Ye. C'est aussi grâce à vous si j'en suis arrivée jusque-là. Merci pour tout votre soutien

Issue d'une formation en école d'ingénieur (Sup'Biotech Paris), j'ai réalisé mon stage de fin d'étude en cinquième année au sein de la société ScreenCell où j'ai pu découvrir tout le potentiel de l'analyse des cellules tumorales circulantes. J'ai souhaité poursuivre par une formation doctorale qui me permettrait d'une part d'approfondir mes connaissances fondamentales en cancérologie et d'autre part de contribuer au développement d'un outil prometteur et directement applicable à la recherche clinique. L'opportunité de réaliser une thèse CIFRE, avec un aspect recherche appliquée en entreprise et un aspect recherche fondamentale dans le secteur académique me correspondait.

Le projet de recherche que j'ai eu la chance de rejoindre avait pour objectif initial d'aboutir à une avancée dans la prise en charge du cancer, en définissant un ensemble de critères permettant de prendre des décisions thérapeutiques pertinentes, adaptées à chaque patient et d'évaluer l'efficacité des traitements ainsi que le suivi après traitement. Ce projet est financé partiellement par deux PME innovantes et pour le reste par la région Ile de France et la ville de Paris, dans le cadre des appels d'offres FUI.

Les Cellules Tumorales Circulantes (CTC) seront donc au centre de ce projet scientifique et constitueront la partie principale de ce manuscrit de thèse.

Ce projet, appelé EXPEVIVO2-CTC, est centré sur le mélanome. Il s'agit du cancer dont la fréquence augmente le plus rapidement ces dernières années en raison de son haut risque métastatique et qui bénéficie de progrès thérapeutiques récents. Il est moins accessible que les cancers épithéliaux aux techniques courantes de détection des CTC et fait donc l'objet d'un nombre d'études plus réduit. Néanmoins, l'émergence des thérapies ciblées dans ce cancer a accéléré et rendu indispensable la mise au point de marqueurs plus spécifiques et plus sensibles pour la surveillance des patients. C'est la raison pour laquelle les CTC constituent un axe de recherche très actif avec de nombreux essais cliniques incluant ces cellules comme biomarqueurs. Ces essais apportent progressivement des renseignements importants sur le risque de récurrence ou de progression métastatique et ont pour objectif d'étudier en temps réel l'efficacité de la conduite thérapeutique mise en place.

La collaboration au sein d'un même projet de recherche d'équipes industrielles (ScreenCell et IMSTAR), académiques (INSERM U1197 et U976) et hospitalière (Centre d'oncodermatologie de l'Hôpital Saint Louis) fut très enrichissante au niveau scientifique, professionnel et personnel et a conduit à l'aboutissement de ce travail.

Table des matières

Remerciements	4
Préambule.....	5
Table des matières	7
Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	13
Liste des Abréviations	14
 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	 15
 Chapitre I La biologie du cancer.....	 16
1. Épidémiologie	16
2. Progression tumorale.....	17
2.1. Processus angiogénique	18
2.2. Processus métastatique.....	19
3. Maladie résiduelle	21
4. Médecine de précision	22
 Chapitre II Le Mélanome	 24
1. Définition.....	24
1.1. Épidémiologie	25
1.2. Facteurs de risque	26
2. Diagnostic	30
2.1. Signes cliniques.....	30
2.2. Classification anatomo-pathologique	31
2.3. Ganglion sentinelle	33
3. Thérapies	34
3.1. Les immunothérapies	36
3.2. Les thérapies ciblées.....	41
3.3. Les combinaisons de thérapies.....	44

Chapitre III Les Cellules Tumorales Circulantes	47
1. Les sous-populations de cellules circulantes dans le cancer	48
1.1. Les Cellules Tumorales Circulantes	49
1.2. Les Microembolies Tumorales Circulantes	51
1.3. Les macrophages associés aux tumeurs	53
1.4. Les cellules endothéliales vasculaires associées aux tumeurs	53
2. Utilité clinique et valeur pronostique des CTC	54
2.1. Aide au diagnostic initial	54
2.2. Prédiction de la résistance aux traitements	55
2.3. Étude de la viabilité cellulaire	55
2.4. Détection et caractérisation des métastases	57
3. Méthodes d'enrichissement des CTC	57
3.1. Détection des cellules tumorales circulantes	58
3.2. Identification des cellules tumorales circulantes	60
4. Les CTC dans le mélanome	62
Chapitre IV La technologie ScreenCell®	65
1. Le principe technique	65
2. Les interfaces compatibles avec la technologie ScreenCell	67
2.1. DEPCArray™	67
2.2. droplet digital PCR (ddPCR)	68
2.3. TeloView	70
2.4. Microscopie à Force Atomique (AFM)	71
2.5. Culture <i>ex vivo</i> des CTC	72
3. Les études cliniques	72
3.1. Cancer du sein	73
3.2. Cancer de la prostate	75
3.3. Cancer colorectal	75
3.4. Cancer du poumon	76
3.5. Cancer du pancréas	78
3.6. Cancer de la vessie	80
3.7. Mélanome	80
3.8. Cancers rares	81
OBJECTIFS DE LA THESE	84

RESULTATS EXPERIMENTAUX	87
Chapitre I Étude Cytologique et valeur pronostique des CTC	88
1. Contexte	88
2. Matériels et Méthodes.....	91
2.1. Outils statistiques	91
2.2. Méthode d'isolement des CTC.....	92
2.3. Lecture cytologique et compte des CTC	93
3. Résultats.....	93
3.1. Descriptif clinique de la cohorte.....	93
3.2. Résultats cytologiques	95
3.3. Résultats phénotypiques	101
4. Discussion	104
5. Annexes.....	108
Chapitre II Analyse semi-automatisée des CTC	109
1. Contexte	109
2. Matériels et Méthodes.....	110
2.1. Isolement des CTC	110
2.2. Système automatisé Pathfinder™ CTC Mélanome	111
3. Résultats.....	113
3.1. Digitalisation des SI par scanning semi-automatisée.....	113
3.2. Analyse semi-automatisée des CTC et des CTM du mélanome.....	114
3.3. Validation des galeries d'images de CTC et de CTM de mélanome	116
4. Discussion	120
5. Annexes.....	122
5.1. Abstract 1.....	122
5.2. Poster 1.....	124
Chapitre III Expansion <i>ex vivo</i> des CTC.....	125
1. Contexte	125
2. Matériels et Méthodes.....	127
2.1. Méthode d'isolement des CTC.....	127
2.2. Mise en culture des CTC	128
3. Résultats.....	131
3.1. Culture 3D avec Biomimesys	131
3.2. Culture 3D avec ScreenCell	136

4. Discussion	145
5. Annexes	146
5.1. Abstract 2.....	146
5.2. Poster 2.....	149
5.3. Abstract 3.....	150
5.4. Poster 3.....	152

Chapitre IV | Analyse Moléculaire des CTC 153

1. Contexte	153
2. Matériels & Méthodes	154
2.1. Méthode d'isolement des CTC.....	154
2.2. Analyse moléculaire.....	155
3. Résultats.....	157
3.1. Analyse de la mutation BRAF par ddPCR	157
3.2. Analyse d'un panel de gènes spécifiques du mélanome par NGS	160
4. Discussion	162

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES 164

1. Les diagnostics de médecine de précision en oncodermatologie	165
1.1. Caractérisation cytologique	165
1.2. Caractérisation immunologique	166
1.3. Caractérisation moléculaire.....	166
2. Compréhension du processus métastatique.....	168
2.1. Modèle <i>ex vivo</i>	168
2.2. Modèle <i>in vivo</i>	169
3. Évaluation de nouveaux biomarqueurs sur les CTC.....	169
3.1. PD-L1.....	169
3.2. Le complexe eIF4F	171
4. La valeur clinique des CTC	172
4.1. Mélanome.....	172
4.2. Autre cancer : le cancer du sein.....	173

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 174

Liste des Figures

FIGURE 1 NOMBRE DE NOUVEAU CAS DE CANCER LIES AU MODE DE VIE ET A L'ENVIRONNEMENT	16
FIGURE 2 PROCESSUS ANGIOGENIQUE	18
FIGURE 3 TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE	20
FIGURE 4 LE PROCESSUS METASTATIQUE	21
FIGURE 5 REPRESENTATION D'UNE COUPE DE TISSUS DE PEAU NORMALE	24
FIGURE 6 MELANOME CUTANE : TAUX DE SURVIE A 5 ANS EN FONCTION DES STADES.....	25
FIGURE 7 NOUVEAUX GENES DE PREDISPOSITION DU MELANOME	28
FIGURE 8 ÉMISSION DES RAYONNEMENTS UV	29
FIGURE 9 THEORIE DU GANGLION SENTINELLE	33
FIGURE 10 CHRONOLOGIE DES TRAITEMENTS APPROUVES POUR LE MELANOME	35
FIGURE 11 PRINCIPAUX CHECKPOINTS IMMUNITAIRES.....	37
FIGURE 12 THERAPIE AGISSANT AUX NIVEAUX DES INHIBITEURS DE POINT DE CONTROLE IMMUNITAIRE	37
FIGURE 13 PRINCIPE D'ACTION DES TRAITEMENTS ANTI-PD-1 ET ANTI-PD-L1.....	39
FIGURE 14 LES DIFFERENTS MODES D'ACTION DES THERAPIES CIBLEES	41
FIGURE 15 LA VOIE RAS/MAP KINASE ET LES DIFFERENTS MODES D' ACTIONS DES INHIBITEURS	42
FIGURE 16 LES DIFFERENTS ELEMENTS DE LA BIOPSIE LIQUIDE	47
FIGURE 17 LES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE LA BIOPSIE LIQUIDE	48
FIGURE 18 COMPOSITION DES MICROEMBOLES TUMORAUX CIRCULANTS	51
FIGURE 19 PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE SCREENCELL®	66
FIGURE 20 PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE DEPARRAY	67
FIGURE 21 PRINCIPE DE LA ddPCR	69
FIGURE 22 REPRESENTATION 3D DES TELOMERES AVEC TELOVIEW	70
FIGURE 23 PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE	71
FIGURE 24 PRINCIPE D'ISOLEMENT DES CTC AVEC LA TECHNOLOGIE SCREENCELL.....	92
FIGURE 25 CTC, CTM ET CAML / ML DE SANG A L'INCLUSION	97
FIGURE 26 COURBE ROC : CTC / RC+RP+STABLE, CHEZ LES PATIENTS AVEC BRAF MUTE	99
FIGURE 27 COURBE ROC : CTC / RC+RP+STABLE, CHEZ LES PATIENTS AVEC LDH SUP MED.....	100
FIGURE 28 COURBE DE SURVIE SANS PROGRESSION ESTIMEE PAR LA METHODE KAPLAN MEIER	100
FIGURE 29 CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DE PDL1.....	103
FIGURE 30 ÉVOLUTION LONGITUDINALE DES CTC ET SOUS-GROUPE POUR LE PATIENT 1071	105
FIGURE 31 PRINCIPE DE LA PLATEFORME SEMI-AUTOMATISEE POUR L'ANALYSE DES CTC	110
FIGURE 32 DISPOSITION DES AIMANTS SUR CHAQUE SUPPORT	112
FIGURE 33 AUTOMATISATION DU SCANNING ET ANALYSE QUANTITATIVE DE LA PRESENCE DE CTC	114
FIGURE 34 EXEMPLE DE DETECTION SEMI-AUTOMATISEE D'ELEMENTS ATYPIQUES	115
FIGURE 35 GALERIE DE CTC ISOLEES AVEC SCREENCELL	118

FIGURE 36 GALERIE DE CTM ISOLEES AVEC SCREENCELL	119
FIGURE 37 PRINCIPE D'ISOLEMENT DES CTC VIVANTES AVEC LE DISPOSITIF SCREENCELL CC	127
FIGURE 38 PROTOCOLE DE MISE EN CULTURE 3D DE CTC GRACE AU DISPOSITIF LCDD.....	128
FIGURE 39 PROTOCOLE CULTURE 3D DES CTC - BIOMIMESYS®	129
FIGURE 40 CULTURE 3D DES CTC – SCREENCELL	130
FIGURE 41 CULTURE 3D DE CELLULES A375 EN BASSE DENSITE	132
FIGURE 42 CARACTERISATION PAR IMMUNOFLUORESCENCE DES SPHEROÏDES OBTENUS APRES 28 JOURS DE CULTURE 3D	133
FIGURE 43 CARACTERISATION PAR CYTOMETRIE DE FLUX DES SPHEROÏDES OBTENUS APRES CULTURE 3D.....	134
FIGURE 44 CULTURE <i>EX VIVO</i> DE CTC ISOLEES DE SANG DU PATIENT 1071 ATTEINT DE MELANOME	136
FIGURE 45 CARACTERISATION CULTURE A375	137
FIGURE 46 CULTURE 3D DE CTC ISOLEES AVEC SCREENCELL	139
FIGURE 47 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CULTURE 3D AVEC SCREENCELL MB.....	140
FIGURE 48 CULTURE <i>EX VIVO</i> DE CTC ISOLEES DE PATIENT ATTEINT DE MELANOME.....	141
FIGURE 49 SOUS-POPULATION DE CTC FORMANT DES SPHEROÏDES DANS LE MATRIGEL.....	143
FIGURE 50 ISOLEMENT DES CTC POUR ANALYSE MOLECULAIRE AVEC LE DISPOSITIF SCREENCELL MB	154
FIGURE 51 PRINCIPE DE LA ddPCR – BIO RAD	155
FIGURE 52 PRINCIPE DE LA ddPCR – RAINDANCE	156
FIGURE 53 PRINCIPE DU NGS – ION TORRENT (THERMO FISHER)	156
FIGURE 54 DETECTION DE 5 ET 10 CELLULES BRAFV600E PAR ddPCR BIO RAD	158
FIGURE 55 DETECTION DE 5 ET 10 CELLULES BRAFV600E PAR ddPCR RAINDANCE	159
FIGURE 56 PANEL DES 70 MUTATIONS SPECIFIQUES DU MELANOME	160
FIGURE 57 CONTROLE DE L'ÉCHAPPEMENT IMMUNITAIRE PAR PD-L1.....	170
FIGURE 58 CONTROLE DE L'ÉCHAPPEMENT IMMUNITAIRE PAR LE BLOCAGE DU COMPLEXE EIF4F.....	171

Liste des Tableaux

TABLEAU 1 CRITERES "ABCDE".....	31
TABLEAU 2 CLASSIFICATION TNM DU MELANOME	32
TABLEAU 3 NOUVELLES THERAPIES POUR TRAITER LE MELANOME.....	36
TABLEAU 4 COMBINAISONS DE THERAPIES APPROUVEES PAR LA FDA POUR LE TRAITEMENT DU MELANOME	45
TABLEAU 5 SYNTHÈSE DES SUCCES DE CULTURE (LONG TERME) DE CTC ISOLEES DE PATIENT	56
TABLEAU 6 ÉTUDES UTILISANT LES DISPOSITIFS SCREENCELL.....	83
TABLEAU 7 DESCRIPTIF DE LA COHORTE	89
TABLEAU 8 CRITERES DES PATIENTS INCLUS DANS LA COHORTE	90
TABLEAU 9 DESCRIPTIF CLINIQUE DES PATIENTS INCLUS DANS LA COHORTE.....	94
TABLEAU 10 CLASSIFICATION TNM DES PATIENTS INCLUS DANS LA COHORTE	95
TABLEAU 11 RESULTATS ANATOMOPATHOLOGIQUES BASES SUR L'ANALYSE DES CTC	96
TABLEAU 12 ÉVALUATION TUMORALE DES PATIENTS A 6 MOIS (+/- 1 MOIS)	98
TABLEAU 13 AUC ET SEUILS BASES SUR LE NOMBRE DE CTC RAPPORTE AU VOLUME SANGUIN.....	99
TABLEAU 14 MODELES DE COX, HAZARD RATIO (HR) ET INTERVALLE DE CONFIANCE A 95 % (IC %)	101
TABLEAU 15 ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DE PD-L1 AU NIVEAU DES CTM.....	102
TABLEAU 16 RESULTATS CULTURE 3D BIOMIMESYS.....	135
TABLEAU 17 COMPOSITION MILIEU DE CULTURE CTC.....	138
TABLEAU 18 SUCCES DE CULTURE EN FONCTION DES CONDITIONS UTILISEES	143
TABLEAU 19 POURCENTAGE DE MUTANTS BRAFV600E DETECTES (BIO RAD VS RAIN DANCE).....	159
TABLEAU 20 ANALYSE NGS SEQUENTIELLE DE CTC ISOLEES DE 4 PATIENTS ATTEINTS DE MELANOME.....	161

Liste des Abréviations

ACC <i>Adrenocortical Carcinoma</i>	HA <i>Hyaluronic Acide</i>
ADNtc <i>ADN tumoral circulant</i>	HAS <i>Haute Autorité de Santé</i>
AFM <i>Atomic Force Microscope</i>	HER2 <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
AJCC <i>American Joint Committee on Cancer</i>	HMM-MAA <i>High Molecular Weight Melanoma Associated Antibody</i>
AP-HP <i>Assistance Publique - Hopitaux de Paris</i>	HNC <i>Head and Neck Cancer</i>
ARNm <i>ARN messenger</i>	HPC <i>hémangiopericytome</i>
AT <i>AdnaTest</i>	HR <i>Hazard Ratio</i>
BC <i>Breast Cancer</i>	IARC <i>International Agency for Research on Cancer</i>
BFF <i>Bronchoscopie à fibre flexible</i>	IC <i>intervalle de confiance</i>
BMS <i>Bristol-Myers Squibb</i>	ICC <i>immunocytochimie</i>
CAML <i>Cancer Associated Macrophages-Like cell</i>	IF <i>immunofluorescence</i>
CAVE <i>Cancer Associated Vascular Endothelial cell</i>	IgG4 <i>Immunoglobuline G4</i>
CC <i>Cell Culture</i>	INCa <i>Institut National du Cancer</i>
CDK4 <i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	InVS <i>Institut de Veille Sanitaire</i>
CDKN2A <i>cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>	IRM <i>Imagerie à Résonance Magnétique</i>
CE <i>Cryothérapie Endobronchique</i>	IS <i>isolation support</i>
cfDNA <i>cell free DNA</i>	LCDD <i>live Cell Detachment Device</i>
CIN <i>chromosome instability</i>	MB <i>Molecular Biology</i>
CIRC <i>Centre International de Recherche contre le Cancer</i>	MBC <i>Metastatic Breast Cancer</i>
CK <i>cytokeratine</i>	MelCAM <i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>
CL <i>Changement de Ligne</i>	MGG <i>May Grunwald Giemsa</i>
CMH <i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>	miRNA <i>micro ARN</i>
CQ <i>Contrôle Qualité</i>	MRD <i>Minimal Residual Disease</i>
CRC <i>Colorectal Cancer</i>	NGS <i>Next Generation Sequencing</i>
CSC <i>Cellule Souche Cancéreuse</i>	Obj. <i>Objectif</i>
CTC <i>Cellules Tumorales Circulantes</i>	PCa <i>Prostate Cancer</i>
CTLA4 <i>antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques</i>	PD1 <i>Programmed cell death 1</i>
CTM <i>Circulating Tumor Microemboli</i>	PDAC <i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
ddPCR <i>droplet digital PCR</i>	PD-L1 <i>Programmed cell death ligand 1</i>
DEP <i>Dielectrophorèse</i>	RFA <i>radiofréquence ablation</i>
D-SI <i>Digital- Support d'Isolement</i>	RNAseq <i>Séquencage de l'ARN</i>
EMT <i>Transition Epithélio-Mésenchymateuse</i>	RO <i>recepteur aux oestrogènes</i>
EpCAM <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>	ROC <i>receiver operating characteristic</i>
EpEX <i>EpCAM extracellular domain</i>	RTK <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
EpICD <i>EpCAM intracellular domain</i>	SC <i>ScreenCell</i>
ET <i>Evaluation tumorale</i>	SLN <i>Sentinel Lymph Node</i>
FACS <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>	SNP <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
FDA <i>Food and Drug Administration</i>	SP <i>Side Population</i>
FFPE <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>	TCR <i>T Cell Receptor</i>
FISH <i>Fluorescence in situ Hybridisation</i>	TP53 <i>Tumor Protein 53</i>
FNA <i>Fine Needle Aspiration</i>	UICC <i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
FUI <i>Fonds Unique Interministériel</i>	UV <i>Ultra Violet</i>
Gx <i>Grossissement</i>	VEGF <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
H&E <i>Hematoxyline Eosine</i>	WGA <i>Whole Genome Amplification</i>

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La biologie du cancer	16
1. Épidémiologie	16
2. Progression tumorale	17
3. Maladie résiduelle	21
4. Médecine de précision	22
 Chapitre II : Le Mélanome	 24
1. Définition	24
2. Diagnostic	30
3. Thérapies	34
 Chapitre III : Les Cellules Tumorales Circulantes	 47
1. Les sous populations de cellules circulantes dans le cancer	48
2. Utilité clinique et valeur pronostique des CTC	54
3. Méthodes d'enrichissement des CTC	57
4. Les CTC dans le mélanome	62
 Chapitre IV : La technologie ScreenCell®	 65
1. Le principe technique	65
2. Les interfaces compatibles	67
3. Les études cliniques	72

Chapitre I | La biologie du cancer

1. Épidémiologie

En France en 2017, le cancer a concerné près de 400 000 nouveaux cas et a été la cause de plus de 150 000 décès faisant du cancer, la première cause de mortalité (Source : INCa). Les cancers de la prostate (chez l'homme), du sein (chez la femme), du côlon-rectum et du poumon sont les cancers les plus fréquents en France.

Un tiers des Français reste persuadé qu'il n'y a aucun moyen d'éviter la maladie. Or la dernière étude¹ menée par l'Institut National du Cancer (INCa) et le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC), publiée en juin 2018, confirme que chacun peut agir sur son risque de cancer grâce à des changements de comportements et d'habitudes de vie.

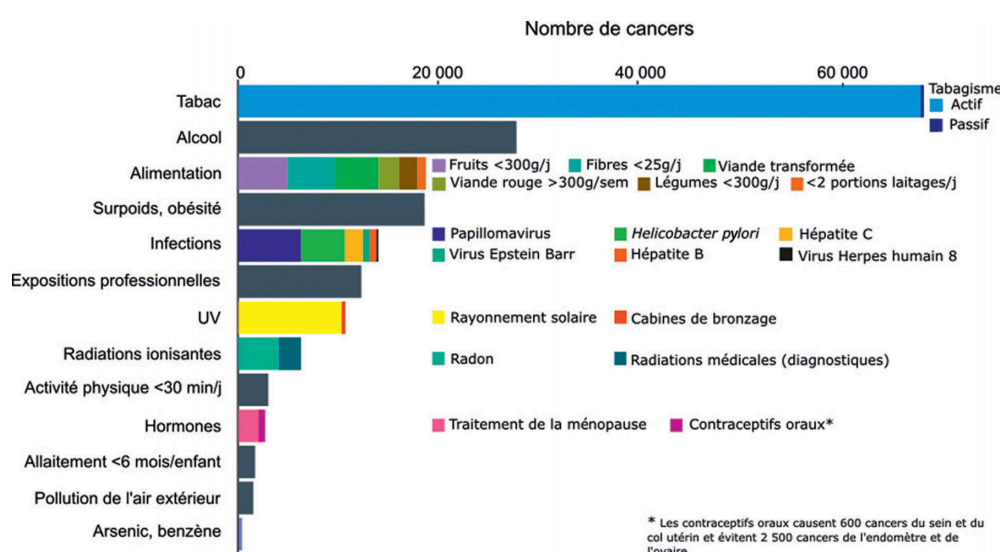


Figure 1 || Nombre de nouveau cas de cancer liés au mode de vie et à l'environnement

Étude réalisée en 2015 chez les adultes de plus de 30 ans et est arrivée à la conclusion que certains cancers pourraient être évités en modifiant nos modes de vie (arrêt du tabac, réduction de la consommation d'alcool, alimentation équilibrée, pratique d'une activité physique régulière).

¹ Disponible ici : <https://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/33-des-Francais-pensent-que-l-on-ne-peut-rien-faire-pour-eviter-un-cancer-pourtant-nous-ne-sommes-pas-impuissants-face-aux-cancers>

Cette étude a évalué qu'il était possible de prévenir 40 % des cancers grâce à l'arrêt du tabac, la réduction de l'alcool, tout en adoptant une alimentation équilibrée et en pratiquant une activité physique régulière.

De plus, l'opinion selon laquelle le cancer est héréditaire reste majoritaire dans l'esprit de la population française (61,7 % d'opinions dans ce sens). En réalité, la part de cancers résultant de facteurs, liés à la transmission d'une mutation génétique prédisposant au cancer, est estimée à moins de 10 % (Source : INCa).

Enfin, il est important de noter que des progrès considérables en termes de survie ont été faits ces dernières années², notamment dans les cancers du poumon et le mélanome, qui demeurent des cancers très agressifs à un stade avancé. Le développement de nouveaux traitements innovants (immunothérapie et thérapies ciblées) montre aujourd'hui des résultats encourageants sur des cancers, qui jusqu'à présent laissaient peu de chance de survie.

2. Progression tumorale

Au cours de la prolifération cellulaire, des mutations ponctuelles apparaissent, au moment de la réplication de l'ADN pouvant détourner certains mécanismes de contrôle, responsables de la progression tumorale. L'acquisition progressive d'un nombre croissant de mutations au sein d'un même clone va engendrer un phénotype de malignité. Ce qui va favoriser le développement tumoral, c'est d'une part la mise en place d'un processus angiogénique robuste, d'autre part la transition vers un état métastatique hautement défini.

² Rapport CIRC-INCa, *Les cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine*, juin 2018.

2.1. Processus angiogénique

Comme tous les tissus, les tumeurs doivent pour survivre et croître être alimentées en oxygène et en nutriment par le système vasculaire. La néo-angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux sanguins déjà existants.

Il s'agit d'un processus physiologique normal mais qui est détourné dans le cas d'une progression tumorale. Pour cela, les cellules tumorales émettent des facteurs de croissance (comme le VEGF) qui vont diffuser jusqu'aux vaisseaux sanguins les plus proches (Li et al. 2012) et activent des voies de signalisation (comme NOTCH) qui vont guider le développement des cellules endothéliales (Tetzlaff and Fischer 2018).

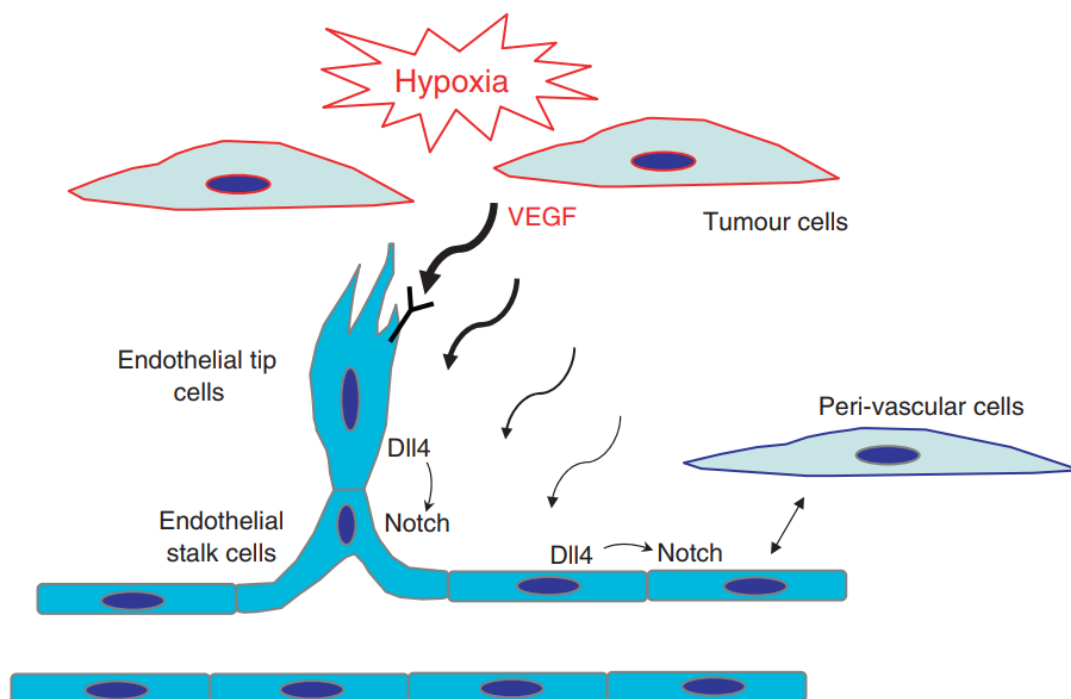


Figure 2 || Processus angiogénique

Rôle des voies VEGF et NOTCH dans l'angiogenèse et le développement tumoral. La voie Delta-Notch (en particulier DII4 et notch 1) agit sur les cellules endothéliales pour qu'elles puissent devenir réceptives au VEGF et ainsi favoriser le développement vasculaire. Source : (Thurston and Kitajewski 2008)

Le développement du phénotype angiogénique se produit en plusieurs étapes au cours du développement tumoral (voir Figure 2). Au fur et à mesure que la tumeur devient maligne, les cellules progressent d'un stade pré-vasculaire (hyperplasie normale à précoce) à un stade vasculaire (hyperplasie tardive à invasive). L'angiogenèse devient indispensable au cours de la dysplasie et est essentielle pour la croissance tumorale future.

2.2. Processus métastatique

Le développement des métastases est un processus complexe, qui est responsable de la plupart des décès liés au cancer. Depuis plusieurs années, la migration des cellules tumorales d'un site primaire aux sites secondaires, qui se fait généralement par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, constitue un axe de recherche très important. Des études cliniques ont mis en avant des facteurs pronostiques associés au risque de rechute métastatique (Vegas et al. 2012). Les CTC font partie intégrante des mécanismes par lesquels le cancer se propage à différents tissus et organes. Ce processus métastatique reste toutefois un phénomène qui peut être long. Les récives tardives chez les patients en rémissions mettent d'ailleurs en évidence le phénomène de « dormance », phénomène faisant partie intégrante du processus métastatique.

Lorsqu'il s'agit d'un carcinome, le processus métastatique s'accompagne presque toujours d'une Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT), processus biologique indispensable pour le relargage des cellules dans la circulation sanguine. L'EMT est un processus embryonnaire réactivé de manière aberrante au cours de la progression tumorale. De nombreuses voies de signalisation oncogéniques, l'hypoxie ainsi que le microenvironnement tumoral peuvent initier et favoriser l'EMT, entraînant l'acquisition par les cellules de propriétés migratrices et invasives. Ce processus est contrôlé par des facteurs de transcription comme *Snail*, *Twist* et *Zeb* (Puisieux et al, 2014) qui entraînent une méthylation (condensation de l'ADN) à l'origine de changement d'expression de certains gènes clés. De nombreuses tumeurs sont caractérisées par une EMT incomplète, dans laquelle les cellules tumorales acquièrent les caractéristiques mésenchymateuses mais conservent également en partie leur phénotype épithélial.

Dans les cellules présentant le phénotype épithélio-mésenchymateux hybride, l'E-cadhérine s'accumule dans les jonctions adhérentes qui deviennent alors moins stables que dans les cellules épithéliales normales. La participation de l'E-cadhérine à ces jonctions est essentielle pour l'efficacité de la migration collective des cellules, à l'acquisition de leur caractère invasif, ainsi qu'à leur survie au sein même des métastases. La plasticité de ce phénotype épithélio-mésenchymateux hybride améliore les capacités d'adaptation des cellules cancéreuses. En effet, l'importance de ces deux transitions inverses : épithélium-mésenchyme montre la nécessité d'une grande plasticité de la part des cellules tumorales pour pouvoir proliférer, intravaser puis extravaser de la circulation sanguine et enfin développer de nouvelles métastases.

En effet, en subissant une transition d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux, les cellules acquièrent une plasticité cellulaire les rendant beaucoup plus mobiles. Certaines de ces cellules mésenchymateuses vont acquérir des marqueurs de cellules souches qui leur permettront de devenir résistantes à la chimiothérapie et d'acquérir la capacité d'inhiber la réponse immunitaire (Figure 3).

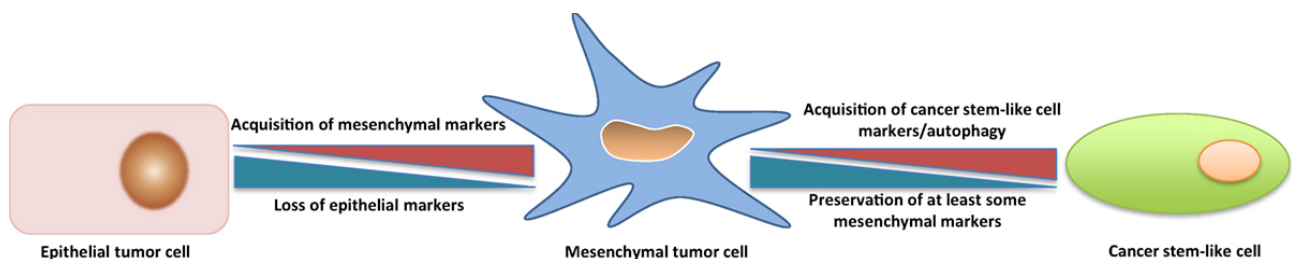


Figure 3 || **Transition Epithelio-Mésenchymateuse**

La Transition Épithélio-Mésenchymateuse est un phénomène permettant aux cellules épithéliales d'acquérir de manière réversible un phénotype mésenchymateux. Ce phénotype mésenchymateux permet aux cellules d'acquérir une nouvelle plasticité cellulaire associée à des capacités migratoires et invasives. Les cellules en transition possèdent alors un potentiel d'auto renouvellement et de différenciation ainsi qu'une résistance accrue aux traitements thérapeutiques pouvant s'apparenter à des caractéristiques de cellules souches. (Marcucci et al. 2016)

Notre compréhension actuelle de la progression métastatique provient principalement de modèles tumoraux murins. La propagation des cancers épithéliaux est aujourd'hui plus particulièrement étudiée, car ce sont les plus courants. Cette propagation de la tumeur primaire vers un ou des sites secondaires implique plusieurs étapes mises en évidence en 2011 (Hanahan and Weinberg 2011) et d'écrit en Figure 4.

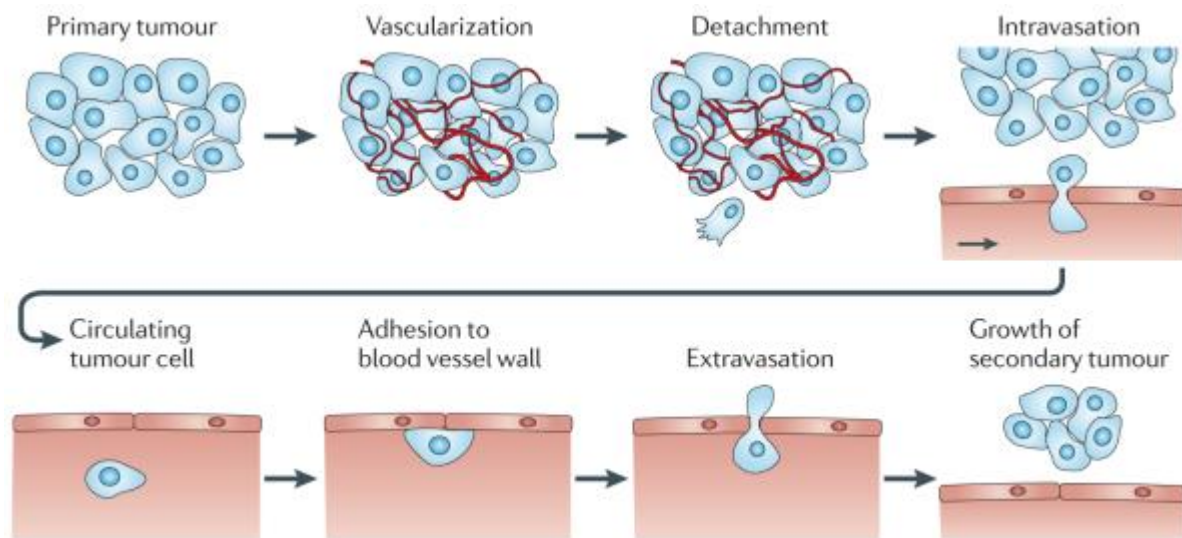


Figure 4 || Le processus métastatique

Le processus métastatique est indispensable pour permettre aux cellules de proliférer à distance. Ce processus est composé de plusieurs étapes : le détachement des cellules de la tumeur primaire, puis leur intravasation dans la circulation sanguine où elles deviennent des Cellules Tumorales Circulantes (CTC). Leur adhésion à la paroi des vaisseaux sanguins, puis leur extravasation au sein d'un nouveau tissu et la croissance d'une nouvelle tumeur. Source : (Wirtz et al. 2011)

3. Maladie résiduelle

La détection de cellules malignes résiduelles dans les tissus n'est pas toujours possible avec les techniques conventionnelles (Scanner, IRM). Cela pose un problème dans le suivi du patient après son traitement.

La maladie résiduelle minimale (Minimal Residual Disease, MRD) est le nom donné à cette population de cellules pathologiques encore présentes chez le patient à un stade donné de son traitement, autrement dit les cellules les plus résistantes aux traitements et susceptibles de provoquer une rechute métastatique ultérieure.

Effectivement, certains patients avec un traitement qui semble efficace à un stade précoce peuvent avoir des micrométastases qui vont persister après le traitement initial et qui sont en dessous du seuil de détection des techniques actuelles d'imagerie médicale. La détection et la surveillance des MRD sont bien établies et largement utilisées chez les patients atteints de néoplasmes malins hématologiques (leucémies, lymphomes), mais demeurent difficiles chez les patients présentant des tumeurs solides en raison de la difficulté à échantillonner les faibles concentrations de cellules tumorales en circulation (CTC) ou des facteurs libérés dans le sang par ces cellules cancéreuses (cfDNA, exosomes, protéines, etc.).

Le développement récent de tests sanguins de plus en plus sensibles a permis de mieux surveiller et de mieux détecter les MRD dans les cancers solides ([Pantel and Alix-Panabières 2019](#)). Ces biopsies liquides offrent plusieurs avantages : (1) elles sont moins invasives (2) elles permettent en complément de la biopsie tissulaire d'affiner le diagnostic (3) elles permettent également de suivre l'évolution de la maladie et d'anticiper une éventuelle résistance au traitement.

4. Médecine de précision

La médecine de précision se développe en oncologie à travers la recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement. Chaque cancer possède un profil génétique particulier qui nécessite un traitement personnalisé et adapté.

Des progrès scientifiques récents ont permis de mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine du développement et de la progression des cancers. Ils ont permis de mettre en place de nouveaux traitements pour les patients ne répondant plus aux traitements « classiques ».

Certains de ces nouveaux traitements ont été développés sur la découverte que le système immunitaire dispose de mécanismes pour se protéger contre le développement tumoral et que les tumeurs agressives contournent ces protections pour se développer et se propager. Le premier cancer à avoir bénéficié de la médecine de précision a été le mélanome ([voir page 36](#)) avec l'arrivée de la première immunothérapie.

D'autres traitements issus de la médecine de précision ont une action plus ciblée et prennent en compte l'hétérogénéité intratumorale de la tumeur et limite les dommages causés aux cellules saines de l'organisme. Ces traitements par thérapies ciblées ont pu être développés grâce à l'émergence des nouvelles méthodes de séquençages telles que le NGS.

À ce jour, la médecine de précision comprend 51 médicaments disponibles :

- 47 thérapies ciblées dans 19 types de cancers
- 4 immunothérapies spécifiques dans 4 types de cancers (mélanome, cancer du poumon non à petites cellules, cancer du rein et leucémie aiguë lymphoblastique).

Toutefois, les traitements par thérapies ciblées ou immunothérapies ne remplacent pas les traitements déjà en place mais viennent compléter l'arsenal thérapeutique existant. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association, avec d'autres traitements de médecine de précision, de la chimiothérapie conventionnelle ou encore de la radiothérapie.

Malheureusement, tous les patients ne répondent pas favorablement à ces thérapies (résistance primaire) et d'autres développent une résistance au cours du traitement (résistance secondaire). Compte tenu de la toxicité et du coût de ces traitements, les médecins, avec l'aide des équipes de recherche, font de plus en plus souvent appel aux biopsies liquides (prises de sang) ou aux biopsies en dynamique (prélèvements de fragments de la tumeur au fil du temps) pour comprendre comment se mettent en place ces résistances et comment les déjouer. Il est important de mieux identifier les patients qui pourront tirer les bénéfices de ces nouveaux traitements.

Chapitre II | Le Mélanome

1. Définition

Le mélanome est un cancer de la peau particulièrement agressif qui se caractérise par le développement d'une tumeur maligne au niveau de l'épiderme. La tumeur se forme à partir de la transformation néoplasique des mélanocytes. Au fur et à mesure de son évolution, les cellules malignes envahissent le derme puis peuvent conduire à la formation de différentes métastases à distance le plus souvent : pulmonaire, hépatique, ou cérébrales

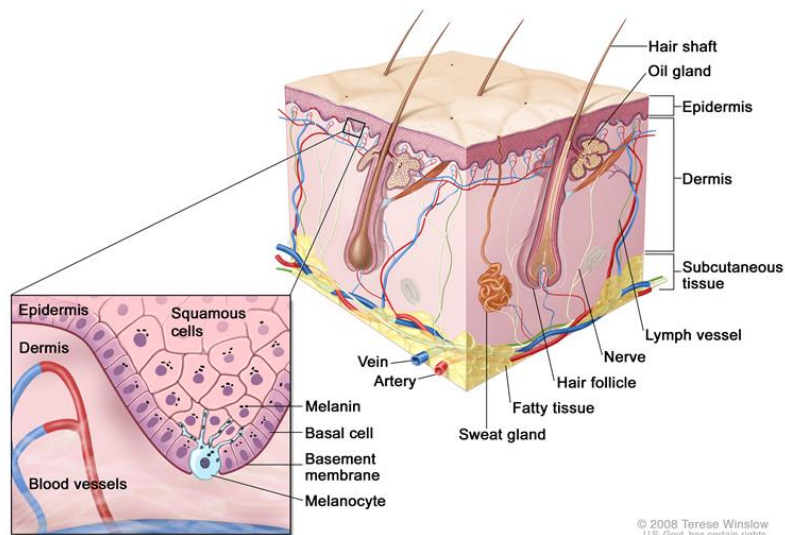


Figure 5 || Représentation d'une coupe de tissus de peau normale

La peau est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est l'enveloppe externe de la peau où sont présents les mélanocytes. Le derme, couche intermédiaire contient les fibroblastes, responsables de la production des fibres de collagène. L'hypoderme, couche la plus profonde, est constitué des cellules graisseuses, les adipocytes.

Les mélanocytes, cellules à l'origine du développement des mélanomes, sont les cellules responsables de la fabrication des pigments de mélanine et dérivent de la crête neurale. Ils sont présents dans la peau normale et servent de cellule source pour le développement du mélanome.

Bien que la majorité des mélanomes surviennent au niveau de la peau, ils peuvent également provenir de surfaces muqueuses ou d'autres sites vers lesquels les cellules de la crête neurale migrent, dont le tractus uvéal. Les mélanomes uvéaux sont significativement différents des mélanomes cutanés tant au niveau de l'incidence, des facteurs pronostiques, des caractéristiques moléculaires que des traitements. Nous ferons ici un focus sur le mélanome cutané, modèle d'étude de ce projet de thèse.

1.1. Épidémiologie

Depuis le début du 21^{ème} siècle, le mélanome demeure un cancer avec une incidence très élevée. Avec 15 404 nouveaux cas de mélanomes cutanés estimés en 2017 en France métropolitaine (8 061 hommes et 7 343 femmes) et 1 783 décès (1 036 hommes et 747 femmes), ce cancer représente près de 4 % de l'ensemble des cancers incidents et 1,2 % des décès par cancer, tous sexes confondus ([Source : INCa](#)). Les mélanomes cutanés représentent 10 % de l'ensemble des cancers de la peau. Ils surviennent principalement chez les adultes et dans plus de 70 % des cas, ils apparaissent sur une peau saine. Les mélanomes résultent de la transformation maligne d'un naevus (ou « grains de beauté ») dans seulement 20 à 30% des cas. Bien que le mélanome puisse survenir n'importe où, y compris sur les muqueuses et l'uvée, le mélanome cutané chez les femmes se manifeste le plus souvent aux extrémités et chez les hommes, le plus souvent sur le tronc ou à la tête et au cou. Alors que l'incidence de la majorité des cancers décroît, l'incidence du mélanome lui ne cesse d'augmenter. En effet, c'est l'un des cancers dont l'incidence comme la mortalité a significativement augmenté sur la période 1980-2012 ([Les cancers en France, édition 2017](#)).

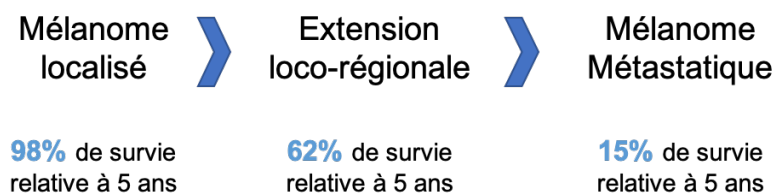


Figure 6 || Mélanome Cutané : Taux de survie à 5 ans en fonction des stades

Le mélanome reste un cancer avec un bon pronostic, s'il est diagnostiqué à temps. Le taux de survie à 5 ans reste variable : 98% si le mélanome est diagnostiqué à un stade localisé. En revanche, le taux de survie à 5 ans chute fortement à 15% dans le cas d'un mélanome métastatique. Source adaptée : www.e-cancer.fr donnée obtenue d'après le programme américain SEER.

Le mélanome cutané est un cancer de pronostic relativement favorable (Figure 6) s'il est détecté assez tôt (indice de Breslow < 1 mm et sans métastases), d'où l'importance d'un diagnostic précoce et des campagnes de sensibilisation. En effet, dans le cas d'un mélanome localisé (T1aN0M0), les chances de survie à 5 ans sont estimées à 98 % et le traitement repose alors sur une simple exérèse chirurgicale. En revanche, un diagnostic tardif réduit considérablement les chances de guérison car ce cancer possède un fort potentiel métastatique réduisant la survie à 5 ans à seulement 15% (médiane de survie entre 9 et 12 mois) (Balch et al. 2009). En France, le mélanome métastatique est responsable d'environ 1600 décès par an (1% des décès par cancer) (InVS 2009).

1.2. Facteurs de risque

Le mélanome est aujourd'hui considéré comme une maladie multifactorielle avec une interaction entre des facteurs à la fois intrinsèques (génétiques et phénotypiques) et extrinsèques (environnementaux).

1.2.1. Facteurs génétiques

La majorité des altérations génétiques de cette maladie surviennent sous forme de mutations acquises au hasard au sein des mélanocytes. Ces mutations contribuent au développement, à la progression et à l'évolution du mélanome. On estime que seulement 10 % des tumeurs correspondraient à des formes familiales héréditaires. Le mélanome est dit familial si deux ou trois patients d'une même famille sont atteints de mélanome quel que soit le niveau de parenté. L'incidence du mélanome familial est d'environ 1/66 000 et sa prévalence est inconnue.

L'étude approfondie de familles avec une forte incidence de mélanome a abouti à l'identification de deux gènes de susceptibilité (**CDKN2A** situé en 9p21, et **CDK4** situé en 12q13). Aucune modification de la lignée germinale n'est actuellement connue pour garantir le développement du mélanome.

Le principal impact de ces gènes de prédisposition reste l'augmentation du risque initial de développer un mélanome. De plus, ces gènes de prédisposition peuvent interagir directement avec d'autres gènes ou facteurs de risques environnementaux pour influencer et activer les voies de croissance du mélanome (Fargnoli et al. 2010).

Le gène le plus communément impliqué dans le mélanome familial est l'inhibiteur de kinase dépendant de la cycline 2A (**CDKN2A**). Ce gène est retrouvé dans 20 à 40% des formes familiales de mélanome (Goldstein et al. 2006).

D'autres gènes de haute pénétrance, comme **CDK4**, sont connus. Cependant, de nombreux cas de mélanomes restent inexpliqués au niveau moléculaire, même pour un grand nombre de mélanomes de forme familiale. Ceci suggère un mécanisme héréditaire polygénique probable, comprenant plusieurs allèles et modifications génétiques à faible risque individuel, ainsi que la possibilité de mutations rares dans d'autres gènes à haute pénétrance qui restent encore à découvrir. Les gènes à risque qui sous-tendent les formes de mélanome familial peuvent également être pertinents pour d'autres cancers. En effet, des regroupements familiaux de cancers autres que le mélanome ont été observé, en particulier le cancer du pancréas, et pourrait également être lié aux mutations de **CDKN2A** (Helgadottir et al. 2014).

Au cours des dernières années, les efforts de séquençage de l'ADN des cellules du mélanome ont conduit à un certain nombre de découvertes. Celles-ci comprennent la mise en évidence de voies moléculaires inconnues et la découverte de nouveaux gènes de prédisposition. Ces découvertes peuvent aider à identifier des cibles thérapeutiques moléculaires potentielles ou même servir de biomarqueurs pour suivre la progression du mélanome. Bien que l'identification de nouveaux gènes de prédisposition nous éclaire sur la complexité de la génétique du mélanome, la manière dont ces gènes influencent les phénotypes des patients n'est pas encore totalement élucidée. Les deux mutations communément trouvées dans les mélanomes et les mieux caractérisées sont **BRAFV600E** (~ 40%) et **NRASQ61** (~ 20%). Cependant, ces 2 mutations se produisent également avec des fréquences élevées dans les nævus bénins. Ce qui suppose que la mutation **BRAFV600E** à elle seule n'est pas suffisante pour induire une transformation maligne des mélanocytes. Les autres mutations qui favorisent le développement et la progression du mélanome sont par exemple : des mutations de **BAP1**, du **complexe Shelterin**, de **MITF** et de **PTEN** (Soura et al. 2016) (Figure 7).

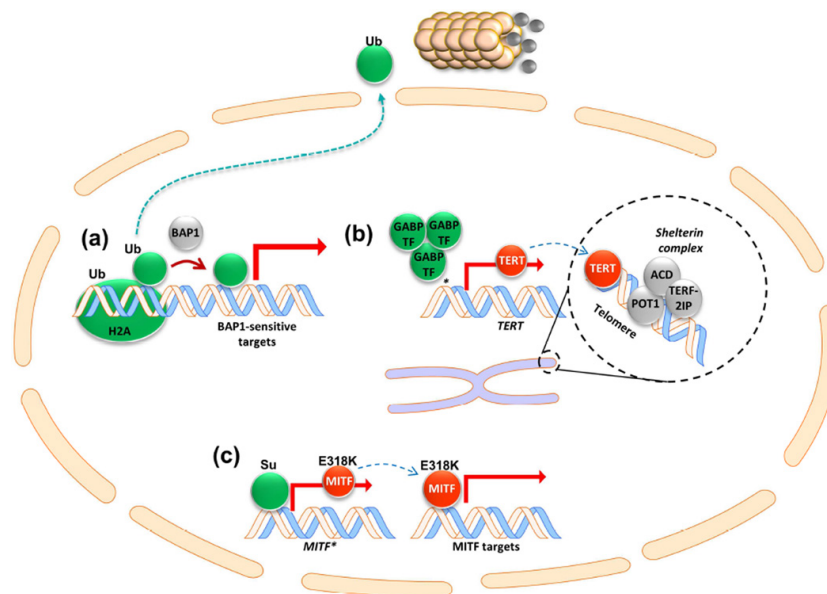


Figure 7 || Nouveaux gènes de prédisposition du mélanome

(a) **BAP1**, enzyme de déubiquitination codée par le gène **BAP1** agit comme suppresseur de tumeur sur les gènes contrôlant le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire et la réparation des dommages de l'ADN.

(b) **TERT** et le **complexe Shelterin** : leurs interactions contribuent ensemble à l'équilibre des télomères des chromosomes lors de la réplication de l'ADN.

(c) **MITF**, l'identification de la mutation **E318K** entraînerait une hyposumoylation. **MITF** hyposumoylée empêcherait l'adaptation des cellules au stress et induirait une transformation cellulaire. Source : (Soura et al. 2016)

Davantage d'études épidémiologiques, cliniques et génétiques sont nécessaires pour bien comprendre la manière dont ces modifications génétiques sont héritées, le rôle des facteurs environnementaux dans la pénétrance de ces gènes, l'influence des interactions gène-gène et l'importance de ces gènes dans le pronostic du patient. Ces études pourraient également aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du mélanome.

1.2.2. Facteurs environnementaux

Concernant les facteurs environnementaux jouant un rôle dans le développement des mélanomes, le plus important reste l'exposition au soleil. En effet, selon l'IARC, près de 70% des mélanomes cutanés seraient dus à l'exposition aux rayons ultra-violet (UV) provenant du soleil ([Source IARC, 2007](#)). Les rayonnements solaires les plus dangereux et de longueurs d'ondes les plus courtes sont arrêtés par les couches supérieures de l'atmosphère : les UVC dans leur totalité et les UVB en très grande partie. La partie des UVB restante pourrait être soit retenus par les nuages ou soit atteindre la première couche de la peau (épiderme). Les UVA quant à eux n'étant pas retenus par les nuages, pénétreront plus profondément et pourront atteindre la couche dermique de la peau.

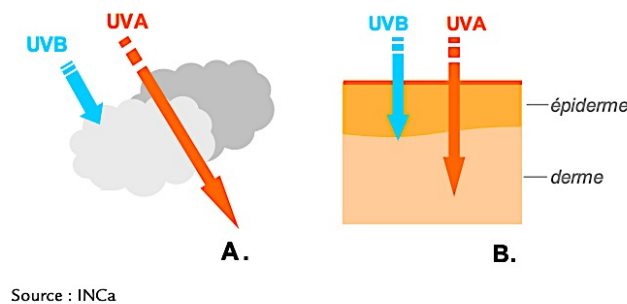


Figure 8 || Émission des rayonnements UV

Les rayonnements ultraviolets font partie du spectre électromagnétique émis par le soleil. Les longueurs d'ondes les plus dangereuses, sont arrêtées par les couches supérieures de l'atmosphère : l'ensemble des UVC et la majorité des UVB. Ainsi, à la surface de la terre, le rayonnement solaire est composé essentiellement d'UVA (entre 95 et 99 %) et plus faiblement d'UVB (à hauteur de 1 à 5 %). Le rayonnement UVA, contrairement au rayonnement UVB, n'est pas arrêté par la couverture nuageuse et pénètre jusqu'aux couches profondes du derme. Source : INCa

Les expositions prolongées à de fortes doses d'UVA/UVB sont connues pour induire des dommages au niveau de l'ADN pouvant entraîner un vieillissement cutané prématuré, des atteintes oculaires ainsi que le développement de certains cancers cutanés, comme le mélanome. Les UVB augmentent également l'infiltration de macrophages et de neutrophiles dans la peau responsable d'une réaction inflammatoire localisée.

Cette inflammation serait favorable pour la survie, l'invasion et l'angiogenèse des cellules du mélanome (Sample and He 2018). Ainsi, les rayons UV émis par le soleil mais également par les cabines de bronzage (Burbidge et al. 2019), sont des agents classés comme cancérogènes (groupe 1) par L'IARC.

Dans le mélanome, une interaction potentielle entre l'emplacement géographique et la pénétrance de certains gènes comme **CDKN2A** a d'ailleurs été observée. Une vaste étude internationale (Fargnoli et al. 2010) sur 17 familles vivants dans trois continents (Europe, USA et Australie) a révélé une variation significative de la pénétrance des mutations en fonction de la localisation géographique, ce qui est probablement en corrélation avec l'exposition UV correspondante mais également la couleur de peau, et donc la teneur en mélanine, des individus étudiés. Ceci venant appuyer l'interaction possible entre des prédispositions génétiques et environnementales faisant du mélanome une maladie complexe et multifactorielle.

2. Diagnostic

2.1. Signes cliniques

Compte tenu de l'incidence élevée du mélanome et des chances de survie à 5 ans très élevée dans les stades localisés contrairement aux stades avancés. Une détection précoce (mélanome *in situ*, mélanome à faible indice de Breslow) demeure le facteur clé pour diminuer la mortalité. La sensibilisation à une détection précoce du mélanome est devenue priorité d'utilité publique pour les autorités de santé. Toutes lésions mélanocytaires douteuses doivent faire l'objet d'un suivi attentif.

Un suivi encore plus précis sera réalisé pour les sujets à risque : Nombre de nævi > 50, antécédents familiaux de mélanome cutané, phototype I, antécédent de coup de soleil, etc.

La règle simple « ABCDE » établie afin d'analyser facilement les grains de beauté est utilisée aussi bien par les médecins traitants, les médecins spécialistes que par le patient lui-même (Tableau 1).

A	A symétrie	<i>une lésion susceptible d'être un mélanome est de forme asymétrique</i>
B	B ord	<i>une lésion susceptible d'être un mélanome a des bords irréguliers, encochés, polycycliques</i>
C	C ouleur	<i>une lésion susceptible d'être un mélanome est de couleur hétérogène, associant plusieurs couleurs (brun clair ou foncé, rouge, bleuté, noir)</i>
D	D iamètre	<i>une lésion susceptible d'être un mélanome a une taille supérieure à 6 mm.</i>
E	É volution	<i>une lésion susceptible d'être un mélanome change d'aspect, de taille, de couleur, d'épaisseur au cours du temps</i>

Tableau 1 || Critères "ABCDE"

Les critères « ABCD » ont été développés en 1985, puis plus tard, la lettre E a été ajoutée. Le critère évolutif de la lésion est d'ailleurs le critère le plus important. Ce diagnostic clinique doit toujours être confirmé par l'examen anatomopathologique de la pièce chirurgicale complète lorsque cela est possible et non sur une biopsie partielle qui peut entraîner des erreurs de diagnostic. Source adaptée : HAS (Guide ALD n°30 : mélanome cutané)

2.2. Classification anatomo-pathologique

Après exérèse chirurgicale du mélanome cutané, la classification officielle utilisée afin de stratifier et de déterminer le stade du mélanome reste la classification internationale TNM ([Tableau 2](#)). Cette classification regroupe les recommandations de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Stades	Critères
Stade 0	Tumeur in situ
Stade IA	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, sans ulcération et mitoses < 1/mm2 (pT1a), N0, M0
Stade IB	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, avec ulcération et/ou mitoses ≥ 1/mm2 (pT1b), N0, M0 Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT2a), N0, M0
Stade IIA	Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b), N0, M0 Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a), N0, M0
Stade IIB	Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT3b), N0, M0 Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT4a), N0, M0
Stade IIC	Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0
Stade IIIA	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a), M0
Stade IIIB	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1b, 2b, 2c), M0 Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1a, 2a, 2c), M0
Stade IIIC	Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b), M0 Tumeurs avec ou sans ulcération (tous pT), métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus ou métastases en transit avec métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) (N3), M0
Stade IV	Métastases à distance (tous pT, tous N, M1)

Tableau 2 || **Classification TNM du mélanome**

Critère de classification TNM du mélanome selon les stades (I à IV). La biopsie de la tumeur et la classification internationale TNM demeure aujourd'hui le standard pour le diagnostic et la stratification du mélanome. Plusieurs révisions de cette classification ont été publiées. La dernière étant la huitième édition et a eu lieu en 2017-2018. Tableau traduit et adapté par la Haute Autorité de Santé (HAS) à partir des recommandations de l'UICC et de l'AJCC (8^{ème} édition). Ce tableau est disponible sur le site de l'HAS et a été consulté le 03 avril 2019.

Ces critères cliniques et histologiques peuvent être simplifiés de la manière suivante :

- Stade I : Mélanome *in situ* ou localisé
- Stade II : Mélanome *in situ* ou localisé de plus grande taille ou avec ulcération
- Stade III : Mélanome avec envahissement locorégional cutané ou ganglionnaire
- Stade IV : Mélanome avec métastases à distance

2.3. Ganglion sentinelle

L'analyse du ganglion sentinelle consiste à retirer le ou les ganglions lymphatiques situés dans la zone de drainage du mélanome. Les résultats d'analyse permettent de mettre en évidence la présence ou non de cellules cancéreuses (micrométastases) dans les ganglions. Les métastases du mélanome se développant le plus souvent dans les ganglions lymphatiques, la biopsie du ganglion sentinelle est apparue comme un outil de diagnostic clé pour déterminer si le cancer s'est propagé au-delà du site de la tumeur primaire ([Morton et al. 2014](#)). Aujourd'hui, la recherche du ganglion sentinelle est pratiquée, selon les recommandations françaises, chez l'ensemble des patients dont le mélanome primitif à un indice de Breslow (épaisseur) de plus de 1 mm ou si le mélanome primitif est ulcéré. Cette technique chirurgicale a été introduite dans les années 90 et a profondément transformé la méthode de stratification nodale.

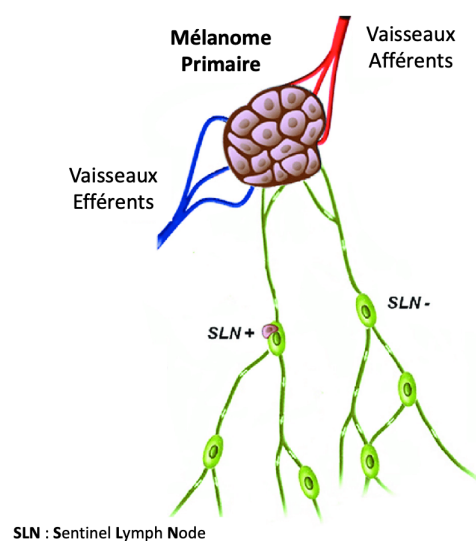


Figure 9 || Théorie du ganglion sentinelle

La recherche des micrométastases ganglionnaires par la technique du ganglion sentinelle est utilisée depuis 1991 et est considérée comme une alternative intéressante pour déterminer le stade du patient. Source : (Manca et al. 2014)

La positivité du ganglion sentinelle est un facteur de mauvais pronostic et un curage ganglionnaire est alors proposé aux patients lors d'une seconde intervention réalisée sous anesthésie générale. Compte tenu des progrès considérables réalisés dans le traitement du mélanome, la biopsie du ganglion sentinelle fournit des informations importantes et précises sur la classification du mélanome, classification essentielle pour la prise de décisions thérapeutiques. Cependant, l'émergence des biopsies liquides pourrait remettre en question l'utilité de cet acte invasif.

3. Thérapies

La caractérisation génétique très fine de la tumeur a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie du mélanome et le développement de nouveaux traitements très prometteurs qui ont notamment révolutionnés la prise en charge des patients à un stade avancé. Avant 2011, les options thérapeutiques étaient limitées à la chimiothérapie classique (dacarbazine, fotémustine) qui constituait le traitement de référence, avec des taux de réponse n'excédant pas 10% et une survie globale médiane autour de 8 mois (Robert et al. 2011).

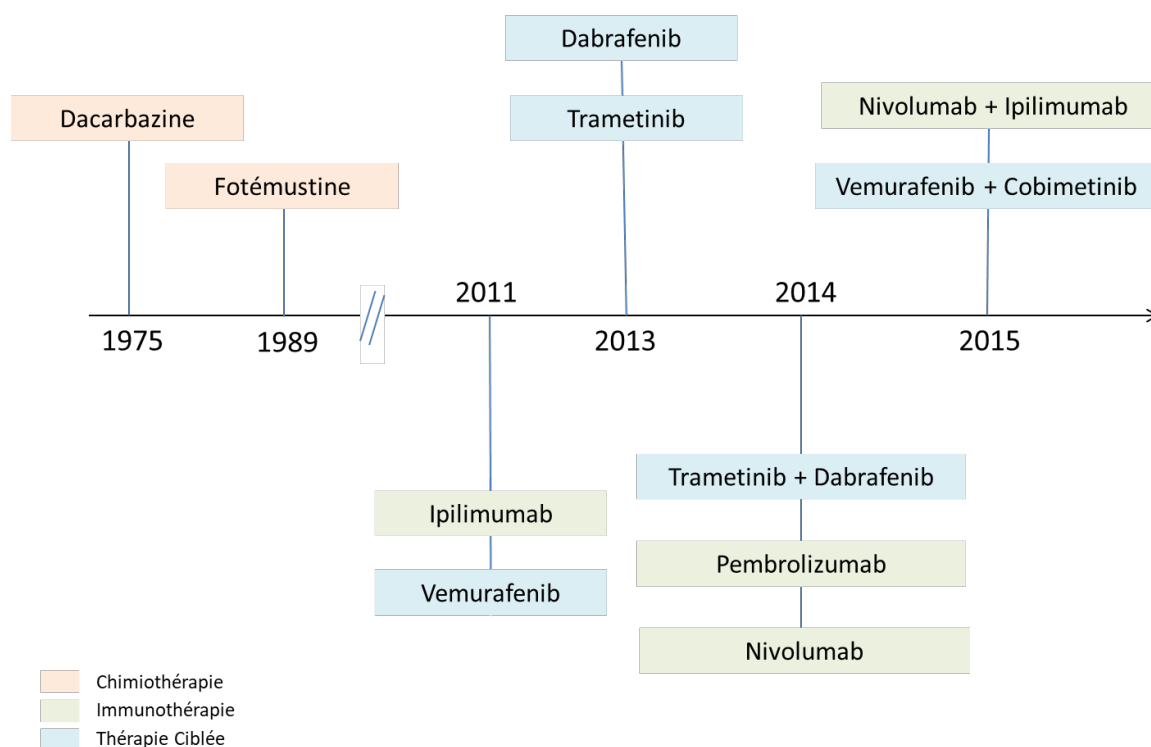


Figure 10 || **Chronologie des traitements approuvés pour le mélanome**

En 1975, la FDA a approuvé la dacarbazine pour le traitement des mélanomes métastatiques avancés. Puis la fotémustine a été approuvée par l'EMA, pour le traitement, uniquement en Europe, du mélanome malin disséminé (y compris en cas de métastases cérébrales). 2011 a marqué un tournant important dans la prise en charge du mélanome avec l'introduction de la première immunothérapie (ipilimumab) et de la première thérapie ciblée (vemurafenib). Puis, 2 ans plus tard, l'utilisation de deux nouvelles thérapies ciblées a été approuvée par la FDA (dabrafenib et trametinib). Leur utilisation en combinaison a ensuite été validée en 2014. La même année, 2 nouvelles immunothérapies (pembrolizumab et nivolumab) ont fait leur arrivée sur le marché). Depuis 2015, la FDA a approuvé l'utilisation en combinaison de 2 immunothérapies (nivolumab et ipilimumab) et de deux thérapies ciblées (vemurafenib et cobimetinib). Chronologie adaptée de (Wróbel et al. 2019)

Récemment, la commercialisation de sept traitements innovants (Tableau 3) : trois immunothérapies (anticorps monoclonaux anti CTLA4, anti PD1) et de quatre thérapies ciblées (inhibiteurs des tyrosine kinase BRAF et MEK), ont montré une amélioration significative de la survie des patients métastatiques atteignant une moyenne de 23 mois (Kandel et al. 2018). Les thérapies ciblées et les immunothérapies sont deux voies thérapeutiques avec un mode d'action totalement différent.

Les immunothérapies et les anti-BRAF, seuls ou associés aux anti-MEK, se sont révélées plus efficaces que la chimiothérapie en termes de survie sans progression et/ou de survie globale. La place de la chimiothérapie est désormais restreinte, en dernière ligne de traitement.

Traitements	Mode d'action	Cible	Indication	Essais clinique
Pembrolizumab	Immunothérapie	PD-1	Tumeur BRAF V600 sauvage	KEYNOTE-006 (NCT01866319)
Nivolumab	Immunothérapie	PD-L1	Tumeur BRAF V600 sauvage	CheckMate 069 (NCT01927419)
Ipilimumab	Immunothérapie	CTLA4	Tumeur BRAF V600 sauvage	CheckMate 067 (NCT01844505)
Cobimetinib	Thérapie Ciblée	MEK	Tumeur BRAF V600 muté	coBRIM (NCT01689519)
Vemurafenib	Thérapie Ciblée	BRAF	Tumeur BRAF V600 muté	coBRIM (NCT01689519)
Trametinib	Thérapie Ciblée	MEK	Tumeur BRAF V600 muté	COMBI-AD (NCT01682083)
Dabrafenib	Thérapie Ciblée	BRAF	Tumeur BRAF V600 muté	BREAK-3 (NCT01227889)

Tableau 3 || **Nouvelles thérapies pour traiter le mélanome**

Les immunothérapies et les thérapies ciblées sont des voies prometteuses dans la lutte contre le mélanome. De nombreux essais cliniques récents ont montré des résultats impressionnants notamment avec les immunothérapies qui permettent grâce à leur action de débloquent les freins du système immunitaire pour qu'il puisse de nouveau être apte à attaquer les cellules cancéreuses. Ces nouvelles thérapies s'accompagnent toutefois d'effets secondaires importants dont l'apparition de maladies auto-immunes.

3.1. Les immunothérapies

3.1.1. « Immune Checkpoint Inhibitor »

Les « immune checkpoints » sont indispensables pour l'activation de la réponse immunitaire. Ils permettent de moduler l'intensité et la durée de la réponse. Des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs sont présents à la surface des cellules comme les lymphocytes T et c'est l'équilibre des signaux co-activateurs et co-inhibiteurs au niveau de ces points de contrôle qui détermine l'activation ou non de la réponse immunitaire (voir Figure 11).

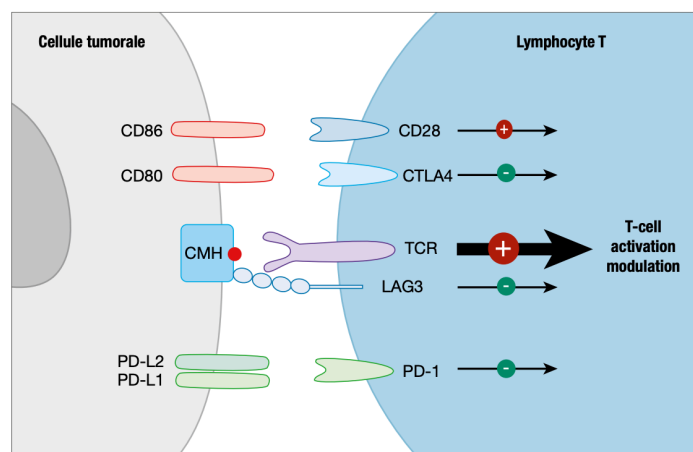


Figure 11 || Principaux checkpoints immunitaires

Les cellules tumorales sont capables de contourner les points de contrôle mis en place par le système immunitaire en déclenchant des mécanismes très précis qui inactivent les lymphocytes T et inhibent la réponse du système immunitaire. Source : (Vuagnat and Champiat 2018)

Ces « points de contrôle » peuvent être ciblés par des traitements, appelés « inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ». Ces inhibiteurs réactivent alors le système immunitaire et lui permettent de nouveau de lutter contre le développement tumoral.

Les thérapies ciblant des inhibiteurs du point de contrôle immunitaire sont recommandées chez les patients atteints de mélanome présentant des ganglions lymphatiques régionaux positifs de stade III avec micrométastases et présentant un risque élevé de récurrence ultérieure.

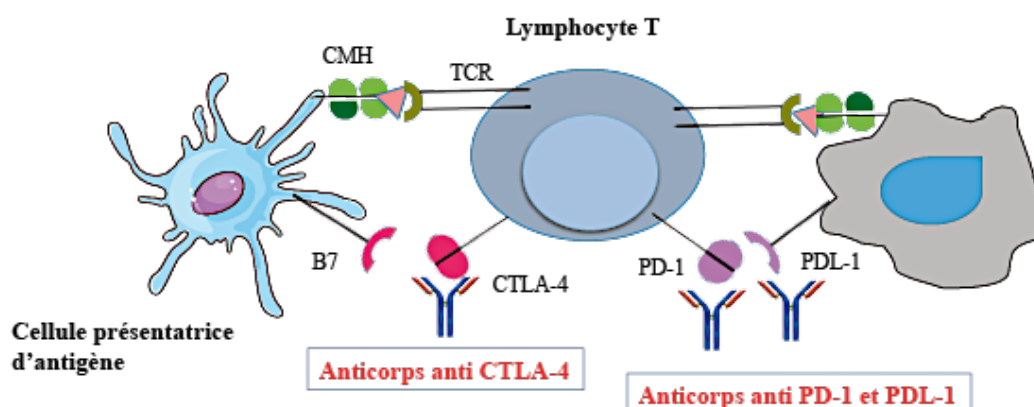


Figure 12 || Thérapie agissant aux niveaux des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

Ces points de contrôle de l'immunité permettent un équilibre de la réponse immunitaire. La mise en place d'une réponse immunitaire efficace passe dans un premier temps par l'activation des lymphocytes T. Les traitements ciblant les lymphocytes T représentent aujourd'hui une avancée majeure dans la prise en charge du mélanome métastatique. CMH : complexe majeur d'histocompatibilité. TCR : T Cell Receptor. Source : (Aparicio 2018)

Actuellement, les principaux anti-checkpoint utilisés ciblent des récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire (Figure 12) :

- Le récepteur CTLA4
- Le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1

De nouveaux récepteurs sont en ce moment à l'étude : le récepteur **LAG-3** (Figure 11), par exemple, est actuellement étudié à travers un essai clinique ([NCT01968109](#)). LAG-3 comme PD-1 et CTLA4 sont des récepteurs présents à la surface des lymphocytes T et responsables de la faible efficacité du système immunitaire ([Andrews et al. 2017](#)).

Les immunothérapies peuvent agir sur le système immunitaire soit en stimulant les cellules du système immunitaire pour les rendre plus efficaces, soit en rendant les cellules tumorales plus reconnaissables par le système immunitaire.

3.1.2. Immunothérapie : CTLA4

L'immunothérapie anti-CTLA-4 a été la première immunothérapie évaluée dans le traitement d'un cancer, et il s'agissait du mélanome. L'ipilimumab, anti-CTLA-4, dont l'AMM a eu lieu en 2011 a été le premier à révolutionner la prise en charge du mélanome métastatique.

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) et a été le premier traitement systémique à montrer une survie globale prolongée chez les patients atteints de mélanome à un stade avancé dans le cadre d'essais de phase III contrôlés et randomisés ([Robert et al. 2011](#)).

Puis une analyse groupée des données de 12 études dans le mélanome avancé a montré une augmentation du taux de survie globale à 3 ans chez 26% des patients non traités précédemment et une survie jusqu'à 10 ans chez environ 20% de l'ensemble des patients (Robert et al. 2011).

3.1.3. Immunothérapie : anti-PD-1/anti-PD-L1

Certaines cellules tumorales pour détourner les points de contrôle sur-expriment la protéine PD-L1 à leur surface. La liaison entre PD-L1 et son récepteur PD-1 présent à la surface des lymphocytes T entraîne l'inhibition des cellules immunitaires, les empêchant ainsi de réagir efficacement. L'interaction entre ces deux molécules fait entrer les lymphocytes T dans un état dit d'anergie qui empêche le contrôle de la prolifération tumorale. Le blocage de l'interaction PD1 / PD-L1 est une voie thérapeutique actuellement à l'étude dans le mélanome et dans d'autres cancers comme le cancer du poulmon.

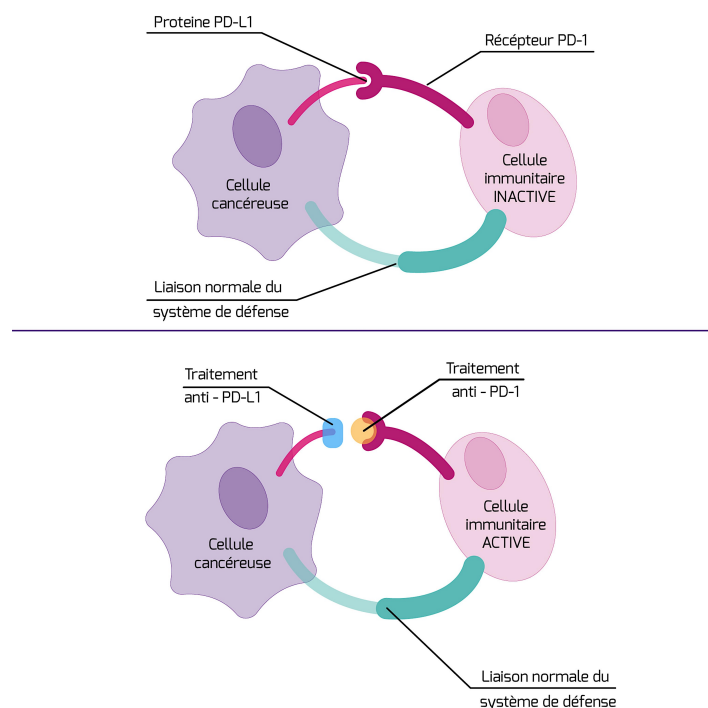


Figure 13 || Principe d'action des traitements anti-PD-1 et anti-PD-L1

La liaison de la protéine PD-L1, présente sur les cellules tumorales, au récepteur PD-1 présent sur les lymphocytes T entraîne l'inactivation de ces derniers. En bloquant le récepteur PD-1 ou la protéine PD-L1 (avec des anti-PD-1 ou anti-PD-L1, respectivement), l'inactivation des lymphocytes T est levée. Le système immunitaire peut de nouveau être efficace. Source INCa

Les agents anti-PD-1 ont montré des taux de survie globaux, de survie sans progression et de réponse objective, avec un meilleur profil de tolérance, supérieurs à ceux de l'ipilimumab seul ([Robert et al. 2015](#)) poursuivant le développement de l'arsenal thérapeutique pouvant être proposé aux patients. Les agents anti-PD-1 et anti-PD-L1 actuellement utilisés dans le traitement du mélanome sont le **nivolumab** et le **pembrolizumab**.

- Nivolumab

Le nivolumab est un anticorps monoclonal humain de type immunoglobine G4 (IgG4) qui potentialise les réponses des cellules T. Il est indiqué en monothérapie dans le traitement du mélanome avancé (non résectable ou métastatique). Son autorisation de mise sur le marché a eu lieu en 2015.

- Pembrolizumab

Le pembrolizumab est un nouvel anticorps monoclonal qui potentialise les réponses des cellules T en se liant au récepteur PD-1 (*programmed death-1*), il bloque son interaction avec les ligands PD-L1 et PD-L2. Il est prescrit en monothérapie dans le traitement des patients adultes atteints d'un mélanome avancé (non résectable ou métastatique). L'autorisation de mise sur le marché a été accordée au pembrolizumab, sur la base des données issues de trois études cliniques conduites sur plus de 1 500 patients, dont 2 études pivots ([Keynote 006](#) et [Keynote 002](#)) et une étude support ([Keynote 001](#)).

Il existe donc actuellement trois immunothérapies en France qui agissent sur 2 voies différentes :

- Immunothérapie : anti-CTLA-4
 - Ipilimumab (Yervoy[®], mis sur le marché en 2011 par le laboratoire BMS)
- Immunothérapie : anti-PD-1/anti-PD-L1
 - Pembrolizumab (Keytruda[®], mis sur le marché en 2015 par le laboratoire MSD)
 - Nivolumab (Opdivo[®], mis sur le marché en 2015 par le laboratoire BMS)

3.2. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur vers d'autres sites, en bloquant les mécanismes de la prolifération ou bien la néo-angiogenèse à l'origine de la dissémination et du développement tumoral (voir Figure 14). Toutes les nouvelles propriétés acquises par les cellules lors du développement tumoral peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles. Ces différentes cibles ont été mises en évidence par (Hanahan and Weinberg 2011) et font l'objet de recherches actuelles.

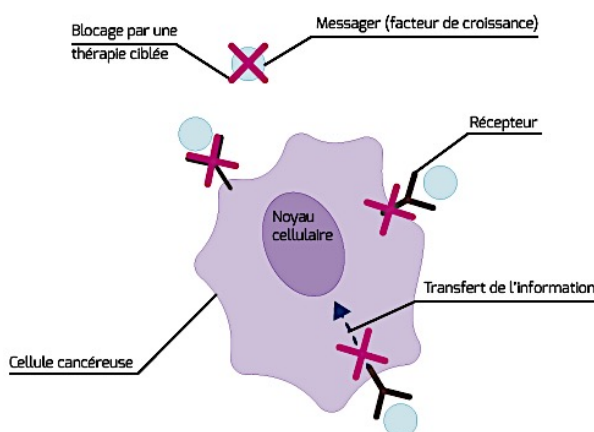


Figure 14 || Les différents modes d'action des thérapies ciblées

Les thérapies ciblées ont été développées afin d'agir : soit au niveau des facteurs de croissance, soit au niveau des récepteurs pour bloquer la cascade de réactions provoquant le développement tumoral dans la cellule. Source INCa

Dans le mélanome, la voie de signalisation RAS/MAP Kinase est la plus fréquemment altérée. Cette voie de signalisation a donc un intérêt fort dans le développement des thérapies ciblées. D'une part, en agissant au niveau de BRAF, d'autre part en agissant au niveau de MEK. Dans la cascade d'activation RAF est responsable de l'activation de MEK, il est donc possible, au niveau thérapeutique, d'agir à ces deux niveaux (voir Figure 15)

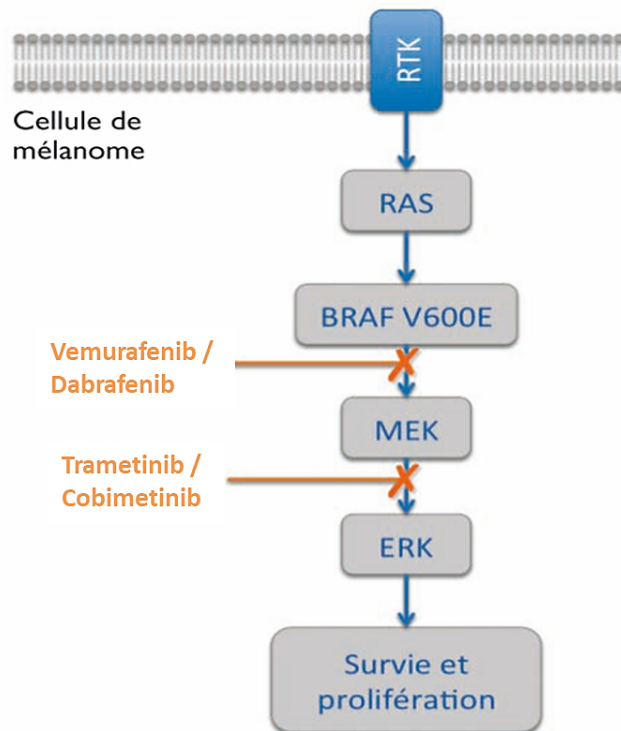


Figure 15 || La voie RAS/MAP Kinase et les différents modes d’actions des inhibiteurs

La stimulation du récepteur de membrane RTK (Receptor Tyrosine Kinase) active la protéine RAS (mutée dans 15 % des mélanomes) qui entraîne l’activation de BRAF (mutée dans 50% des mélanomes). RAF active ensuite MEK, qui à son tour phosphoryle ERK. Cette voie de signalisation est responsable de la croissance, de la survie et de la différenciation cellulaire. Le vemurafenib et le dabrafenib bloquent la forme mutée de BRAF. Le trametinib et le cobimetinib bloquent la kinase MEK. Source adaptée : (Tzika et al. 2013)

3.2.1. Thérapie ciblée : Anti BRAF

Le gène BRAF étant muté dans près d’un mélanome sur deux, l’identification de cette mutation a dans un premier temps conduit au développement de thérapies ciblant les tumeurs porteuses de cette mutation. Parmi ces thérapies les deux qui ont reçu l’approbation de la FDA pour le mélanome sont le **Vemurafenib** et le **Dabrafenib**.

- Vemurafenib

Le Vemurafenib, approuvé par la FDA en 2011, est un inhibiteur sélectif de la protéine BRAF muté et a donc une indication limitée aux patients présentant une mutation BRAF V600E démontrée par un test approuvé par la FDA. L'efficacité du vemurafenib a été démontrée dans une étude ([Maio et al. 2018](#)) révélant une amélioration significative de la survie sans progression et de la survie globale chez les patients atteints d'une maladie non opérable ou avancée.

- Dabrafenib

Le Dabrafenib est un autre inhibiteur sélectif de BRAF muté et a été approuvé par la FDA en 2013. Comme le vemurafenib, le dabrafenib a montré une amélioration de la survie sans progression par rapport à la chimiothérapie dans un essai international multicentrique ([BREAK-3 \[NCT01227889\]](#)). Un taux de réponses élevé a également été démontré au niveau des métastases cérébrales.

3.2.2. Thérapie Ciblée : Anti MEK

Dans un second temps, d'autres traitements appelés « inhibiteurs de MEK » ont été développés pour également bloquer la prolifération des cellules tumorales. Ces traitements, comme les thérapies ciblées anti-BRAF sont proposés uniquement aux patients porteurs de la mutation BRAF car interviennent au niveau de la même voie de signalisation ([voir Figure 15](#)).

Il existe pour le moment deux inhibiteurs de MEK approuvés pour le traitement du mélanome : **Tramétinib** et **Cobimétinib**.

- Tramétinib

Le Tramétinib est un inhibiteur sélectif de MEK1 et MEK2, approuvé par la FDA en 2013 pour les patients atteints de mélanome non résecable ou métastatique porteur de la mutation BRAF V600E ou BRAF V600K. Le Tramétinib a démontré une meilleure survie sans progression par rapport à la chimiothérapie lors d'une étude ([Latimer et al. 2016](#)).

- Cobimetinib

Le Cobimetinib est un inhibiteur ciblant la molécule MEK approuvé par la FDA en 2015. Contrairement au Trametinib qui peut être administré en monothérapie, le cobimetinib n'a été approuvé que pour une utilisation en combinaison avec le Vemurafenib, un inhibiteur de BRAF.

Des résultats significatifs ont été obtenus avec l'arrivée des immunothérapies et des thérapies ciblées parmi l'arsenal thérapeutique, notamment des taux de réponses supérieures à 50% jamais atteints avec les chimiothérapies conventionnelles. Cependant, les patients ne présentent que des réponses de courtes durées et de nombreux mécanismes de résistance apparaissent. C'est pourquoi l'action combinée sur différentes cibles thérapeutiques semble la voie la plus prometteuse.

3.3. Les combinaisons de thérapies

3.3.1. Combinaison d'immunothérapies : Anti-CTLA4 / Anti-PDL1

Pour les patients non mutés BRAF, des traitements par immunothérapie sont préconisés en première intention, anti-PD-1 et/ou anti-CTLA-4. En effet, au stade métastatique, les immunothérapies anti-PD-1 et anti-CTLA-4 ont montré leur efficacité en monothérapie et également en association.

Plusieurs études ont montré que lorsque l'on combinait deux types d'immunothérapies dont le mode d'action était différent (anti-PD-1 et anti-CTLA-4), l'efficacité pour le patient était augmentée :

- L'essai randomisé de phase 2 CheckMate 069 portant sur des patients n'ayant jamais été traités a montré un taux de survie globale à 2 ans de 64% dans le groupe recevant un traitement d'association (Nivolumab + Ipilimumab) contre 54% dans le groupe recevant l'ipilimumab seul ([Kandel et al. 2018](#)) ([Hodi et al. 2016](#)).
- L'essai CheckMate 067 impliquant des patients atteints d'un mélanome avancé non encore traité a montré une survie sans progression significativement plus longue et des taux de réponses plus élevées avec le nivolumab associé à l'ipilimumab par rapport au nivolumab seul ou encore à l'ipilimumab seul ([Atkins et al. 2019](#)) ([Wolchok et al. 2017](#)).

Les combinaisons d'immunothérapies ont démontré un prolongement de la survie dans le mélanome métastatique, voir pour certains patients la possibilité d'avoir une perspective de guérison. Malheureusement ces associations simultanées de deux molécules ont un coût très élevé qui n'est actuellement pas pris en charge par la Sécurité Sociale bien que ces molécules aient montré une efficacité supérieure lorsqu'elles sont combinées, et moindre lorsqu'elles sont prises séparément.

La seule possibilité reste alors pour les malades d'entrer dans des essais cliniques, tels que ceux décrits précédemment, afin de pouvoir bénéficier de ces traitements innovants et pour lesquels il existe déjà des données antérieures qui sont très prometteuses.

3.3.2. Combinaison de thérapies ciblées : Anti BRAF / Anti MEK

Les recommandations de combinaisons de thérapies pour le mélanome métastatique dépendent actuellement du statut de la mutation BRAF : La FDA a approuvé en 2014, l'association du Dabrafenib et du Tramétinib pour les patients atteints de mélanome non résecable ou métastatique porteur de la mutation BRAF V600E ou BRAF V600K. La combinaison d'un anti-MEK associé à un anti-BRAF a démontré une amélioration du taux de réponse durable par rapport au Dabrafenib administré en monothérapie.

Puis en 2015, toujours pour les patients atteints de mélanome non résecable ou métastatique porteur de la mutation BRAF V600E ou BRAF V600K, la FDA a également approuvé l'association du Vemurafenib et du Cobimetinib (Tableau 4).

Combinaison de thérapie	Compagnie pharmaceutique	Approuvé par la FDA
Trametinib (Mekinist®) + Dabrafenib (Tafinlar®)	Novartis	janv-14
Nivolumab (Opdivo®) + Ipilimumab (Yervoy®)	Bristol Mayer Squibb	sept-15
Vemurafenib (Zelboraf®) + Cobimetinib (Cotellic®)	Roche/Genetech	nov-15

Tableau 4 || **Combinaisons de thérapies approuvées par la FDA pour le traitement du mélanome**

Les combinaisons de thérapies se révèlent être plus efficaces comparées à leur utilisation en monothérapie. La FDA a donc approuvé l'association du dabrafenib et du trametinib en 2014 et la combinaison du cobimetinib et de vemurafenib, en 2015, à la fois pour les patients atteints de mélanome non résecable ou métastatique avec mutations BRAFV600E. En 2015, la combinaison de deux immunothérapies : nivolumab et ipilimumab a également fait l'objet d'une approbation par la FDA. Source adaptée : (Wróbel et al. 2019).

Depuis 2011, l'homologation de ces sept nouveaux médicaments innovants a progressivement amélioré le pronostic des patients. Les premiers traitements anti-CTL4 et anti-BRAF ont augmenté la survie globale à 12 mois ([Hall et al. 2018](#)). De leur côté, les associations d'anti-MEK et d'anti-BRAF ont augmenté la survie médiane à 23 mois ([Ascierto et al. 2016](#)).

Cependant, bien que la FDA ait approuvé ces thérapies ciblées et ces immunothérapies pour traiter les patients métastatiques, de nombreux patients ne répondent pas à ces thérapies qui sont parfois très coûteuses et le plus souvent très toxiques. D'autres patients développent des résistances dans un temps très court. Par conséquent le taux de survie à 5 ans des patients au stade IV a progressé mais reste faible, 40% seulement ([American Cancer Society](#)).

Ces études soulignent l'intérêt des traitements néo-adjuvants dans les mélanomes à haut risque de récurrence (stade 3 et 4) et permettent de lancer des hypothèses de travail pour d'autres types de cancers. Toutefois, la toxicité de ces nouveaux traitements doit faire réfléchir aux schémas d'administration.

La biopsie tissulaire demeure un outil précieux pour guider le choix thérapeutique, mais présente des limitations importantes. Des alternatives telles que la biopsie liquide se développent afin de mieux comprendre la maladie et surtout de pouvoir suivre de façon dynamique la cinétique de l'efficacité de ces nouveaux traitements et pouvoir anticiper une éventuelle résistance ou toxicité. Il est donc hautement souhaitable de pouvoir bénéficier d'un test prédictif de la réponse thérapeutique afin de pouvoir personnaliser les traitements.

L'identification de facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique est toujours une priorité, a fortiori pour des traitements qui ont des toxicités importantes. La découverte de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse clinique pourrait ainsi aider à la sélection des traitements de manière individualisée pour chaque patient et maximiser les avantages cliniques. D'autant plus que les immunothérapies, efficaces chez un nombre limité de patients, peuvent provoquer, des effets indésirables graves liés à l'immunité. Ainsi, identifier les bons biomarqueurs prédisant la réponse ou une éventuelle toxicité est important pour poursuivre le développement de ces thérapies.

Chapitre III | Les Cellules Tumorales Circulantes

Lors du développement tumoral, certaines cellules vont se détacher de la tumeur solide et entrer dans la circulation sanguine. Ces cellules une fois dans la circulation sont appelées Cellules Tumorales Circulantes (CTC). Ces CTC vont soit survivre et potentiellement aller former des métastases à distance, soit être détruites et libérer des fragments de leur matériel génétique dans la circulation sanguine. Les CTC ainsi que l'ADN tumoral libre circulant (ADNtc), les exosomes et les protéines libérées dans le sang (par les cellules en circulation ou le plus souvent par la tumeur primaire elle-même) sont détectables par une simple prise de sang ou « biopsie liquide » (voir Figure 16). L'analyse de l'ensemble de ces sources tumorales offre des perspectives cliniques intéressantes.

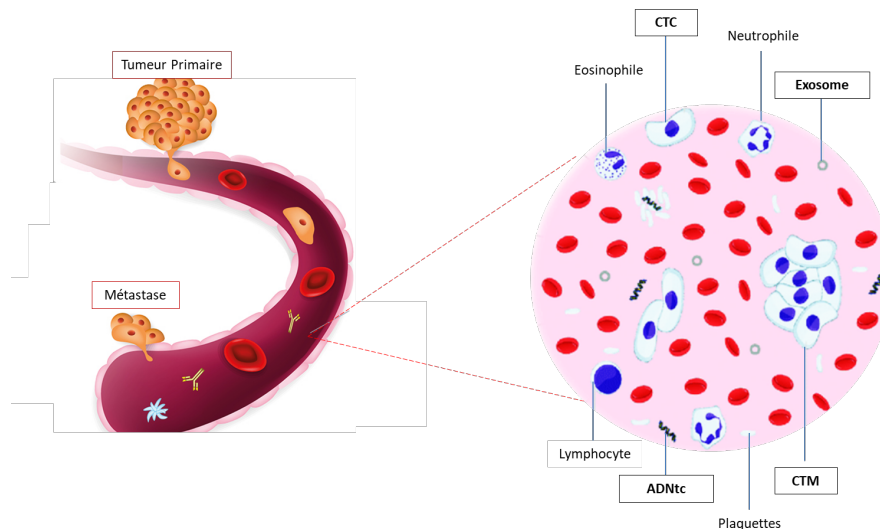


Figure 16 || Les différents éléments de la biopsie liquide

En oncologie, la biopsie conventionnelle de la tumeur demeure indispensable pour poser le diagnostic initial du cancer. La biopsie liquide, quant à elle permet de suivre l'évolution du cancer au cours du temps. Ce suivi est réalisé grâce à une simple prise de sang et permet l'analyse de l'ensemble des éléments tumoraux circulants (CTC, CTM, exosomes, ADNtc, protéines) présents en très faibles quantités et qu'il faut distinguer des autres éléments sanguins : globules rouges, globules blancs (éosinophile, neutrophile, lymphocyte) et plaquettes. Source adaptée: (Calabuig-Fariñas et al. 2016)

Nous ferons ici un focus uniquement sur les cellules tumorales circulantes, objet d'étude de ce manuscrit et n'aborderons pas l'ADN tumoral libre circulant et ses dérivées.

1. Les sous-populations de cellules circulantes dans le cancer

Les cellules tumorales circulantes (CTC), les cellules tumorales disséminées (DTC), les cellules en transition Epithelio-Mesenchymateuse (EMT), les microembolus tumoraux (CTM), les macrophages associés aux tumeurs (CAML) ainsi que certaines cellules endothéliales (CAVE) sont autant de cellules qui circulent dans le sang des patients atteints de cancer. Individuellement et ensemble, ces cellules fournissent des informations biologiques et cliniques qui peuvent être utiles pour le diagnostic et le pronostic. L'isolement de ces différents sous-groupes de cellules circulantes reste un défi aujourd'hui car les marqueurs spécifiques exprimés par ces cellules ne sont pas encore complètement définis. Cela rend difficile leur isolement par des techniques immunologiques. En revanche, l'isolement de ces cellules par des méthodes basées sur leurs propriétés physiques semble plus adapté et permet d'isoler tous ces éléments sans les biais liés à des antigènes peu spécifiques ou dont l'expression est évolutive (Wechsler 2018). Cependant, ces méthodes basées sur les propriétés physiques doivent éliminer efficacement les globules rouges et les globules blancs du sang périphérique total, qui sont très largement majoritaires.

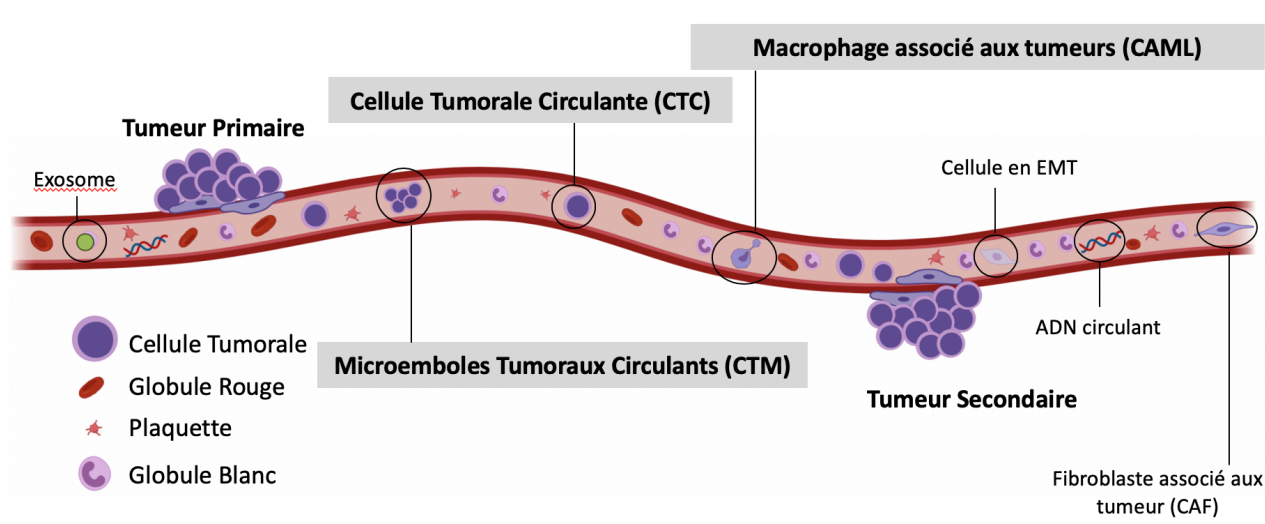


Figure 17 || Les différentes sous-populations de la biopsie liquide

La biopsie liquide permet d'avoir accès à de nombreux types de cellules dans la circulation sanguine. Nous ferons un focus dans ce manuscrit sur les Cellules Tumorales Circulantes (CTC), les Microembolus Tumoraux Circulants (CTC) également appelé « cluster » et les macrophages associés aux tumeurs (CAML).

1.1. Les Cellules Tumorales Circulantes

Les cellules tumorales circulantes ont été détectées pour la première fois chez un patient atteint de cancer en 1869 ([Ashworth et al. 1869](#)) lors de son autopsie par un médecin Australien. Ces cellules découvertes dans le sang du patient n'étaient pas des cellules hématopoïétiques mais semblaient posséder des caractéristiques tumorales proches des cellules retrouvées au niveau des différentes métastases de ce patient.

Depuis la découverte en 1869 de ces cellules, de nombreux termes ont été utilisés pour les définir. Il est important de faire un point sur la sémantique autour de ces cellules : la terminologie la plus utilisée reste « CTC » pour *Cellules Tumorales Circulantes* en Français et *Circulating Tumor Cells* en Anglais. Certaines équipes ([Broncy et al. 2018](#)) préfèrent utiliser le terme de *Cellules Cancéreuses Circulantes* (CCC). Certaines terminologies vont de façon plus précise catégoriser ces cellules : Cellules épithéliales Tumorales Circulantes, Cellules non hématopoïétiques Circulantes. Ces différentes appellations révèlent la complexité de ces cellules et de leur étude. Dans la suite de ce manuscrit, j'utiliserai la dénomination CTC pour parler de ces cellules

Plusieurs études menées pendant ces quinze dernières années, ont montré que les CTC pouvaient être utilisées comme marqueur pour prédire la progression de la maladie et la survie chez les patients avec un cancer précoce ou métastatique ([Cristofanilli et al. 2004](#)).

Un nombre élevé de CTC est corrélé à l'agressivité de la maladie, l'augmentation des métastases et la diminution du taux de survie ([Chaffer and Weinberg 2011](#)). Il est donc important de détecter et de caractériser de façon précise ces cellules.

- **La détection cytologique des CTC** : La caractérisation cytologique, basée sur une coloration cytologique standard, repose sur une reconnaissance des cellules cancéreuses en circulation parmi les cellules sanguines. Les critères de détection utilisés par le pathologiste sont proches des critères de malignité utilisés classiquement pour les examens cytologiques ([Wechsler 2015](#)) :
 - Un noyau dense et hyper chromatique d'une taille supérieure ou égale à 18 µm
 - Un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (≥ 0.75)
 - Une membrane nucléaire irrégulière

- **La détection immunologique des CTC** : La caractérisation immunologique repose sur une immunocytochimie (ICC) des CTC, en utilisant des anticorps dirigés contre des antigènes épithéliaux supposés être exprimés par les cellules. Une analyse multiple, combinant des marqueurs leucocytaires (comme le CD45) et épithéliaux (comme les cytokératines), peut être réalisée sur des cellules isolées, généralement par immunofluorescence (IF). Les CTC issues de carcinomes expriment les marqueurs épithéliaux et sont négatifs pour les marqueurs leucocytaires.
- **La détection moléculaire des CTC** : La caractérisation moléculaire repose essentiellement sur une analyse des mutations présentes dans les cellules isolées. Cette analyse nécessite l'utilisation de techniques de biologie moléculaire très sensibles telles que la ddPCR ou le NGS afin de pouvoir analyser ces cellules rares, très minoritaires parmi des globules blancs résiduels.

Une grande partie des techniques d'isolement repose sur une étape initiale d'enrichissement, généralement basée sur une immunosélection positive de cellules exprimant un marqueur membranaire épithélial, tel qu'EpCAM. D'autres techniques d'enrichissement ont également été rapportées : isolement par la taille, la densité, la déformabilité ou immunosélection leucocytaire négative basée sur l'antigène CD45. Aucune de ces techniques ne donne un rendement de 100% pour la purification des CTC. L'utilisation de la sélection d'antigènes multiples (combinaison de différents anticorps) n'a pas encore démontré de supériorité claire comparée à la sélection à un seul antigène. De plus, des taux de discordance élevés peuvent être observés avec différents anticorps dirigés contre le même marqueur membranaire, comme cela a été montré dans le cancer colorectal ([Antolovic et al. 2010](#)).

Ces étapes préliminaires d'enrichissement sont suivies de techniques de détection moléculaires ou cytologiques, très hétérogènes, permettant de comprendre les divergences qui apparaissent entre les études publiées.

1.2. Les Microembolies Tumorales Circulantes

Les amas ou « clusters » de Cellules Tumorales Circulantes (CTC-cluster) également appelés microembolies tumorales (CTM) peuvent être détectés dans le sang de patients ayant un cancer.

La capacité des cellules tumorales en circulation à former ces amas a été associée à un potentiel métastatique accru dans certaines études (Mascalchi et al. 2016) (Aceto et al. 2014).

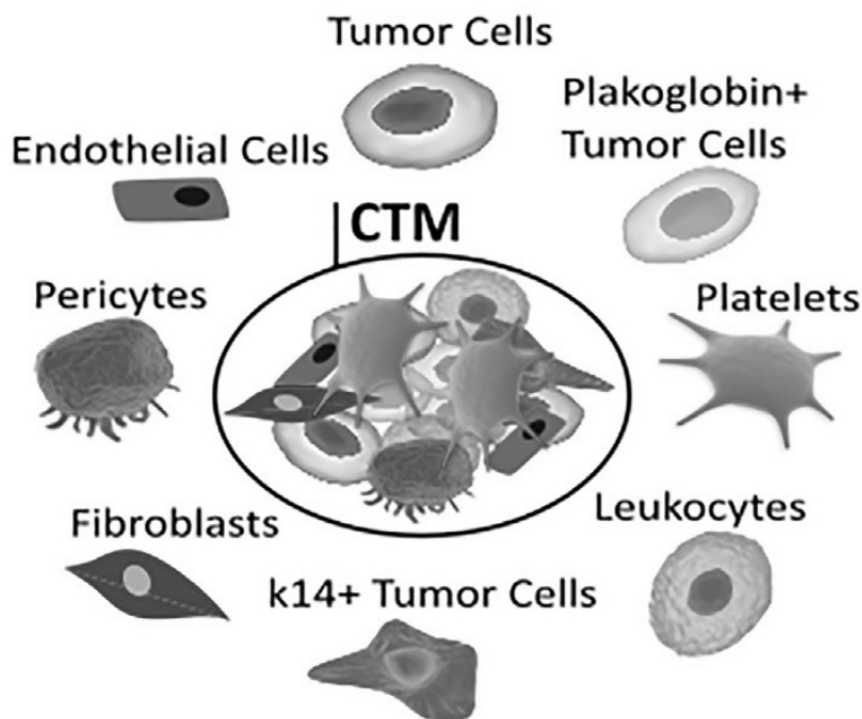


Figure 18 || Composition des microembolies tumorales circulantes

Les microembolies tumorales (CTM) sont composées de cellules hétérogènes comme des cellules mésenchymateuses, des cellules épithéliales, des cellules immunitaires, des péricytes, des plaquettes, des fibroblastes associés aux tumeurs, etc.

Les CTM sont plus rares dans la circulation sanguine comparés aux cellules tumorales individuelles. Ce sont des groupements multicellulaires de cellules tumorales primaires maintenues ensemble par des jonctions (plakoglobine ou gamma-caténine) permettant une adhérence intercellulaire forte (Aceto et al. 2014). Bien que rares ces structures pluricellulaires contribuent grandement à la propagation métastatique.

Cependant, on ignore les mécanismes impliqués dans ce potentiel métastatique augmenté et les particularités de ces amas de CTC. Une piste récente est à l'étude ([Gkountela et al. 2019](#)) à travers une analyse précise d'événements de méthylation de l'ADN des CTC de patients et de CTC xénogreffés. De manière surprenante, il a été observé des différences de méthylation dans les CTC isolées par rapport aux CTC circulant en groupe.

Le groupement en amas des CTC entraîne d'une part l'hypométhylation de certaines régions de l'ADN, notamment de gènes contrôlant la prolifération cellulaire comme : OCT4, NANOG, SOX2 et SIN3A, et d'autre part l'hyperméthylation de gènes cibles du complexe POLYCOMB responsable de la différenciation de ces cellules.

Il a également été montré que les amas de CTC pourraient partager plusieurs propriétés liées à la biologie des cellules souches. En effet, OCT4, NANOG, SOX2 et SIN3A sont normalement actifs dans les cellules souches embryonnaires, régulant simultanément l'auto-renouvellement et la prolifération cellulaire ([van den Berg et al. 2010](#)).

De plus, l'utilisation de modèles de souris a permis de démontrer que les amas de CTC proviennent de groupements de cellules tumorales oligoclonales et non d'événements d'agrégation intravasculaire ([Aceto et al. 2014](#)). La dissociation de ces amas en cellules individuelles par l'inhibition des pompes $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$ entraînerait l'augmentation de la proportion des CTC isolées dans le flux sanguin ([Gkountela et al. 2019](#)) mais réduirait la formation globale des métastases indiquant que le ciblage des groupes de CTC pourrait constituer une stratégie thérapeutique précieuse. En conséquence, le traitement par inhibiteurs de $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$ apparaît comme une nouvelle stratégie visant à réduire de manière significative la propagation des cancers, justifiant ainsi l'utilisation de ces composés thérapeutiques dans de nouvelles études cliniques.

Des données *in vivo* suggèrent d'ailleurs que le traitement par la ouabaïne et la digitoxine, prescrits normalement dans le traitement des hypotensions et des arythmies cardiaques, devrait être administré tôt dans le traitement des cancers, idéalement au moment où la tumeur est encore à un stade localisé et avant la dissémination vers des sites distants, dans le but de prévenir la formation d'amas de CTC ([Zhang et al. 2017](#)).

La perturbation de ces pompes ATPase conduirait à une augmentation concomitante des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire entraînant la perturbation des amas de CTC par suppression des jonctions cellule-cellule (Kim et al. 2011).

Ces nouvelles découvertes fournissent des informations clés sur la biologie des CTC et mettent en évidence un lien fondamental entre les caractéristiques phénotypiques des CTC (telles que leur capacité à circuler en grappes multicellulaires) et la dynamique de la méthylation de l'ADN sur des sites critiques liés à la prolifération cellulaire.

1.3. Les macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages constituent un groupe hétérogène de cellules capables de maintenir, dans les tissus à l'équilibre, des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales présentes à la surface des vaisseaux sanguins. Ces macrophages périvasculaires limitent la perméabilité des vaisseaux, phagocytent les agents pathogènes potentiels avant leur entrée dans le sang et limitent l'inflammation inappropriée. Il a également été découvert que les macrophages peuvent jouer un rôle dans des maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques ou le cancer (Lapenna et al. 2018). Le sous-ensemble de macrophages associés aux tumeurs, nous intéressent plus particulièrement, et a initialement été caractérisé par leur expression du récepteur de l'angiopoïétine 1 (TIE2) (De Palma et al. 2005). Puis leur rôle dans l'angiogenèse et la croissance tumorale a ensuite été démontré (Venneri et al. 2007). Ces macrophages associés aux tumeurs ont été baptisés CAML (*Cancer Associated Macrophages-Like*). Ce sous-groupe de cellules circulantes est de plus en plus étudié. Il a même été mis en évidence que les CAML sont plus répandus que les CTC dans de nombreuses tumeurs solides, et que contrairement aux CTC, les CAML se retrouvent à tous les stades du cancer (Adams et al. 2016). Des données récentes suggèrent que les CAML et les CTC isolés du même échantillon de sang de patient fournissent une utilité clinique supérieure à celles des CTC seules (Tang et al. 2018).

1.4. Les cellules endothéliales vasculaires associées aux tumeurs

Des cellules endothéliales vasculaires associées au cancer (CAVE) se trouvent également en circulation et ont été mises en évidence récemment (Tang et al. 2018). Cette sous-population récente n'a pas fait partie de nos analyses dans le cadre de cette thèse.

Cependant, il s'agit d'une population très intéressante qu'il était important de citer. En effet, les CAVE sont considérées comme un sous-type de CTC positives pour Vimentine et CD31 et négative pour CD14. Les CAVE sont également identifiées comme étant positives pour CK8, 18 et 19, marqueurs spécifiques de la transition EMT.

Ce sous-groupe de cellules n'exprimant pas EpCAM ne pourra pas être isolé selon ce critère. De plus, les CAVE se trouvent souvent au sein des amas ([voir page 51](#)) et peuvent être, comme les CTC et les CAMLS, un bon outil pour l'analyse de biomarqueurs informatifs tel que PD-L1 ([Adams et al. 2017](#)).

2. Utilité clinique et valeur pronostique des CTC

Plusieurs projets sont en cours pour tenter de démontrer la valeur pronostique des CTC, et donc permettre leur passage en clinique. Ces essais apporteront des renseignements importants sur le risque de récurrence ou de progression métastatique et ont pour objectif final de pouvoir gérer en temps réel la conduite thérapeutique. Parmi ces projets, 12 sont financés par l'INCa et sont soit des projets basés sur la validation clinique et la quantification des CTC en vue d'une application en routine, soit des projets de recherche translationnelle et fondamentale basés essentiellement sur la caractérisation moléculaire des CTC. Les CTC ont plusieurs rôles aujourd'hui et peuvent être utilisés pour des applications cliniques allant du diagnostic initial et jusqu'à la mise en évidence de l'émergence de certaines résistances aux traitements ([Bailey and Martin 2019](#)).

2.1. Aide au diagnostic initial

Certaines données démontrent que le nombre de cellules tumorales circulantes dans le sang de patients pourrait refléter le pronostic de la maladie. En effet, un taux de CTC élevé serait synonyme d'un potentiel métastatique accru ([Bidard et al. 2012](#)).

De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours afin de démontrer le potentiel des CTC en tant que biomarqueurs pour le diagnostic initial de la maladie et la prise en charge thérapeutique.

L'utilité clinique et la valeur pronostique avant traitement, par exemple, ont été évaluées à travers une étude de phase III française, STIC CTC (NCT01710605), qui inclut des patientes présentant un cancer du sein hormono-dépendant (RO+) et négatif pour HER2 (HER2-) ([Bidard et al. 2013](#)). Le choix du traitement de première ligne (chimiothérapie ou hormonothérapie) a été basé soit sur le choix du clinicien, soit sur le niveau de CTC. Cette étude met en évidence que la quantité de CTC dans le sang des patientes refléterait le pronostic de la maladie.

Dans la majorité des cas, le comptage des CTC et le choix thérapeutique fait par le médecin vont dans le même sens. En revanche, pour les 300 patientes qui présentaient une évaluation discordante et qui ont été traitées par chimiothérapie en raison de leur taux de CTC élevé alors que le médecin préconisait une hormonothérapie ont vu leur survie augmentée ([Bidard et al. 2016](#)).

Un autre essai américain, SWOG 0500 ([NCT00382018](#)) compare la prise en charge standard à une prise en charge intégrant l'évolution des CTC en première ligne pour les patients métastatiques ([Smerage et al. 2014](#)). La conclusion de cette étude va dans le même sens que le postulat selon lequel les CTC pourraient guider le choix thérapeutique fait il y a maintenant plusieurs années ([Alix-Panabieres and Pantel 2013](#)). Cependant, l'interprétation de ces résultats et de la valeur pronostique des CTC reste souvent limitée par la petite taille des cohortes et par l'hétérogénéité des méthodes de détection des CTC utilisées.

2.2. Prédiction de la résistance aux traitements

L'utilisation des CTC comme un outil prédictif pour évaluer le stade de la maladie, l'efficacité des traitements et la survie globale des patients est limitée par la variété des technologies d'enrichissement et l'hétérogénéité de ces cellules. Il est donc nécessaire de mieux comprendre la biologie de ces cellules. Cependant, les CTC fournissent des informations précieuses sur les caractéristiques de la tumeur, l'identification des voies métastatiques, ainsi que sur la détermination d'outils de diagnostic et de pronostic précis pour le suivi de la maladie.

2.3. Étude de la viabilité cellulaire

La majorité des techniques d'isolement des CTC commercialisées actuellement ne permet pas de distinguer les cellules tumorales circulantes viables des cellules apoptotiques.

Cependant, de récents développements sont en cours offrant l'opportunité de pouvoir étudier la viabilité de ces cellules, notamment par leur mise en culture.

Quelques équipes de recherche sont arrivées à isoler, maintenir dans le temps ces cellules en culture et à obtenir des lignées de CTC immortelles ([Tableau 5](#)). Ces lignées établies permettent l'ouverture à de nombreuses nouvelles applications.

La technique EPISPOT permet la détection exclusive de CTC vivantes : dans un premier temps, les cellules sont enrichies sur la base d'une sélection négative CD45 (RosetteSep™) puis mise en culture sur une membrane revêtue d'anticorps spécifiques. Cette technique a été mise au point par le Dr Alix-Panabières ([Alix-Panabières 2012](#)) au sein du laboratoire « cellules circulantes rares humaines » du CHU de Montpellier et a déjà été utilisée pour la détection des CTC dans les cancers du sein ([Alix-Panabières et al. 2005a](#)), du côlon ([Deneve et al. 2013](#)) et de la prostate ([Alix-Panabières et al. 2005b](#)) et plus récemment dans le mélanome ([De Roeck et al. 2015, p. 100](#)).

Les analyses fonctionnelles pouvant être réalisées sur ces CTC viables contribueront d'une part à la compréhension biologique du processus métastatique et d'autre part à révéler de nouvelles cibles thérapeutiques contre les cellules cancéreuses en dissémination.

Cancer	Méthode d'isolement	Conditions de Culture	Succès	Références
Sein	FACS	Sans sérum > 10 % SVF	8 %	(Zhang et al. 2013)
Sein	CTC-iChip	Sans sérum / Hypoxie	17 %	(Yu et al. 2014)
Colon	RosetteSep	2 % SVF / Hypoxie > Normoxie	1 %	(Cayrefourcq et al. 2015)
Prostate	Ficoll + RosetteSep	Sans sérum / Matrigel / Normoxie	6 %	(Gao et al. 2014)
Poumon	Ficoll	Sans sérum / Normoxie	10 %	(Hamilton et al. 2015)

Tableau 5 || Synthèse des succès de culture (long terme) de CTC isolées de patient

La majorité des publications sur la culture des CTC présentent des succès de culture à court-terme (allant de 3 à 14 jours), seules 4 études à long terme rapportent des lignées de CTC établies et stables dans le temps et sont présentées dans ce tableau. Tableau adapté de ([Wang et al. 2016](#)) et complété.

2.4. Détection et caractérisation des métastases

Les CTC jouent un rôle critique dans la formation des métastases ([Williams et al. 2015](#)). Cependant, les mécanismes par lesquels le cancer se propage à différents organes soulèvent encore de nombreuses interrogations. Les nombreuses lignées tumorales immortalisées et cultivées traditionnellement en 2 dimensions peuvent difficilement répondre à toutes ces interrogations car ne reflètent pas précisément l'hétérogénéité de la tumeur.

Des modèles murins de xénogreffes dérivées de patients mis en place soit à partir d'une fraction de tumeur (PDX), soit à partir de CTC isolées de patients (CDX) sont plus proches de l'environnement tumoral. L'avantage des CTC par rapport aux modèles de PDX classiques sont d'une part l'indépendance de la collecte de l'échantillon chirurgical, d'autre part la possibilité de générer des modèles expérimentaux à différents stades de la maladie. Ces modèles expérimentaux sont déjà largement utilisés dans la recherche préclinique et se développent peu à peu pour la recherche clinique (prédire la réponse aux traitements, rechercher de nouveaux biomarqueurs, comprendre le processus métastatique).

Des modèles *in vivo* à partir de CTC de patients ont déjà été étudiés dans le cancer du sein ([Ramirez et al. 2019](#)), de la prostate ([Williams et al. 2015](#)), du poumon ([Drapkin et al. 2018](#)) et du pancréas ([Wang et al. 2019](#)). Les CDX obtenus peuvent aider à la compréhension de la biologie tumorale et du processus métastatique. En revanche, ils ne peuvent pas être utilisés pour le criblage de médicament à haut débit.

3. Méthodes d'enrichissement des CTC

Plus de cinquante technologies ont été développées, ces dernières décennies, pour isoler et caractériser les cellules tumorales du sang circulant ([Bailey and Martin 2019](#)). Les CTC peuvent être identifiées soit en exploitant leurs profils d'expression protéique/génique soit par leurs caractères morphologiques comme leur déformabilité et leur taille distincte par rapport aux cellules sanguines ([Alix-Panabieres and Pantel 2013](#)).

Le caractère hétérogène qui définit les CTC est également à prendre en considération lorsque l'on tente d'isoler ces cellules car certaines caractéristiques comme l'expression des marqueurs épithéliaux-mésenchymateux demeurent des processus transitoires.

Récemment, les plateformes d'enrichissement des CTC ont considérablement évolué, passant d'une sélection exclusivement sur un seul marqueur à des systèmes multi-marqueurs ou indépendants de l'épitope.

3.1. Détection des cellules tumorales circulantes

Ces dernières années, un certain nombre de dispositifs ont été décrits pour détecter et isoler les CTC. Ils utilisent soit des méthodes directes, reposant essentiellement sur la combinaison de la sélection immunologique négative des cellules non épithéliales et positive des cellules épithéliales, soit sur des méthodes indirectes, principalement sur les propriétés physiques de ces cellules ou bien la détection par RT-PCR de transcrits d'ARNm spécifiques du cancer étudié.

3.1.1. CellSearch, le Gold standard

Le développement du système CellSearch (Silicon Biosystems, Bologne, Italie) a joué un rôle déterminant dans l'ouverture du domaine des CTC aux essais cliniques. Ce dispositif semi-automatisé, basé sur l'isolement des CTC potentielles par des billes immunomagnétiques recouvertes d'anticorps anti-EpCAM, vise à identifier les cellules positives pour la cytokératine (CK) présentant une coloration nucléaire positive (DAPI) et une négativité pour le marqueur leucocytaire CD45. Le système CellSearch est aujourd'hui considéré comme le gold standard car c'est la seule méthode approuvée par la US Food and Drug Administration (FDA).

Ce système a été spécifiquement autorisé pour être utilisé comme test de substitution de la survie globale et de la survie sans progression dans le cadre de 3 cancers métastatiques : le cancer du sein (Cristofanilli et al. 2004), le cancer de la prostate (de Bono et al. 2008) et le cancer colorectal (Cohen et al. 2008). Beaucoup d'études ont démontré l'efficacité de ce système et les premières études cliniques conduites ont montré que la présence des CTC était significativement associée à un mauvais pronostic pour le patient. Plusieurs études ont cependant soulevé la question de l'incapacité de CellSearch à détecter l'ensemble du pool des cellules tumorales circulant dans le sang de patients atteints de cancers solides.

En effet, cette méthode atteint ses limites dans le cas de cellules ayant un faible niveau d'expression d'EpCAM à leur surface ou de CTC issues de tumeurs non épithéliales, qui n'expriment pas EpCAM telles que les CTC du mélanome. D'autres limites pourraient provenir de la technique immunomagnétique elle-même et dépendre du clone d'anticorps monoclonaux anti-EpCAM utilisé ([Antolovic et al. 2010](#)).

En effet, EpCAM existe en 2 variants : La présence de son domaine intracellulaire (**EpICD**) et de son domaine extracellulaire (**EpEX**) ont d'ailleurs été étudiés par immunofluorescence dans une étude comparant 2 méthodes d'isolement des CTC utilisant des principes différents : CellSearch (basée sur EpCAM) et ScreenCell (basée sur la taille) ([Nicolazzo et al. 2017](#)).

L'analyse IF a été directement réalisée sur les supports d'isolement ScreenCell. Les résultats ont montré que globalement EpICD et/ou EpEX étaient exprimés dans 176 CTC détectés par ScreenCell alors que le système CellSearch n'a pu capturer que 10 CTC.

Il s'agit là de la première démonstration que la faible sensibilité de CellSearch à la détection des CTC n'est pas directement liée à l'absence d'expression d'EpCAM mais plus à son expression variable. Les niveaux d'expressions d'EpCAM peuvent potentiellement changer lorsque les cellules passent de la tumeur primaire, où elles sont adhérentes, à un état circulant, où elles ne le sont pas.

Ces nombreuses variations phénotypiques qui se produisent lorsque les CTC passent dans la circulation, modifient profondément l'expression des marqueurs épithéliaux empêchant la capture des CTC qui n'expriment pas un taux suffisant d'EpCAM ([Schwarzenbach et al. 2011](#)). Effectivement une autre étude a démontré qu'avec le système CellSearch, les CTC doivent avoir plus de 2000 molécules EpCAM à leur surface pour pouvoir être capturées ([Coumans et al. 2010](#)). Il a également été démontré que différents états de conformation d'EpCAM pourraient masquer les épitopes et empêcher la liaison avec l'anticorps. En effet, la distance et/ou la liaison covalente entre l'anticorps et la surface de la bille pourrait limiter l'orientation de l'anticorps et donc sa reconnaissance de l'épitope. Les différentes études s'entendent sur le fait que l'épitope EpCAM est maintenu au niveau des CTC mettant en lumière le fait que la non-détection de l'épitope n'est pas lié à l'absence d'EpCAM mais que d'autres mécanismes y contribuent.

3.1.2. Les autres technologies

Comme nous venons de le voir, la méthode d'enrichissement gold standard, CellSearch, ne permet pas de capturer les cellules ayant une expression faible d'EpCAM ou une absence d'expression, ce qui peut entraîner une analyse incomplète de l'échantillon. La plupart de ces groupes de sous-populations de CTC sont capturés avec les systèmes basés sur des critères indépendants de l'épitope ou bien peuvent également être isolées en augmentant le nombre et la spécificité des anticorps.

L'approche basée sur la détection immunologique des CTC a d'ailleurs donné naissance à divers dispositifs tels que le dispositif AdnaTest (QIAGEN) disponible dans le commerce, qui permet d'isoler des CTC potentielles par des billes immunomagnétiques revêtues d'anticorps anti-EpCAM ainsi que d'anticorps spécifiques du cancer étudié (Danila et al. 2016).

Une étude récente (Lopresti et al. 2019) a rendu possible la détection de CTC par cytométrie en flux. Technique couramment utilisée pour l'analyse fine d'une population cellulaire mais pas assez sensible pour des cellules rares comme les CTC sans étape d'enrichissement.

Cependant, la détection des CTC par cytométrie en flux a été rendue possible en ajustant certains paramètres notamment en diminuant la vitesse et en combinant la présence de 2 caractéristiques : la taille de la cellule et son expression positive pour la cytokératine.

D'autres approches utilisant les caractéristiques morphologiques des CTC ont également été développées. Des dispositifs basés sur de la microfluidique par exemple ont permis l'isolement de CTC (Stott et al. 2010) chez des patients atteints de maladie localisée ou métastatique. De manière similaire, des CTC ont pu être isolées en utilisant des dispositifs de filtration (Kolostova et al. 2014) (Lin et al. 2010) et ont obtenu des taux de récupération élevés pouvant aller jusqu'à 92%.

3.2. Identification des cellules tumorales circulantes

Les approches techniques actuellement utilisées pour la détection des CTC, bien que basées sur des propriétés distinctes, partagent un manque de spécificité biologique. Alors que l'on peut affirmer que les CTC identifiées sont, selon tous les critères, des cellules cancéreuses, les données sur leur capacité à envahir, à proliférer ou à provoquer des métastases sont encore rares.

Il est de plus en plus évident que la détection des CTC basée exclusivement sur la détection cytologique ou sur les antigènes ne reflète pas le pool total de cellules en dissémination et peut même ignorer des sous-populations hautement pertinentes sur le plan clinique comme les amas de CTC ([Voir page 51](#)). De plus, différentes approches de détection des CTC identifient probablement des sous-populations distinctes de cellules tumorales, mais nécessitent une normalisation technique avant que leur validité clinique et leur spécificité biologique puissent être examinées de manière adéquate.

Un essai clinique ([Smerage et al. 2014](#)) a montré que la seule numération des CTC ne suffisait pas à guider le changement de traitement et à améliorer la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, ce qui souligne l'importance de la caractérisation moléculaire des CTC pour être plus informative pour le choix des options de traitements.

La caractérisation moléculaire des CTC est fondamentale pour l'identification phénotypique des cellules malignes et la description des altérations génétiques pertinentes susceptibles de changer en fonction de l'évolution de la maladie et de la résistance au traitement.

Cependant, la caractérisation moléculaire des CTC reste un défi en raison de leur rareté et de leur hétérogénéité et des difficultés technologiques rencontrées.

Concernant l'approche de détection immunomagnétique directe, il est nécessaire d'optimiser la composition des cocktails d'anticorps utilisés pour l'enrichissement des CTC et d'inclure également les caractéristiques de la transition épithéliaux-mésenchymateuse et des cellules souches. En effet, dans ces conditions, un nombre significativement plus élevé de CTC a pu être détecté ([Fina et al. 2015](#)).

L'approche qui consiste à enrichir les CTC par une méthode basée sur la taille, sans biais liés aux antigènes permet de sélectionner d'avantages de CTC, supprimant paradoxalement les différences de statut entre les patients métastatiques et non métastatiques. Ceci soulève des questions intéressantes sur les caractéristiques moléculaires distinctes des CTC isolées par les deux approches, qui pourraient non seulement aider à définir le stade de la maladie, mais également aider à prédire sa progression.

La disponibilité de techniques d'isolement efficaces associées à une caractérisation moléculaire sensible est donc le défi actuel pour rendre l'utilisation des CTC cliniquement pertinentes. Les technologies de ddPCR ou de NGS, déjà opérationnelle, peuvent être les prochaines étapes de l'approche moléculaire et ainsi apporter des éléments de réponses concernant les mutations présentes au sein de ces cellules en circulation. Cependant, le processus d'isolement et l'identification des CTC manque de standardisation ([Bünger et al. 2015](#)). Des techniques normalisées d'isolement et d'analyse des CTC doivent être appliquées afin de permettre la réalisation d'essais multicentriques à grande échelle, correctement contrôlés et fondés sur des cohortes d'échantillons de haute qualité.

4. Les CTC dans le mélanome

Le diagnostic initial du mélanome est aujourd'hui basé sur l'analyse du site d'origine de la tumeur et de sa classification clinique internationale ([voir page 30](#)). Mais de nouveaux marqueurs, non invasifs pouvant être utilisés en complément, sont à l'étude pour améliorer la survie et le suivi des patients tout au long de leurs traitements.

Les cellules de mélanome en circulation (CMC) ont été décrites pour la première fois dans le sang de patients il y a environ 30 ans ([Smith et al. 1991](#)). Dans cette étude, les chercheurs sont partis du postulat qu'étant donné que les mélanocytes normaux ne circulent pas dans le sang périphérique, la détection d'un gène spécifique des mélanocytes, la tyrosinase, devrait indiquer la présence de cellules cancéreuses en circulation. Cependant, cette détection moléculaire a été difficile car les techniques existantes étaient très peu sensibles.

Toutefois, des mises au point ont permis de rendre possible la détection d'une seule cellule de mélanome introduite dans 2 ml de sang sain. Les échantillons de sang de quatre des sept patients atteints de mélanome malin testés dans cette étude ([Smith et al. 1991](#)) ont également donné des résultats positifs, tandis que les huit sujets sains ont donné des résultats négatifs.

Une deuxième étude allant dans le même sens et basée sur la même méthode de détection ([Kunter et al. 1996](#)), portant cette fois sur un échantillon plus grand de 64 patients atteints de mélanome malin à différents stades a été évaluée de manière prospective et a également suggéré qu'une détection de la tyrosinase dans le sang périphérique pouvait être utile dans la détection précoce de cellules tumorales en circulation dans le mélanome. Les résultats de cette étude démontrent pour la première fois que la détection de l'ARNm de la tyrosinase dans les cellules présentes dans le sang périphérique pourrait servir de marqueur rapide de la progression tumorale. Déjà en 1996, la question de la standardisation des méthodes entre différents laboratoires et pour une meilleure définition de la sensibilité et du traitement était abordée.

La PCR a été la méthode prédominante utilisée pour l'analyse des CTC du mélanome, ce qui diffère des cellules provenant de cancers d'origine épithéliale, pour lesquels la détection des CTC est principalement basée sur un enrichissement par des anticorps qui ciblent les antigènes de la membrane plasmique (comme EpCAM). En effet, l'absence d'EpCAM à la surface des cellules du mélanome complique l'utilisation de la méthode standard actuelle (CellSearch), développée pour l'étude des carcinomes ([Khoja et al. 2014](#)).

En effet, dans le mélanome, un kit spécifique pouvant être utilisé avec la plateforme CellSearch n'en est qu'au début de son développement. Il utilise les anticorps CD146 (MelCAM) et HMM-MAA (High Molecular Weight-Melanoma-Associated Antibody) respectivement pour la capture et la détection des cellules du mélanome.

Encore peu de rapports utilisant ce test spécifique sont publiés. La première étude ([Khoja et al. 2013](#)) avec ce kit spécifique a montré que la détection des CTC pouvait fournir des données pertinentes sur le pronostic des patients atteints de mélanome métastatique.

Une étude plus récente ([Hall et al. 2018](#)) réalisée sur un total de 93 patients atteints d'un mélanome de stade I à IV montre que la présence d'au moins une CTC lors de la prise de sang initiale est associée à une survie sans progression raccourcie pour les patients atteints de mélanome métastatique (stade IV). Néanmoins, aucune association entre l'identification de CTC et l'épaisseur de Breslow ou le statut de la mutation BRAF n'a été trouvée. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de s'assurer de la spécificité de ce kit.

Toujours dans le mélanome, et pour s'affranchir de cette spécificité liée aux anticorps, d'autres études utilisent des techniques, telles ClearCell FX (ClearBridge Biomedics, Singapour), un instrument avec une puce microfluidique ([Lim and Hoon 2014](#)) permet l'isolement des cellules d'intérêt à travers leur taille et leur masse sans biais de l'expression des antigènes de surface.

Également, certaines études ([De Souza et al. 2017](#)) ([De Roeck et al. 2015](#)) ont réussi à montrer que la détection des CTC était associée à une progression tumorale chez les patients atteints de mélanome avancé. La technique EPISPOT ([voir page 54](#)) dans le mélanome basé sur la protéine S100 permet l'étude des propriétés fonctionnelles des CTC viables.

L'utilisation de ce test comme d'autres tests pourrait être proposée pour la détection des CTC chez les patients atteints de mélanome. Cependant, comme de nombreuses méthodes différentes et non standardisées ont été utilisées, les informations obtenues sur les CTC, qui auraient pu servir au suivi des patients, n'ont pas pu être introduites dans la pratique clinique pour le mélanome.

Chapitre IV | La technologie ScreenCell®

Les dispositifs ScreenCell sont indépendants de tout équipement lourd et conçus pour les plateformes et les essais IVD standardisés. Ces dispositifs sont à usage unique, de faible coût et utilisent une membrane poreuse pour isoler les cellules tumorales selon leur taille ([Desitter et al. 2011](#)). La technologie ScreenCell est capable d'isoler les cellules tumorales rares avec un taux de recouvrement élevé (91.2% pour 5 cellules et 74% pour 2 cellules). Les cellules étant bien préservées morphologiquement, les analyses d'immunocytochimie, d'immunofluorescence et de FISH peuvent être effectuées directement sur le support d'isolement. Les dispositifs ScreenCell permettent également d'isoler des cellules vivantes capables de survivre et de proliférer en culture. Du matériel génétique de haute qualité peut également être isolé directement à partir des cellules tumorales isolées vivantes ou fixées sur la membrane des dispositifs. Cette technologie permet l'isolement et la caractérisation de différents sous-groupes de cellules dont les CTC, les microembolus tumoraux (CTM), les CAML, les CAVE, etc. ([Wechsler 2015](#)) ([Voir page 48](#)). Néanmoins, cette technique basée sur la taille capture en plus des CTC, des cellules sanguines de grandes tailles, comme les monocytes ou certains lymphocytes activés ([Awe et al. 2017](#)). Par leur taille réduite, leur polyvalence et leur capacité à isoler les CTC en quelques minutes, les dispositifs ScreenCell peuvent être en mesure de simplifier et d'améliorer l'accès non invasif aux cellules tumorales.

1. Le principe technique

Les dispositifs ScreenCell ont été développés pour isoler les CTC par la taille sur une membrane microporeuse. Ces dispositifs sont conçus pour isoler : (i) des cellules fixées pour des études cytologiques (ScreenCell® Cyto) (ii) des cellules vivantes pour une mise en culture (ScreenCell® MB) et (iii) des cellules fixées ou vivantes pour des analyses moléculaires (ScreenCell® MB). Les dispositifs comprennent une partie haute (réservoir), une membrane (support d'isolement) et une partie basse qui, après retrait d'une membrane protectrice, permet l'insertion d'un tube (sous vide) collecteur. Avant de procéder à l'isolement, l'échantillon à analyser doit être dilué avec un tampon spécifique pour les cellules fixées ou vivantes, en fonction des applications. Le processus d'isolement des cellules (fixées ou vivantes) est un processus rapide qui est généralement réalisé en moins de 3 minutes. À la fin de la filtration, le support d'isolement contenant les cellules d'intérêts peut rapidement être récupéré pour être analysé ([Figure 19](#)).

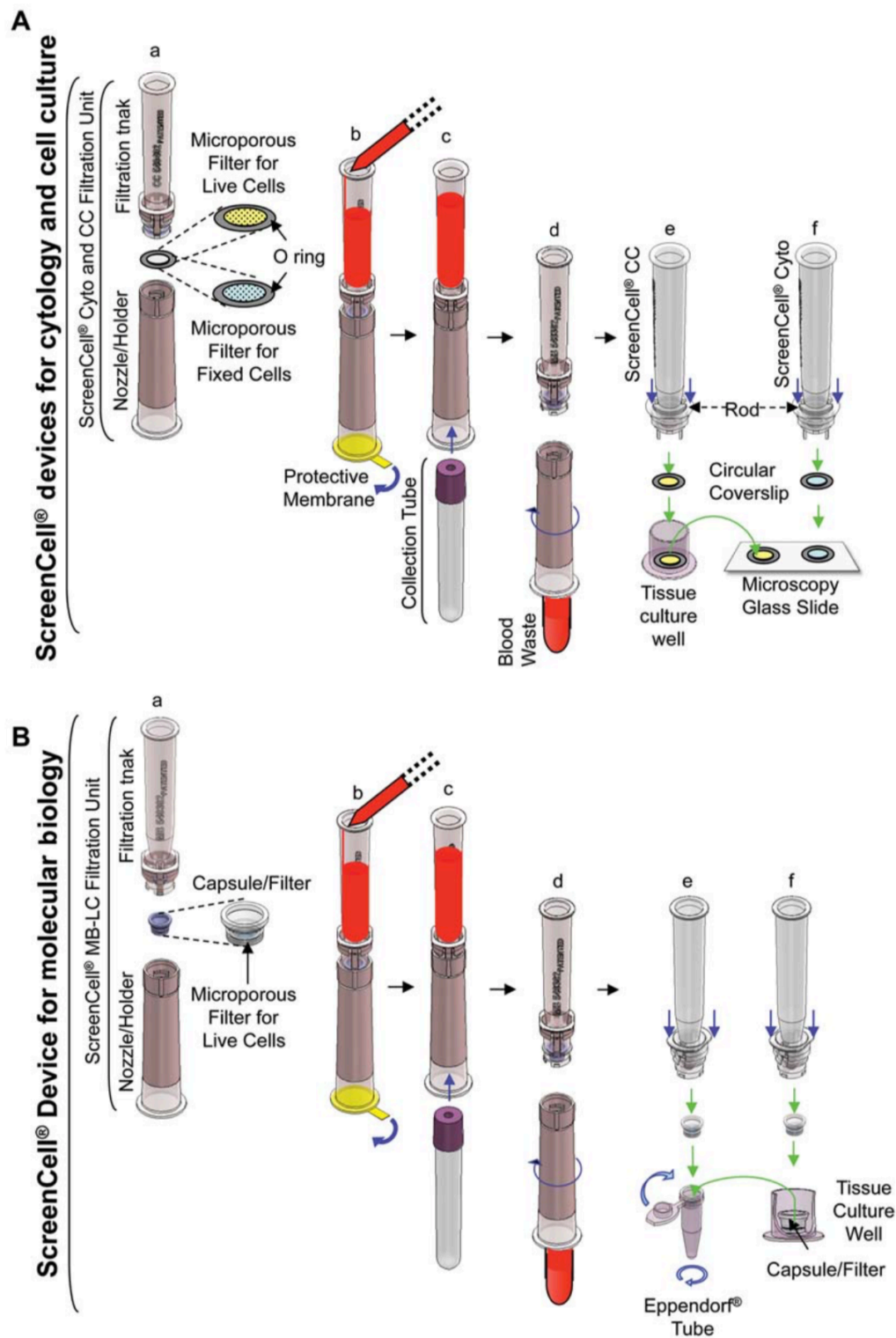


Figure 19 || Principe de la technologie ScreenCell®

(A) Dispositif ScreenCell CYTO pour les analyses cytologique (B) Dispositif ScreenCell MB pour la culture cellulaire et les analyses moléculaires. Source : (Desitter et al. 2011)

2. Les interfaces compatibles avec la technologie ScreenCell

Depuis le développement de la technologie ScreenCell en 2011, plusieurs études scientifiques ont démontré l'utilité de ces dispositifs ainsi que leur compatibilité avec des interfaces ou des plateformes novatrices.

2.1. DEPArray™

La technologie DEPArray™ (Menarini, Silicon Biosystems) est basée sur la diélectrophorèse (DEP) permettant la récupération et l'analyse de cellules uniques. Après une étape préalable d'enrichissement, le DEPArray™ permet l'obtention de cellules rares, viables et uniques obtenues à partir d'un échantillon hétérogène (voir Figure 20). Cette plateforme assure la récupération des cellules d'intérêt de façon individuelle, permettant des analyses génomiques et moléculaires poussées au niveau d'une cellule unique.

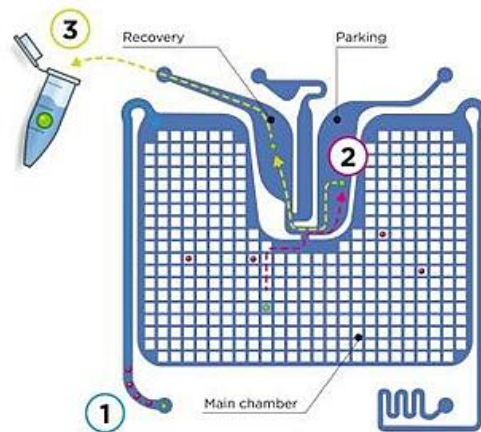


Figure 20 || Principe de la technologie DEPArray

La puce microfluidique est chargée avec l'échantillon d'intérêt (1), des forces diélectriques s'appliquent au niveau de la chambre principale pour répartir les cellules une à une. Les cellules d'intérêt sélectionnées sont dirigées vers le « parking » (2) avant d'être récupérées individuellement

Une étude (Mu et al. 2016) regroupant 30 patientes atteintes de cancer du sein métastatique (mBC) a permis d'identifier des CTC, des microembolies (CTM), des CTC en Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT) et des cellules de type macrophage associées au cancer (CAML). Ces différents sous-groupes de cellules ont été enrichis par la technologie ScreenCell, purifiés individuellement avec la technologie DEPArrayTM puis analysés par séquençage ciblé. Ces analyses moléculaires ont permis la détection de différentes mutations du gène TP53 au niveau des CTC :

- Une mutation hétérozygote de la protéine TP53 (R248W) au niveau d'une CTC unique et d'un pool de 3 CTC
- Une mutation homozygote de la protéine TP53 (R248W) provenant d'une seule CTC et d'un pool de 2 CTC.

De plus, le gène ESR1 sauvage a également été détecté chez ce même patient. Bien qu'aucune mutation n'ait pu être détectée pour ce gène chez ce patient, la possibilité de le détecter ouvre de nouvelles possibilités. En effet, l'étude des altérations de ce gène est intéressante car ce gène a été identifié comme jouant un rôle clé dans la résistance à l'hormonothérapie. La détection au niveau du sang circulant de la mutation ESR1 acquise au cours du traitement permet d'anticiper une éventuelle résistance et permet d'adapter la prise en charge des cancers du sein exprimant les récepteurs hormonaux

Les résultats de cette étude révèlent que l'association ScreenCell / DEPArray, peut être utilisée pour enrichir, identifier et caractériser les CTC pour des altérations génétiques de façon précise.

2.2. droplet digital PCR (ddPCR)

La PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) est une technique d'analyse de mutation très précise qui permet une quantification absolue et extrêmement sensible à l'aide d'un flux de travail simple, rapide et économique. L'utilisation de la ddPCR a joué un rôle clé dans le profilage moléculaire des cancers et notamment dans la détection de mutation très minoritaire au sein de la population d'intérêt (Figure 21).

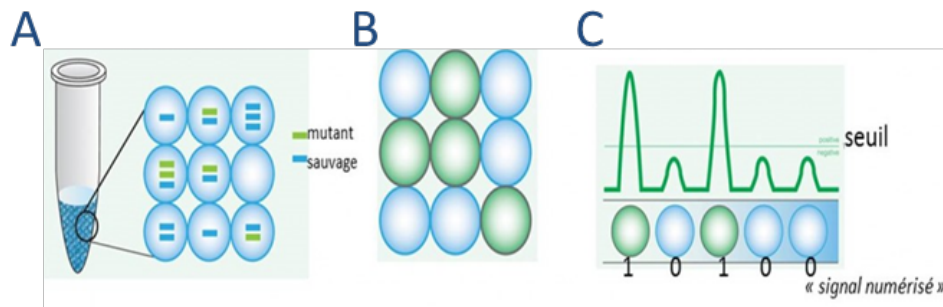


Figure 21 || Principe de la ddPCR

Technique très sensible basée sur un découpage et une répartition de l'échantillon au sein de 20 000 gouttelettes (A). Une amplification ciblée est alors réalisée par PCR standard au sein de chaque gouttelette (B). Puis la fluorescence émise au sein de chaque gouttelette sera détectée et analysée (C). La quantification absolue sera alors déterminée selon la loi de Poisson. Source : www.bio-rad.com

Dans le cancer colorectal, les mutations KRAS sont un puissant facteur prédictif négatif pour l'utilisation de traitement avec des anticorps ciblant l'EGFR, comme le cetuximab et le panitumumab. Comme il peut être difficile d'obtenir des tissus tumoraux appropriés pour le génotypage de KRAS, d'autres méthodes sont nécessaires, comme l'analyse des CTC. Les CTC ont été dans cette étude (Denis et al. 2016) isolées à partir de 35 patients avec CRC à différents stades. Il a été possible de détecter au moins une CTC dans 90% des échantillons, y compris dans les échantillons provenant de CRC non métastatique en utilisant le dispositif ScreenCell, ce qui est significativement plus élevé que ce qui a été rapporté par d'autres techniques, en particulier celles utilisant une immunosélection basée sur des marqueurs épithéliaux (Cao et al. 2015). De plus, le génotypage de KRAS a été réussi pour 86% (30/35) des échantillons par ddPCR. La concordance était de 77% avec une sensibilité de 83%. La nature peu invasive de cette procédure associée à la sensibilité élevée de la ddPCR, pourrait offrir à l'avenir une occasion de surveiller les patients tout au long de la maladie à plusieurs niveaux, y compris la détection précoce d'une éventuelle rechute au cours du traitement.

2.3. TeloView

TeloView est une technologie développée et brevetée par la société 3D Signature (3DS) (Toronto, Canada). Cette technologie, basée sur l'analyse de la structure 3D des télomères des chromosomes par FISH (Figure 22), est à l'étude dans la maladie d'Alzheimer ainsi que dans différents cancers (Lymphome d'Hodgkin, Prostate, Poumon, etc.).

Cette technologie s'intéresse à l'instabilité génomique des télomères comme biomarqueur pour le diagnostic, le pronostic, et la réponse des patients aux traitements.

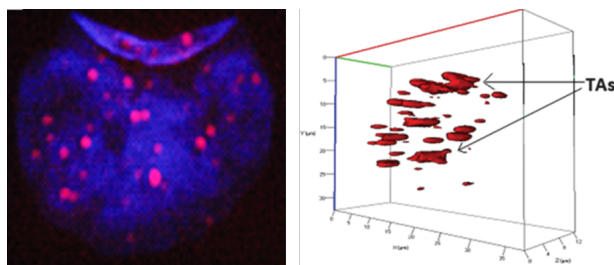


Figure 22 || **Représentation 3D des télomères avec TeloView**

L'hybridation quantitative in situ en fluorescence des télomères est réalisée sur les noyaux des CTC directement sur les supports d'isolement ScreenCell. Application possible car la conformation 3D des cellules est préservée lors de l'étape d'isolement. Source : (Adebayo Awe et al. 2013)

En 2013, l'isolement des CTC sur support ScreenCell, combiné à l'analyse quantitative des télomères par TeloView (Adebayo Awe et al. 2013), a permis l'identification et la caractérisation moléculaire de différentes sous-populations de CTC. L'analyse télomérique tridimensionnelle a été réalisée sur des CTC isolées de 19 patients comprenant quatre types de tumeurs différentes, à savoir la prostate, le côlon, le sein et le mélanome. Cette analyse télomérique des CTC a permis de déterminer leur niveau d'instabilité chromosomique (CIN). L'étude a montré que les CTC isolées de patients atteints de ces différents cancers, présentent des profils télomériques 3D uniques. Des sous-populations distinctes ont été observées sur la base d'analyse quantitative d'images télomériques nucléaires 3D à l'aide de TeloView (Vermolen et al. 2005) (Vermolen et al. 2005). Une étude allant dans le même sens a été réalisée en incluant uniquement un groupe de 20 patients avec cancer de la prostate (Wark et al. 2017).

Cette étude et celle de 2013 ont démontré la capacité de l'analyse 3D des télomères de CTC à mettre en avant l'hétérogénéité de la maladie dans un groupe de patients cliniquement homogène mais qui présente des réponses thérapeutiques différentes. Ceci offre une nouvelle opportunité d'améliorer le suivi du traitement et la gestion de patients atteints de cancer.

2.4. Microscopie à Force Atomique (AFM)

Toujours dans l'étude du cancer de la prostate, une autre interface a été combinée aux dispositifs ScreenCell, il s'agit de la Microscopie à Force Atomique (AFM). L'AFM est un type de microscopie permettant de visualiser la topographie d'un échantillon et d'évaluer des forces (de l'ordre du nanonewton) sur des zones de seulement quelques microns.

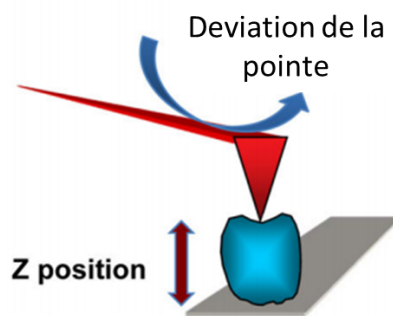


Figure 23 || Principe de la microscopie à force atomique

La FAM mesure la déviation de la pointe du microscope lorsqu'elle exerce une force sur l'échantillon à l'aide de la réflexion d'un laser. La déviation de la pointe sera proportionnelle à la force appliquée. Ce microscope a de nombreuses applications en biologie dont l'analyse de l'élasticité cellulaire. Source (Chen et al. 2013)

La combinaison de ScreenCell et de la FAM (Chen et al. 2013) a permis d'observer une augmentation de l'élasticité cellulaire et de la souplesse de la membrane dans les CTC par rapport aux cellules non cancéreuses, pouvant jouer un rôle dans leur potentiel invasif et leur mobilité dans la circulation périphérique.

Ces modifications de la membrane cellulaire peuvent être le résultat d'une transformation morphologique et phénotypique de ces cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Des gènes favorisant la transition mésenchymateuse vers un état plus malin, notamment IGF1, IGF2, EGFR, FOXP3 et TGFB3, ont d'ailleurs été observés dans ces cellules, ce qui renforce cette hypothèse.

2.5. Culture *ex vivo* des CTC

La culture *ex vivo* des CTC permet de distinguer les cellules viables des cellules apoptotiques, d'obtenir un nombre plus élevé de cellules et d'approfondir leur analyse. Des analyses fonctionnelles peuvent être réalisées sur ces CTC viables et isolées du sang de patients. Elles peuvent contribuer d'une part à mieux comprendre la biologie du processus métastatique et d'autre part à révéler de nouvelles cibles thérapeutiques contre les cellules cancéreuses en dissémination.

La technologie ScreenCell permet l'étude des CTC et des sous-groupes de CTC en préservant la viabilité cellulaire à 85 % $\pm 0,09$ (Desitter et al. 2011). Des résultats ont démontré l'adhérence et la croissance des CTC directement sur le support d'isolement. De plus, des sous-populations de cellules ont été identifiées, avec un pouvoir prolifératif et invasif (données internes non publiées) (Benali-Furet et al, 2012). Néanmoins, la croissance des CTC ne dépasse pas quelques semaines et nécessite des développements avant de pouvoir être utilisée comme modèle pharmacologique et offrir la possibilité de développer des cultures primaires de CTC de patients. Ces travaux ont été utilisés comme références dans ce projet de thèse.

3. Les études cliniques

En raison de sa taille réduite, sa grande polyvalence et sa capacité à isoler et à caractériser de grandes cellules dans le sang circulant en quelques minutes, le dispositif ScreenCell a la capacité de simplifier considérablement l'accès clinique aux CTC. Le postulat fait en 2011 (Desitter et al. 2011), concernant l'urgence de la validation clinique des CTC en tant que substitut de la tumeur primaire pour détecter des mutations pertinentes pour la surveillance de thérapies ciblées est toujours d'actualité. Un grand nombre de cancers solides ont été étudiés à l'aide de ces dispositifs et ces études combinées à d'autres peuvent contribuer à la validation de l'utilité clinique des CTC.

3.1. Donneurs sains

Un grand nombre de donneurs sains ont été analysés avec cette technologie mettant en évidence sa grande spécificité et sa grande sensibilité. Cependant, il est important de noter, la présence de cellules bénignes ou de grandes tailles, comme cela a été le cas dans d'autres études utilisant également les propriétés physiques pour l'enrichissement ([Mayall et al, 2019](#)). En effet, des mégacaryocytes ou des cellules épithéliales bénignes peuvent être isolées par la technologie ScreenCell. Les cellules épithéliales bénignes sont facilement reconnaissables par un pathologiste en se basant sur la morphologie. Néanmoins, pour s'assurer du caractère mégacaryocyte, une analyse immunologique de l'expression des antigènes MNF116 et CD31 peut s'avérer nécessaire. En effet, ces cellules sont connues pour être négatives aux cytokératines.

3.2. Cancer du sein

Dans le cancer du sein métastatique, le système CellSearch est actuellement la seule plateforme de recensement des CTC approuvée par la FDA et utilisée dans la gestion clinique des patients métastatiques. Des pronostics défavorables ont été déterminés sur la base d'une limite de 5 CTC pour 7,5 ml de sang ([Cristofanilli et al. 2004](#)) ([Bidard et al. 2014](#)). Cependant, il n'y a pas d'autres marqueurs pronostiques supplémentaires chez les patients avec plus de 5 CTC. Une étude ([Mu et al. 2016](#)) a montré que la présence des amas de CTC détectés avec la technologie ScreenCell lorsque les CTC étaient dénombrées au même moment d'analyse avec le système CellSearch pourrait fournir des valeurs pronostiques supplémentaires par rapport au seul dénombrement des CTC pour les patients atteints de mBC ([Mu et al. 2015](#)) ([Aceto et al. 2014](#)).

Toujours dans le cancer du sein, la sous-population de cellules en EMT a été très étudiée. En effet, des études de plus en plus nombreuses suggèrent que les cellules en EMT sont impliquées dans le processus métastatique et dans la résistance aux médicaments. Malgré ces observations, très peu d'études ont été en mesure de démontrer la valeur pronostique indépendante des CTC en EMT dans le cancer du sein métastatique ([Barrière et al. 2012](#)) ([Kasimir-Bauer et al. 2012](#)). À l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur de référence standard ni de méthode approuvée pour la sélection et la détection des CTC en EMT.

Les tests fondés uniquement sur EpCAM sont incapables de capturer les cellules en EMT ([Kallergi et al. 2011](#)) en raison de la perte de leurs caractéristiques épithéliales, mais ce sous-groupe peut être détecté chez les patientes en utilisant une méthode d'enrichissement basée sur les propriétés physiques et permettant ainsi leur étude approfondie.

Une étude comparant ScreenCell et AdnaTest ([Fina et al. 2015](#)) a d'ailleurs été réalisée dans ce sens. Les taux de détection de CTC les plus élevés avec AdnaTest ont été obtenus en combinant des anticorps d'enrichissement dirigés contre ERBB2 et EGFR, en plus de MUC1 et du marqueur de surface épithéliale classique EPCAM (13% vs 48%). Fait intéressant, les taux de positivité ont encore augmenté lorsque les marqueurs liés à l'EMT (TWIST1, AKT2 et PIK3CA) et aux caractères souches (ALDH1) ont également été évalués en plus d'EPCAM, MUC1 et ERBB2.

En parallèle, lorsque les cellules tumorales ont été détectées sur des bases physiques (ScreenCell), les CTC ont été détectées à des pourcentages supérieurs comparés à AdnaTest, laissant supposer une perte de certaines cellules liée à l'utilisation d'anticorps pas assez spécifiques. Cependant, la technologie ScreenCell semble éliminer la différence entre les stades cliniques (78% pour les patients non métastatiques (M0) contre 72% chez les patients métastatiques (M+) au départ) ce qui peut poser problème dans la stratification des patients. De plus, les microembolies tumorales circulantes (CTM), détectables par la technologie ScreenCell en plus des CTC ont été dénombrés avec une fréquence significativement plus élevée chez les patients M0 que chez les patients M+ (78% contre 27%, $p = 0,0002$) ([Fina et al. 2015](#)), ce qui est contradictoire avec d'autres études.

En plus des CTM et des CTC en EMT, les CAML sont également un autre biomarqueur sanguin potentiel pour le cancer du sein. Des études récentes ont montré que la présence de CAML pouvait être associée à l'activation de l'immunité innée chez certains patients ([Adams et al. 2014](#)) ([Hamilton et al. 2016](#)). Cependant, la fonction, la valeur pronostique et le rôle des CAML dans l'immunité des patientes atteintes de cancer du sein restent aujourd'hui à l'étude.

3.3. Cancer de la prostate

Dans le cadre d'une étude menée en 2017 ([Awe et al. 2017](#)), des échantillons de sang prélevés chez 41 patients ont permis d'analyser des patients atteints de cancer de la prostate (PCa) à différents stades cliniques avec la technologie ScreenCell.

Les CTC isolées ont été confirmées comme CTC par la présence des récepteurs aux androgènes et aux cytokératines 8, 18 et 19 et par l'absence d'expression du CD45. Les tailles des noyaux des CTC ont été mesurées à l'aide du programme TeloView ([voir pages 70](#)). Outre la taille, l'analyse détaillée des noyaux permet de déterminer le niveau d'instabilité génomique et peut permettre à l'avenir une gestion personnalisée des patients, comme cela a été montré dans des études précédentes ([Stott et al. 2010](#)) ([Kolostova et al. 2014](#)).

3.4. Cancer colorectal

Dans le cancer colorectal, la détection des CTC peut également être une alternative de choix pour étudier la tumeur primaire comme cela a été montré dans l'étude ([Coget et al. 2014](#)) où la présence de CTC a été détectée chez 23/36 (64%) des patients atteints de cancer colorectal métastatique (mCRC). D'un côté, l'antigène CK a été principalement perdu dans les CTC probablement en raison de l'EMT. D'un autre côté, le marqueur EpCAM confirme l'origine épithéliale des CTC et CDX2 indique leur origine digestive.

Dans une autre étude ([Denis et al. 2016](#)), les CTC ont été isolées à partir de 35 patients avec CRC à différents stades. Il a été possible de détecter la présence d'au moins une CTC dans 90% des échantillons, y compris dans les échantillons provenant de CRC non métastatique en utilisant le dispositif ScreenCell®, ce qui est significativement plus élevé que ce qui a été rapporté avec d'autres techniques, en particulier celles utilisant une immunosélection épithéliale ([Cao et al. 2015](#)). De plus, le génotypage de KRAS a été obtenu pour 86% (30/35) des échantillons par droplet digital PCR (ddPCR) ([voir page 68](#)). La concordance était de 77% avec une sensibilité de 83%. La nature peu invasive de cette procédure associée à la sensibilité élevée de la ddPCR, pourrait offrir à l'avenir une possibilité de surveiller les patients tout au long de la maladie à plusieurs niveaux, y compris la détection précoce, le pronostic, le traitement et la rechute.

3.5. Cancer du poumon

Le diagnostic précoce du cancer du poumon pose toujours un problème majeur. Chez une grande proportion de patients, le diagnostic est tardif et les options thérapeutiques limitées.

La biopsie liquide ouvre de nouvelles perspectives pour un diagnostic plus précoce ainsi qu'une aide pour distinguer les lésions pulmonaires malignes des lésions bénignes. Toutefois, la perte de cellules n'exprimant plus les antigènes épithéliaux (EpCAM) lors de l'EMT complique l'analyse des CTC, d'autant plus que le nombre de CTC dans le cancer du poumon reste faible, ce qui complique leur identification.

Dans une étude ([Freidin et al. 2014](#)) évaluant les performances de la technologie ScreenCell, le sang de 76 patients opérés d'un cancer du poumon connu ou suspecté a été analysé. Les cellules capturées ont été mises en évidence à l'aide d'une coloration cytologique à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) puis évaluées indépendamment par deux pathologistes. Des CTC ont été identifiées chez 52,7% et 56,8% respectivement selon les pathologistes. Une autre étude ([Fiorelli et al. 2015](#)) a évalué 77 patients présentant des lésions pulmonaires (n= 60 lésions malignes et n=17 lésions bénignes). Des cellules circulantes malignes ont été détectées chez 90% (54 patients/60) des patients avec maladie maligne et chez seulement 5% des (1 patient/17) patients avec maladie bénigne. Dans le même sens, ([Mascalchi et al. 2017](#)) a révélé qu'au moins une CTC / CTM a été trouvé chez 47 des 67 patients (70%) ayant reçu un diagnostic final de tumeur maligne du poumon et chez aucun des 8 patients présentant des nodules pulmonaires bénins.

D'autres études ont voulu explorer les conséquences de la manipulation de la tumeur sur la détection des cellules tumorales dans le sang. Une première étude ([Chudasama et al. 2015a](#)) a évalué les effets de la RFA (ablation par radiofréquence) sur la diffusion des CTC dans le sang. Des échantillons ont été prélevés avant et après RFA chez 9 patients et ont révélé une augmentation générale du nombre de CTC chez 7 des 9 patients après RFA, avec une plus forte augmentation chez les patients métastatiques. Cette étude démontre que la manipulation de la tumeur entraîne la diffusion immédiate de cellules tumorales dans le sang dont les effets sont inconnus et nécessitent des études complémentaires.

Toujours dans le même objectif, les conséquences de la cryothérapie endobronchique (CE) sur la diffusion des CTC a également été évaluée grâce à la technologie ScreenCell. La cryothérapie endobronchique est une forme de traitement palliatif offerte aux patients atteints de tumeurs obstructives des voies respiratoires. Des échantillons pré et post CE ont été analysés pour évaluer la présence de CTC ([Chudasama et al. 2015b](#)). Les résultats ont montré une augmentation du nombre de CTC après CE chez 75% des patients.

Une augmentation significative (>100 fois) a même été montrée chez 7 patients. L'augmentation la plus significative a été observée chez des patients naïfs de traitement par cryothérapie avant leur inclusion dans cette étude.

Les actes de biopsie réalisés par FNA (Fine Needle Aspiration) ou par BFF (Bronchoscopie à fibre flexible) peuvent également avoir un impact sur le devenir et l'isolement des cellules tumorales circulantes.

Une étude a été réalisée chez 6 patients ayant subi une biopsie de la tumeur du poumon par BFF. La présence de CTC a été évaluée *pré-BFF et post-BFF* en utilisant la méthode ScreenCell. Dans trois cas (50%), aucune cellule tumorale n'a été détectée avant et après la BFF. Dans deux cas (33,3%), aucune cellule tumorale n'a été détectée avant BFF, tandis que des CTC ont été détectées après BFF. Pour un cas (17,7%), des CTC ont été détectées avant la BFF et de nombreuses CTC ont été détectées après la BFF. Ces résultats suggèrent qu'une biopsie par BFF pourrait potentiellement libérer des cellules tumorales dans le sang circulant, comme cela peut se produire lors d'un acte chirurgical. Pour cette étude en particulier, les auteurs ont indiqué que la méthode « gold standard » CellSearch n'était pas suffisamment sensible, et qu'une méthode de sélection par la taille a été utilisée car très sensible aux amas de CTC.

Une dernière étude ([Chudasama et al. 2017b](#)) révèle qu'une augmentation significative du nombre de CTC a été observée entre la Baseline et juste après chirurgie. Aucune corrélation n'a pu être faite entre l'augmentation du nombre de CTC et la survie ou le développement de métastases. En revanche, il a pu être démontré que la manipulation de la tumeur lors de la chirurgie entraînait une augmentation temporaire du nombre de CTC dans le sang circulant. Ceci, combiné aux études précédentes, renforce la théorie selon laquelle la manipulation chirurgicale de la tumeur résulte en une augmentation de la concentration des CTC dans le sang. Cependant, il est important de noter qu'après chirurgie le nombre de CTC revient à un niveau proche de la baseline.

Effectivement, il n'y avait pas d'augmentation significative entre la baseline et la post-chirurgie (3 jours après chirurgie). Cette étude est la première qui évalue l'impact d'une dissémination des CTC intra-opérative (au cours d'une opération).

Ces différentes études ont mis en évidence l'importance de réaliser le prélèvement sanguin pour les analyses de biopsie liquide avant de réaliser la biopsie standard.

Ce point de prélèvement de sang, avant chirurgie permet d'éliminer la possibilité que la manipulation de la tumeur lors de la biopsie puisse conditionner la dissémination accidentelle de CTC dans le sang et fausse les interprétations.

De plus, la présence d'éléments suspects non basés sur EpCAM au cours de ces différentes études révèle l'utilité d'une technologie non-antigène dépendante. Cependant, des analyses phénotypiques et moléculaires supplémentaires sont nécessaires pour caractériser complètement ces éléments en circulation.

Actuellement, la recherche des CTC ne peut pas remplacer la FNA percutanée ni la biopsie principale dans le bilan diagnostique des patients présentant des lésions pulmonaires malignes suspectes. La biopsie liquide peut toutefois jouer un rôle dans les cas pour lesquels les résultats de FNA ou de biopsie principale n'aboutissent pas à un diagnostic formel. Alors que la sensibilité est une préoccupation majeure dans le dépistage du cancer du poumon, la spécificité reste la caractéristique essentielle exigée pour un outil de diagnostic.

3.6. Cancer du pancréas

L'équipe du Dr Birte Kulemann, experte dans le cancer pancréatique (PDAC) a réalisé différentes études avec la technologie ScreenCell comme méthode d'isolement des CTC.

Une première étude publiée en 2015 révèle que des cellules tumorales en circulation peuvent être retrouvées chez la plupart des patients atteints de PDAC ([Kulemann et al. 2015](#)) à n'importe quel stade, qu'ils soient localisés, localement avancés ou métastatiques. La capacité de capturer des CTC avec ScreenCell, de les identifier et de les analyser en cytologie et en génétique suggère un outil possible pour le diagnostic et la caractérisation des modifications génétiques dans le PDAC.

Les cellules tumorales circulantes ont été identifiées par analyse anatomo-cyto-pathologique maligne ou par la présence de la mutation KRAS chez 73% des 11 patients ($p = 0,001$). Des cellules tumorales circulantes ont été identifiées chez 3 patients sur 4 atteints de PDAC précoce ($\leq$ stade IIB) et chez 5 patients sur 7 atteints de PDAC avancée ($\geq$ stade III). Aucune CTC n'a été détecté dans le sang des 9 donneurs sains.

Une seconde étude réalisée en 2016 par la même équipe ([Kulemann et al. 2016](#)) démontre soit par la cytologie soit par la détection de la mutation du gène KRAS, la présence de CTC chez 18 des 21 patients (86%) présentant un PDAC avérée : 8 patients sur 10 (80%) présentant un stade précoce (UICC IIA / IIB) et 10 des 11 patients (91%) atteints d'une maladie au stade avancé (UICC III / IV).

Aucune CTC n'a été trouvée chez les 10 patients du contrôle ($p < 0,001$). Les patients porteurs d'une mutation KRAS CTC avaient une survie sensiblement meilleure (19,4 vs 7,4 mois), par rapport aux patients porteurs d'un gène KRAS de type sauvage ($p = 0,015$).

Cette étude a donc démontré qu'un isolement par la taille permet de détecter les CTC dans le PDAC (86%) et que la caractérisation moléculaire et génétique des mutations telles que KRAS, peut se révéler utile pour le pronostic.

Ce taux est comparable à celui trouvé dans l'étude de ([Khoja et al. 2012](#)) qui a permis la détection de CTC chez 93% de patients métastatiques en utilisant également une technique d'isolement par la taille. Ces résultats sont également comparables à une précédente étude pilote ([Kulemann et al. 2015](#)) réalisée par la même équipe chez des patients atteints de PDAC. En revanche, d'autres publications utilisent des anticorps dirigés contre EpCAM, pour capturer les CTC, ont montré des taux de détection de CTC plus faibles dans le PDAC compris entre 5 et 50% ([Bidard et al. 2013](#)) ([de Albuquerque et al. 2012](#)) ([Kurihara et al. 2008](#)).

Une dernière étude ([Kulemann et al. 2017](#)), a comparé les mutations KRAS des CTC pancréatiques et des tumeurs correspondantes. Des échantillons de 68 personnes (58 patients PDAC, 10 donneurs sains) ont été analysés. Des CTC ont été détectées chez les patients atteints de tumeurs de stade IA-IV (UICC) et chez aucun des témoins en bonne santé ($p < 0,001$). Les patients avec plus de 3 CTC / ml avaient tendance à présenter une survie globale médiane inférieure à celle des patients avec 0,3 à 3 CTC / ml ($p = 0,12$).

Seules quelques études ont été menées sur les CTC pancréatiques, certaines démontrant une corrélation entre la présence, le nombre de CTC et la survie (Bidard et al. 2013) (Kurihara et al. 2008), tandis que d'autres n'ont pas confirmé ces résultats (Khoja et al. 2012). Étonnamment, dans ces études réalisées où il n'a pas été trouvé de corrélation statistiquement significative entre la survie et la présence de CTC, les patients ayant des CTC dans leur circulation ont survécu 16 mois de plus par rapport aux patients sans CTC (10 mois) (Khoja et al. 2012).

Les raisons de ces résultats restent inexplicables ; une explication probable pourrait être le très petit groupe de patients négatifs pour les CTC ($n = 3$) dans cette étude. Néanmoins, une étude de 54 patients avec PDAC (Khoja et al. 2012) n'a également pas trouvé de corrélation statistiquement significative entre la survie globale ou la survie sans progression ni avec l'isolement par la taille ni avec la méthode CellSearch basée sur EpCAM.

3.7. Cancer de la vessie

Une étude sur le cancer de la vessie (Fina et al. 2017) a comparé l'enrichissement en CTC avec les kits AdnaTest (AT) et ScreenCell Cyto (SC), associé à une identification par EpCAM, MUC1 et ERBB2 ou par des critères cytologiques, dans 19 échantillons non métastatiques (M0) et 47 métastatiques (M+). Cette étude a été réalisée de façon cinétique : au départ (T0) et pendant le traitement (T1). La proportion d'échantillons concordants (AT/SC positifs et négatifs) était d'environ 30% chez les patients présentant un stade précoce de la maladie (M0), à la fois au début et au cours du traitement, alors que des concordances plus élevées étaient observées chez les patients avec métastases (M+), principalement après traitement. La concordance globale entre les deux approches techniques reste toutefois faible, aussi bien au début qu'au cours du traitement. Selon l'approche ScreenCell, les échantillons étaient positifs pour les CTC dans plus de 80% des cas, indépendamment du stade de la maladie, alors qu'AdnaTest n'a pas réussi à détecter de CTC chez environ 40% des patients métastatiques.

3.8. Mélanome

L'isolement des CTC des patients atteints de mélanome est difficile en raison de l'incohérence d'expression des antigènes de surface. Un total de 15 patients avec un mélanome avancé (Yanagita et al. 2018) a été étudié.

Les cellules isolées à partir d'un premier dispositif ScreenCell ont été analysées par FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) ; Les cellules isolées à partir d'un second dispositif ScreenCell ont été analysées par IF (*Immunofluorescence*) pour un panel d'anticorps spécifiques du mélanome.

Il a été ici démontré que la technologie ScreenCell a permis de capturer et d'identifier les CTC dans le sang de patients atteints de mélanome. Un plus grand nombre de cellules pouvaient être identifiées par la méthode FISH comparée à la méthode par immunofluorescence.

Ceci indique que des cellules négatives pour les antigènes de surface spécifiques du mélanome peuvent être isolées grâce à cette technologie. Des amas de CTC ont également été observés dans 42% des échantillons.

Une preuve de concept démontrant la faisabilité clinique de la capture et de l'identification des CTC chez les patients atteints de mélanome métastatique a été faite. La microfiltration par la technologie ScreenCell suivie de l'identification par FISH des CTC peut donc constituer une approche largement applicable.

Des résultats antérieurs de la R&D ScreenCell obtenus dans le mélanome ([voir page 72](#)) ont montré la possibilité d'isoler les CTC de patients atteints de mélanome avec la technologie ScreenCell. Ils ont permis d'obtenir un financement via le 18^{ème} appel à projet du FUI. Le projet EXPEVIVO-CTC financé par le pôle de compétitivité Medicen Paris Région fait partie intégrante de mon projet de thèse.

3.9. Cancers rares

La technologie ScreenCell est capable d'isoler les CTC pour un grand nombre de tumeurs solides comme des cancers très rares et très peu étudiés tels que l'hémangiopericytome, une tumeur en localisation intracrânienne ou bien le carcinome corticosurrénalien. L'hémangiopericytome (HPC) est un cancer non épithélial et difficilement accessible aux technologies qui isolent les CTC par EpCAM, comme CellSearch. Un autre avantage de ScreenCell ([Nicolazzo et al. 2018](#)) est la possibilité d'étudier les CTC et leur hétérogénéité ([Hong et al. 2016](#)). La technologie ScreenCell a donc démontré la faisabilité d'une biopsie liquide dans une tumeur rare telle que HPC.

Chez les patients au stade avancé d'un cancer de la tête et du cou (HNC), des CTC ont été détectées chez 8/43 (18,6%) par CellSearch, 13/28 (46,4%) par ScreenCell® et 16/25 (64,0%) par RosetteSep™ ([Kulasinghe et al. 2016a](#)). Les 2 plateformes indépendantes de l'épitope ont détecté un nombre de CTC et de CTM plus élevés. Aucune CTC n'a été détectée chez les contrôles (n=4). Cependant, la signification clinique des CTC chez les patients atteints de HNC n'a pas encore été déterminée.

Une autre tumeur rare, le carcinome corticosurrénalien, a également été analysée grâce à la technologie ScreenCell.

La grande majorité des masses surrénaliennes sont bénignes (ACA : AdrenoCortical Adenoma) et un seul petit sous-groupe est constitué de carcinome corticosurrénalien (ACC : AdrenoCortical Carcinoma), une tumeur maligne rare, dont le pronostic dépend principalement du stade au moment du diagnostic. Un diagnostic précis est essentiel car le pronostic, la survie et la stratégie thérapeutique de l'ACC sont très différentes de ceux d'une tumeur bénigne. Cependant, les biopsies étant souvent contre-indiquées, les imageries en coupe (Scanner et IRM) sont les seuls outils pour poser le diagnostic. Il demeure difficile dans certains cas de distinguer la forme bénigne de la forme maligne uniquement par des caractéristiques cliniques voir même histologiques.

Une étude ([Pinzani et al. 2013](#)) a été réalisée à partir d'échantillons de sang de 14 patients souffrant d'ACC (forme maligne) et de 10 patients souffrant d'ACA (forme bénigne). Des CTC ont été détectées dans tous les échantillons ACC et dans aucun échantillon ACA. Pour les patients ACC, une immunocytochimie a confirmé l'origine corticosurrénale des cellules isolées. Les résultats de cette étude fournissent la première preuve pour les tumeurs corticosurrénales que les CTC peuvent représenter un marqueur utile au diagnostic différentiel entre l'ACC et l'ACA. La corrélation entre certains paramètres cliniques suggère une possible pertinence de l'analyse des CTC pour le pronostic et le suivi non invasif de la maladie.

L'ensemble de ces études ([Tableau 6, page suivante](#)) réalisées par différentes équipes de recherche, sur un panel de cancers différents (épithéliaux et non épithéliaux) ainsi que les plateformes compatibles pour caractériser de manière précise les cellules isolées permettent d'avoir un aperçu des capacités de cette méthode qui isole les CTC par la taille. La simplicité, la rapidité et la polyvalence de ces dispositifs à usage unique peuvent contribuer à sa mise en place rapide dans la pratique clinique de routine à conditions que la preuve de l'utilité des cellules tumorales circulantes soit faite prochainement.

Pour cela, il est nécessaire de standardiser les méthodes utilisées pour l'isolement de ces cellules et d'accéder à des cohortes variées et conséquentes de patients (Bünger et al. 2015).

Cancer	Référence de l'étude	Nombre de Patients	Nombre d'échantillons	Taux de détection
Œsophage	(Kuvendjiska et al. 2019)	20	48	60 % (12/20)
Mélanome	(Yanagita et al. 2018)	15	13	77 % (10/13)
Poumon	(Mascalchi et al. 2017)	75	75	46 % (35/75)
Poumon	(Chudasama et al. 2017b)	10	40	90 % (36/40)
Poumon	(Coco et al. 2017)	73	73	-
Poumon	(Morbelli et al. 2017)	79	79	-
Poumon	(Chudasama et al. 2017a)	23	46	76 % (35/46)
Poumon	(Mascalchi et al. 2016)	26	26	65 % (17/26)
Poumon	(Chudasama et al. 2015b)	20	40	50 % (20/40)
Poumon	(Chudasama et al. 2015a)	9	18	61 % (11/18)
Poumon	(Fiorelli et al. 2015)	60	60	90 % (54/60)
Poumon	(Freidin et al. 2014)	76	76	51 % (39/76)
Colorectal	(Nicolazzo et al. 2017)	10	10	40 % (04/10)
Colorectal	(Denis et al. 2016)	29	29	90 % (26/29)
Colorectal	(Coget et al. 2014)	39	36	64 % (23/36)
Urothélial	(Fina et al. 2017)	66	156	-
Pancréas	(Rosenbaum et al. 2017)	171	171	49 % (53/108)
Pancréas	(Cauley et al. 2015)	179	179	49 % (51/105)
Pancréas	(Kulemann et al. 2015)	11	11	73 % (08/11)
Prostate	(Awe et al. 2017)	41	41	92 % (38/41)
Prostate	(Chen et al. 2013)	9	9	100 % (9/9)
Prostate	(Adebayo Awe et al. 2013)	19	19	100 % (19/19)
Sein	(Kruspe et al. 2017)	19	19	-
Sein	(Mu et al. 2016)	30	30	66 % (20/30)
Sein	(Fina et al. 2015)	30	30	75 % (24/32)
Rein	(El-Heliebi et al. 2013)	40	160	-
AdrenoCortical	(Pinzani et al. 2013)	24	29	50 % (14/28)

Tableau 6 || Études utilisant les dispositifs ScreenCell

Liste des études utilisant les dispositifs ScreenCell dans différents cancers. Ces études ont été menées entre 2013 et 2017 par différentes équipes de recherche françaises et internationales. Ce tableau présente le nombre de patients et le nombre d'échantillons pour chaque étude ainsi que le taux de détection³ (en %)

³ Patients présentant des CTC / Patients analysés dans l'étude

OBJECTIFS DE LA THESE

Les CTC constituent un axe très actif de recherche sur le cancer. L'analyse des CTC a d'ailleurs démontré à travers de nombreuses études son utilité afin d'accéder rapidement à des informations morphologiques, immunocytochimiques et moléculaires sur la tumeur. Dans ce projet, nous analyserons en temps réel des CTC de mélanomes obtenus par la technologie ScreenCell, un procédé non invasif et CE-IVD⁴.

Tout d'abord, ce projet de thèse se concentrera sur le mélanome, car malgré une incidence en constante augmentation, il existe peu de marqueurs pronostiques pour ce cancer, et les CTC pourraient être utiles dans ce contexte. D'autre part, les principaux systèmes de détection des CTC, actuellement commercialisés, se sont concentrés sur les cellules épithéliales, et peu sur les cellules du mélanome.

Dans ce projet, nous analyserons au cours du temps les CTC de mélanome obtenues par le procédé CE-IVD non invasif, développé par la société ScreenCell. L'avantage important de ce système est sa simplicité, sa rapidité et sa haute sensibilité. De plus, ce système sera couplé à une analyse cellulaire par imagerie semi-automatisée développée et commercialisée par la société IMSTAR spécialisée dans la détection, le dénombrement et la caractérisation morpho-phénotypique des CTC. Ce système d'image PathfinderTM CellScan à haut débit et haut contenu d'information permettra l'analyse rapide selon de multiples critères morphologiques et immunocytochimiques d'un grand nombre d'échantillons cytologiques.

L'avantage supplémentaire de la technologie ScreenCell est sa capacité à isoler vivantes les CTC et les sous-populations de CTC qui peuvent être mises en culture rapidement (<3 min) ouvrant l'opportunité d'identifier de nouvelles sous-populations. La mise au point de l'expansion de ces cellules rares permettrait d'élargir considérablement le champ de ces analyses. Enfin il existe de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ce cancer, qui pourraient être testées sur le modèle *ex vivo* mis au point.

De plus, ce projet permettra la création d'une base de données-images de grand volume ainsi que des méta-informations relatives à chaque patient, intégrant la traçabilité, l'interprétation des données statistiques et l'archivage, permettant à terme l'établissement de corrélations avec les données cliniques.

⁴ CE-IVD « selon l'annexe III, à l'exception du point 6, de la directive 98/79 CE du 27 octobre 1998 »

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet collaboratif EXPEVIVO-CTC du Fonds Unique Interministériel (FUI) conduit de 2014 à 2018.

Le projet à travers la détection des CTC et leurs analyses phénotypiques devrait à terme :

- Contribuer à donner une information pronostique indépendante de celle obtenue sur la tumeur primaire.
- Permettre le diagnostic précoce des rechutes cliniques métastatiques, avant même qu'elles soient visibles par les techniques traditionnelles d'imagerie.
- Fournir un biomarqueur pour suivre l'efficacité et la toxicité des traitements des patients atteints de mélanome.

De plus, grâce aux compétences complémentaires des partenaires industriels, académiques et cliniques, nous espérons :

- Mettre au point un microenvironnement spécifique de culture tridimensionnelle favorable pour l'expansion des CTC.
- Identifier et caractériser au sein des CTC des sous-populations immatures, invasives, responsables d'éventuelles résistances aux traitements conventionnels du mélanome.

RESULTATS

EXPERIMENTAUX

Chapitre I Étude Cytologique et valeur pronostique des CTC	88
1. Contexte	88
2. Matériels et Méthodes	91
3. Résultats	93
4. Discussion	104
5. Annexes	108
Chapitre II Détection semi-automatisé des CTC	109
1. Contexte	109
2. Matériels et Méthodes	110
3. Résultats	113
4. Discussion	120
5. Annexes	122
Chapitre III Expansion <i>ex vivo</i> des CTC comme modèle de pharmacologie prédictive.....	125
1. Contexte	125
2. Matériels et Méthodes	127
3. Résultats	131
4. Discussion	145
5. Annexes	146
Chapitre IV Analyse Moléculaire des CTC	153
1. Contexte	153
2. Matériels & Méthodes	154
3. Résultats	157
4. Discussion	162

Chapitre I | Étude Cytologique et valeur pronostique des CTC

1. Contexte

Il existe une similitude morphologique et phénotypique entre les CTC du mélanome et les cellules de la tumeur primaire (De Giorgi et al. 2010). Les CTC et les sous-groupes de CTC issus du mélanome peuvent être identifiés selon des critères cytomorphologiques standards de malignité associés à l'expression de marqueurs mélanocytaires (HMB45 + M2-7C10 + M2-9E3 + T311). Il s'agit des marqueurs couramment utilisés pour le diagnostic histopathologique du mélanome primaire et qui peuvent également être appliqués sur les CTC. L'analyse cytologique des critères de malignités associée à un immunomarquage des antigènes tumoraux du mélanome permet de reconnaître l'ensemble des cellules y compris celles qui par dédifférenciation n'exprimeraient plus certains marqueurs mélanocytaires. A l'inverse, il évite également de compter par excès des cellules avec une cytologie normale qui exprimeraient l'un de ces marqueurs.

Afin de réaliser cette étude, une cohorte de 150 patients atteints de mélanome métastatique associé aux épithéliums (cutanés primitifs, muqueux) en excluant les mélanomes non associés aux épithéliums (uvéaux, viscéraux) a été mise en place. L'équipe du centre d'oncodermatologie de l'hôpital Saint-Louis (AP-HP), seul centre recruteur et coordinateur dans cette étude, s'est chargé du recrutement des patients au sein de la cohorte : comprenant l'identification des patients (effectuée au cours des RCP hebdomadaires), le recueil du consentement, l'organisation des prélèvements, leur envoi et l'annotation des données cliniques.

Le recrutement des 150 patients au sein de la cohorte a eu lieu entre le 06/04/2016 et le 20/06/2018. Les patients une fois inclus ont fait l'objet d'un suivi clinique standard de 36 mois minimum ainsi qu'un suivi par biopsie liquide (analyse des CTC) à différents temps d'évaluation (minimum 3 temps d'évaluations par patient) définis comme suit :

- **Inclusion** (avant le début du traitement ou d'une nouvelle ligne de traitement)
- **M1** (1 mois après le début du traitement)
- **CL** (à chaque changement de ligne de traitement)
- **ET** (à chaque évaluation tumorale par imagerie : TEP, IRM, Scanner, ...)

Le descriptif des 150 patients inclus ainsi que les différents prélèvements sanguins réalisés pour les analyses des CTC par biopsie liquide sont présentés dans le [Tableau 7](#) ci-dessous :

	N=150 patients (%)
Age moyen (ans)	60 ans
Femme	75 (50)
Homme	75 (50)
Ligne de traitement	
en 1ère ligne	108 (72)
en 2ème ligne	17 (11)
en 3ème ligne ou plus	25 (17)
Statut BRAF au diagnostic	
BRAF muté	85 (57)
BRAF sauvage	65 (43)
Traitement à l'inclusion	
Immunothérapie	98 (66)
Thérapie ciblée	36 (24)
Chimiothérapie	8 (5)
Virus oncolytique	4 (2,5)
Surveillance sans traitement	4 (2,5)
Prélèvements de biopsie liquide	
Inclusion	150 (100)
M1	147 (98)
Évaluation	
ayant eu 1 évaluation	139 (93)
ayant eu 2 évaluations	84 (56)
ayant eu 3 évaluations	65 (43)
ayant eu 4 évaluations	47 (31)
Changement de Ligne	
sans changement de ligne	69 (56)
avec changement de ligne	53 (44)
- 1 changement	53
- 2 changements	25
- 3 changements	11
- 4 changements	3
- 5 changements	1
- 6 changements	1

Tableau 7 || Descriptif de la cohorte

L'âge moyen de la cohorte est de 60 ans avec autant d'hommes que de femmes. Les patients ont majoritairement été inclus en 1^{ère} ligne de traitement et sont le plus souvent traités par immunothérapie. La population incluses dans cette étude est homogène et a été suivie à différents temps (minimum 3 points de suivi)

Cette étude a été répertoriée sous le numéro ID RCB suivant : **2015-A01389-40** et les critères d'inclusion sont présentés dans le [Tableau 8](#) ci-dessous.

Paramètres	Valeurs	N	Statistiques*
Les patients ayant un mélanome primitif cutané ou muqueux, Stade IV ou III inopérables	1	80	100 %
Naïfs de traitement systémique ou en progression clinique ou radiologique si préalablement traités et avant début d'une nouvelle ligne de traitement	1	80	100 %
Absence de second cancer évolutif dans les 3 ans (à l'exclusion des carcinomes cutanés et des carcinomes in situ du col)	1	80	100 %
Suivis à l'hôpital Saint-Louis	1	80	100 %
Pour lesquels du matériel tumoral est disponible à la tumorothèque de l'hôpital Saint-Louis	1	80	100 %
Informés de la recherche et ayant donné leur consentement	1	80	100 %
Absence de grossesse en cours	1	36	100 %
	NA	44	
Absence d'infection par VIH connue	1	80	100 %
Absence d'infection par hépatite A, B ou C connue	1	80	100 %

Tableau 8 || Critères des patients inclus dans la cohorte

L'ensemble des critères d'inclusion ont été respectés et ont permis le recrutement, au sein du centre d'oncodermatologie de l'hôpital Saint-Louis (AP-HP), des 150 patients prévus initialement.

L'effectif des 150 patients prévu dans ce projet a bien été atteint et les critères d'inclusion respectés.

Une première analyse statistique sur les 100 premiers patients a d'abord été réalisée. Au cours de cette analyse et par souci d'homogénéisation des données étudiées, il a été choisi d'écarter les 20 premiers patients pour lesquels la méthode de comptage des CTC était non automatisée et d'analyser uniquement les patients 1021 à 1100.

L'étude cytologique présentée ci-après est basée sur l'analyse statistique de ces 80 patients et a pour objectifs de :

- **Déterminer la valeur pronostique de la présence des CTC et dérivée**
- **Déterminer la valeur prédictive des CTC dans la réponse thérapeutique**

2. Matériels et Méthodes

2.1. Analyse semi-automatisée des CTC

L'analyse semi-automatisée de l'ensemble des supports d'isolement via la plateforme IMSTAR ([voir page 109](#)) a été développée tout au long de l'étude de cette cohorte. Des améliorations ont été réalisées au fur et à mesure des inclusions et de l'obtention des différents prélèvements. Afin de tenir compte de cela le Dr Wechsler, pathologiste en charge de ces analyses effectuait un contrôle manuel (lecture standard) afin de confronter les résultats obtenus par lecture semi-automatisée et obtenir des résultats concordants et pouvant être analysés sans biais.

2.2. Outils statistiques

Les variables catégorielles sont présentées sous la forme d'effectifs et de pourcentage. Les variables quantitatives sont présentées par leur médiane et inter quartiles range.

L'analyse de la valeur prédictive pour la réponse thérapeutique à 6 mois est basée sur l'analyse de la courbe ROC du nombre de CTC. Les aires sous la courbe ROC (AUC) ainsi que leurs intervalles de confiance à 95 % sont estimées par la méthode de DeLong et DeLong ([DeLong et al. 1988](#)) et confirmé par Bootstrap.

Un seuil diagnostique a été systématiquement recherché à l'aide de l'indice de Youden. Les sensibilités et spécificités correspondantes à ce seuil ont été estimées ainsi que les intervalles de confiance à 95%. De plus, les sensibilités et spécificités correspondantes à la présence ou l'absence de CTC ont été estimées ainsi que leurs intervalles de confiance à 95%.

La survie globale et la survie sans rechute ont été estimées à l'aide de la méthode de Kaplan Meier ainsi que les intervalles de confiance à 95% correspondants.

Les analyses statistiques de cette étude ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.4.2 ou plus récente) et SAS (version 9.3). Cette étude statistique a été réalisée au sein de l'équipe ECSTRAA (Epidemiology and Clinical Statistics for Tumor, Respiratory, and Resuscitation Assessments) du CRESS (Centre de Recherche Épidémiologique et Statistique de la Sorbonne) de l'INSERM U1153 et de l'Université Paris Diderot - Paris 7, USPC, Paris, France.

2.3. Méthode d'isolement des CTC

Dans cette étude et afin d'évaluer la valeur pronostique des CTC, les CTC et sous-groupe de CTC ont été isolés fixées à l'aide de la technologie ScreenCell à partir d'un tube de sang K2-EDTA de 9 ml prélevé au centre d'Oncodermatologie de l'Hôpital Saint-Louis par des infirmières diplômées d'état (IDE) dans le cadre de leur suivi standard.

Le tube de sang une fois prélevé a été conservé à 4°C et transféré dans les locaux de ScreenCell par un coursier habilité. L'isolement des CTC réalisé avec la technologie ScreenCell a eu lieu dans les 4 heures maximum qui ont suivi le prélèvement et en suivant les instructions préconisées par le fournisseur.

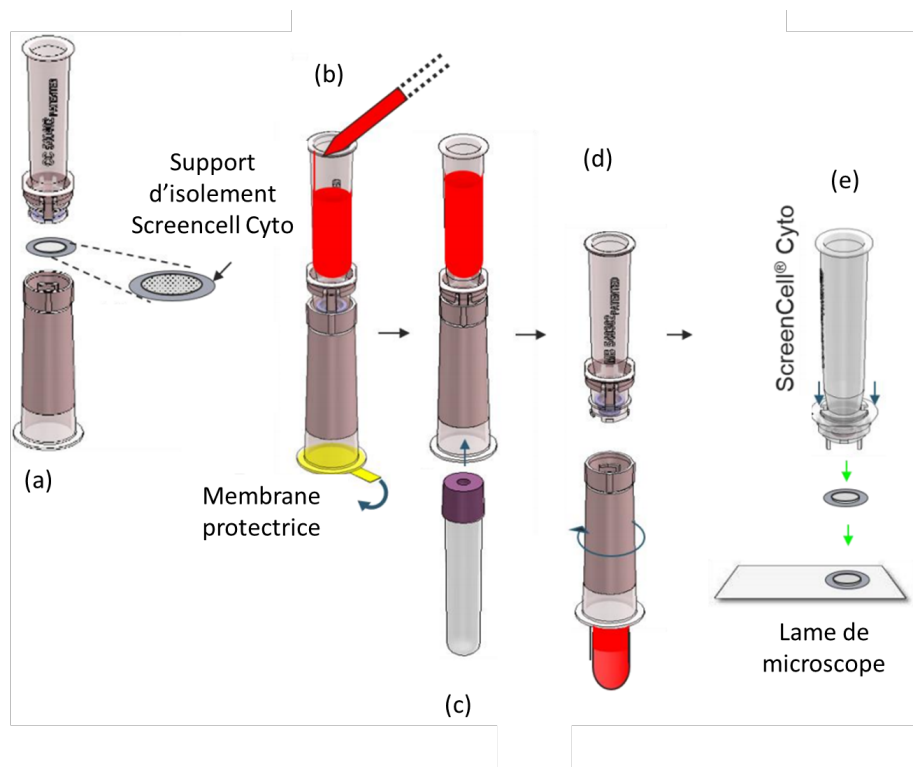


Figure 24 || Principe d'isolement des CTC avec la technologie ScreenCell

Les dispositifs ScreenCell (a) sont simples et à usage unique. Ils permettent une fois le sang dilué et déposé dans la partie haute du dispositif (b) de réaliser l'isolement par insertion d'un tube sous vide dans la partie basse du dispositif (c). Une fois la filtration terminée (temps < 3min), la partie haute peut être désolidarisée de la partie basse (d) et ainsi permettre l'éjection du support d'isolement (e) et son observation rapide sous un microscope après coloration cytologique.

2.4. Lecture cytologique et compte des CTC

Les supports d'isolement possèdent un numéro de traçabilité unique permettant un archivage et un suivi simple de l'ensemble des échantillons biologiques générés dans le cadre de cette cohorte. Ainsi, les cellules d'intérêt une fois isolées sur la membrane poreuse peuvent être facilement conservées et stockées de façon stable dans le temps pour des études immédiates ou rétrospectives

Les supports d'isolement sont soumis à une coloration cytologique standard par May Grunwald-Giemsa (MGG) afin de visualiser facilement et rapidement les différentes cellules ou groupes de cellules atypiques présentes sur la membrane transparente. Les lectures et acquisitions d'images sont ensuite réalisées par le pathologiste soit sur un microscope Nikon Eclipse 80i couplé au logiciel NIS Element BR 2.30 soit avec le système Pathfinder™ d'imagerie automatisée équipé avec un microscope motorisé Olympus BX61, une platine motorisée 3D Prior, une caméra CCD haute résolution et le logiciel Smart Capture CellScan développé par IMSTAR ([Voir Chapitre II | Analyse semi-automatisée des CTC page 109](#))

3. Résultats

3.1. Descriptif clinique de la cohorte

Les 150 patients atteints de mélanome métastatique inclus dans cette étude ont fait l'objet d'un suivi longitudinal (minimum 3 points de suivi par patient). Parmi ces patients, 98 patients ont reçu une immunothérapie, 36 patients ont reçu une thérapie ciblée et 8 patients une chimiothérapie conventionnelle. 50 % des patients sont porteurs de la mutation BRAF au niveau de la tumeur primaire et 25 % présentent des métastases cérébrales au moment du diagnostic.

Il est également important de souligner que la majorité des patients a été incluse en première ligne de traitement et était donc naïf de tout traitement au moment de la première évaluation des CTC (baseline, M0). Le descriptif clinique détaillé de la cohorte est disponible dans le [Tableau 9](#) et le [Tableau 10](#).

L'ensemble de cette cohorte représente un total de 893 prélèvements avec une moyenne de 4 prélèvements par patient réalisés à des temps différents (Min : 3 temps ; Max : 18 temps)

Tableau 9 || Descriptif clinique des patients inclus dans la cohorte

Paramètres	Valeurs	N	Statistiques*
Age		80	
Sexe	Masculin	44	55 %
	Féminin	36	45 %
Type de Mélanome	Sans type de mélanome	3	3.75 %
	SSM	41	51.25 %
	Nodulaire	16	20 %
	Acrolentigineux	3	3.75 %
	Lentigo malin	0	0 %
	Ambigu	0	0 %
	Inclassable	2	2.5 %
	Muqueux	3	3.75 %
	Inconnu	11	13.75 %
	Exophytique	1	1.25 %
Indice de Breslow		63	2.69 [1.4;4.95]
Ulcération	Non	31	53.45 %
	Oui	27	46.55 %
	NA	22	
Indice de Clark	1	2	4.44 %
	2	1	2.22 %
	3	10	22.22 %
	4	26	57.78 %
	5	6	13.33 %
	NA	35	
Indice mitotique		32	4 [3;10]
Régression	Non	43	86 %
	Oui	7	14 %
	NA	30	
Stade AJCC à l'inclusion	I	0	0 %
	II	0	0 %
	III	1	1.3 %
	IV	0	0 %
	IIIa	0	0 %
	IIIb	0	0 %
	IIIc	12	15.58 %
	M1a	6	7.79 %
	M1b	8	10.39 %
	M1c	50	64.94 %
	NA	3	
Stade AJCC à l'inclusion	III	13	16.88 %
	M	64	83.12 %
	NA	3	
BRAF muté	0	31	49.21 %
	1	32	50.79 %
	NA	17	
LDH à l'inclusion		72	343.5 [300;466]
LDH à l'inclusion inférieur à médiane	0	31	43.06 %
	1	41	56.94 %
	NA	8	
Lignes de traitement antérieures	0	78	97.5 %
	1	2	2.5 %
Métastases cérébrales	0	60	75 %
	1	20	25 %

Tableau présentant le descriptif clinique pour les 80 patients éligibles à l'analyse statistique. Les paramètres indiqués dans ce tableau sont au moment de l'inclusion des patients dans l'étude.

Tableau 10 || Classification TNM des patients inclus dans la cohorte

Paramètres	Valeurs	N	Statistiques*
Classification TNMM		80	
	T1a	10	12 %
	T1b	1	1 %
	T2a	14	18 %
	T2b	3	4 %
	T3a	7	9 %
	T3b	9	11 %
	x	11	14 %
	in situ	0	0 %
	non déterminé	5	6 %
Classification TNMN	4	20	25 %
	0	60	75 %
	1	11	14 %
	2	2	2 %
Classification TNMT	3	7	9 %
	0	66	82 %
	1a	1	1 %
	1b	2	2 %
Stade AJCC au diagnostic du mélanome	1c	11	14 %
	I	22	29 %
	II	23	31 %
	III	2	3 %
	IV	0	0 %
	IIIa	3	4 %
	IIIb	4	5 %
	IIIc	7	9 %
	M1a	1	1 %
	M1b	2	3 %
Le patient a-t-il des traitements concomitants en cours ?	M1c	11	15 %
	NA	5	
	Non	61	86 %
	Oui	10	14 %
	NA	9	

Ce tableau présente la classification TNM détaillée des 80 patients inclus dans l'étude ainsi que leur stade AJCC au diagnostic du mélanome.

3.2. Résultats cytologiques

Parmi les 80 patients analysés statistiquement dans cette cohorte, le taux de CTC pour 3 patients n'a pas pu être recueilli à l'inclusion en raison d'un prélèvement coagulé. Le [Tableau 11](#) présente les valeurs des CTC et des sous-groupes de CTC pour les 77 patients analysables. Le seuil a été fixé à 0, considérant une quantité > 0 comme positif pour la catégorie en question.

De plus, la quantité de sang analysée par échantillon pouvant être variable d'un prélèvement à un autre, le nombre de CTC (et de leur sous-groupes) a également été ramené à une quantité par millilitre de sang afin de standardiser l'ensemble des échantillons.

Paramètres	Valeurs	N	Statistiques*
Nombre de CTC		80	
CTC >0	Non	77	22 [10;42] (1;150)
	Oui	0	0 %
	NA	77	100 %
Nombre de CTC/Sang		3	
CTC/Sang >0	Non	77	2.8 [1.205;5] (0.1163;16.67)
	Oui	0	0 %
	NA	77	100 %
Nombre de Cluster/CTM		3	
CTM >0	Non	76	0 [0;2] (0;63)
	Oui	49	64.47 %
	NA	27	35.53 %
Nombre de CTM/Sang		4	
CTM/Sang >0	Non	76	0 [0;0.2542] (0;8.4)
	Oui	49	64.47 %
	NA	27	35.53 %
Nombre de cellules min		4	
Nombre de cellules max		10	3 [2.25;3.75] (2;50)
Nombre de CAMLS		10	15 [9.75;19.5] (8;70)
CAMLS>0	Non	76	0 [0;0.25] (0;7)
	Oui	57	75 %
	NA	19	25 %
Nombre de CAMLS/Sang		4	
CAMLS/Sang >0	Non	76	0 [0;0.02778] (0;0.7955)
	Oui	57	75 %
	NA	19	25 %
Nombre de CEC		0	
Nombre de UMC		76	10.5 [4.75;33.25] (0;101)
UMC>0	Non	10	13.16 %
	Oui	66	86.84 %
	NA	4	
Nombre de UMC/Sang		76	1.314 [0.6389;3.912] (0;11.48)
UMC/Sang >0	Non	10	13.16 %
	Oui	66	86.84 %
	NA	4	

Tableau 11 || **Résultats Anatomopathologiques basés sur l'analyse des CTC**

Les résultats anatomopathologiques indiqués dans ce tableau ont été classés en différents groupes (CTC, CTM et CAMLS) par le pathologiste. Les résultats ont été présentés soit pour 1 échantillon (environ 9 ml de sang analysé réparti en 3 supports d'isolement) soit rapporté à 1 ml de sang (/Sang) afin de standardiser les résultats et de s'affranchir des variations liées au remplissage des tubes de sang.

L'analyse des supports d'isolement (3 supports par patient et par prélèvement) a été réalisée par le même pathologiste. Les résultats obtenus pour les 3 supports ont été additionnés et rassemblés en un seul compte associé à la quantité de sang analysé pour chaque prélèvement. Le pathologiste a classé chacune des cellules identifiées et considérées comme « atypiques » en 3 groupes principaux : CTC, CTM et CAML.

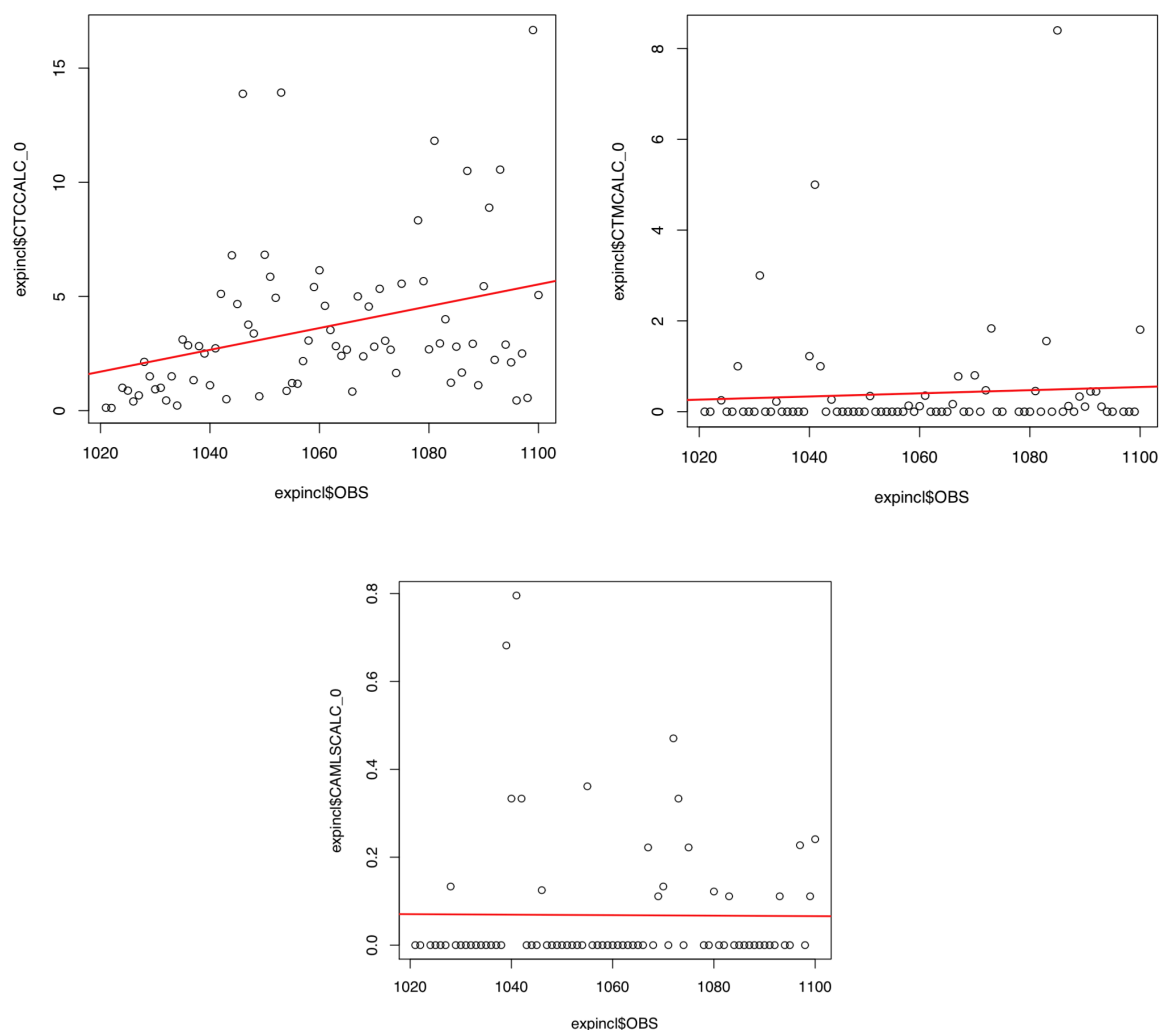


Figure 25 || CTC, CTM et CAML / ml de sang à l'inclusion

Représentation schématique du nombre de CTC (en haut à gauche), CTM (en haut à droite) et CAML (en bas) en fonction de l'identifiant patient (1021 à 1100)

Sur les 80 patients analysés statistiquement, l'ensemble des patients (100 %) présentaient des CTC à l'inclusion avec une moyenne de 22 CTC par prélèvement (environ 9 ml de sang) et une moyenne de 2,8 CTC rapporté par ml de sang (/sang).

35 % des patients en plus de présenter des CTC possèdent également des CTM dans leur sang circulant à l'inclusion. La présence de CTM a d'ailleurs été démontrée comme étant de mauvais pronostic par d'autres équipes de recherche (Aceto et al. 2014). 25 % des patients présentent également des CAML, macrophages associés aux tumeurs, définis aussi comme étant de mauvais pronostic pour les patients dans d'autres études (Adams et al. 2016).

Les patients ont été suivis au centre d'oncodermatologie de l'Hôpital Saint-Louis durant toute l'étude et l'évaluation tumorale pour chaque patient présenté dans le [Tableau 12](#) est basée sur les données médicales recueillies par l'équipe clinique.

Paramètres	Valeurs	N	Statistiques
Réponse au traitement	Réponse Complète	10	16 %
	Réponse Partielle	20	31 %
	Stabilisation	12	19 %
	Réponse Dissociée	2	3 %
	Progression	20	31 %
Si progression	Progression Localisée	12	60 %
	Progression Diffuse	8	40 %

Tableau 12 || Évaluation tumorale des patients à 6 mois (+/- 1 mois)

Les évaluations tumorales sont présentées à 6 mois et dans un intervalle de plus ou moins 1 mois. La réponse au traitement (complète, partielle, stable, dissociée) et la progression (localisée ou diffuse) n'a pu être évaluée que pour 64 patients sur les 80 inclus dans l'étude statistique. Pour les 16 autres patients, nous manquons de données cliniques, permettant d'évaluer la réponse au traitement de façon précise.

La réponse au traitement a ensuite été corrélée à la valeur des CTC trouvée en baseline par le pathologiste afin d'évaluer le caractère prédictif du nombre initial des CTC.

Le caractère prédictif obtenu à partir des CTC et des autres sous-groupes pour prédire la réponse au traitement est faible voire très faible puisque les estimations ponctuelles des AUC ne dépassent jamais 0,65 ([Tableau 13](#)). Pour rappel une valeur de 0,5 représente l'équivalent d'un tirage au sort complètement au hasard et 1 une prédiction parfaite.

	AUC	low CI95% AUC	up CI95% AUC	Best threshold	Se	Sp
RC 6 mois	0.61	0.43	0.80	2.67	0.70	0.57
RC+RP 6 mois	0.65	0.53	0.78	2.81	0.72	0.60
RC+RP+Stable 6 mois	0.57	0.44	0.70	2.81	0.61	0.58

Tableau 13 || **AUC et seuils basés sur le nombre de CTC rapporté au volume sanguin**

Les valeurs d'AUC estimées ainsi que les Intervalles de confiance à 95 % sont présentés ici. Les sensibilités et spécificités correspondantes sont également indiquées dans ce tableau.

Les faibles valeurs retrouvées ne permettent donc pas de conclure à la valeur prédictive des CTC analysées chez les patients, en baseline.

Parmi toutes les analyses réalisées, nous présentons ici la courbe ROC réalisée sur le sous-groupe des patients BRAF muté (n=32) (Figure 26) ainsi que la courbe ROC réalisée chez les patients avec un niveau de LDH supérieur à la moyenne (n=31) (Figure 27). Malgré l'absence de conclusion significative, ces deux courbes semblent plus informatives.

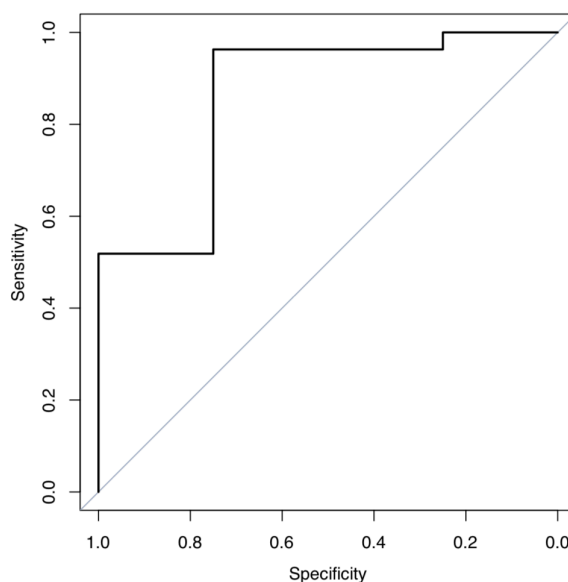


Figure 26 || **Courbe ROC : CTC / RC+RP+Stable, chez les patients avec BRAF muté**

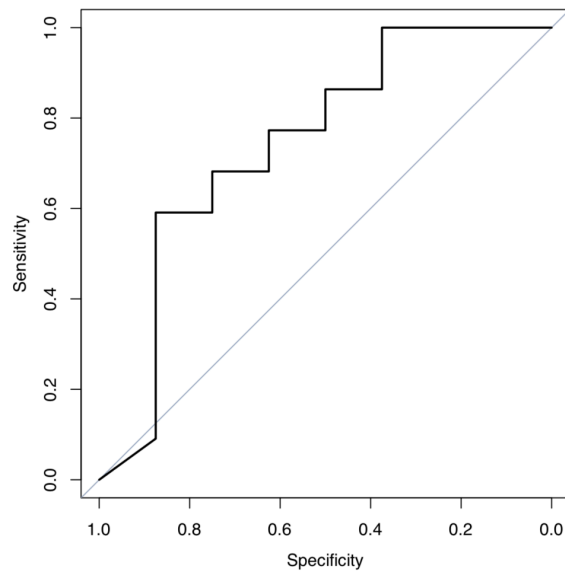


Figure 27 || **Courbe ROC : CTC / RC+RP+Stable, chez les patients avec LDH SUP MED**

Parmi les 80 patients de la cohorte analysable statistiquement, 56 patients ont progressé ou sont décédés sans progression. La courbe de survie est présentée en [Figure 28](#).

- Le taux de survie sans progression à 6 mois est de 41.2 [31.8 ; 53.6]
- Le taux de survie sans progression à 12 mois est de 34.7 [25.7 ; 47]
- Le taux de survie sans progression à 24 mois est de 27.6 [18.9 ; 40.4]

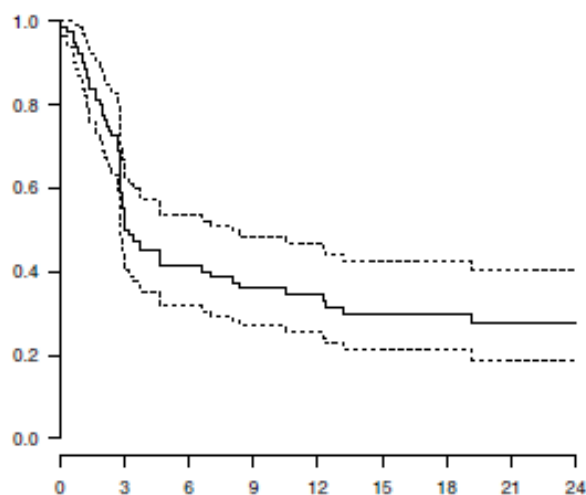


Figure 28 || **Courbe de survie sans progression estimée par la méthode Kaplan Meier**

Courbe de survie sans progression de 0 à 24 mois estimée par la méthode Kaplan Meier. Sur les 80 patients analysés, 56 patients ont progressé ou sont décédés sans progression.

Le [Tableau 14](#) présente les Hazard Ratio (HR) associés à la survie sans progression. Là encore les mesures obtenues par la technique développée apparaissent peu liées à la survie.

	Valeurs	N	HR	IC95%	pvalue
CTC		77	1	(1 ; 1.01)	0.28
CTM		76	1	(0.97 ; 1.03)	0.99
CAML		76	1.02	(0.84 ; 1.24)	0.85
CTM>0	0	49	1.00		
	1	27	1.28	(0.74 ; 2.21)	0.38
CAML>0	0	57	1.00		
	1	19	0.89	(0.48 ; 1.67)	0.72

Tableau 14 || Modèles de Cox, Hazard Ratio (HR) et Intervalle de Confiance à 95 % (IC %)

Le tableau présente les HR, les IC95% et les pvalue correspondantes pour la présence de CTC, CTM et CAML.

Cette cohorte de patients fait l'objet d'une période de suivi de 3 ans qui est actuellement toujours en cours. Cette période de suivi permettra de rendre plus robuste les précédents résultats obtenus. Ces résultats finalisés feront l'objet d'un article scientifique en cours d'écriture.

3.3. Résultats phénotypiques

Nous nous sommes également intéressés à l'analyse des CTC au niveau phénotypique et notamment à l'évaluation de l'expression de PD-L1. La détection de PD-L1 au niveau des CTC peut constituer un outil potentiel pour le dépistage de patients éligibles aux traitements d'immunothérapie. En effet, certaines cellules tumorales détournent les inhibiteurs de point de contrôle en sur-exprimant PD-L1, Cette sur-expression inhibe les cellules T cytotoxiques, les empêchant de réagir efficacement contre le développement tumoral. Le blocage de l'interaction PD1 / PD-L1 est une voie thérapeutique possible et actuellement utilisée pour le traitement du mélanome. Cependant, cette approche très coûteuse et très toxique reste inefficace en l'absence d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales du patient ([voir page 44](#)).

C'est dans ce but que nous avons trouvé intéressant de mettre au point l'analyse de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales circulantes isolées à partir de 3 ml de sang de 20 patients.

Les 20 patients (Tableau 15) ont été sélectionnés car naïfs de tout traitement à l'inclusion et traités par des agents anti-PD1 en première ligne : Nivolumab ou Pembrolizumab (voir page 34) pour plus d'information sur les traitements).

ID PATIENT	Traitement	NB CTC / 3 ml sang	NB CTM / 3 ml sang	STATUT PDL1
1039	Pembrolizumab	8	-	-
1041	Pembrolizumab	9	19	+
1042	Pembrolizumab	21	5	NA
1051	Pembrolizumab	20	2	++
1066	Pembrolizumab	3	1	++
1067	Nivolumab	17	5	++
1068	Pembrolizumab	9	-	-
1070	Pembrolizumab	3	3	+
1071	Pembrolizumab	20	-	-
1073	Pembrolizumab	6	6	++
1078	Nivolumab	19	-	-
1084	Pembrolizumab	5	-	-
1088	Pembrolizumab	10	-	-
1095	Pembrolizumab	9	-	-
1100	Pembrolizumab	25	6	++
1105	Pembrolizumab	NA	NA	NA
1109	Pembrolizumab	5	-	-
1112	Pembrolizumab	9	-	-
1114	Pembrolizumab	6	-	-
1121	Pembrolizumab	14	3	+

Tableau 15 || Évaluation de l'expression de PD-L1 au niveau des CTM

L'expression de PD-L1 au niveau des CTM a été évaluée et stratifiée selon son intensité (absence (-), modéré (+), forte (++)) par observation microscopique manuelle (microscope Nikon Eclipse 80i couplé au logiciel NIS Element BR 2.30)

Il est important de noter que l'expression de PD-L1 a été mise en évidence uniquement dans des structures multicellulaires (CTM) et qu'aucune CTC isolée n'a présenté de marquage PD-L1 positif. De plus, l'ensemble des CTM analysés ont été définis comme positifs avec des expressions variables d'un groupement de cellules à un autre mais également au sein d'un même amas (Figure 29).

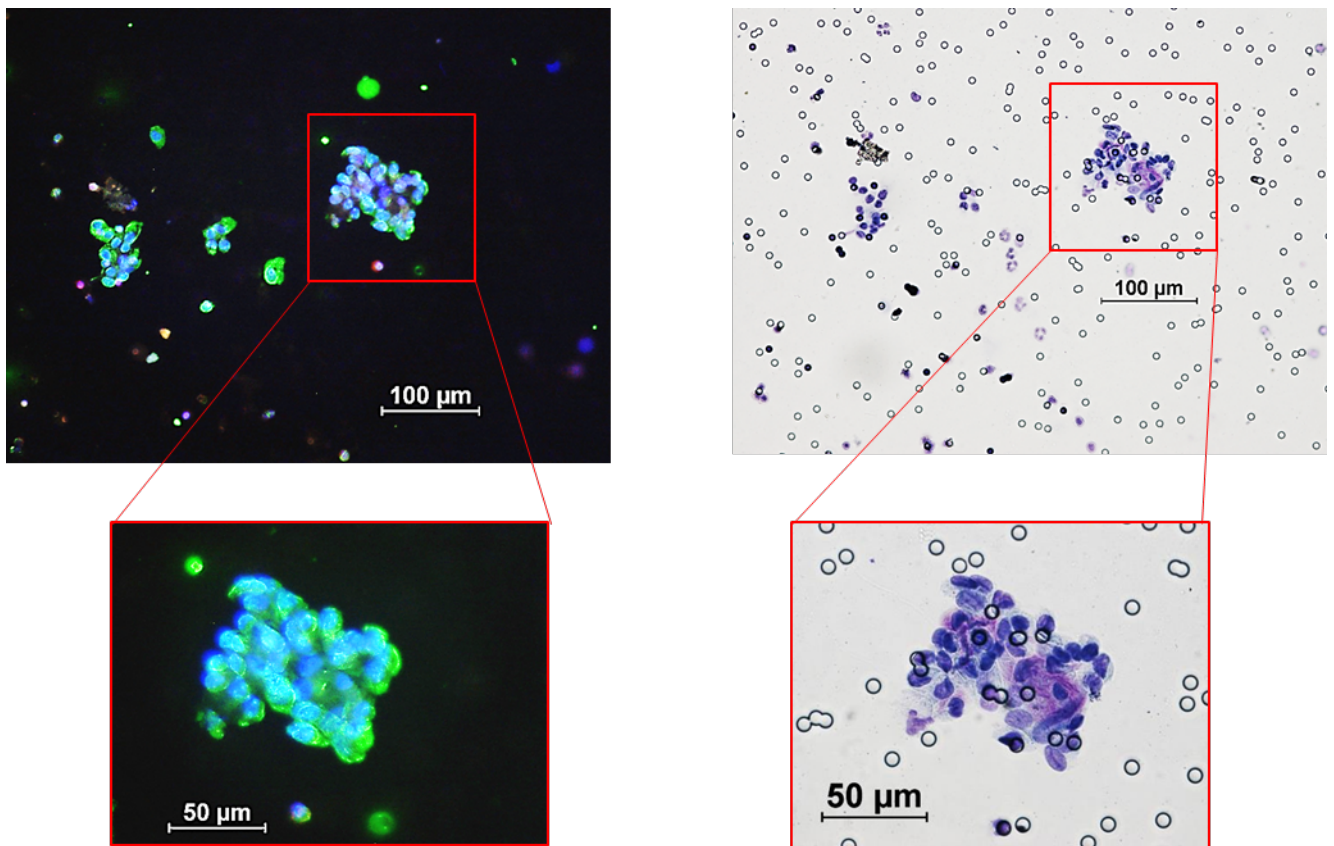


Figure 29 || Caractérisation de l'expression de PDL1

Évaluation de l'expression de PD-L1 au niveau des cellules tumorales circulantes isolées du sang de patients avec la technologie ScreenCell. L'expression de PD-L1 a été évaluée à l'aide de l'anticorps anti-PD-L1/B7H1 (MAB1561 Clone 130021, R&D Systems) combiné à l'anticorps secondaire (A11001, Life Technologies)

4. Discussion

Des progrès ont été réalisés dans le traitement du mélanome métastatique, en particulier grâce à l'utilisation des nouvelles thérapies (les immunothérapies et les thérapies ciblées). Néanmoins, le taux de survie à 5 ans pour les patients métastatiques reste faible et le développement de biomarqueurs pouvant guider les choix thérapeutiques pourrait être utile. De façon analogue aux cancers épithéliaux, l'analyse des CTC dans le mélanome pourrait être un outil précieux permettant de stratifier les patientes en sous-groupes et de mieux définir les patients susceptibles de répondre ou non à un traitement. Toutefois, il existe actuellement très peu d'études sur la valeur pronostique des CTC chez les patients atteints de mélanome métastatique.

La présente étude a été menée dans un premier temps pour évaluer la présence brute, en baseline, des CTC et sous-groupes de CTC. Elle a permis de mettre en évidence des types variés de cellules tumorales circulantes et de les classer selon 3 groupes principaux (CTC, CTM et CAML) mais aucune corrélation statistique concernant la valeur prédictive des CTC au diagnostic n'a pu être établie.

Cependant, comme l'ensemble des patients de cette étude étaient diagnostiqués avec un mélanome métastatique (Stade III inopérable ou IV) à l'inclusion, une stratification plus fine en différents groupes au sein du groupe métastatique semble nécessaire.

De plus, les analyses statistiques présentées dans cette étude n'évaluent que 80 patients sur les 150 patients inclus dans l'étude. Des analyses ultérieures sur l'ensemble de la cohorte et surtout en tenant compte de l'évolution des CTC au cours du temps pourraient aboutir à de nouvelles conclusions. En effet, il a été montré dans des études précédentes ([Cristofanilli et al. 2004](#)) que l'évolution de la quantité des CTC ainsi que l'apparition de certains sous-groupes au cours du temps ([Adams et al. 2016](#)) avait une valeur prédictive plus forte que l'évaluation seule des CTC en baseline. Un exemple d'un patient, analysé de manière individuelle, indépendante et non statistique est présenté en [Figure 30](#).

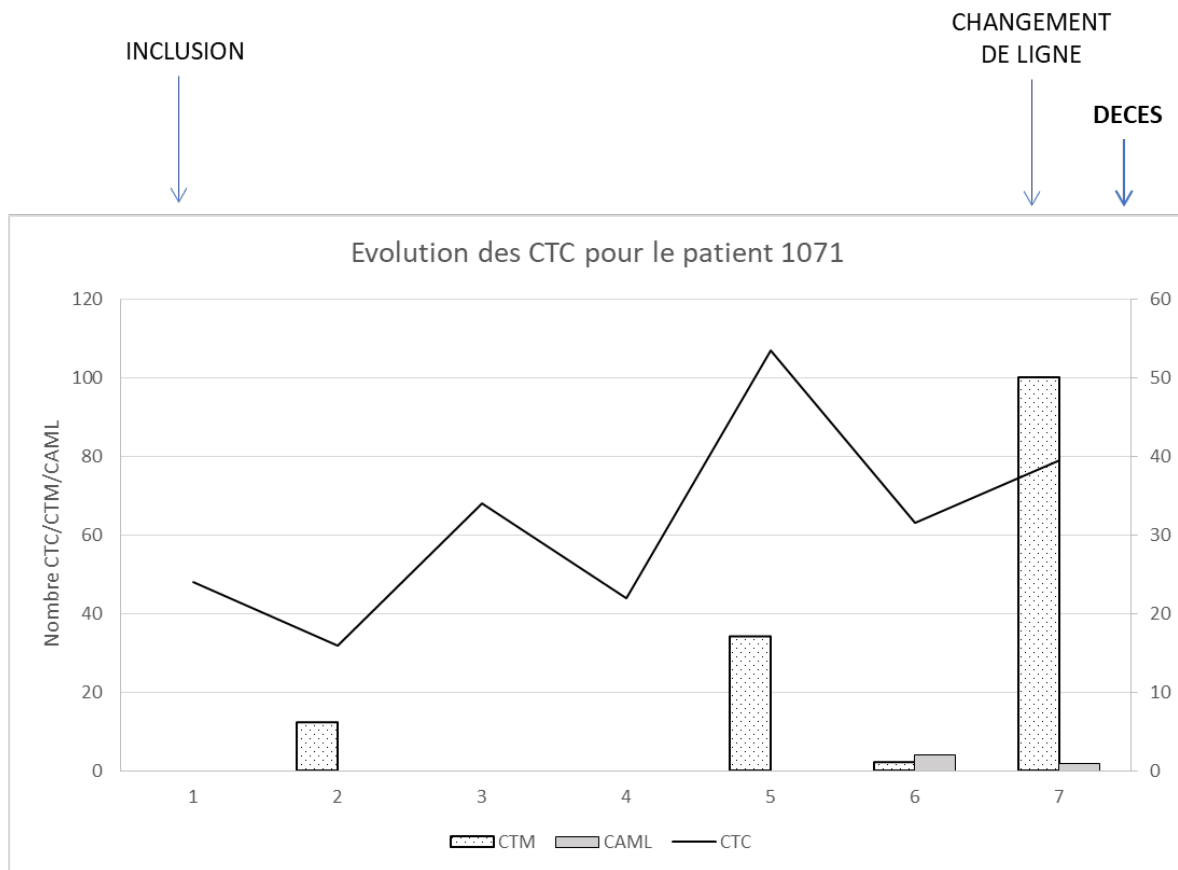


Figure 30 || Évolution longitudinale des CTC et sous-groupe pour le patient 1071

Le patient 1071 a été inclus dans l'étude en première ligne de traitement, sans mutation BRAF connue au niveau de la tumeur primaire et traité en première intention par immunothérapie (Pembolizumab). L'analyse par biopsie liquide révèle une augmentation du nombre de CTC au cours du temps ainsi qu'une apparition de CTM et de CAML précédant un changement de ligne thérapeutique.

L'absence de corrélation significative entre les taux de survie des patients et le nombre de CTC détectées en baseline pose de nombreuses interrogations auxquelles il est important de répondre.

En plus de l'évolution du nombre de CTC, l'apparition de sous-groupes de cellules (CAMLS et CTM) serait intéressante à analyser.

Dans le cancer du sein, le seuil de 5 CTC pour 7,5 mL a été sélectionné sur la base d'études antérieures ([Cristofanilli et al. 2019](#)). Dans notre étude, les analyses statistiques sur les échantillons de notre cohorte n'ont pas permis de déterminer un seuil.

Pour déterminer ce seuil au mieux il aurait fallu inclure un certain nombre de donneurs sains en tant que témoin dans l'étude. De plus, les analyses statistiques dont nous disposons actuellement ne sont basées que sur la baseline. Nous espérons qu'une analyse tenant compte des 3 premiers points (M0, M1 et M3) permettra d'aboutir à une nouvelle stratification de ces patients métastiques. En effet, la difficulté dans ces études est de stratifier les patients en différents groupes (deux groupes ou plus) afin de limiter les biais d'analyses. En effet, dans notre étude, les patients ont subi des stratégies thérapeutiques différentes et cela doit être pris en compte dans l'analyse statistique globale.

L'utilisation des CTC dans la surveillance longitudinale de la maladie est à prendre avec précaution car la présence de CTC dans l'échantillon sanguin est fluctuant, même chez les patients atteints de maladies à un stade avancé ([Aceto 2019](#)) (voir Figure 30). Cette variation pourrait être influencée par des facteurs extrinsèques non connus mais pouvant être lié à l'état clinique du patient. De la même façon, l'absence de CTC dans la circulation sanguine n'exclut pas leur présence mais vient appuyer la supposition que les CTC seraient libérées dans le sang par vagues. L'analyse longitudinale de très grandes cohortes de patients pourrait aider à comprendre la dynamique des CTC ([Aceto 2019](#)).

De plus, la question de la méthode d'isolement des CTC qui a été utilisée dans cette étude se pose. Nous avons utilisé une méthode d'enrichissement fondée sur la taille des CTC. D'autres études utilisant des méthodes analogues, indépendantes des antigènes tumoraux, ont révélé des taux de CTC plus élevés comparé à CellSearch ([Nicolazzo et al. 2017](#)). La valeur biologique des CTC isolées n'était toutefois pas claire et n'a pas trouvé de corrélation entre le nombre de CTC et une survie diminuée. La détection des CTC liée à leur taille et à leur morphologie pourrait être moins sélective que les méthodes utilisant des antigènes de surface. Il est également supposé que cette méthode isole du sang une fraction plus complète mais peut-être moins pertinente de CTC quant à la relation avec la survie des patients.

Néanmoins, l'identification des CTC par des pathologistes expérimentés correspond à la pratique clinique standard en oncologie. En effet, les cellules cancéreuses sont identifiées dans les épanchements (ascite, épanchement pleural, LCR) de la même façon que sur les coupes de tissus. Un immunomarquage automatisé supplémentaire pourrait toutefois augmenter la spécificité de cette méthode.

Les échantillons obtenus tout au long de cette étude ont permis la création d'une bio-banque très riche et qui peut être utilisée pour des études rétrospectives.

5. Annexes

	Prélèvement	Date		CTC	CTM	CAML
1071	1	14/11/2016	Inclusion	48	0	0
	2	06/12/2016	M1	32	6	0
	3	27/12/2016	ET 1	68	0	0
	4	17/01/2017	ET 2	44	0	0
	5	02/03/2017	ET 3	107	17	0
	6	10/05/2017	ET 4	63	1	2
	7	12/06/2017	CL	79	50	1
	X	03/09/2017	D			

Annexe 1 || Évolution longitudinale des CTC et sous-groupe pour le patient 1071

Evolution du nombre de CTC, CTM et CAML au cours du suivi du patient. Le premier prélèvement a été réalisé au moment de l'inclusion dans l'étude et avant le début du traitement. Puis un deuxième prélèvement a été réalisé 1 mois après le début du traitement puis à chaque évaluation tumorale (ET1, ET2, ET3, ET4) et enfin lors du changement de ligne (CL). Le graphique illustrant cette évolution au cours du temps est disponible page 105.

Chapitre II | Analyse semi-automatisée des CTC

1. Contexte

Les méthodes d'identification des CTC comportent généralement deux étapes : une première étape d'enrichissement basée sur les propriétés phénotypiques ou physiques des CTC, puis une seconde étape d'analyse. Afin d'augmenter la sensibilité de cette dernière étape nous avons souhaité développer une méthode semi-automatisée de reconnaissance des CTC après enrichissement.

Cette méthode semi-automatisée a été développée tout au long de l'étude de la cohorte de 150 patients. Des améliorations ont été réalisées au fur et à mesure des inclusions et de l'obtention des différents prélèvements. Afin de tenir compte de cela notre pathologiste en charge de ces analyses effectuait un contrôle manuel (lecture standard) en parallèle afin d'obtenir des résultats concordants et pouvant être analysés sans biais lié à la méthode de lecture.

Le développement d'un système semi-automatisé et « intelligent » inclut :

- La capture numérique réalisée par le système Pathfinder™ d'IMSTAR fournit les images de l'ensemble des supports d'isolement de ScreenCell dédiés à la cytologie
- L'analyse qualitative et quantitative des images numériques présente une galerie des cellules candidates calculée par le module logiciel CellScan en vue d'une pré-sélection permettant par la suite une sélection définitive et le comptage des CTC et CTM par un pathologiste.

Le développement de la plateforme combinée de ScreenCell (pour la sélection des cellules par la taille, analyse et validation) et d'IMSTAR (pour l'instrumentation et les logiciels de scanning) est illustré en [Figure 31](#) :

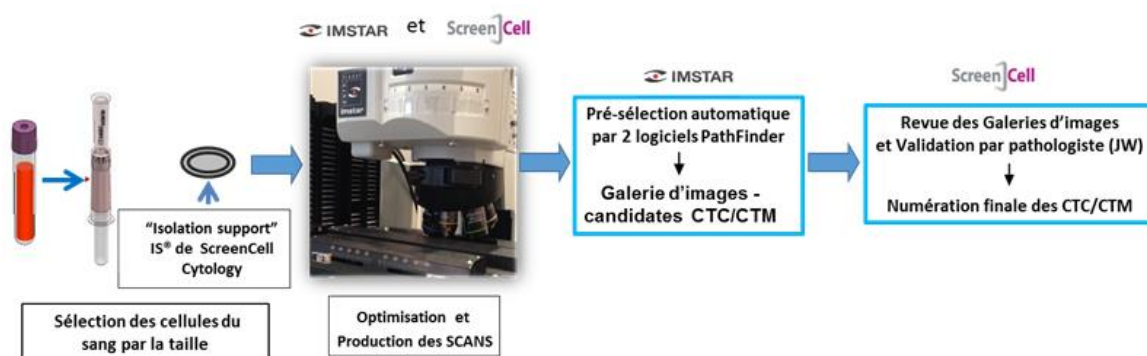


Figure 31 || Principe de la plateforme semi-automatisée pour l'analyse des CTC

Cette plateforme combine les développements de deux partenaires industriels : d'un côté une technique spécialisée pour l'isolement des CTC, de l'autre une interface expérimentée dans l'analyse cellulaire par algorithme hautement spécialisé.

Le développement de cette plateforme semi-automatisée possède un double objectif :

1. L'instrumentation d'un système motorisé, contrôlé par un logiciel permettant le scanning digital 3D et possédant une technologie d'autofocus tenant compte de l'épaisseur et de la non-planéité de l'échantillon pour la capture de bases de données-images.
2. L'acquisition d'une très riche bibliothèque d'images obtenues selon des algorithmes spécifiques intégrés au logiciel d'analyse et parallélisés pour chaque échantillon.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Isolement des CTC

Les CTC et sous-groupes associés ont été isolés à partir du sang périphérique de patients suivis au centre d'oncodermatologie de l'hôpital Saint-Louis (AP-HP), en utilisant les dispositifs ScreenCell. Chaque patient a eu au moins 3 prélèvements (M0, M1 et M3) à des temps différents. Tous les supports « SI » (support d'isolement) ont été colorés par coloration cytologique (MGG), lus au microscope « conventionnel » par un pathologiste, puis analysés par le logiciel de capture puis d'analyse Pathfinder™, qui a généré un « SI » virtuel numérisé, appelé 'Digital-SI' ou 'D-SI'.

2.2. Système automatisé Pathfinder™ CTC Mélanome

Les modules développés dans ce projet sont dédiés :

- (1) D'une part, au scan des SI ScreenCell (**développement du support lame**)
- (2) D'autre part, à l'analyse qualitative et quantitative (**développement du système Pathfinder™ SmartCapture**) par observation en microscopie optique à fond clair des CTC et CTM recueillis sur les supports.

2.2.1. Développement du support lame

Pour améliorer la planéité de la membrane, ScreenCell et IMSTAR ont conçu et développé un support spécifique au format d'une lame de verre de microscopie standard, portant 3 x SI par support, ce qui correspond à un prélèvement de patient. Comme la platine du microscope peut accueillir 4 supports, on peut ainsi scanner automatiquement et simultanément 4 prélèvements de patients (soit $4 \times 3 = 12$ SI).

La numérisation de ces 12 SI peut être réalisée de façon autonome et selon 3 axes X, Y, Z sur le lecteur-analyseur Pathfinder™ SmartCapture CellScan. En option, un robot-chargeur de supports peut fournir un débit de 480 SI soit 160 patients, par batch sans intervention du manipulateur.

De plus, afin d'améliorer le maintien de la lamelle, 2 aimants supplémentaires (flèche rouge) ont été ajoutés afin de mieux positionner le cache opaque rectangulaire indispensable au maintien correct des SI durant les étapes de scanning (Figure 32).

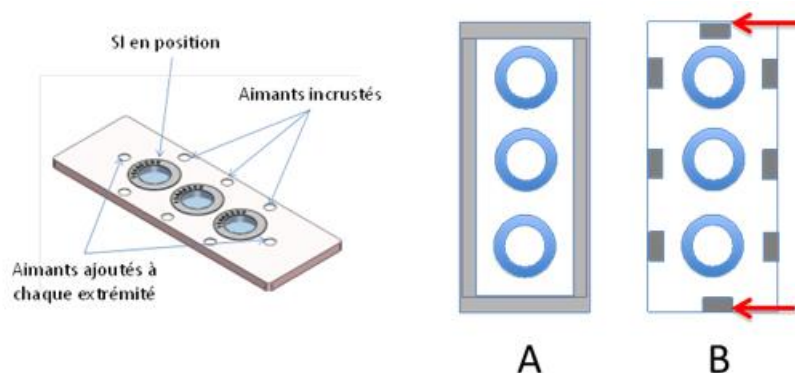


Figure 32 || **Disposition des aimants sur chaque support**

Trois supports d'isolement peuvent être positionnés par support-lame et un total de 4 supports-lame par plateau peut être placé. Ce qui permet un positionnement de 12 SI ScreenCell par plateau et par scan.

2.2.2. Développement du logiciel de capture Pathfinder™

Les captures automatiques des SI ScreenCell positionnés sur un support lame sont réalisées en microscopie multimodale à fond clair après coloration cytologique May-Grunwald-Giemsa (MGG).

Le logiciel de capture d'image Pathfinder™ Smart Capture a été mise au point et adapté aux SI-ScreenCell Cyto. Les zones de capture automatisée ont été paramétrées pour correspondre à la surface des 3 SI placés sur chaque support. Un algorithme propriété d'IMSTAR de correction de focus en profondeur « 3D-Focus-depth » de 150µm a été appliqué et a permis une mise au point parfaitement de l'ensemble des SI, créant des images de haute résolution sur la totalité des D-SI avec un temps de numérisation de 10 min pour une surface de 2 cm².

3. Résultats

3.1. Digitalisation des SI par scanning semi-automatisée

La digitalisation par scanning automatisé pour créer des images de très grande taille et de haute résolution (>120 M pixels) pour la totalité des SI numérisés ou SI digitalisés a été rendu possible grâce au développement de porte-SI spécifique mis au point dans le cadre de ce travail.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une communication par Poster lors du 8^e International Symposium on Minimal Residual Cancer (ISMRC) du 3 au 5 Mai 2018 à Montpellier ([Voir Poster présenté en Annexe - Page 122](#)).

Nous avons analysé 1240 SI représentant 412 prélèvements d'échantillons de sang (7 - 9 ml) provenant d'une cohorte de 150 patients atteints de mélanome de stade IV et suivis au département d'oncodermatologie de l'Hôpital Saint-Louis, Paris. Dans cette cohorte, 130 patients ont été analysés, au minimum 3 fois et à différents temps.

Une standardisation de la capture d'Hyper-Image digitale, appelée « SI digitalisé », a été réalisée à partir du scanning développé précédemment. La présélection automatique en 2 catégories de cellules (CTC et CTM) détectables sur les SI de patients, a été réalisée en microscopie à fond clair ([Figure 33](#)).

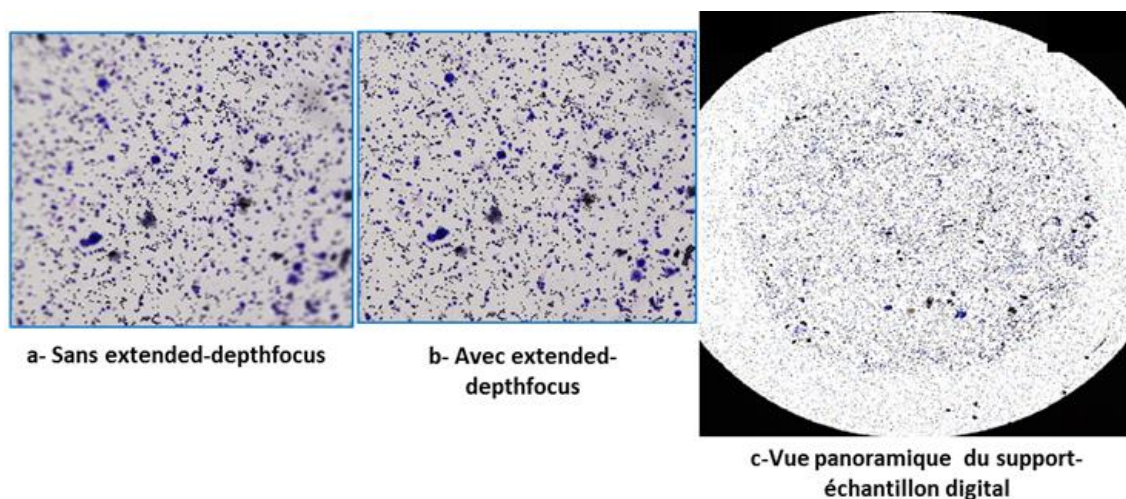


Figure 33 || Automatisation du scanning et analyse quantitative de la présence de CTC

Interface montrant l'Hyper Image ou « SI digitalisé » de 127 M pixels, reconstruite numériquement et pouvant être lue à distance, après scanning (x10) de la totalité du support ScreenCell CYTO.

Une optimisation de l'autofocus 3D tenant compte de la non-planéité de la membrane et de l'épaisseur de l'échantillon a été réalisée. Une profondeur de champ à 150 μm a été définie et permet une précision, une netteté et une parfaite mise au point du set d'images sur l'ensemble du support à l'objectif 10X.

Une amélioration du temps de scanning a également été réalisée et a permis de passer de 20 min à environ 10 min. Ce temps correspond au temps nécessaire pour la totalité du scanning de l'échantillon et la capture de chaque image digitalisée recouvrant la totalité de la surface des supports SI-Cyto.

3.2. Analyse semi-automatisée des CTC et des CTM du mélanome

La reconnaissance automatique des CTC a été développée grâce à une analyse complète des images cellulaires obtenues après scanning. Les CTC sont rares et environnées de plus de 1000 cellules sanguines de différents types. C'est pourquoi leur identification doit être sensible et spécifique. L'identification des cellules d'intérêts intègre de nombreux paramètres et a été possible grâce aux multiples critères morphologiques. Ces critères ont été définis par le pathologiste et pris en compte pour le développement du module semi-automatisé d'analyse spécifique du mélanome adapté au SI.

Afin de distinguer les cellules détectées par l'algorithme automatique, des cellules validées par le pathologiste, les différents labels (CTC, UMC⁵, CTM et CAML) sont complétés du label « soft » lorsqu'il s'agit de l'algorithme logiciel semi-automatisé.

Les cellules à détecter et à dénombrer dans notre étude sont :

1.	CTC	Circulating Tumor Cell
2.	UMC	Uncertain Malignant Cell
3.	CTM	Circulating Tumor Microemboli
4.	CAML	Cancer-Associated Macrophage Like cell

1. Les critères morphologiques des CTC sont : la taille du noyau $>18 \mu\text{m}$, un noyau dense (coloration sombre), la forme irrégulière du noyau, le rapport nucléo-cytoplasmique élevé, proche de 1.
2. Les UMC diffèrent des CTC par la taille de leur noyau : $18 \mu\text{m} > T > 16 \mu\text{m}$
3. Un CTM est défini par un amas de 2 CTC ou plus.
4. Les CAML n'ont pas été présélectionnées par un logiciel de reconnaissance spécifique. Le pathologiste les identifie séparément parmi les images proposées par les logiciels Pathfinder comme « candidat-CTC ou candidat-CTM ».

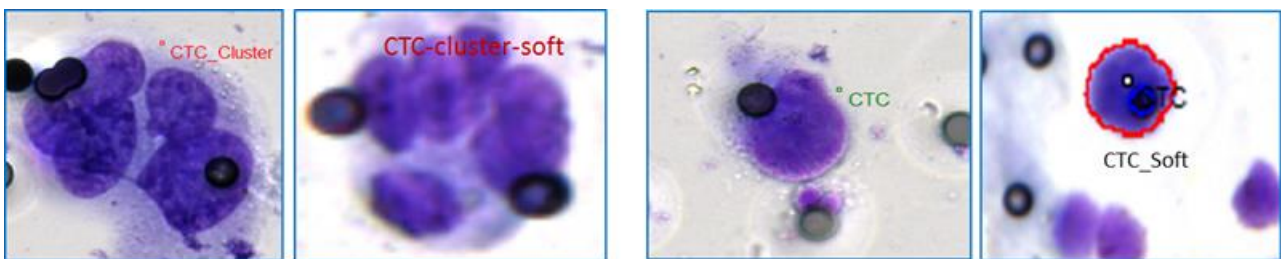


Figure 34 || Exemple de détection semi-automatisée d'éléments atypiques

⁵ UMC : cellules identiques aux CTC, mais de taille inférieure ($18 \mu\text{m} > T > 16 \mu\text{m}$)

Le système final intègre les algorithmes mis au point pour la reconnaissance et le comptage des cellules « candidat-CTC et candidat-CTM ». Ce développement a été réalisé en collaboration étroite avec un pathologiste. A gauche, CTC-Cluster étiqueté par le pathologiste versus CTC-cluster-soft détecté par le logiciel (G X400) ; A droite, 1 CTC étiquetée par le pathologiste et 1 CTC-soft détectée par le logiciel (G x400).

Les critères morphologiques fournis par le pathologiste ont été intégrés comme des règles numériques de reconnaissance et ont permis de créer un algorithme spécifique pour la reconnaissance de CTC et CTM de mélanome sur SI ScreenCell.

Deux jeux d'algorithmes ainsi « éduqués » pour la reconnaissance et le classement (*scoring*) des CTC et des CTM du mélanome ont été finement ajustés et intégrés dans la procédure de "Revue & Validation" ou écran R & V de l'interface, en vue de la sélection finale par le pathologiste. Cette validation peut être faite sur un ordinateur situé à distance du lieu de scan du SI à analyser.

Les SI digitalisés sont analysés par le logiciel Pathfinder™ CTC-CTM qui propose 2 galeries d'images pour une lecture et une validation sur Pathfinder™ CTC -CTM "écran R & V". L'une composée par les CTC-candidates (voir Figure 35) et la seconde composée par les CTM-candidates (voir Figure 36) qui ont été sélectionnées et étiquetées par le pathologiste. Les images proposées et celles retenues sont comptées séparément.

La sauvegarde et le stockage de toutes les images enregistrées pour chaque patient avec leurs étiquettes (labels) permet une confrontation diagnostique ultérieure entre plusieurs experts, facilite la formation à la lecture et à la numération des CTC éventuellement à distance, la conservation d'autres données (informations cliniques, ligne de traitement et autres informations techniques) dans la base de données du logiciel Pathfinder™.

3.3. Validation des galeries d'images de CTC et de CTM de mélanome

Un développement et une amélioration des performances ont également été réalisés concernant le protocole automatique de validation des galeries d'images appelé « revue & validation » des cellules candidates. Une fois détectées par le logiciel de reconnaissance automatisée, les cellules atypiques sont soumises et validées par le pathologiste.

3.3.1. Résultats pour les CTC.

Parmi l'ensemble des D-SI numérisés par cette technique mise au point et standardisée dans le cadre de ce projet, 166 échantillons pris au hasard ont permis d'évaluer la robustesse de l'algorithme. Pour cela, le nombre de CTC identifiées et comptées directement à l'écran à distance par le pathologiste sur les D-SI, a été comparé au comptage automatisé des CTC détectées par le logiciel spécifique d'analyse et de reconnaissance puis validées et étiquetées de nouveau par le pathologiste.

Pour $n=170$, le comptage réalisé directement à l'écran par le pathologiste donne un total de 2382 CTC, alors que le comptage automatisé détecte 2375 CTC. Ces deux modes de comptage donnent donc des résultats parfaitement concordants.

Pour 32 D-SI, le nombre de CTC détecté à l'écran par le pathologiste est inférieur au comptage automatisé. A l'inverse, pour 24 D-SI : le comptage des CTC à l'écran par le pathologiste est supérieur au comptage automatisé.

Cet ensemble de 170 D-SI a été divisé en 2 groupes :

Groupe A = 85 D-SI avec < 8 CTC et **Groupe B** = 85 D-SI avec ≥ 8 CTC

- Pour le groupe A : Le score automatisé est égal ou supérieur au score visuel dans plus de 98 % des cas.
- Pour le groupe B : Le score visuel est égal ou supérieur à la notation automatisée dans 90 % des cas.

Ceci suggère que pour les échantillons avec un nombre faible de CTC, la procédure automatisée est plus sensible et plus robuste, cette opération ayant été répétée plus de 3 fois en tout. La moindre sensibilité de l'examen visuel pourrait être en partie expliquée par les difficultés à évaluer la taille des cellules directement à l'œil, sans allonger le temps de l'analyse.

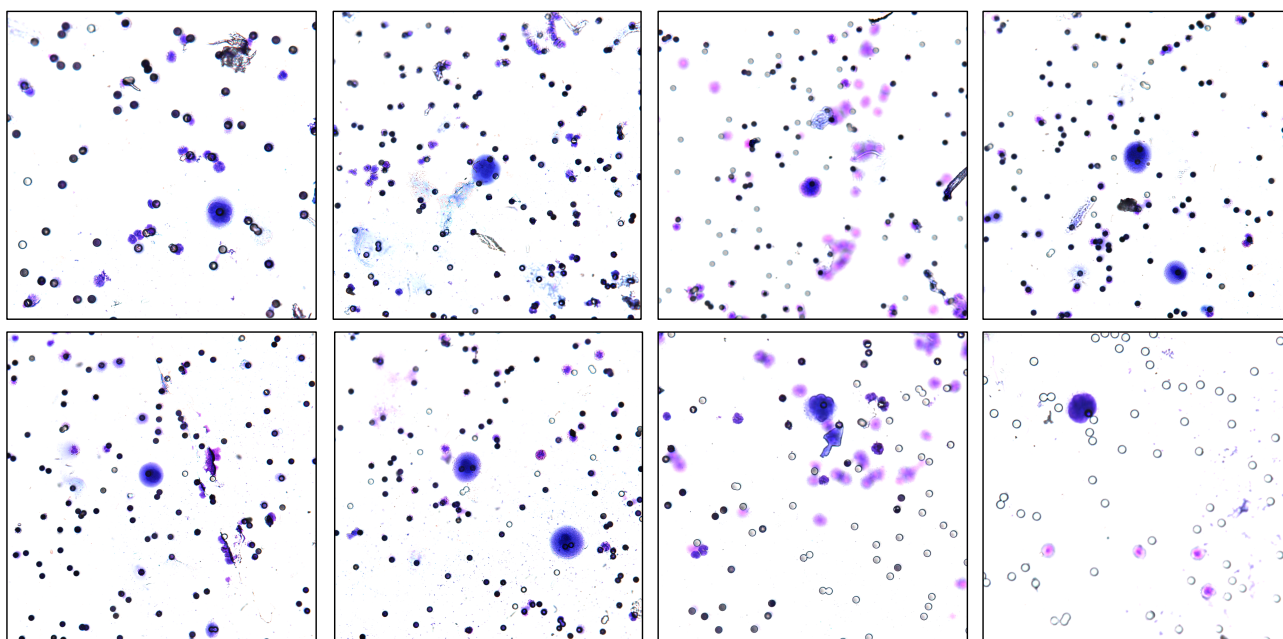


Figure 35 || Galerie de CTC isolées avec ScreenCell

Échantillon de 8 images capturées à l'aide de la plateforme semi-automatisée mise en place dans le cadre de ce projet. Une fois le module de reconnaissance automatique appliqué sur l'ensemble de l'échantillon et validé par le pathologiste, chaque cellule peut faire l'objet d'une capture à un plus fort grossissement (Objectif 20X ou 40X)

3.3.2. Résultats pour les CTM

Parmi les D-SI présentant des CTM, 70 échantillons digitalisés ont été sélectionnés aléatoirement afin de valider la robustesse de l'algorithme qui a été mis au point et standardisé dans cette étude. Le nombre de CTM identifiés et comptés à distance par le pathologiste, a été comparé au comptage automatisé des CTM détectés par le logiciel spécifique d'analyse et de reconnaissance, puis validées et étiquetées par le pathologiste.

Pour $n=70$, le comptage à l'écran du pathologiste donne un total de 418 CTM, alors que le comptage automatisé donne 410 CTM.

On peut en déduire que les deux méthodes sont en concordance en termes de comptage des CTC et des CTM dans le mélanome. On peut en déduire que les deux méthodes de comptage sont en concordances pour les CTM comme cela est le cas pour les CTC dans le mélanome.

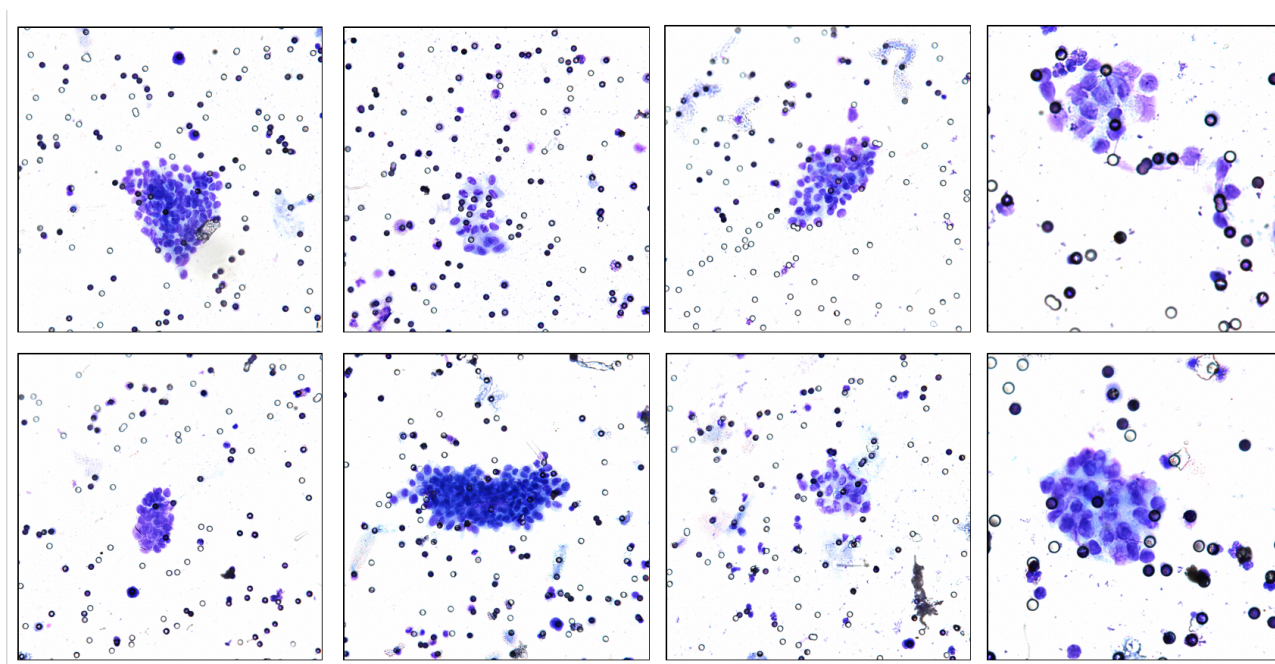


Figure 36 || **Galerie de CTM isolés avec ScreenCell**

Échantillon de 8 images capturées à l'aide de la plateforme semi-automatisée mise en place dans le cadre de ce projet. Une fois le module de reconnaissance automatique déployé sur l'ensemble de l'échantillon et validé par le pathologiste, chaque groupe de cellule a pu faire l'objet d'une capture à un grossissement plus important (Objectif 20X ou 40X)

4. Discussion

Les supports d'isolement ScreenCell ont été digitalisés et analysés par le système Pathfinder™ d'Imagerie Cellulaire Quantitative à Haut-Contenu. Le logiciel développé dans le cadre de ce projet permet la détection semi-automatisée d'éléments atypiques considérés comme candidats-CTC, leur dénombrement, et enfin leur classification en sous-groupe. Le système Pathfinder™ permet le scanning d'échantillons en coloration cytologique standard (MGG), en immunochimie (ICC) mais également en immunofluorescence (IF) et en FISH.

L'évaluation des algorithmes d'analyse et de caractérisation morphologique/colorimétrique développés a été réalisée par comparaison systématique avec la lecture directe au microscope. Le temps de l'analyse d'un D-SI par la méthode automatisée puis la validation par le pathologiste est inférieur à 5 min par échantillon. Ce qui est plus rapide que la méthode manuelle (10 min)

Dans la version actuelle du logiciel, l'algorithme de détection des CTC-candidates affiche automatiquement leur taille ce qui permet de les valider soit en CTC si la taille affichée est $\geq 18 \mu\text{m}$ soit en UMC, cellule étant de malignité incertaine, si la taille se situe entre 16 et $18 \mu\text{m}$.

La comparaison entre les CTC et les UMC identifiées par le pathologiste directement sur les D-SI ou bien sélectionnées directement par l'algorithme mis au point, a été faite sur des échantillons issus de 27 patients qui ont produit un total de 81 D-SI. Les variations du score final entre le comptage manuel et le comptage semi-automatisé après validation des CTC et des UMC, se situent entre 0 % et 25 % avec une majorité de cas inférieurs à 15 %. Les 2 types cellulaires ne différant l'un de l'autre que par la taille, le résultat est plus fiable lorsqu'il est réalisé à partir de la galerie d'images présélectionnées qui indique la taille précise des cellules.

Une autre équipe ([Pailler et al. 2016](#)) a également développé une méthode de microscopie semi-automatisée permettant la reconnaissance des CTC. Avec cette méthode, les CTC sont aussi isolées selon la taille puis reconnues selon les marqueurs exprimés par les cellules et analysés par immunofluorescence.

Une étude ([Haenssle et al. 2018](#)) menée par plusieurs équipes de recherche (France, Allemagne, USA) a également montré récemment que l'analyse par algorithme ou par intelligence artificielle pouvait jouer un rôle important dans l'identification et le diagnostic des mélanomes. Dans cette étude réalisée uniquement sur les coupes cytologique des tumeurs primaires, il a été comparé la performance diagnostique d'un algorithme avec le corps médical. Le programme a été capable d'identifier 95 % des mélanomes contre 87 % pour le groupe international de 58 dermatologues issus de 17 pays, dont 30 experts ayant plus de 5 ans d'expérience en dermoscopie. En plus de la spécificité, la sensibilité de la reconnaissance par intelligence artificielle a également été évaluée. Les dermatologues ont montré une spécificité inférieure à l'intelligence artificielle (75,7 % contre 82,5 %, $p < 0,01$).

Ces données récentes associées à nos développements montrent qu'un outil approprié pourrait aider les pathologistes dans la détection des mélanome au niveau de la tumeur primaire ou au niveau des CTC, indépendamment de leur niveau individuel d'expérience et de formation en cytologie. Cela pourrait faciliter l'accès aux CTC à une utilisation en routine clinique.

5. Annexes

5.1. Abstract 1

AUTOMATED DETECTION OF CTCS/CTMS AFTER SIZE-BASED SELECTION FROM BLOOD OF PATIENTS WITH MELANOMA

Jessica Groult^{1,4}, Charles Homsy², Ekaterina Tatarinova², Laetitia Da Meda³, Naoual Benali-Furet¹, Nicolas Dumez⁵,
Alexandre Papine², Georges Uzan⁴, Celeste Lebe³, Janine Wechsler¹ and Françoise Soussaline²

¹ ScreenCell, Roger Pérez Centre, 10 av. Charles Péguy, 95200 Sarcelles. ² IMSTAR S.A. 93 Bld Arago, Paris 75014, ³ Onco-Dermatology Saint-Louis Hospital, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris. ⁴ Inserm U1197, Paul Brousse Hospital, 12 av. Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, ⁵ Inserm U976, Saint Louis

Ce poster est la réalisation d'une collaboration entre IMSTAR et ScreenCell dans le cadre du projet Medicen (EXPEVIVO-CTC / FUI 18).

Ce poster a été présenté lors du 11^{ème} symposium sur les maladies résiduelles minimales (ISMRC) qui a eu lieu à Montpellier en Mai 2018.

Il présente les premières mises au point réalisées sur la lignée cellulaire de mélanome A375 ainsi que les résultats obtenus à partir de 4 premiers prélèvements de patients.

Automated detection of CTCs/CTMs after size-based selection from blood of patients with melanoma

Jessica Groult^{1,4}, Charles Homsy², Ekaterina Tatarinova², Laetitia Da Meda³, Naoual Benali-Furet¹, Nicolas Dumez⁵, Alexandre Papine², Georges Uzan⁴, Celeste Lebe³, Janine Wechsler¹ and Françoise Soussaline²

¹ ScreenCell, Roger Pérez Centre, 10 av. Charles Péguy, 95200 Sarcelles. ² IMSTAR S.A. 93 Bld Arago, Paris 75014, ³ Onco-Dermatology Saint-Louis Hospital, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris. ⁴ Inserm U1197, Paul Brousse Hospital, 12 av. Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, ⁵ Inserm U976

Circulating Tumor Cells (CTC) and Clusters (CTM) in the blood play a critical role in cancer staging and treatment management. Analysis of CTC/CTM during cancer evolution could be helpful for early detection of cancer relapse, but this analysis is limited by the current methodology constraints. On one hand, methods based on CTC recognition by immunological techniques could give rise to false negative results because the expression level of markers may differ in CTCs as compared to tumor tissues. On the other hand, methods based on cytological observation of CTC/CTM performed by pathologists are more accurate, but time consuming and observer-dependent. It cannot be applied to large cohorts of patients.

In this study, we analyzed 131 patients with stage IV melanoma, from the onco-dermatology department in Saint-Louis Hospital, Paris. CTCs/CTMs were isolated from 9 ml of patient blood, using ScreenCell[®] Cyto devices which capture CTCs/CTMs by a size-based technology. The CTCs/CTMs are isolated on a transparent porous membrane named Isolation Support (IS). Each patient was analyzed at least 3 times, at different intervals during their follow-up (M0, M1 and M3). The different IS were stained with MGG, and scanned using a Pathfinder[™] fully motorized microscope-based system and a proprietary software developed by IMSTAR[®], providing an optimally focused ultra-resolution image of the whole filter surface. On all virtual filters, CTCs/CTMs were localized and counted on PC-screen by a cytopathologist, according to morphological parameters for suspicious cells and clusters. In parallel, the same digital virtual filters were automatically analyzed by Pathfinder[™] specific software module, which algorithms take into account all experts' criteria for CTC/CTM recognition. The sensitivity of automated CTC counting compared to conventional reading under microscope, is 96.6 %

The specific software module applied to automatic detection of CTCs on IS Cyto devices was co-developed by IMSTAR[®] and ScreenCell[®] in the frame of a French consortium project "ExpeVivo-CTC. Validation of this CTC-based automated digital microscopy and software process was performed on stage IV melanoma patients, and can be applied to any solid cancer at different stages. This automated method of CTC analysis and count will facilitate cancer patient's follow-up in multicenter clinical trials.

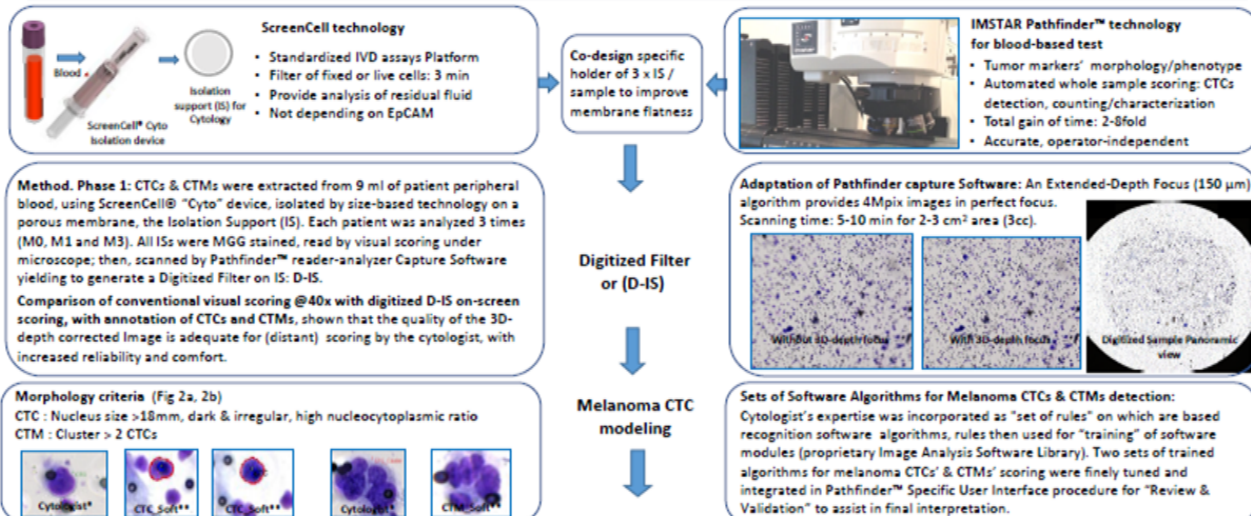
5.2. Poster 1

CTCs/CTMs Automated detection after size-based selection from blood of patients with melanoma

Jessica Groult¹, Charles Homay², Ekaterina Tatarinova³, Laetitia Da Meda³, Naoual Benali-Furet³, FeiYe⁴, Alexandre Papine², Georges Uzan⁴, Celeste Lebbé², Janine Wechsler¹ and Françoise Soussaline²

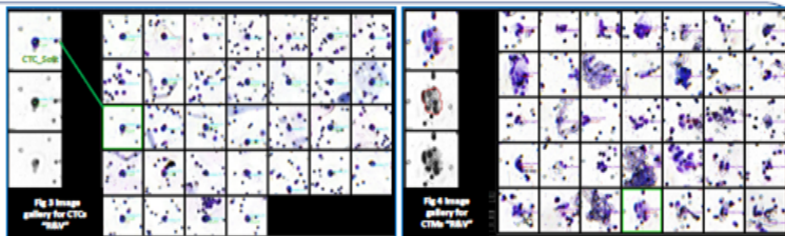
(1) ScreenCell, Roger Pérez Centre, Sarcelles FRANCE; (2) IMSTAR, Paris FRANCE; (3) Onco-Dermatology AP-HP Saint-Louis Hospital, Paris F; (4) Inserm U1197, Paul Brousse Hospital, Villejuif - FRANCE

Introduction: Circulating Tumor Cells (CTCs) and Clusters (CTMs) in the blood play a critical role in cancer staging and treatment management. Counting of CTCs/CTMs during cancer evolution was shown to be helpful for early detection of cancer relapse, but is limited by the current methodology constraints. Methods based on CTCs recognition by immunological techniques could give rise to false negative results because the expression level of markers may differ in CTCs as compared to tumor tissues. And methods based on Cyto-Pathologist observation of CTCs/CTMs are more accurate, but time consuming and observer-dependent, thus cannot be applied in clinical use. In this study, we analyzed 166 blood samples from a cohort of 131 patients with stage IV melanoma, from the onco-dermatology department in Saint-Louis Hospital, Paris.



AUTOMATED DETECTION & VALIDATION

Method Phase 2: In parallel, all Digitized Filters are analyzed by Pathfinder™ CTC-CTM BF software module and the cytologist counts CTCs and CTMs by visual scoring, and set these labels on each D-IS. Cells automatically detected as suspicious are displayed in an image gallery for fast review & validation on Pathfinder™ CTC-CTM "R&V screen", for final scoring and classification of CTCs as well as CTMs (Fig 3, 4). All Images and Data are recorded in the Pathfinder software database.



RESULTS & DISCUSSION

CTCs: n= 166 digitized filters. Cytologist's on-screen CTCs counting on D-IS was compared to CTCs automated counting using the specific analysis/detection software (CTC_Soft).

The cytologist' on-screen counting yields to a total of 2382 CTCs, while automated counting yields to 2375 CTCs. For 32 D-ISs, cytologist' on-screen CTCs number is inferior, and for 24 D-ISs, the cytologist on-screen CTCs counting is superior to automated counting.

The 166 D-IS set were split in 2 groups: A = 85 IS with <8 CTCs and B = 85 IS with >8 CTCs. For group A, automated scoring is equal or superior to visual scoring in over 98% cases. For group B: Visual scoring is equal or superior to the automated one in 90% cases.

CTMs: n= 70 digitized filters. Cytologist's on-screen CTMs counting and automated counting using specific analysis/detection software yields to 418 CTMs and 410 CTMs_Soft, respectively.

Both methods are in concordance in terms of CTCs' and CTMs' counting, thus in Digitized filters' (D-IS) classification success rate.

Total time/sample: 5 - 6 min.

CONCLUSION

The Pathfinder™ CTC software module was developed and partly funded in the frame of a French consortium project: ExpeVivo-CTC, for highly specific automated detection and counting of GMM stained melanoma CTCs/CTMs on IS Cyto® device. The accuracy and robustness validation of CTCs & CTMs scoring on Digitized - Filter (IS) was performed on stage IV melanoma patients from Saint-Louis Paris Hospital Onco-Dermatology Department.

The essential benefits of automated CTCs/CTMs detection are:

- High CTCs & CTMs counting and characterization accuracy – Sensitivity 96,6% - Specificity 100%.
- 2-fold gain of time reducing to 2 - 3 min the Expert time per D-IS (2 - 3 cm² spread; 3ml blood).
- Operator independency - Facilitate Junior Cytotech' training in a shorter time

We demonstrated that the combination of IMSTAR Pathfinder™ technology for assisted accurate scoring of CTCs /CTMs, adapted to ScreenCell® Cyto devices simple-to-use, inexpensive technology, could substantially facilitate melanoma patient's treatment follow-up, in clinical trials and ultimately for clinical application.

Chapitre III | Expansion *ex vivo* des CTC

1. Contexte

Les tumeurs solides, comme le mélanome, libèrent des cellules tumorales circulantes dans le sang. Ces CTC sont des indicateurs cliniques importants du pronostic et de l'efficacité des traitements. Cependant, la rareté de ces cellules ne permet pas de réaliser de recherches fonctionnelles approfondies. L'obtention d'un nombre suffisant de cellules viables permettrait d'identifier de façon individuelle les différentes sous-populations. Ceci aiderait à comprendre l'apparition des résistances et la mise en place du processus métastatique.

L'objectif de notre projet était de mettre au point un système de culture innovant en 3 dimensions permettant de mettre en culture les CTC de patients atteints de mélanome. Ce système devrait être capable, de manière reproductible, de conserver les capacités de migration et de prolifération des cellules isolées puis après quelques jours de culture d'identifier les sous-populations de CTC les plus agressives.

Pour cela, les CTC ont été mises en culture dans une matrice biologique 3D, appelée Biomimesys[®], et composée principalement d'acide hyaluronique (HA), le principal glycosaminoglycane de la matrice extracellulaire. Dans le cadre de ce projet, cette matrice devrait être améliorée et enrichie par différents éléments matriciels (fibronectine, laminine, et facteurs de croissance) pour créer un microenvironnement favorable et spécifique pour la prolifération des CTC du mélanome.

Des résultats encourageants ([Demange et al., 2012](#)) sur la prolifération des cellules mononuclées CD34⁺ du sang de cordon ombilical ont déjà été obtenus avec Biomimesys[®]. Ils montrent qu'au bout de 28 jours de culture dans la matrice, 280 fois plus de progéniteurs hématopoïétiques sont obtenus comparé à une culture en milieu liquide standard.

L'objectif final de ce projet est de fournir un modèle pharmacologique prédictif, qui permettrait de tester sur les CTC en culture, la sensibilité de ces cellules aux agents thérapeutiques et de caractériser (immaturité, prolifération, migration, invasion), les sous-populations de CTC les plus agressives, potentiellement résistantes aux traitements.

Les différents objectifs de cette étude sont :

- **Établir la preuve de concept que la technologie de culture des CTC mise au point dans ce projet permet la caractérisation des CTC et l'établissement d'un modèle pharmacologique basé sur la culture et l'expansion des CTC isolées de patients atteint de mélanome métastatique**
- **Réaliser des analyses phénotypiques sur ces CTC isolées et d'identifier des sous-populations avec un caractère immature et/ou invasif.**

2. Matériels et Méthodes

2.1. Méthode d'isolement des CTC

Dans cette étude et afin de mettre au point l'expansion des CTC, les CTC et sous-groupes de CTC ont été isolées vivantes à l'aide des dispositifs ScreenCell CC ou ScreenCell MB à partir de 6 ml de sang prélevé en tube K2-EDTA au centre d'Oncodermatologie de l'Hôpital Saint-Louis par des infirmières diplômées d'état (IDE) dans le cadre de leur suivi standard. Les tubes de sang une fois prélevés ont été conservés à 4°C et transférés dans les locaux de ScreenCell par un coursier habilité.

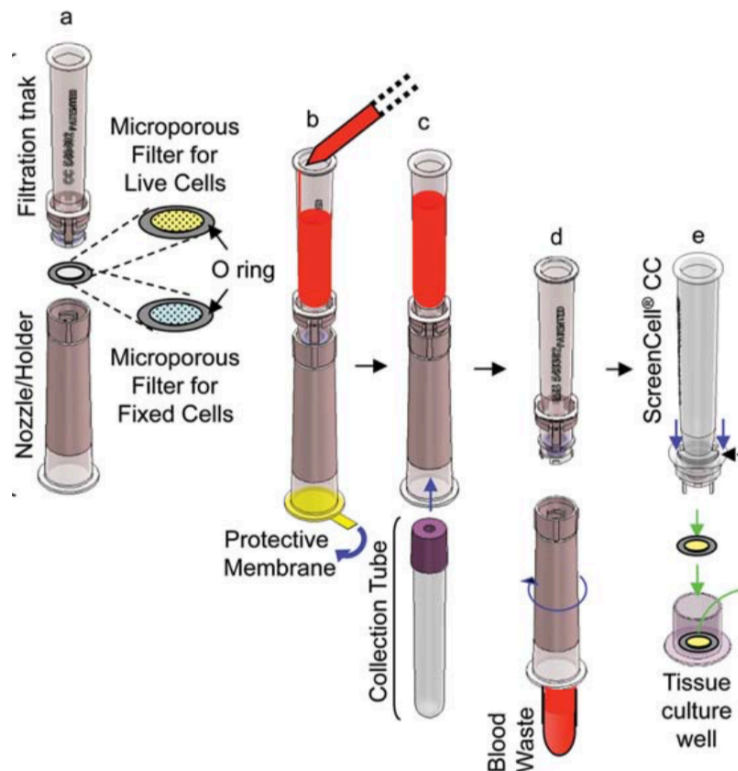


Figure 37 || Principe d'isolement des CTC vivantes avec le dispositif ScreenCell CC

Les dispositifs ScreenCell CC (a) sont simples et à usage unique. Ils permettent une fois le sang dilué et déposé dans la partie haute du dispositif (b) de réaliser l'isolement par insertion d'un tube sous vide dans la partie basse du dispositif (c). Une fois l'isolement terminé (temps < 3min), la partie haute peut être désolidarisée de la partie basse (d) et ainsi permettre l'éjection du support d'isolement (e) et la mise en culture rapide des cellules, adhérentes au support d'isolement directement dans un puits de culture (format 24 puits).

L'isolement des CTC réalisé avec la technologie ScreenCell au maximum dans les 4 heures qui suivent le prélèvement conformément aux instructions du fournisseur. A la fin du processus, les cellules isolées sont soit directement mises en culture sur le support d'isolement déposé dans une plaque de culture (24 puits) (Figure 37) soit maintenues vivantes en suspension et récupérées en phase liquide dans un tube 1,5 ml grâce au dispositif LCDD (Live Cell Detachment Device) mis au point par ScreenCell (Figure 38).

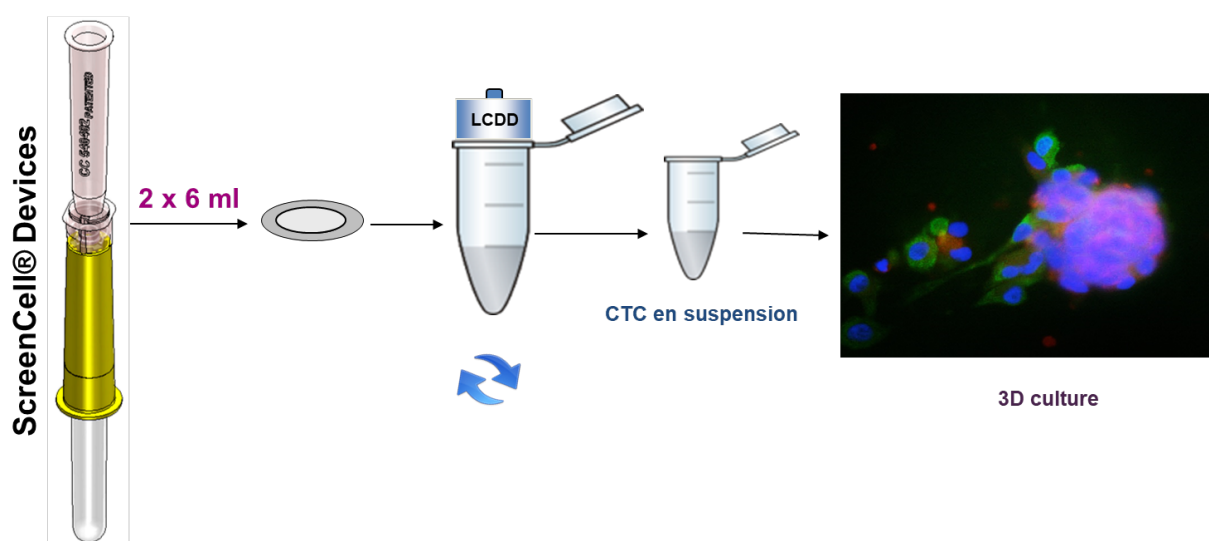


Figure 38 || **Protocole de mise en culture 3D de CTC grâce au dispositif LCDD**

Les CTC sont capturées vivantes à partir de 6 ml de sang total de patients. Après isolement, les cellules ont été immédiatement libérées du support d'isolement avec le dispositif de détachement de cellules vivantes (LCDD) et mises en phase liquide. Les cellules en suspension ont étéensemencées dans Biomimesys®, une matrice 3D commercialisée et composée d'un biomatériau formé de chaînes réticulées d'acide hyaluronique.

2.2. Mise en culture des CTC

Les CTC isolées de patients une fois isolées vivantes en phase liquide peuvent être mises en culture 3D. Un certain nombre de conditions de culture ont été testées dans le cadre de ce projet afin d'identifier les conditions optimales pour l'isolement et la prolifération de CTC isolées de patients atteints de mélanome.

2.2.1. Biomimesys

Les CTC isolées et récupérées en phase liquide peuvent être implantées en 3D dans les matrices *Biomimesys*, selon les instructions du fournisseur (Figure 39).

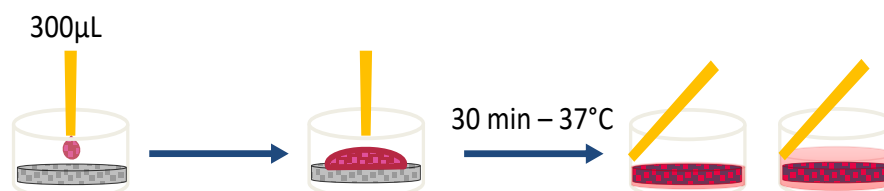


Figure 39 || **Protocole Culture 3D des CTC - Biomimesys®**

La suspension contenant les cellules d'intérêts doit être déposée délicatement, dans un volume ne dépassant pas 300 µl, au sein de la matrice d'acide hyaluronique en 3 dimensions. Une fois l'ensemble du volume absorbé par le biomatériau, la plaque est placée dans l'incubateur (37°C, 5 % CO₂) pendant 30 minutes, puis la quantité adéquate de milieu est ajoutée dans le puits.

2.2.2. ScreenCell / Matrigel

Les CTC isolées et adhérentes au support d'isolement peuvent être cultivées directement sur la membrane ScreenCell déposée dans un puits de culture (plaque 24 puits). La plaque de culture doit être préalablement recouverte de Matrigel© afin de former une surface semi-rigide riche en facteurs de croissance et favorable pour la culture de ces cellules rares. Ce procédé de culture peut être réalisé avec les supports d'isolement ScreenCell CC et ScreenCell MB (Figure 40)

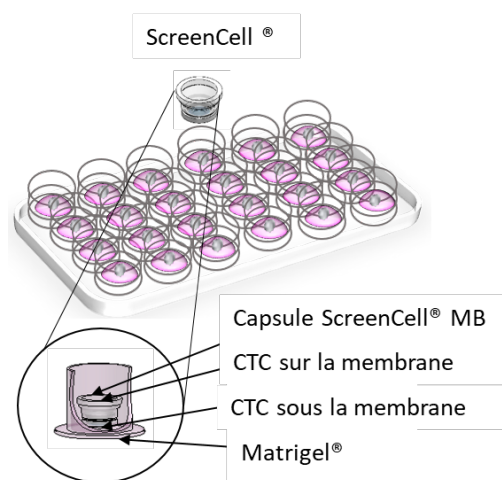


Figure 40 || Culture 3D des CTC – ScreenCell

Les CTC sont isolées vivantes du sang de patient sur les supports ScreenCell CC ou ScreenCell MB possédant un revêtement spécifique pour l'adhérence et la culture des cellules. Une fois l'isolement terminé (temps < 3minutes), la partie haute des dispositifs s'adaptant spécifiquement aux plaques de culture 24 puits, les supports contenant les cellules d'intérêts peuvent être directement et facilement éjectés dans le puits de culture préalablement recouvert de Matrigel®. Ici il s'agit d'une représentation schématique du support ScreenCell MB, le principe étant similaire avec le support ScreenCell CC.

Afin de pouvoir analyser et suivre au mieux les différentes cultures obtenues tout au long de cette étude, il est important de définir le terme « succès » et « échec » de culture.

- Succès de culture : Adhérence des cellules sur le support d'isolement (ScreenCell CC ou ScreenCell MB), prolifération des cellules (formation d'un tapis cellulaire), motilité des cellules, observation de différentes populations évoluant au cours de la culture, obtention de structures sphéroïdes en 3 dimensions dans le Matrigel®, culture évoluant dans le temps (minimum 20 jours de culture, moyenne de 28 jours de culture)

- Échec de culture : Très peu de cellules adhérentes sur le support d'isolement (ScreenCell CC ou ScreenCell MB), pas ou peu de prolifération visible, aucune sous population se différenciant au cours de la culture, aucune structure en 3 dimensions visible dans le Matrigel®

Les succès et échecs de culture dans notre étude ne tiennent pas compte des éventuels problèmes techniques (sang coagulé, réception de l'échantillon supérieur à 4h, processus d'isolement incomplet) et en tiennent compte uniquement des propriétés biologiques des cellules.

3. Résultats

3.1. Culture 3D avec Biomimesys

3.1.1. Culture en basse densité

Les premiers tests de culture 3D ont été mis au point avec *Biomimesys*® et avec des lignées cellulaires de mélanome (SKMEL28 et A375) avant d'être réalisés avec des prélèvements de patients.

Pour commencer nous avons testé avec des lignées cellulaires de mélanome, les matrices Biomimesys® standard (HA neutre) placées dans des plaques de culture 96 puits. Au départ, les cellules ont étéensemencées à haute densité, puis la densité cellulaire a été diminuée progressivement afin de se rapprocher des conditions permettant de cultiver des cellules rares, analogues aux CTC de patients (10 cellules)



Figure 41 || **Culture 3D de cellules A375 en basse densité**

Acquisition de la structure multicellulaire 3D obtenue à partir de 10 cellules de lignée de mélanome A375 mis en culture dans la matrice d'acide hyaluronique, Biomimesys pendant 28 jours (Gx Obj 10)

Nos résultats indiquent que les cellules de mélanome A375 sont capables de donner des structures de type sphéroïde même quand les cellules sont cultivées en basse densité (10 cellules/puits) pendant 28 jours.

3.1.2. Analyse en microscopie confocale

L'analyse en microscopie confocale (Figure 42) montre que les cellules A375 au sein des sphéroïdes expriment les marqueurs S100 et Wnt-5A. Par contre, le marqueur Melan-A exprimé par les cellules A375 initialement et sur le SI après isolement, ne l'était pas dans les sphéroïdes en culture 3D.

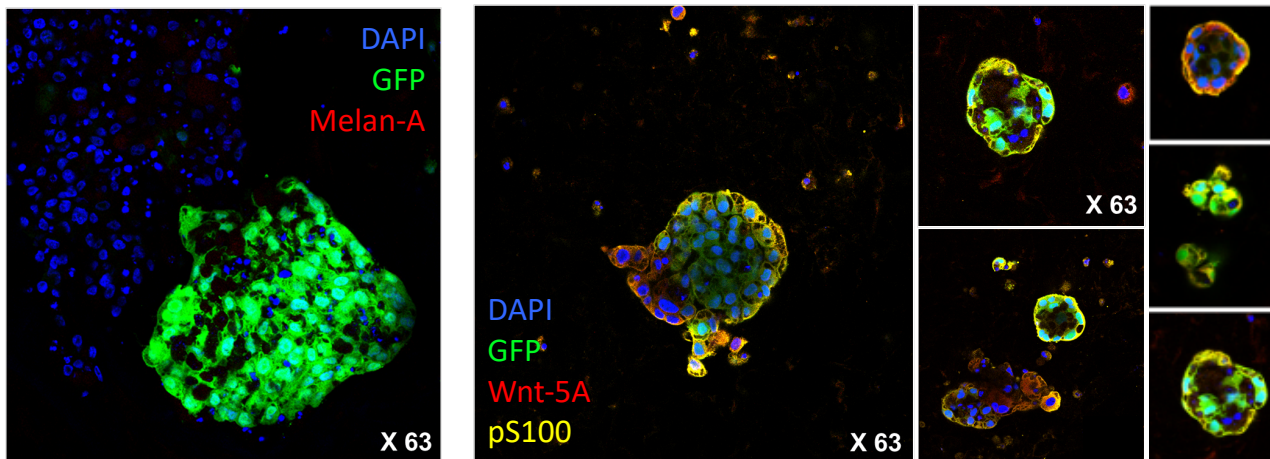


Figure 42 || Caractérisation par immunofluorescence des sphéroïdes obtenus après 28 jours de culture 3D

Après 28 jours de culture, les clones de type sphéroïde ont été analysés directement dans la matrice 3D par immunofluorescence. Les sphéroïdes expriment les protéines Wnt-5A et S100 et n'expriment plus la protéine Melan-A. Confocal Gx Obj.63

3.1.3. Analyse en cytométrie de flux

Nous avons également montré que les sphéroïdes présents dans les Biomimesys pouvaient être dissociés, et réimplantés dans de nouvelles matrices. Cela permet d'une part d'analyser les cellules après culture en cytométrie de flux (Figure 43) et/ou d'autre part d'amplifier les cellules en culture pour en obtenir un plus grand nombre.

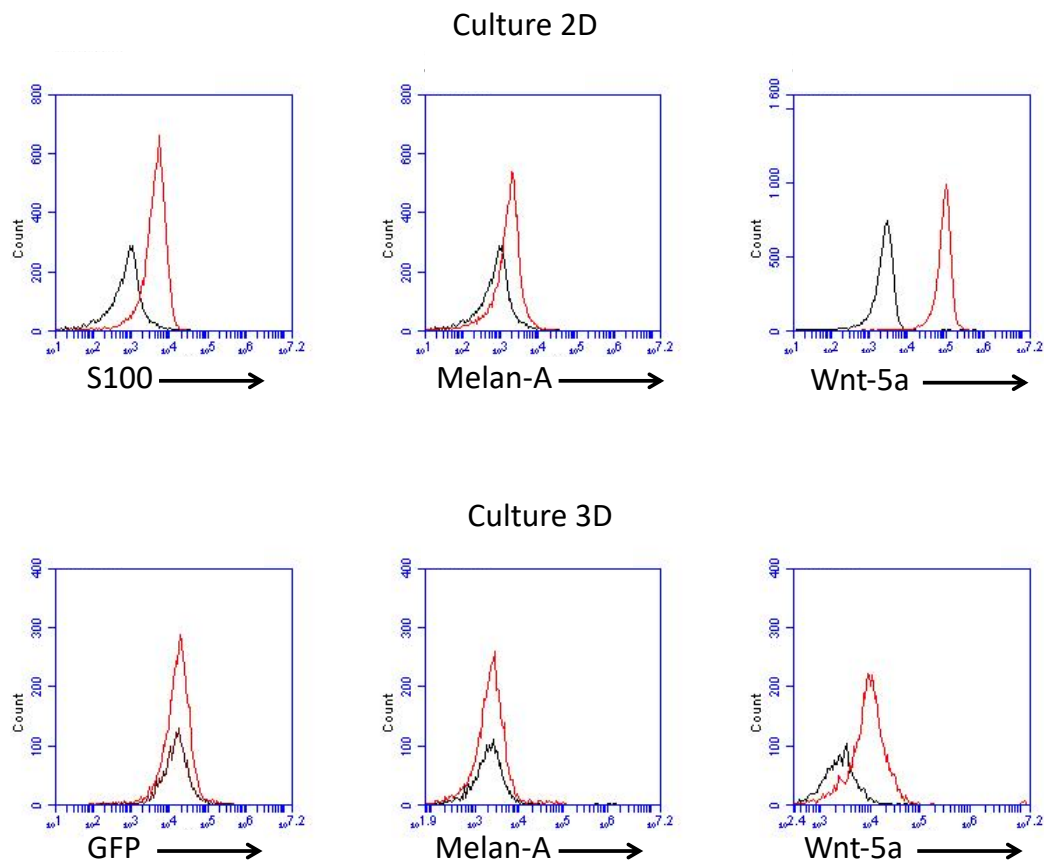


Figure 43 || **Caractérisation par cytométrie de flux des sphéroïdes obtenus après culture 3D**

Les cellules A375 ont été récupérées et analysées par cytométrie de flux (FACS) avant et après 28 jours de culture 3D. Afin d'identifier les différentes sous-populations, deux marqueurs ont été évalués par cytométrie de flux : Melan-A (marqueur prolifératif) et Wnt-5A (marqueur invasif). En culture 2D, les cellules A375 expriment les deux marqueurs alors qu'après culture 3D, les cellules n'ont qu'un phénotype invasif avec expression Wnt-5A et ont perdu l'expression de la protéine mélanocytaire, Melan-A.

Après ces mises au point réalisées sur des lignées de mélanome, nous avons mis en culture les CTC isolées à partir du sang des patients. Ces différents résultats sont présentés dans le [Tableau 16](#).

Les premiers prélèvements de patients (N=46) ont été mis en culture avec la première génération de Biomimesys, fournit par Celenys. Cette première génération est formée d'une structure réticulée 3D composée essentiellement d'acide hyaluronique (HA). Aucun succès de culture n'a pu être observé.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la matrice, fonctionnelle pour la lignée de mélanome A375 en basse densité ne semblait pas adaptée aux CTC isolées de patients.

Les prélèvements suivants (N=37), ont alors été mis en culture avec la deuxième génération de Biomimesys, améliorée par Celenys. Cette deuxième génération intégrant des peptides RGD⁶ et du collagène I et IV semblait plus proche du microenvironnement tumoral. Là encore, aucun succès de culture n'a pu être observé.

	Biomimesys 1ère Génération	Biomimesys 2ème Génération
Total Culture (N)	46	37
Succès (N)	0	0
Succès (%)	0,00 %	0,00 %

Tableau 16 || Résultats Culture 3D Biomimesys

Les différentes générations de Biomimesys testées dans le cadre de ce projet n'ont pas permis d'aboutir à des résultats de culture satisfaisants avec les prélèvements de patients

Cependant, malgré tous nos essais d'amélioration : au niveau du diamètre, de l'épaisseur et de la spécificité de la structure 3D, le pourcentage de succès de culture restait nul. Nous sommes donc repartis sur un processus plus simple, basé sur un isolement et une mise en culture en une seule étape et nous avons éliminé l'étape de récupération des cellules en suspension, qui pouvait changer les propriétés phénotypiques des CTC et inhiber leur croissance.

⁶ R : Arginine G : Glycine D : Aspartate. Séquence d'acide aminée identifiée au sein de la fibronectine

3.2. Culture 3D avec ScreenCell

Pour les raisons évoquées précédemment, dans la suite du projet, les CTC des patients suivants ont été mis en culture en déposant les SI ScreenCell, directement dans des plaques 24 puits recouvertes avec du Matrigel®.

Les dispositifs ScreenCell CC et ScreenCell MB permettent d'isoler les cellules vivantes et de les mettre en culture directement sur les membranes d'isolement traitées avec un revêtement spécifique pour l'adhérence et la culture des cellules.

3.2.1. ScreenCell CC

Dans un premier temps, les 33 prélèvements de patients suivants ont été mis en culture en utilisant les dispositifs ScreenCell CC. Un succès de culture a été observé pour 4 patients.

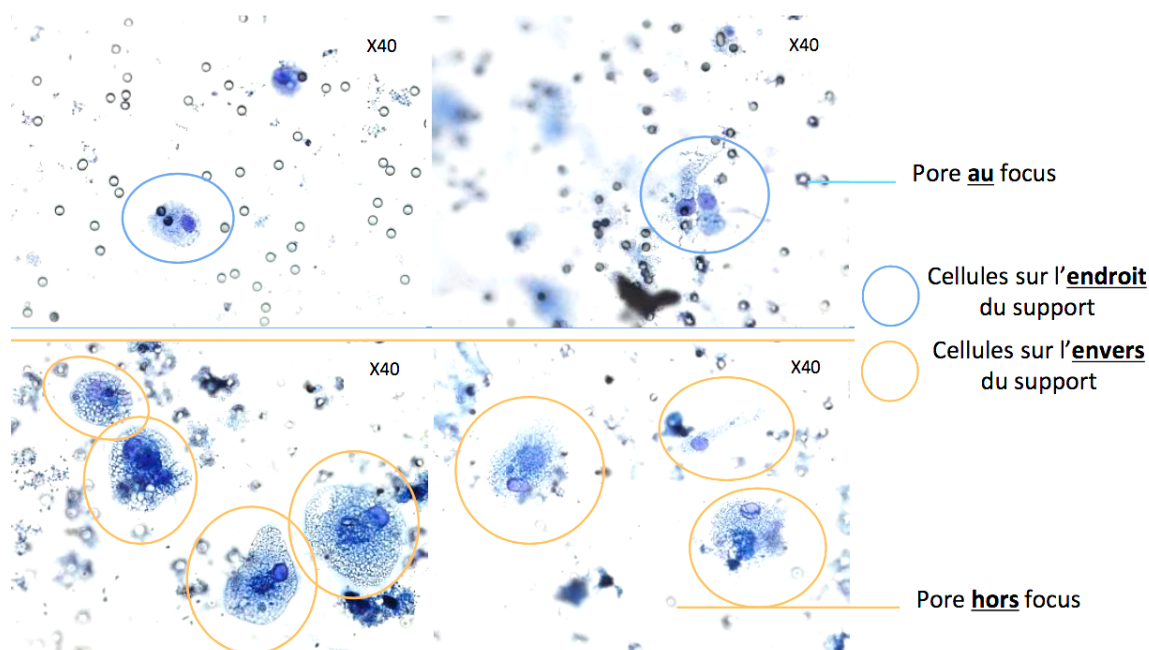


Figure 44 || Culture *ex vivo* de CTC isolées de sang du patient 1071 atteint de mélanome

CTC isolées de sang de patient atteint de mélanome métastatique (stade IV) par la technologie ScreenCell. Les cellules maintiennent leur viabilité et leur capacité d'invasion après 15 jours de culture. Les cellules ont été fixées (2 % formaldéhyde) et colorées MGG. Gx Obj. 40.

Les résultats obtenus, par exemple, avec le patient 1071 (Figure 44) montrent qu'il est possible de cultiver les CTC de patients avec mélanome inclus dans la cohorte du centre d'oncodermatologie de l'Hôpital Saint-Louis, lorsqu'elles sont isolées et maintenues sur le support d'isolement ScreenCell CC.

Ce que montrent également ces résultats et qui confirme des données internes non publiées de ScreenCell et obtenues avant le début de ce projet, est qu'un certain nombre de CTC migrent à travers les pores du SI et sont visibles dans le Matrigel® et sur l'envers de la membrane. Il est donc intéressant d'analyser plus précisément ces cellules capables de migrer.

3.2.2. ScreenCell MB

Le dispositif ScreenCell MB donnait de meilleurs résultats pour la culture des CTC que les dispositifs ScreenCell CC, comme cela a été montré par des expériences de *spiking* avec la lignée cellulaire de mélanome A375 (Figure 45). Ces résultats ont été confirmés avec des CTC de patients atteints de mélanome (Benali-Furet et al. 2013).

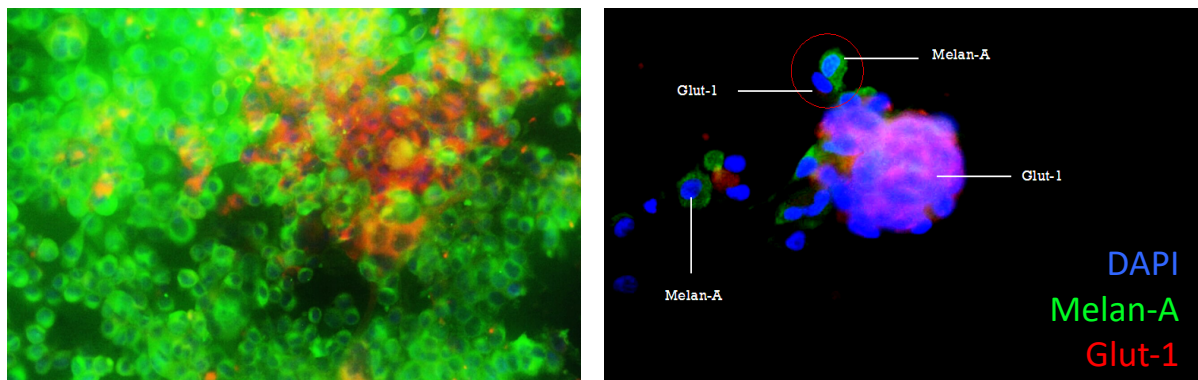


Figure 45 || Caractérisation culture A375

Les cellules de mélanome A375 ajoutées à du sang de donneur sain ont été isolées avec ScreenCell MB et mises en culture. Après 28 jours de culture, les cellules ont été fixées et analysées par immunofluorescence pour évaluer le pouvoir prolifératif (marqueur de prolifération mélanocytaire, Melan-A) et le pouvoir invasif (marqueur d'hypoxie, Glut-1).

3.2.3. Milieu de culture pour CTC de mélanome

Nous avons ensuite mis au point un milieu de culture plus spécifique et sans sérum afin de conserver au mieux les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules isolées sur le support d'isolement.

La mise au point du milieu de culture est le résultat combiné entre une étude bibliographique poussée et nos propres connaissances et observations. La composition de ce milieu est présentée dans le [Tableau 17](#).

DMEM (+GlutaMAX)
F-12 (+GlutaMAX)
B27 Additive
HEPES
P/S
EGF
FGF10
FGF2
Insulin
R-spondin 1
Noggin
A83-01
SB202190
Y-27632
Nicotinamide
N-Acetyl-L-cysteine

Tableau 17 || **Composition milieu de culture CTC**

Ce milieu de culture a été développé pour la culture des CTC isolées à partir de sang de patient atteint de mélanome métastatique (stade IV). La composition de ce milieu a pu être établie sur la base de cette publication (Kulasinghe et al. 2016b) puis adaptée pour correspondre au mieux aux CTC de mélanome.

3.2.4. Condition de culture pour CTC de mélanome

Un incubateur classique de culture a été utilisé durant ce projet : 37°C / 5 % CO₂. Dans certaines cultures (évaluées comme « échec de culture ») réalisées avec le support ScreenCell CC, des potentielles cellules en dormance étaient visibles sur le support au départ de la culture puis disparaissaient au cours du temps. Nous avons augmenté le nombre de succès de culture et surtout le pouvoir invasif de ces cultures (observation de cellules se développant en 3D dans le Matrigel) lorsque nous avons utilisé les supports ScreenCell MB à la place des supports ScreenCell CC. L'avantage de ce support au format capsule, analogue à un insert de culture, serait la création hypothétique d'une zone d'hypoxie ou d'un gradient d'oxygène potentiel, entre le support et le Matrigel® (Campillo et al. 2019). Nous n'avons pas pu démontrer et calculer de manière précise la présence de ce gradient d'oxygène, cependant ce modèle de culture a été choisi et nous avons pu observer la prolifération et le pouvoir invasif des cellules. D'autres études ont également souligné l'importance de l'hypoxie dans la culture des CTC (Kulasinghe et al. 2016b)

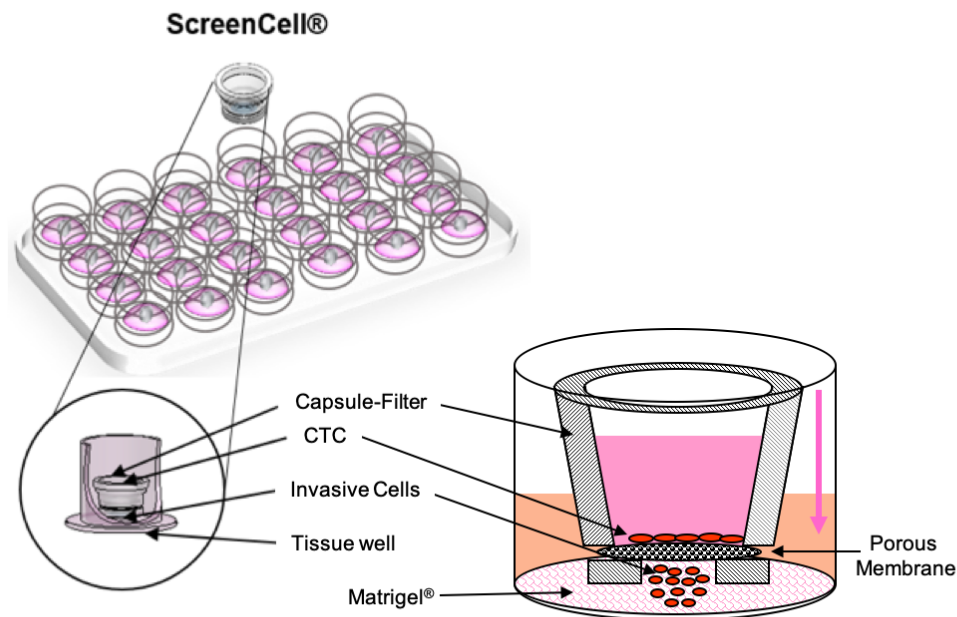


Figure 46 || Culture 3D de CTC isolées avec ScreenCell

Les cellules ont été cultivées directement sur une membrane poreuse et à forte adhésion dans des conditions de culture optimisées. Le support d'isolement a également été utilisé comme barrière de passage pour initier la migration des cellules vers le Matrigel®.

Les meilleures performances en culture ont été obtenues avec les SI-MB et peuvent s'expliquer par le fait que la surface de la membrane des SI-MB est plus petite que celle des SI-CC. Les cellules sont confinées dans la capsule et se retrouvent donc plus concentrées, ce qui favorise les interactions cellules-cellules, importantes pour la survie et la prolifération des cellules tumorales (Figure 46).

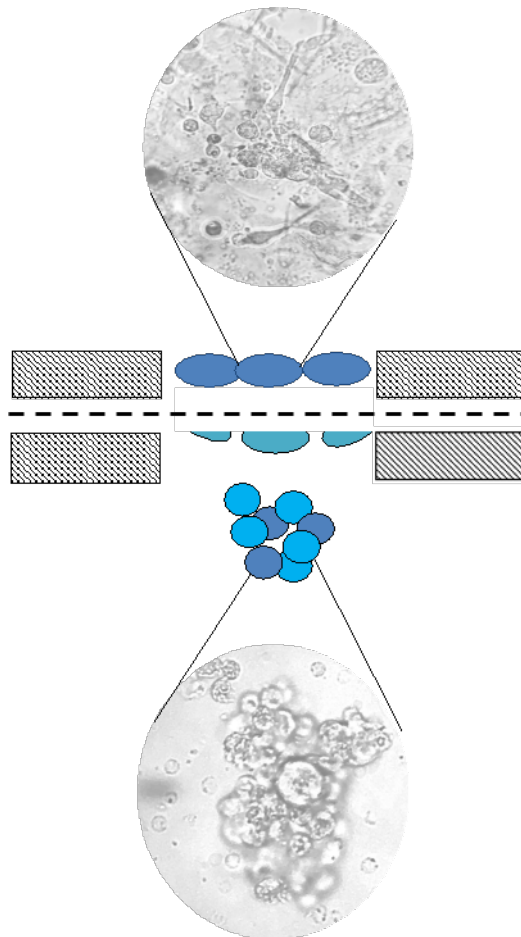


Figure 47 || **Représentation schématique de la culture 3D avec ScreenCell MB**

Les cellules isolées avec ScreenCell MB peuvent adhérer et proliférer directement sur le support d'isolement (culture 2D) ou bien migrer à travers les pores et former des sphères (3D culture) au sein du Matrigel.

Ce modèle de culture a deux avantages :

- (1) L'isolement et la mise en culture des CTC se font en une seule étape simple et rapide
- (2) La distinction de différentes sous-populations (invasive dans le Matrigel[®], non invasives sur le SI

3.2.5. Caractérisation des sous-populations de CTC de mélanome

Après 30 jours de culture, les cellules obtenues ont été fixées et colorées pour être observées morphologiquement.

- A. Les cellules adhérentes sur les SI ont été fixées (2 % formaldéhyde) et colorées au MGG (Figure 48).
- B. Les cellules développant des structures de type sphéroïdes au niveau du Matrigel® ont été fixées et récupérées sur une lame de verre en utilisant une centrifugeuse Cytospin (Figure 49).

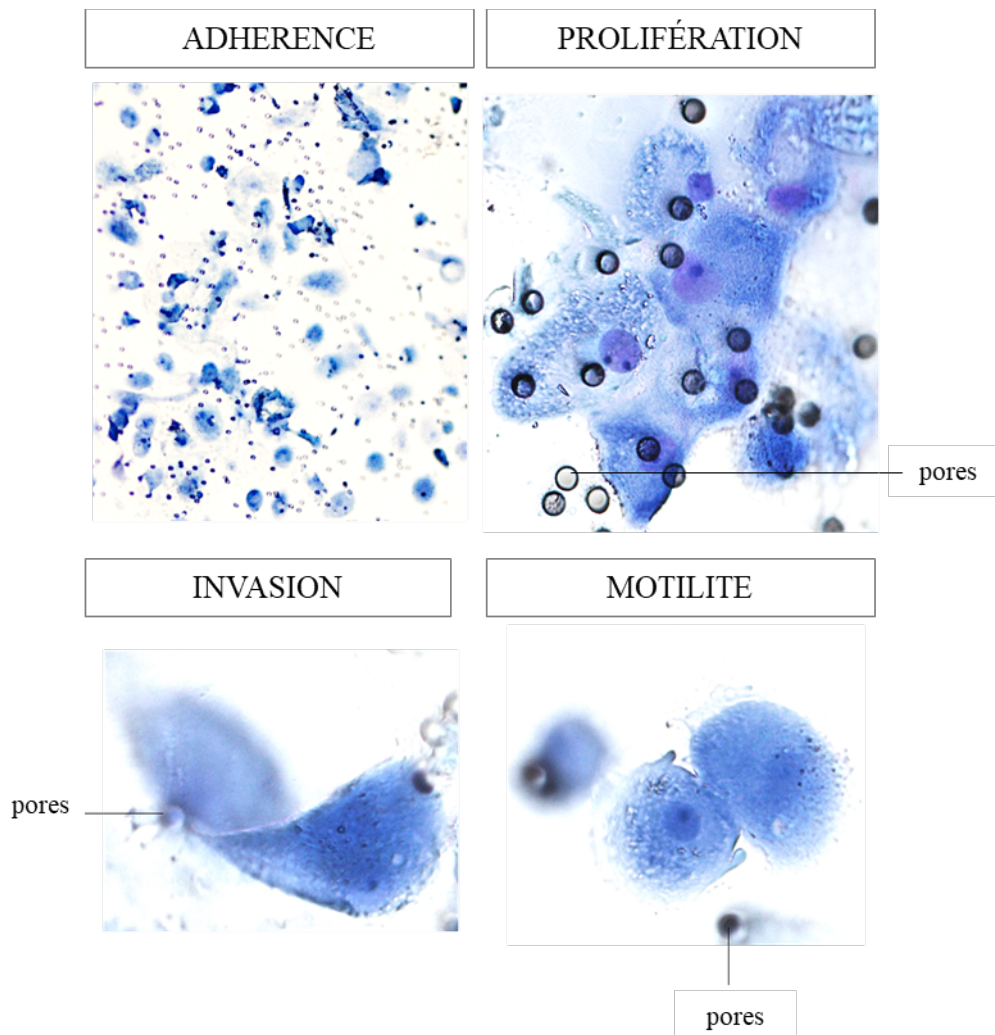


Figure 48 || Culture *ex vivo* de CTC isolées de patient atteint de mélanome

Après 28 jours de culture, les cellules adhérentes à la membrane poreuse ont été récupérées après un lavage avec du PBS IX et fixées avec du formaldéhyde 2 %. Les cellules ont été colorées au MGG et observées au microscope (G x Obj. 40)

L'observation morphologique de ces cellules révèle la présence de 3 sous-populations de cellules au sein d'un même échantillon :

- La première population de cellules possédant des formes et des tailles distinctes est capable de former un tapis cellulaire sur la membrane, spécifiquement étudiée pour l'adhérence des cellules (voir Figure 48, haut).
- La seconde population de cellules est localisée sous la membrane. Ces cellules sont donc capables de se déformer et de migrer à travers les pores de la membrane. Elles sont de plus petites tailles que les cellules adhérentes et qui prolifèrent sur la face supérieure de la membrane. La présence de pseudopodes a également pu être observée révélant la forte motilité de ces cellules en culture (voir Figure 48, bas).
- La troisième sous-population observée dans le Matrigel[®] se trouve au niveau de la zone d'hypoxie supposée et formée par la présence du support ScreenCell MB (voir Figure 49 A). Ces cellules capables de migrer dans le Matrigel et de former des structures 3D apparentées à des sphéroïdes ont un phénotype invasif plus élevé que les cellules proliférant en monocouche sur la face supérieure de la membrane. Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires de ces cellules n'ont pas encore été étudiées et feront l'objet de futures investigations (voir Figure 49 B).

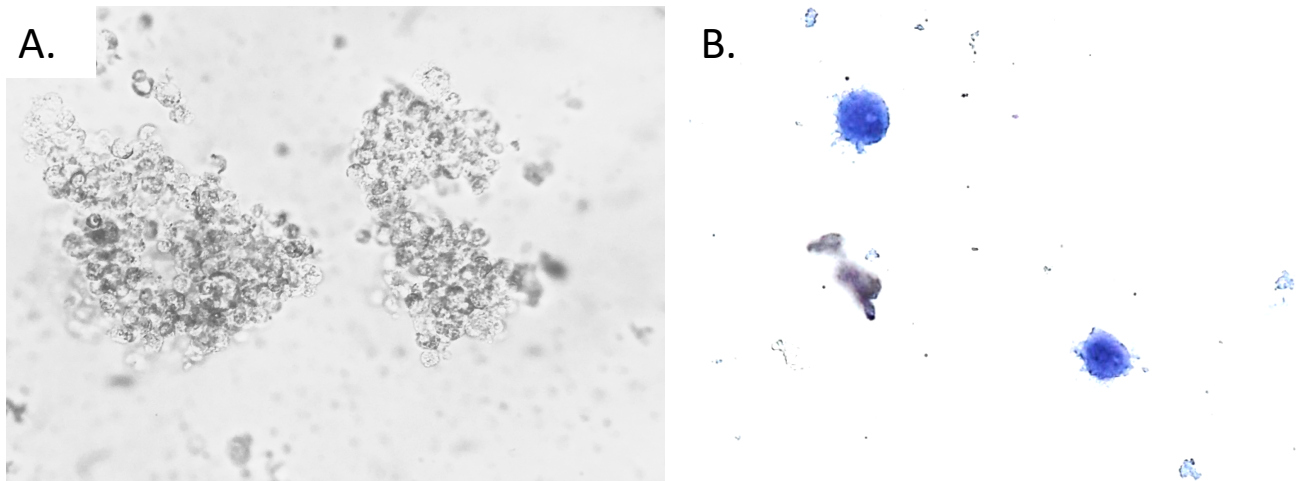


Figure 49 || **Sous-population de CTC formant des sphéroïdes dans le Matrigel**

(A) Cellules isolées et mis en culture avec ScreenCell MB. Les cellules après avoir migré dans le Matrigel® en traversant les pores de la membrane sont capables de former des sphéroïdes dans le Matrigel® (Gx Obj. 20)

(B) Après 28 jours de culture, ces cellules ont été fixées, récupérées et mises sur lame à l'aide d'une Cytospin afin d'être observées morphologiquement et ainsi de compléter leur caractérisation. Les cellules ont été colorées au MGG (G x Obj. 40)

Le protocole de mise en culture des CTC isolées à partir de sang de patients atteints de mélanome mis au point et qui vient d'être détaillé conserve la viabilité des cellules ainsi que leur capacité de prolifération, de motilité et d'invasion. De plus, leur pouvoir invasif est également préservé lors de l'isolement et il est maintenu sur une période courte d'environ 1 mois.

	ScreenCell CC Matrigel	ScreenCell MB Matrigel
Total Culture (N)	33	118
Succès (N)	4	17
Succès (%)	12,12 %	14,41 %

Tableau 18 || **Succès de culture en fonction des conditions utilisées**

Nous rapportons un succès de culture de 12,12 % et 14,41 %, avec l'utilisation des dispositifs ScreenCell CC et ScreenCell MB, respectivement.

Les taux de succès de culture (Tableau 18) les plus élevés ont été obtenus avec le dispositif ScreenCell MB. Sur les 118 prélèvements mis en culture avec ScreenCell MB, 55 % (n=65) correspondaient à des prélèvements réalisés au cours du suivi du patient et 45 % (n=53) des prélèvements provenaient de patients au moment de leur inclusion dans l'étude (1^{ère} ligne de traitement ou nouvelle ligne de traitement). Sur les 14,41 % de succès de culture rapportés, la majorité (9/17) ont été obtenus à l'inclusion. Si nous considérons uniquement les prélèvements lancés avec ScreenCell MB (technique la plus performante parmi les essais réalisés) au moment de l'inclusion des patients dans l'étude (condition la plus favorable pour obtenir des cellules viables), le taux de succès atteint 16,98 %.

Nous avons donc démontré que la technologie ScreenCell préserve la viabilité, le potentiel prolifératif et invasif des CTC. De plus, les CTC peuvent être isolées vivantes avec une sensibilité élevée. Enfin, les CTC peuvent être maintenues en culture, directement sur la membrane du dispositif ScreenCell MB, ce qui permet une expansion et une caractérisation *ex vivo* des sous-populations de CTC.

Cette cohorte de patients fait l'objet d'une période de suivi de 3 ans qui est actuellement toujours en cours. Cette période de suivi permettra de rendre plus robuste les précédents résultats obtenus. Ces résultats finalisés feront l'objet d'un article scientifique en cours d'écriture.

4. Discussion

Nous avons montré que les CTC peuvent être isolées vivantes avec une sensibilité élevée. La capture de ces cellules tumorales et les conditions de culture 3D ont été optimisées pour préserver le potentiel prolifératif et invasif des CTC. Nos premiers résultats indiquent qu'il est possible d'isoler 10 cellules tumorales de lignées cellulaires ajoutées dans 6 ml de sang et de les cultiver avec succès dans une matrice 3D jusqu'à 28 jours. De plus, ces cellules tumorales peuvent être récupérées hors de la matrice pour une analyse plus poussée ou pour une sous-culture. Ces protocoles sont en cours d'adaptation aux CTC issus du sang de patients atteints de mélanome et plusieurs optimisations sont en cours d'essai. Notre première voie de mise en culture consistait à récupérer les cellules en suspension à la fin de la filtration, de les maintenir viables et de les implanter dans une matrice en 3D spécialement commercialisée pour la culture des cellules sous forme de sphères. Cette approche n'a pas donné de résultat satisfaisant.

Cette approche n'ayant pas donné de résultats positifs, nous avons dû repenser le processus de mise en culture de CTC et avons fait le choix, fondé sur des résultats antérieurs, de développer la mise au point de la culture directement dans la capsule du dispositif d'isolement.

Nous avons donc démontré que la technologie ScreenCell préserve la viabilité, le potentiel prolifératif et invasif des CTC. Les CTC peuvent être isolées vivantes avec une sensibilité élevée. De plus, les CTC peuvent être maintenues en culture, directement sur la membrane du dispositif ScreenCell MB, ce qui permet une expansion et une caractérisation *ex vivo* des sous-populations de CTC. Nous avons défini les conditions techniques et le microenvironnement optimal pour l'isolement et l'expansion des CTC issus de patients atteints de mélanome.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour approfondir la caractérisation des sous-populations de CTC. L'identification en culture des cellules les plus agressives (immaturité, prolifération, migration, invasion) après culture permettra de détecter une potentielle pharmacorésistance.

D'autres équipes de recherche s'intéressent également à la possibilité d'isoler les CTC vivantes ([Pantel and Alix-Panabieres 2016](#)) et ont réussi à développer des cultures primaires de CTC et dans certains cas des lignées permanentes ([voir Tableau 5 page 56](#)). Plusieurs équipes ont même réussi à obtenir des tumeurs à partir de CTC injectées chez des souris immunodéficientes ([Maheswaran and Haber 2015](#)). Ce qui ouvre de nouvelles voies prometteuses pour la recherche fondamentale et clinique.

5. Annexes

5.1. Abstract 2

LA MISE AU POINT DE L'EXPANSION *EX VIVO* DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES COMME MODELE DE PHARMACOLOGIE PREDICTIVE DU MELANOME

Jessica Groult^{1,2}, Richard Proust¹, Nicolas Dumaz³, Guillaume Vidal⁴, Janine Wechsler², Elise Demange⁴, Celeste Lebbe⁵, Naoual Benali², Georges Uzan¹

¹ INSERM U1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France ² ScreenCell, Paris, France ³ INSERM U976, Hôpital Saint Louis, Paris, France ⁴ Celenys, Rouen, France ⁵ Centre d'onco-dermato, Hôpital Saint Louis, Paris, France

Ce poster a été le premier aboutissement de mon travail et a été présenté lors des 12^{èmes} journées scientifiques de l'école doctorale de cancérologie (ED 418) à la station biologique de Roscoff (France) en Mai 2016.

Il présente les premières mises au point réalisées sur la lignée cellulaire de mélanome A375 ainsi que les résultats obtenus à partir de 4 premiers prélèvements de patients.

Ce travail a également fait l'objet d'une communication orale l'année suivante (Mai 2017) lors des 13^{èmes} journées scientifiques de l'école doctorale de cancérologie (ED 418) à la station biologique de Roscoff (France)

Contexte

Le mélanome constitue le cancer commun dont la fréquence augmente le plus rapidement. Les stades d'évolution de ce cancer sont bien définis avec un pronostic relativement favorable aux stades localisés. Pendant de nombreuses années, la chimiothérapie constituait le traitement de référence, avec des taux de réponse n'excédant pas 10 %. Depuis 2011 des nouvelles thérapies ont été développées et sont en cours de développement dans les domaines de l'immunothérapie et des thérapies ciblées. Mais dans les stades avancés, le risque de développer des métastases reste très élevé¹. La détection précoce de celles-ci est donc un enjeu très important.

Lors de la progression tumorale, des cellules tumorales peuvent se détacher de la tumeur primaire et passer dans le sang où elles constituent les **Cellules Tumorales Circulantes (CTC)**. Ces CTC sont accessibles par une simple prise de sang, évitant ainsi les biopsies invasives. De plus, elles représentent le seul matériel tumoral résiduel après traitement. Les CTC constituent donc un marqueur important pour la surveillance des patients au cours et après leur traitement².

Objectif

L'objectif de ce projet est de définir un ensemble de critères permettant de prendre des décisions thérapeutiques pertinentes, adaptées à chaque patient, et de mesurer l'efficacité des traitements en étudiant ces cellules au devenir métastatique. Cependant, les CTC potentiellement métastatiques ne représentent qu'une fraction très minoritaire de ces cellules tumorales circulantes. C'est pour cela que la mise au point de la culture des CTC est la première étape indispensable afin d'obtenir suffisamment de matériel tumoral pour identifier les populations les plus agressives et pour réaliser des tests fonctionnels sur ces cellules. Actuellement, les conditions de culture utilisées pour les CTC ne permettent qu'une amplification restreinte en 2D et sur une période d'environ 3 semaines. Les cellules entrent ensuite en sénescence. Comme montré sur de nombreux modèles cellulaires, la culture en 3D, permet une amélioration significative de la survie et de la prolifération cellulaire.

Résultats acquis

Nous avons donc mis au point depuis 10 mois les conditions optimales pour l'isolement de ces cellules, leur détachement du support d'isolement et leur transfert en phase liquide puis leur mise en culture 3D. Ces premières étapes ont nécessité des optimisations qui ont été réalisées à partir de cellules tumorales de lignée, la lignée A375, et de prélèvement de sang de donneurs sains. Cette lignée de mélanome a été choisie car c'est une lignée de mélanome malin métastatique présentant une population hétérogène de cellules immatures, ayant notamment un phénotype SP (Side Population) avec une activité clonogénique très élevée et une résistance aux agents chimiothérapeutiques³.

Les cellules tumorales ont donc été isolées des autres éléments du sang et ont été immédiatement détachées du support d'isolement grâce aux dispositifs commercialisés par ScreenCell^{®4}. Les cellules ont ensuite été

prises en culture en 3D dans une plaque de culture contenant des biomatériaux spécifiques, à base d'acide hyaluronique⁵ (collaboration avec une société de biotechnologie) afin de les amplifier.

Après 30 jours de culture dans les biomatériaux, les sphéroïdes qui se sont formés ont été extraits selon un procédé qui permet de récupérer les cellules avec une viabilité optimale. Les cellules ont ensuite été analysées au FACS ou conservées dans les biomatériaux et analysées par immunofluorescence afin d'évaluer l'évolution des marqueurs après culture.

Plan de travail

Après culture, l'objectif est d'analyser l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des CTC, de caractériser des sous populations ayant un caractère particulièrement immature et/ou invasif et de sélectionner ces populations pour les analyser. Cette étape tout comme l'isolement et la culture ont été mis au point sur les lignées et seront maintenant réalisées à partir de prélèvement de patient. Les premiers prélèvements de patients atteints de mélanome métastatique stade III inopérable ou IV débuteront en Mars 2016.

Résultats attendus

D'une part, une fois les conditions de cultures établis avec succès, les CTC de mélanome en culture seront utilisées comme modèle pharmacologique, en traitant ces cellules par des agents pharmaceutiques connus comme étant actifs sur les cellules de mélanome.

D'autre part, dès que les cellules dérivées des CTC de mélanome seront rentrées dans leur phase proliférative, elles seront dissociées et replantées dans des plaques 96 puits à différentes concentrations cellulaires, à partir d'une cellule par puits. Ceci permettra d'analyser le potentiel clonogénique des CTC.

Dans l'objectif à terme de valider l'utilisation de la culture de ces sous populations comme outil pronostic du cancer et pour constituer des modèles pharmacologiques de réponses aux traitements dans le cadre du mélanome.

¹ Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, et al. (2010) Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28: 2452-2459.

² Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*. 2014 Nov 14;7(1):1-11. doi:10.15252/emmm.201303698. Review. PubMed PMID: 25398926; PubMed Central PMCID: PMC4309663.

³ Wouters J, Stas M, Gremeaux L, Govaere O, Van den broeck A, et al. (2013) The Human Melanoma Side Population Displays Molecular and Functional Characteristics of Enriched Chemoresistance and Tumorigenesis. *PLoS ONE* 8(10): e76550. doi:10.1371/journal.pone.0076550

⁴ Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, Yanagita M, Wang L, Berkowitz JA, Distel RJ, Cayre YE. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res*. 2011 Feb; 31(2):427-41.

⁵ David L, Dulong V, Le Cerf D, Chauzy C, Norris V, Delpech B, Lamacz M, Vannier JP. Reticulated hyaluronan hydrogels: a model for examining cancer cell invasion in 3D. *Matrix Biology* 2004 ; 3 :183-93.

Ex vivo expansion of Circulating Tumor Cells (CTC) as predictive pharmacology model of melanoma

Jessica Groult^{1,2}, Richard Proust¹, Nicolas Dumaz³, Guillaume Vidal⁴,
Janine Wechsler², Elise Demange⁴, Celeste Lebbe⁵, Naoual Benali², Georges Uzan¹.

¹INSERM U1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France ²ScreenCell, Paris, France ³INSERM U976, Hôpital Saint Louis, Paris, France ⁴Celency, Rouen, France ⁵Centre d'onco-dermatologie, Hôpital Saint Louis, Paris, France

BACKGROUND & OBJECTIVE

The major concern of cancer is the development of metastases : solid tumor, such as melanoma, release Circulating Tumor Cells (CTC) in the blood stream. These rare cells can be isolated, from peripheral blood of patient, to be used as biomarkers of cancer evolution. But we are still unable to precisely distinguish the minor CTC subpopulation relevant to metastatic diffusion from the non-relevant CTC. **The objective of this study is to develop an innovative 3D culture of CTC isolated from melanoma patients able to expand these cells and to identify the most aggressive CTC subpopulation.** By characterizing these aggressive cells (immaturity, proliferation, migration, invasion), it will be possible to detect potential drug resistance. The final goal of this project is to provide a predictive pharmacology model by testing the sensitivity of these aggressive CTC to therapeutic molecules.

MATERIALS & METHODS

Melanoma cell line (A375) and live CTCs from metastatic melanoma patient (Stage IV) were isolated by size from peripheral blood using the ScreenCell® Technology. On the one hand cells were captured fixed and analyzed subsequently by cytomorphology with a cytopathologist and by immunofluorescence (Fig.1). On the other hand, cells were captured alive and transferred into HA hydrogel for 3D ex vivo expansion (Fig.2). **For 3D culture, the protocols were developed with A375 melanoma cell line (Fig.2). Then, the optimized protocol was applied on CTC of melanoma patients.**

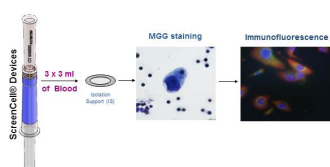


Figure 1: Cytomorphology and enumeration of preserved CTC with ScreenCell Cyto device

CTC were captured fixed on a porous membrane called Isolation Support (IS) from 3 ml whole blood of patients with metastatic melanoma. After isolation, the IS were stained with May-Grunwald-Giemsa (MGG) and subsequently immunostained. Microscopic observation was performed with Epi-fluorescence microscope (Nikon Eclipse E80) equipped with NIS-Elements Viewer Software. M x obj. 40.

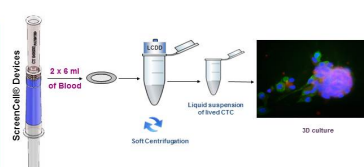


Figure 2: 3D culture of CTC isolated and preserved alive with ScreenCell CC and LCDD devices

CTC were captured alive from 6 ml of whole blood of patients with metastatic melanoma according to the workflow. After isolation, the cells were immediately released from the IS with the Live Cells Detachment Device (LCDD) into liquid phase. The cells in suspension were seeded into Biomimesys®, a hydrogel scaffold of reticulated HA chains commercialized by Celency for 3D culture.

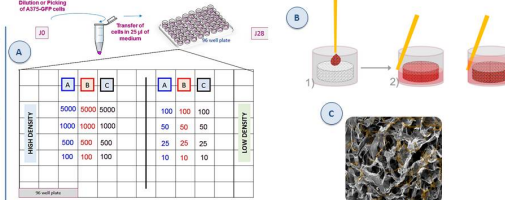


Figure 3: Workflow of Ex vivo expansion of CTC in 3D culture

(A) 3D culture of rare cells. Serial number of cells were seeded in the matrix. From high (5000, 1000, 500, 100) to low (100, 50, 25, 10) density of cells. Three different culture medium were evaluated to set up the appropriate culture condition of CTC. (B) Seeding of CTC onto Biomimesys® and addition of culture medium. (C) Biomimesys® scaffold

RESULTS

Isolation and characterization of A375 from healthy donor blood

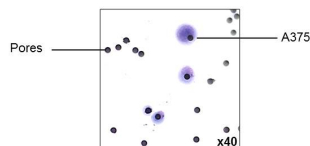


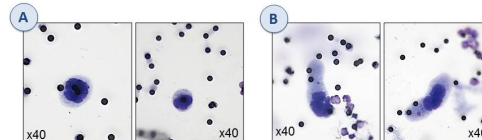
Figure 4: Fixed A375 cells were isolated by size selection from 3 ml of healthy donor's blood using the ScreenCell technology. Cells were stained with MGG. A375 cells displayed typical tumoral morphology and they are heterogeneous in size. This melanoma cell line is known to present a SP phenotype, to be resistant to chemotherapy and to have a high clonogenic activity.

Isolation and enumeration of CTC from melanoma patients' blood

ID	Gender	Age	Stage	CTC	CTC's cluster	CAMLS
1	F	73	IV	13	0	3
2	M	68	IV	0	0	0
3	F	48	IV	0	0	0
4	F	79	IV	2	0	0

Table 1: Fixed CTC were isolated by size selection from 6 ml of melanoma patient's blood using the ScreenCell® technology. CTC were stained with MGG and enumerated by a cytopathologist.

Figure 5: (A) Fixed CTC isolated by size using ScreenCell technology were stained with MGG. CTC displayed typical malignant morphology with cell diameter larger than 20 µm, an irregular nuclei, a high nucleocytoplasmic ratio and a hyperchromatic nucleus. (B) Fixed circulating cancer-associated macrophage-like cells (CAMLS) isolated by size using ScreenCell technology were stained with MGG. CAMLS are very large (20-300 µm in diameter). Their cytoplasm is voluminous and filamentary. The nucleocytoplasmic ratio is lower than that of CTC.



3D Culture and characterization of A375 cells

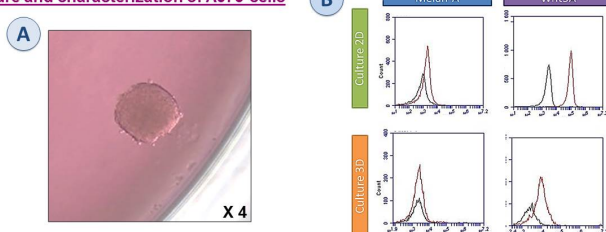


Figure 6: (A) Spheroid-like of A375 cells in Biomimesys. While Biomimesys® is a commercialized product known to expand 50,000 cells, different optimization experiments based on serial number of seeded cells allow to obtain spheroid-like clone starting from 10 cells. (B) After 28 days of culture, the cells were recovered and analyzed by FACS before and after 3D culture. In order to identify the different subpopulations, two markers were evaluated by flow cytometry : Melan-A (proliferative marker) and Wnt-5A (invasive marker). In 2D, A375 express both markers while after 3D culture, the cells have only an invasive phenotype with Wnt-5A expression. (C) After 28 days of culture, the spheroid-like clones were also evaluated directly into the matrix by IF. As observed by flow cytometry, the spheroid-like clones express Wnt-5A and S100 and do not express Melan-A.

First 3D culture with CTC isolated from peripheral blood of melanoma patient (stage IV) were initiated on April 2016.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

We show that CTC can be isolated fixed and alive with high sensitivity. The tumor cell capture and the 3D culture conditions were optimized to preserve the proliferative and invasive potential of CTCs. **Our first results indicates that it is possible to isolate 10 tumor cells in 6 ml of blood and to culture them in 3D scaffold up to 28 days.** In addition, tumor cells can be recovered out of the scaffold for further analysis or subcloning. These protocols are being adapted to CTCs from melanoma patients' blood and several optimization are being tested. Scaffold with CTC spheroid will be xenografted in mice to analyze their tumorigenic and metastatic potential. Both culture and xenograft models will be used as pharmacological studies.

Desitter I, Guerrouahen BS, et al. (2011). A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 31(2):427-41.

David L, Dulong V, et al. (2008). Hyaluronan hydrogel: an appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity. *Acta Biomater.* 4(2): 183-93.

David L, Dulong V, et al. (2004). Reticulated hyaluronan hydrogel: a model for examining cancer cell invasion in 3D. *Matrix Biology.* 23(3):183-93.

5.3. Abstract 3

EXPANSION *EX VIVO* DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES ISOLEE PAR LA TAILLE A PARTIR DE PATIENT ATTEINT DE MELANOME

Jessica Groult^{1,2}, Fei Ye¹, Laetitia Da Meda³, Janine Wechsler¹, Nicolas Dumaz⁴,
Matthieu Resche Rigon⁵, Naoual Benali-Furet¹, Celeste Lebbe³, Georges Uzan²

¹ScreenCell, Roger Perez Centre, 10 av. Charles Péguy, 95200 Sarcelles, ²Inserm U1197, Paul Brousse Hospital, 12 av. Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, ³Onco-Dermatology, Saint-Louis Hospital, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris, ⁴INSERM U976, Hôpital Saint-Louis, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris. ⁵INSERM U1153, Statistic and Epidemiologic Research Center Sorbonne Paris Cité (CRESS), ECSTRRA team, Université Diderot - Paris 7, USPC, Paris, France.

Ce poster a été réalisé à l'occasion du congrès international Molecular MED TRICON qui a eu lieu à San Francisco (USA) en Mars 2019. Lors de ce congrès les développements les plus récents dans la recherche sur les CTC ont été présentés.

***Ex vivo* expansion of live CTCs isolated by size from melanoma patients**

Jessica Groult^{1,2}, Fei Ye¹, Laetitia Da Meda³, Janine Wechsler¹, Nicolas Dumaz⁴, Matthieu Resche Rigon⁵, Naoual Benali-Furet¹, Celeste Lebbe³, Georges Uzan²

¹ScreenCell, Roger Perez Centre, 10 av. Charles Péguy, 95200 Sarcelles, ²Inserm U1197, Paul Brousse Hospital, 12 av. Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, ³Onco-Dermatology, Saint-Louis Hospital, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris, ⁴INSERM U976, Hôpital Saint-Louis, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris. ⁵INSERM U1153, Statistic and Epidemiologic Research Center Sorbonne Paris Cité (CRESS), ECSTRRA team, Université Diderot - Paris 7, USPC, Paris, France.

Background: Circulating Tumor Cells (CTC) are present at low frequency in the peripheral blood of patients with solid tumor cancers, including melanoma. Only few studies demonstrating the ability of CTC isolated from melanoma patients to grow *ex-vivo* in culture are currently available. The main issue for studying circulating melanoma cells is being able to isolate them, since most CTC isolation methods rely on epithelial cell surface marker, not expressed on melanoma cells. Here we defined optimized conditions to isolate live CTC using ScreenCell® technology. The aim of this study was to develop an innovative 3D culture method for CTC isolated from melanoma patients enabling their expansion and then the identification of the most aggressive CTC subpopulations.

Methods: In this study, we analyzed patients with stage IV melanoma, from the onco-dermatology department of APHP Saint-Louis Hospital, Paris. CTC were isolated alive from 6 ml blood of 90 melanoma patients enrolled prospectively from 6/04/2016 to 15/04/2017 using dedicated ScreenCell® devices, based on size selection. Cells were cultured directly on the ScreenCell® porous and high adhesion isolation capsule membrane which was placed over a Matrigel® layer, in 24 wells plate. Cells were then expanded using optimized culture conditions. The capsule-membrane was also used as a crossing barrier for cell invasion assay. After 30 days culture, cells were fixed and immunostained with melanoma and leucocytes markers.

Results: We found that 14% of patients' blood samples yielded cells in culture. After 5 days under specific culture conditions, CTC were adherent to the membrane and displayed different shapes and size. After approximately 15 days in culture, a population started to grow on the membrane, while a subpopulation had migrated through the pores of the membrane to form spheroids-like clones into the Matrigel® layer. After 30 days in culture, a subpopulation of cells adherent to the membrane was positively stained for pan-melanoma markers and negatively stained for leucocyte marker CD-45. Moreover, some cells were successfully recovered from the Matrigel® and put on a slide to be analyzed by immunofluorescence and compare to the cells attached to the membrane.

Conclusion: ScreenCell® technology preserves the viability, proliferative and invasive potential of CTC. In addition, CTC can be maintained in culture, allowing expansion and *ex vivo* characterization of CTC subpopulations. Using ScreenCell® devices, we have defined the optimal technical and microenvironment conditions for the isolation and expansion of melanoma CTC. This study opens opportunities to understand the process of drug resistance. Because CTC DNA is isolated with a high yield of optimal quality, this allows better monitoring of patients by analyzing the evolution of mutation by precision medicine techniques such as NGS and ddPCR.

Ex vivo expansion of live CTC isolated by size from melanoma patients

Jessica Groult^{1,2}, Fei Ye¹, Laetitia Da Meda³, Janine Wechsler¹, Nicolas Dumaz⁴, Matthieu Resche Rigon⁵, Naoual Benali-Furet¹, Celeste Lebbe³, Georges Uzan²

¹ScreenCell, Roger Perez Centre, 10 av. Charles Peguy, 95200 Sarcelles, ²Inserm U1197, Paul Brousse Hospital, 12 av. Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, ³Onco-Dermatology, Saint-Louis Hospital, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris, ⁴INSERM U976, Saint-Louis Hospital, 1, av. Claude Vellefaux, 75010 Paris. ⁵APHP, Department of Statistics, (CRESS-INSERM-UMR1153) Paris, France.

BACKGROUND & OBJECTIVE

The major concern of cancer is the development of metastases: solid tumor, such as melanoma, release Circulating Tumor Cells (CTC) in the blood stream. These rare cells can be isolated, from peripheral blood of patient, to be used as biomarkers of cancer evolution. But we are still unable to precisely distinguish the minor CTC subpopulation relevant to metastatic diffusion from the non-relevant CTC. **The objective of this study is to develop an innovative 3D culture of CTC isolated from melanoma patients able to expand these cells and to identify the most aggressive CTC subpopulation.** By characterizing these aggressive cells (immaturity, proliferation, migration, invasion), it will be possible to detect potential drug resistance. The final goal of this project is to provide a predictive pharmacology model by testing the sensitivity of these aggressive CTC to therapeutic molecules.

MATERIALS & METHODS

Melanoma cell lines (SK-Mel-28 and A375) and live CTCs from 150 metastatic melanoma patient (Stage IV) were isolated by size from peripheral blood using the ScreenCell® Technology. On the one hand cells were captured fixed and analyzed subsequently by cytomorphology with a cytopathologist and by immunofluorescence (PDL1 and pan-Melanoma) (Fig.1A). On the other hand, cells were captured alive on the porous membrane for 2D and 3D ex vivo expansion (Fig.1B). **For 3D culture, the protocols were developed with SK-Mel-28 and A375 melanoma cell line (Fig.1C). Then, the optimized protocol was applied on CTC of melanoma patients.**

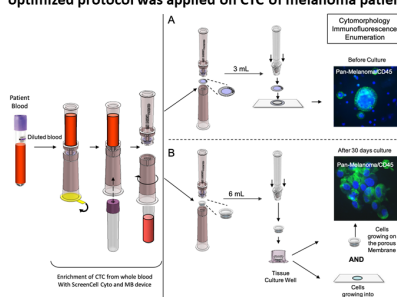
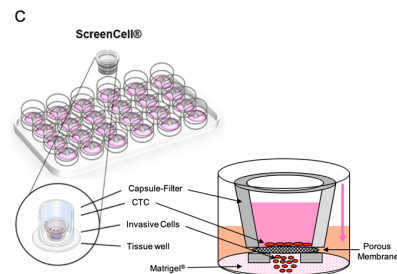


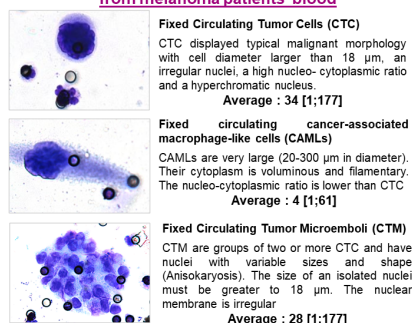
Figure 1 A, B and C: Cytomorphology, enumeration and cell culture of preserved CTC with ScreenCell® technology

- A) CTC, CTM, CAMLs and circulating endothelial cells were captured fixed on a porous membrane named Isolation Support (IS) from 3 ml whole blood of **150 metastatic melanoma patient** (Stage IV). After isolation, the cells were stained with May-Grunwald-Giemsa (MGG) and subsequently immunostained.
- B) CTCs were isolated alive from 6 ml blood of **118 metastatic melanoma patients** at baseline.
- C) Cells were cultured directly on a porous and high adhesion membrane with optimized culture conditions. The IS was also used as a crossing barrier to mimic cell invasion from the IS to Matrigel® (CTC extravasation from vessels to distant organs).



RESULTS

Figure 2: Isolation and enumeration of CTC/CTM/CAMLs from melanoma patients' blood



3D Culture of CTC isolated from melanoma patients' blood

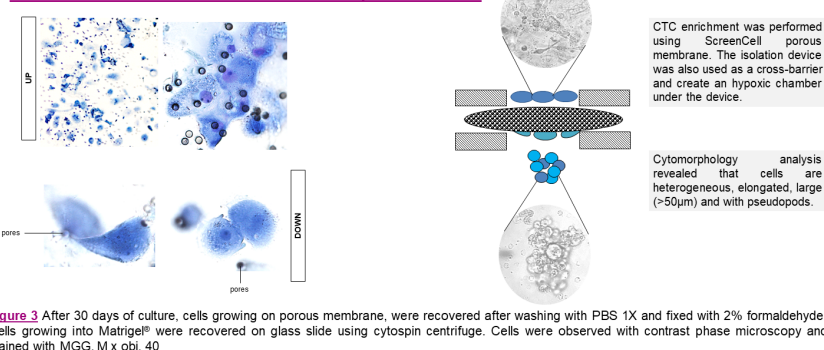


Fig. 4: Characterization of CTC cluster and cancer-associated cells before culture

After microscope observation and counting of MGG stained cells. Cells recovered on isolation support were washed with TBST to remove the MGG staining. Then, cells were stained with primary and secondary conjugated antibodies to evaluate the expression of Melan-A (proliferation), PDL1 (immunotherapy), CD146 (endothelial) and CD45 (WBC) markers. (M x obj. 40).

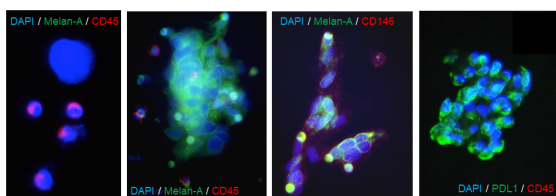
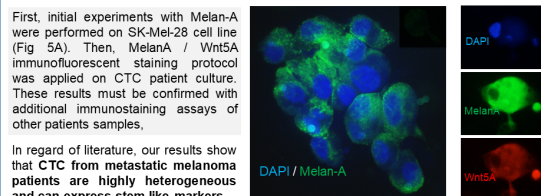


Fig. 5: Characterization of CTC cluster and cancer-associated cells after culture

After microscope observation and fixation of cells attached on the isolation support. Cells were washed with TBST to remove the MGG staining. Cells were stained with primary and secondary conjugated antibodies to evaluate the expression of Melan-A (proliferation) and Wnt5A (invasion) markers. (M x obj. 40).



CONCLUSION & PERSPECTIVES

ScreenCell® technology preserves the viability, proliferative and invasive potential of CTCs. We show that CTC can be isolated fixed and alive with high sensitivity. In addition, CTCs can be maintained in culture, allowing expansion and ex vivo characterization of CTC subpopulations. Using ScreenCell® devices, we have defined the optimal technical and microenvironment conditions for the isolation and expansion of melanoma CTCs. This study opens opportunities to understand the process of metastasis and drug resistance. Further studies are needed to characterize these CTC subpopulations.

1. Campillo N, Falcones B, Otero J, Colina R, Gozal D, Navajas D, Farré R, Almendros I. **Differential Oxygenation in Tumor Microenvironment Modulates Macrophage and Cancer Cell Crosstalk: Novel Experimental Setting and Proof of Concept.** Front Oncol. 2019 Feb 6;9:43.
2. El-Helbati A, Krones T, Zohrer E, Haybaeck J, Pock H, Riedl R, Stauber R, Geigl JB, Huppertz B, Sedlmayr P, Lackner C. **Are morphological criteria sufficient for the identification of circulating tumor cells in renal cancer?** J Transl Med. 2013 Sep 17;11:214.
3. Kulasinghe A, Perry C, Warkiani ME, Blick T, Davies A, O'Byrne K, Thompson EW, Nelson CC, Vela I, Punyadeera C. **Short term ex-vivo expansion of circulating head and neck tumour cells.** Oncotarget. 2016 Sep 13;7(37):60101-60109.

Chapitre IV | Analyse Moléculaire des CTC

1. Contexte

Dans le mélanome, la voie de signalisation principalement impliquée est la voie RAS/RAF/MEK/ERK causée par des mutations activatrices de BRAF dans 50 % des cas et de NRAS dans 15 % des cas ([Voir page 41](#)).

Ces mutations peuvent être présentes au niveau de la tumeur primaire, au moment du diagnostic ou bien apparaître au cours des traitements. L'apparition ou la disparition de certaines mutations peut modifier l'efficacité des traitements et donc la réponse thérapeutique. L'analyse génétique et la détection précoce de mutations pouvant être responsables d'une éventuelle résistance aux traitements futurs font actuellement l'objet d'études intensives.

L'un des avantages des CTC est de pouvoir suivre, au cours du traitement, l'évolution de ces mutations. Les CTC isolées du sang de patients, étant rares (10 cellules en moyenne pour plus de 1000 leucocytes contaminants), nous avons évalué plusieurs technologies de détection de mutation et sélectionné la plus sensible et la plus discriminante pour ces échantillons rares.

L'étude moléculaire présentée ci-après, évaluera différentes technologies, dans l'objectif de :

- **Établir un protocole, suffisamment sensible, permettant l'isolement et l'analyse des CTC au niveau moléculaire**
- **Déterminer l'apparition de mutation au niveau des CTC pouvant anticiper la réponse thérapeutique**

2. Matériels & Méthodes

2.1. Méthode d'isolement des CTC

Dans cette étude et afin d'évaluer les caractéristiques moléculaires des CTC, les cellules ont été isolées vivantes à l'aide des dispositifs ScreenCell MB, à partir de 6 ml de sang prélevé au centre d'Oncodermatologie de l'Hôpital Saint-Louis. Le tube de sang une fois prélevé a été conservé à 4°C et l'isolement des CTC réalisé dans les 4 heures qui suivent le prélèvement et en suivant les instructions préconisées par le fournisseur.

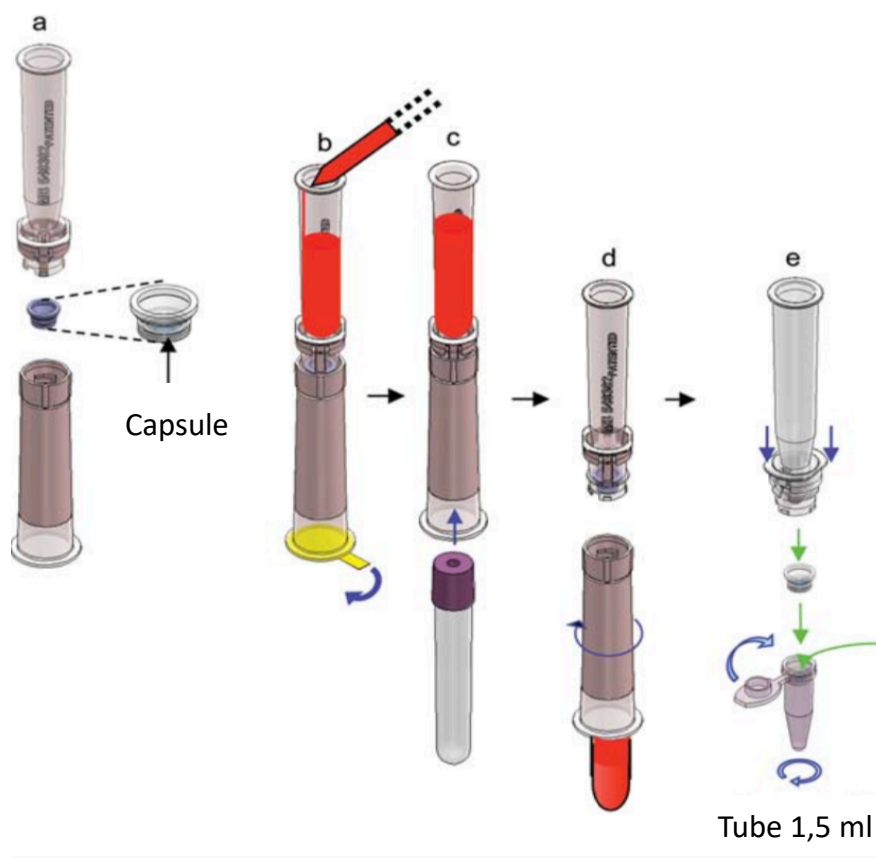


Figure 50 || Isolement des CTC pour analyse moléculaire avec le dispositif ScreenCell MB

Les dispositifs ScreenCell (a) sont simples et à usage unique. Ils permettent une fois le sang dilué et déposé dans la partie haute du dispositif (b) de réaliser l'isolement par insertion d'un tube sous vide dans la partie basse du dispositif (c). Une fois le processus terminé (temps < 3min), la partie haute peut être désolidarisée de la partie basse (d) et ainsi permettre l'éjection du support d'isolement (capsule) dans un tube 1,5 ml (e) en prévision de futures analyses moléculaires.

2.2. Analyse moléculaire

Afin d'analyser au niveau moléculaire le pool de cellules isolées, différentes technologies ont été utilisées, la PCR digitale en gouttelette (ddPCR) et le séquençage de nouvelle génération (NGS) :

2.2.1. ddPCR – BioRad

Les échantillons ont été analysés par la plateforme de ddPCR (droplet digital PCR) QX200 de la société BioRad, dont le principe est résumé dans la [Figure 51](#) ci-dessous :



Figure 51 || Principe de la ddPCR – BioRad

La procédure de ddPCR BioRad consiste à préparer le mix de réaction nécessaire (échantillon, amorces et sondes) puis à générer les gouttelettes (environ 20 000 par échantillon) ; les gouttelettes sont ensuite transférées dans une plaque 96 puits pour réaliser la PCR. Pour finir, l'ensemble de gouttelettes présentes est détecté individuellement par le QX 200 et analysé par le logiciel QuantaSoft. Source adaptée : www.bio-rad.com

2.2.2. ddPCR – RainDance

Les mêmes échantillons ont ensuite été analysés par la technologie de ddPCR de la société RainDance, dont le principe est proche de celui de BioRad et est résumé dans la [Figure 52](#) ci-après. La plateforme RainDance de l'Hôpital Saint-Louis a été utilisée pour ces analyses.

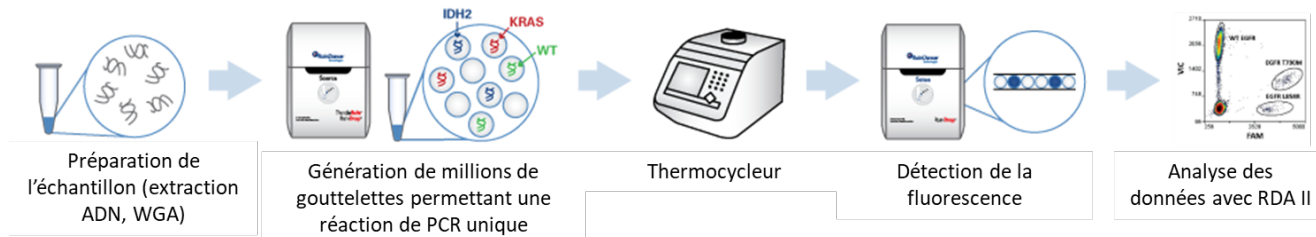


Figure 52 || Principe de la ddPCR – RainDance

La procédure de ddPCR RainDance est proche de la ddPCR BioRad. L'échantillon une fois préparé est inclus dans des millions de gouttelettes permettant une réaction de PCR unique. Grâce à un Thermocycleur. Puis la fluorescence est détectée au niveau de chaque gouttelette et les données sont analysées. Source adaptée : www.raindancetech.com

2.2.3. NGS – Ion Torrent

Les mêmes échantillons ont ensuite été analysés par la technologie NGS Ion Torrent de la société Thermo Fisher dont le principe est résumé dans la Figure 53 ci-dessous. Les analyses ont été réalisées par l'équipe du Pr Samia Mourah au sein du Département de Génomique des Tumeurs Solides de l'Hôpital Saint-Louis.

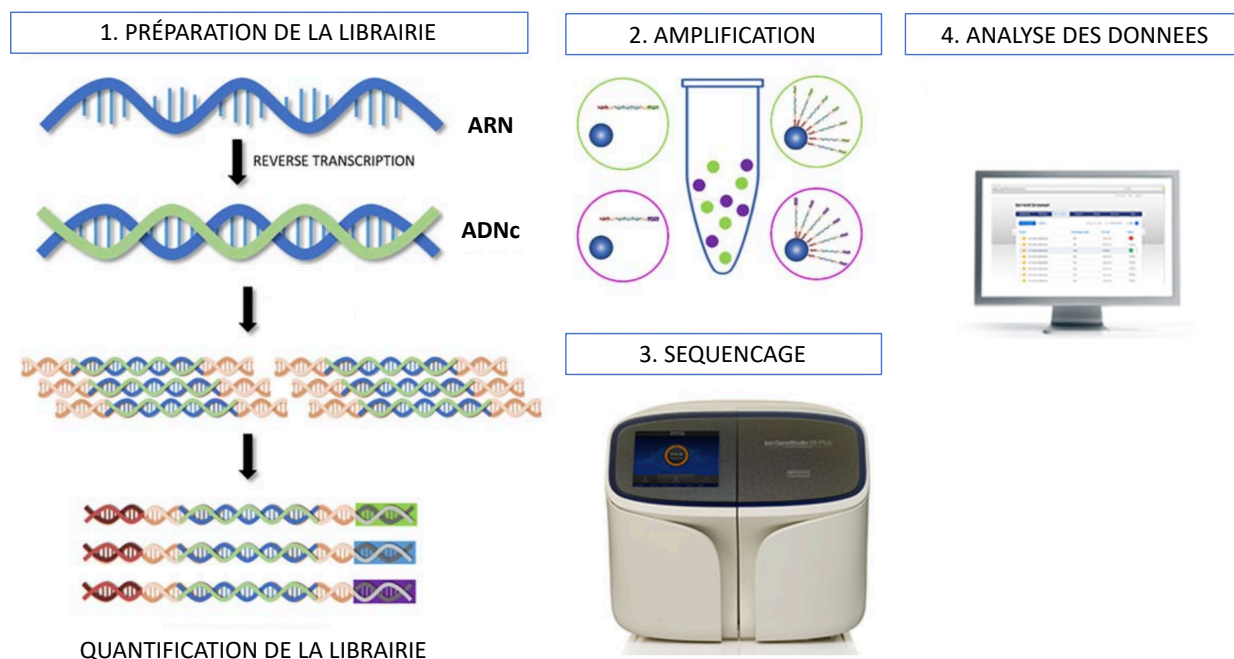


Figure 53 || Principe du NGS – Ion Torrent (Thermo Fisher)

La procédure de séquençage de nouvelle génération réalisée avec la plate-forme Ion Torrent comporte 4 phases : (1) Préparation de la librairie : l'ARN à séquencer est rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) puis amplifié et utilisé pour construire une librairie avec des codes-barres indispensables pour le processus de la plateforme et l'identification des patients. (2) Amplification : une amplification clonale des fragments d'ADNc est réalisée par PCR en émulsion. (3) Séquençage : Les nucléotides individuels doivent se positionner sur une puce. Lors de l'incorporation de chaque nucléotide, la puce détecte le pH lié à la libération d'un hydrogène (H). (4) Analyse des données : l'ensemble de la puce est analysé par un traitement de bio-informatique et des lectures de séquençage de haute qualité sont produites. Source adaptée (Pisapia et al. 2017)

3. Résultats

3.1. Analyse de la mutation BRAF par ddPCR

3.1.1. BioRad

L'utilisation de la ddPCR a joué un rôle clé dans le profilage moléculaire des cancers. Son utilisation permet une quantification absolue et extrêmement sensible des mutations à l'aide d'un flux de travail simple et rapide. Une étude ScreenCell antérieure sur les CTC du cancer du côlon métastatique en collaboration avec le service de Biochimie Endocrinienne et Oncologie de l'Hôpital La Pitié Salpêtrière (Denis et al. 2016) a permis de démontrer la possibilité de détecter la mutation KRAS au niveau de CTC isolées avec ScreenCell.

Dans le cadre de notre projet sur le mélanome, cette technique a permis de détecter la mutation BRAF à partir de 5 et 10 cellules de lignée de mélanome SKMEL28 spikées dans du sang de donneurs sains et isolées avec la technologie ScreenCell MB. La population de leucocytes résiduels présents sur la membrane au moment de l'enrichissement n'a pas interféré avec la détection de la mutation d'intérêt. Une lyse totale des cellules retenues sur la membrane est réalisée suivi d'une extraction d'ADN (QIAmp, Qiagen) et d'une amplification de l'ensemble du génome (WGA GenomePlex, Sigma). Le produit de WGA obtenu est ensuite dilué et analysé. Les résultats obtenus sur ces échantillons sont présentés Figure 54.

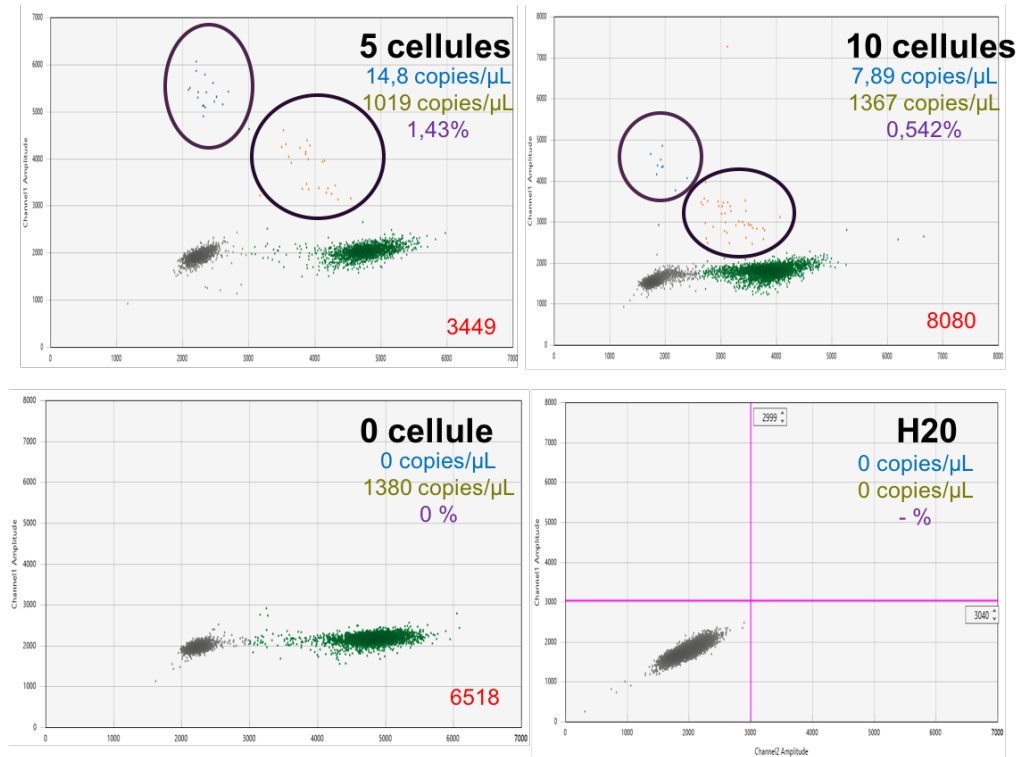


Figure 54 || Détection de 5 et 10 cellules BRAFV600E par ddPCR BioRad

Détection de 5 et 10 cellules de lignée de mélanome SKMEL28 portant la mutation BRAF V600E (homozygote). Les cellules ont été isolées de 6 ml de sang de donneur sain par ScreenCell. Les cellules présentes sur la membrane du SI ont été lysées. Le lysat a été ensuite transféré vers le micro tube 1.5 ml par centrifugation pour extraire l'ADN et réaliser une WGA avant l'analyse sur la plateforme de ddPCR (BioRad)

3.1.2. RainDance

Les mêmes produits de WGA obtenus à partir de 5 et 10 cellules SKMEL28 (lignée cellulaire de mélanome) portant la mutation BRAF^{V600E} isolées de sang de donneurs sains avec ScreenCell MB ont été analysés avec la technologie ddPCR RainDance. Les résultats obtenus avec RainDance sont présentés Figure 55.

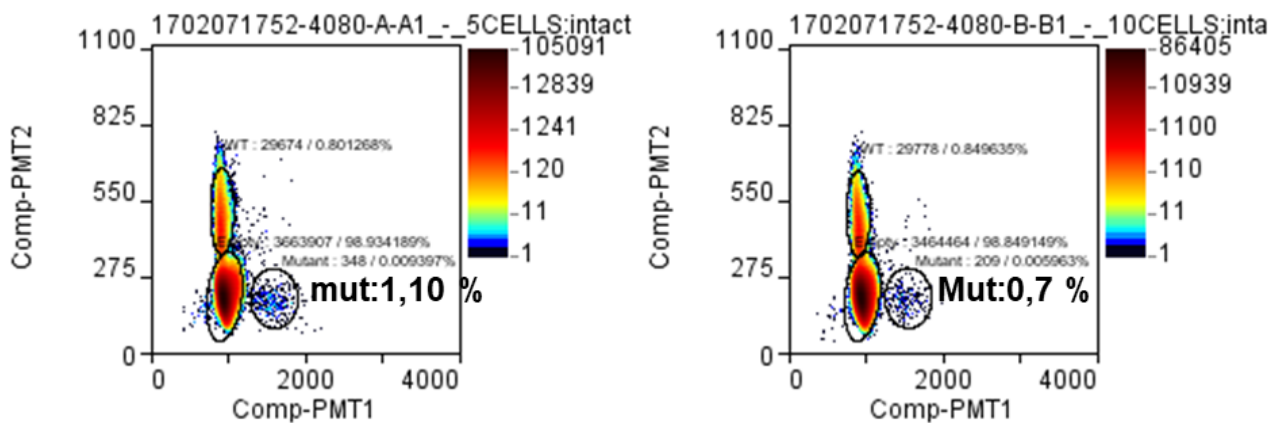


Figure 55 || Détection de 5 et 10 cellules BRAFV600E par ddPCR RainDance

*Détection de 5 et 10 cellules de lignée de mélanome SKMEL28 portant la mutation BRAF V600E (homozygote). Les cellules ont été isolées de 6 ml de sang de donneur sain par ScreenCell. Les cellules présentes sur la membrane du SI ont été lysées. Le lysat a été ensuite transféré vers le micro tube 1.5 ml par centrifugation pour extraire l'ADN et réaliser une WGA avant l'analyse sur la plateforme de ddPCR (**RainDance**)*

Les résultats obtenus à partir des mêmes échantillons WGA analysés en parallèle par deux méthodes de droplet digital PCR : BioRad et Rain Dance ont donné des résultats similaires (voir Tableau 19)

	BioRad	Rain Dance
5 cellules		
	1,43	1,10
10 cellules		
	0,542	0,700

Tableau 19 || Pourcentage de mutants BRAFV600E détectés (BioRad vs RainDance)

Les résultats obtenus avec les technologies de ddPCR BioRad et RainDance montrent la possibilité de détecter la mutation BRAF^{V600E} présente en faible quantité au sein d'un échantillon hétérogène.

A noter, qu'avec l'une comme l'autre des technologies le nombre de copies et le pourcentage de mutants étaient plus élevés pour 5 cellules comparées à l'échantillon 10 cellules. Cette variabilité peut s'expliquer par des procédures d'extraction (QIAmp DNA Micro Kit, Qiagen) et d'amplification (GenomePlex® Single Cell WGA4 Kit, Sigma Aldrich) très manuelle ainsi que par la robustesse de l'ADN polymérase. Toutefois, plusieurs kits de WGA ont été testés en interne.

Le kit Sigma a été sélectionné car plus fidèle que les autres références évaluées. L'avantage de la ddPCR reste son coût très avantageux, si l'analyse porte sur la présence d'une seule mutation d'intérêt.

3.2. Analyse d'un panel de gènes spécifiques du mélanome par NGS

Les mêmes produits de WGA analysés par ddPCR (BioRad puis RainDance) ont également été analysés par NGS. Contrairement aux analyses par ddPCR, les produits de WGA ont nécessité une purification (Maxwell® 16 System DNA Purification Kits, Promega) avant de pouvoir être analysés par NGS. Cette purification réalisée à l'aide de particules magnétiques permet l'élimination de certains sels présents suite à la WGA et qui peuvent interférer lors de l'analyse.

Après purification, des résultats concluants sur les échantillons témoins ont été obtenus : 2 % et 3 % de mutants, respectivement pour 5 et 10 cellules de lignée de mélanome. Ce même protocole, avec purification, a ensuite été appliqué sur 12 échantillons de patients de mélanome (4 patients évalués à 3 temps différents : M0, M1 et M3). Le principal avantage de l'utilisation du NGS comparé à la ddPCR est la possibilité d'analyser le panel de 70 mutations spécifiques du mélanome (Figure 56) contre l'analyse d'une seule mutation (BRAF^{V600E}) par ddPCR.

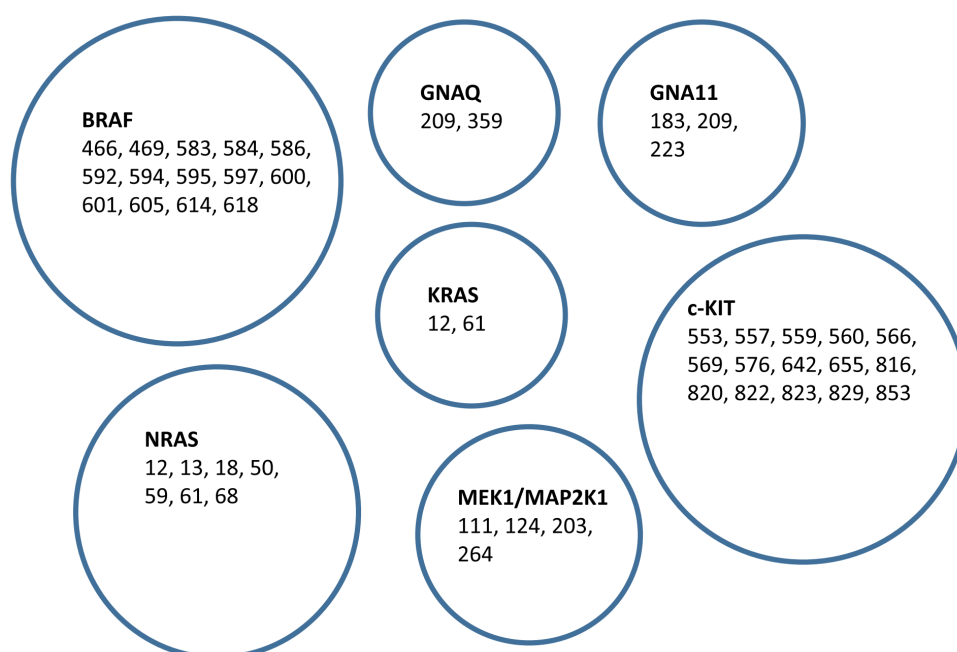


Figure 56 || Panel des 70 mutations spécifiques du mélanome

Représentation des 70 codons présents sur les différents gènes impliqués dans le mélanome. Ce panel est proposé par Thermo Fisher pour être utilisé sur la plateforme Ion Torrent. Les gènes principaux présents dans ce panel sont : BRAF, NRAS et c-KIT.

Les 4 patients sélectionnés pour cette analyse préliminaire avaient tous un mélanome muté BRAF^{V600E} au niveau de la tumeur primaire au moment du diagnostic. Les analyses menées sur les CTC isolées de ces patients ont permis de détecter la mutation BRAF^{V600E} dans 3 cas sur les 4 analysés à des temps différents (Tableau 20). De plus, des mutations additionnelles informatives sur le plan thérapeutique ont pu également être détectées. Il s'agit notamment d'une mutation NRAS^{Q61R} détectée chez un patient au cours de l'analyse du prélèvement à M3. L'apparition de la mutation s'accompagne de la disparition de la mutation BRAF^{V600E} sur le même échantillon.

Patient ID	Echantillon ID	Date isolement CTC	Reads Alignés	Profondeur	BRAF V600E VAF	NRAS Q61R VAF
1013	ExpV 1	12/05/2016	486 863	1508	0,23%	0%
1013	ExpV 2	09/06/2016	456 358	1422	0,23%	0%
1013	ExpV 3	04/08/2016	657 780	2032	0%	0,22%
1015	Exp V 4	24/05/2016	-	-	NI	NI
1015	ExpV 5	21/06/2016	-	-	NI	NI
1015	ExpV 6	29/07/2016	-	-	NI	NI
1017	ExpV 7	30/05/2016	1 327 727	4009	NI	NI
1017	ExpV 8	11/07/2016	353 181	1095	1,04%	0%
1017	ExpV 9	10/08/2016	654 486	2023	0,90%	0%
1025	ExpV 10	20/06/2016	268 695	836	0%	0%
1025	ExpV 11	11/07/2016	284 946	891	0%	0%
1025	ExpV 12	24/08/2016	329 239	1021	0,44%	0%

Tableau 20 || Analyse NGS séquentielle de CTC isolées de 4 patients atteints de mélanome

Les CTC aux 3 temps du patient 15 étant non informatifs à cause d'une qualité sous-optimale des ADN (invalidé par le CQ). NI : non informatif, VAF : Variant Allele Frequency

Ces premiers résultats sont très encourageants et une analyse séquentielle selon le même protocole sera étendue à une série de 24 patients (à 2 temps : M0 et M1) ayant un mélanome muté BRAF^{V600E}, et traités par thérapie ciblée anti-MAP Kinases. Cette étude permettrait de confirmer ces résultats préliminaires et d'évaluer l'intérêt du génotypage des CTC isolées par ScreenCell et analysées par NGS dans la réponse et le suivi thérapeutique en particulier lors de l'émergence d'une résistance. En effet, très peu d'études ont été publiées à ce sujet sur la base de biopsies liquides.

Cette cohorte de patients fait l'objet d'une période de suivi de 3 ans qui est actuellement toujours en cours. Cette période de suivi permettra de rendre plus robuste les précédents résultats obtenus. Ces résultats finalisés feront l'objet d'un article scientifique en cours d'écriture.

4. Discussion

L'isolement et le géotypage des CTC suscitent un intérêt croissant pour le diagnostic, le pronostic et la décision thérapeutique.

Nos résultats ont montré la faisabilité de l'analyse des CTC avec des outils de biologie moléculaire utilisés en médecine de précision. Ces résultats ont été démontrés par l'analyse séquentielle de 4 patients atteints de mélanome. Cette analyse par NGS était possible à condition de réaliser au préalable une amplification de l'ensemble du génome (WGA). Cette amplification est source de débat : il s'agit d'une procédure longue et coûteuse, qui peut intégrer des erreurs liées soit à la procédure elle-même soit à des erreurs techniques. Une étude ([Palmirotta et al. 2017](#)) a d'ailleurs montré, avec des cellules de mélanome, qu'il était possible d'analyser par NGS sans WGA. Cette analyse est possible à condition que la méthode d'enrichissement (dans cette étude : AutoMACS®, Miltenyi) soit couplée au DEPArray afin de réaliser une analyse moléculaire sur des cellules uniques. Cette analyse par DEPArray peut être une alternative pour ne pas utiliser une amplification par WGA. Cependant, cette alternative reste longue et coûteuse.

Nous envisageons donc pour l'instant de poursuivre nos futures analyses selon le protocole que nous avons mis au point. Les résultats très prometteurs obtenus seront étendus à une série de 24 patients afin de confirmer la faisabilité et l'intérêt du géotypage des CTC dans le suivi des patients par biopsie liquide. Si des difficultés apparaissent nous pourrions facilement adapter notre protocole, ScreenCell ayant déjà démontré sa compatibilité avec le DEPArray ([voir page 67](#)).

Grâce aux avancées technologiques, le séquençage de nouvelle génération (NGS) et le séquençage de cellules uniques (SCS : Single Cell Sequencing) permet de mieux analyser le génome complet des CTC et de le comparer aux résultats obtenus sur la tumeur primaire correspondante.

Des progrès concernant les analyses de ces résultats par bio-informatique sont encore nécessaires en particulier dans l'analyse et la prise en compte des biais introduits lors de la préparation de l'échantillon (Zhu et al. 2018). L'utilisation de la WGA, par exemple entraîne une augmentation du taux de faux positifs, surtout lorsqu'il s'agit de l'analyse de SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Une autre alternative envisageable est l'étude de l'ADN tumoral circulant ou des exosomes qui sont en plein essor pour l'identification d'anomalies moléculaires responsable notamment de résistance aux traitements. L'étude des CTC reste toutefois compétitif par la possibilité d'associer l'étude phénotypique à l'étude moléculaire.

Les échantillons obtenus au cours de cette étude ont permis la création d'une bio-banque très riche et disponible pour des études rétrospectives.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

1. Les diagnostics de médecine de précision en oncodermatologie	165
1.1. Caractérisation cytologique	165
1.2. Caractérisation phénotypique	166
1.3. Caractérisation moléculaire	166
2. Compréhension du processus métastatique	168
2.1. Modèle <i>ex vivo</i>	168
2.2. Modèle <i>in vitro</i>	169
3. Découverte de nouveaux biomarqueurs	169
3.1. PD-L1	169
3.2. Le complexe eIF4F	171
4. La valeur clinique des CTC	172
4.1. Mélanome	172
4.2. Autre cancer : le cancer du sein	173

1. Les diagnostics de médecine de précision en oncodermatologie

Des progrès ont été réalisés en médecine de précision pour le mélanome métastatique, d'une part, dans le traitement de ce cancer, grâce à l'utilisation des nouvelles thérapies (les immunothérapies et les thérapies ciblées) venues compléter l'arsenal thérapeutique conventionnel existant. D'autre part, les tests de biomarqueurs circulants (ADN tumoral libre circulant, CTC, exosomes et protéines) se sont révélés être des tests novateurs pour répondre aux besoins cliniques grâce à des techniques non invasives et simple d'utilisation.

Cependant, leur rareté dans l'échantillon sanguin obtenu du sang périphérique est un obstacle majeur et certaines équipes ont voulu évaluer l'obtention des CTC depuis le sang périphérique et les CTC obtenues depuis les vaisseaux sanguins proche de la tumeur primaire (Buscail et al. 2019). Ceci évitant ainsi la perte supposée de CTC via les organes filtrant comme le foie. Cependant, en fonction de la localisation de la tumeur primaire il n'est pas toujours facile d'avoir accès à la veine porte.

Aujourd'hui, une gestion clinique efficace repose sur des informations précises sur le diagnostic et un suivi longitudinal poussé grâce à la découverte de biomarqueurs circulants. Les technologies évaluant ces biomarqueurs évoluent rapidement et s'améliorent en sensibilité et spécificité.

Dans le cadre, de ce projet nous avons fait le choix d'isoler les CTC par la taille depuis le sang périphérique avec un système déjà commercialisé et de caractériser ces CTC et ces sous-groupes de CTC au niveau cytologique, immunologique et moléculaire.

1.1. Caractérisation cytologique

Comme il existe des caractères de malignité communs entre les CTC et les cellules de la tumeur solide, le pathologiste peut sur la base de ces mêmes critères morphologiques, identifier les cellules ayant une cytologie tumorale dans la circulation sanguine. Ces critères de malignité ne dépendent pas du cancer d'origine et sont morphologiquement identiques d'un cancer à un autre. Les cellules une fois identifiées sont classées en 3 groupes principaux : CTC, CTM et CAMLS par le pathologiste. La présence de ces différents éléments peut apporter des indications utiles au pronostic des patients atteints de cancer durant leur suivi.

Le logiciel semi-automatisé permet de modéliser les critères cytologiques de malignité utilisés par un pathologiste expert dans la reconnaissance des CTC et des éléments associés ayant validé sur un nombre important de cas la reconnaissance de ces cellules. Ce logiciel a pour vocation d'aider le pathologiste dans l'exercice de sa routine.

1.2. Caractérisation immunologique

Les CTC peuvent être caractérisées au niveau immunologique par des marqueurs spécifiques du mélanome (HMB45, S100) et plus récemment par PD-L1.

La détection de PD-L1 sur les CTC peut constituer un outil intéressant en médecine de précision. Il est notamment utile au dépistage de patients éligibles aux traitements par immunothérapie. L'analyse de l'expression de PD-L1 sur les CTC en complément de son analyse sur la tumeur primaire, a démontré un intérêt pour prédire les résistances primaires et secondaires possibles avec ce type de traitement.

Dans notre étude, un sous-groupe de 20 patients traités par immunothérapie a été analysé pour l'expression de PD-L1. Parmi ces patients 40 % (8/20) ont montré une expression positive de PD-L1. Fait intéressant, cette expression a été uniquement observée dans les CTM. D'autres analyses doivent être réalisées afin de confirmer et de comprendre cette spécificité.

1.3. Caractérisation moléculaire

Les avancées en médecine de précision qui ont eu lieu sur la tumeur primaire grâce à la ddPCR et au NGS ont été adaptées et appliquées aux CTC dans le cadre de notre étude. Nous avons combiné une technologie d'isolement sensible (ScreenCell) avec une extraction d'ADN efficace (QIAmp, Qiagen) et une amplification de l'ensemble du génome très fidèle (GenomePlex, Sigma). Les premiers résultats obtenus en ddPCR et en NGS sont très encourageants. Nous avons pour la première fois, démontré la compatibilité d'un isolement des CTC par ScreenCell et une analyse par séquençage de nouvelle génération (NGS). Cette nouvelle mise au point ouvre des perspectives d'analyses multiples au niveau d'une cellule unique pouvant apporter des informations importantes sur l'apparition de mutations au cours du traitement des patients.

Le NGS, très informatif, peut s'appliquer à l'ensemble des éléments de la biopsie liquide et fournir d'importantes informations dans l'analyse de mutations. Parmi les différents éléments de la biopsie liquide, l'évaluation de l'ADN tumorale libre circulant (ctDNA) est plus avancée pour une utilisation clinique que les CTC. En effet, pour des raisons de sensibilité, les systèmes commercialisés comme le Cobas EGFR mutation test V2 (Roche) et l'Epi proColon (Epigomics ACG), sont plus adaptés à l'analyse de l'ADN qu'à l'analyse des CTC. La FDA a d'ailleurs approuvé en 2016, le test Roche, comme premier test sanguin⁷ destiné à la détection d'une mutation génétique (EGFR^{L858R} ou EGFR^{T790M}) associée au cancer du poumon non à petites cellules.

Cependant, L'ADN libre circulant est fragmenté, et de moins bonne qualité que l'ADN obtenu des CTC, ce qui peut aboutir à l'obtention d'informations incomplètes. Les CTC constituent une source d'ADN de bonne qualité, qui peut fournir des résultats complémentaires à ceux obtenus avec l'ADN libre circulant. D'autre part, le séquençage de transcrits tumoraux (RNAseq), issus par exemple de gènes de fusion ou d'amplification de gènes peut être réalisée à partir de l'ARNm isolé des CTC. Or, ces ARNm sont très peu disponibles directement dans le sang circulant du fait de leur destruction par les RNAses.

Les biopsies liquides ont un fort potentiel pour suivre la dynamique évolutive et l'hétérogénéité des tumeurs et pour détecter très tôt l'émergence de résistance, de maladie résiduelle ou de récurrence. Nous savons depuis plusieurs années maintenant que les CTC et le ctDNA ont un rôle complémentaire et qu'ils apportent des informations et des possibilités d'analyse différentes (Pantel and Alix-Panabières 2013). Cependant, l'utilité clinique des biopsies liquides doit être rigoureusement démontrée avant de pouvoir être utilisé en clinique (Heitzer et al. 2019).

⁷ <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-blood-test-detect-gene-mutation-associated-non-small-cell-lung-cancer>

2. Compréhension du processus métastatique

2.1. Modèle *ex vivo*

Le protocole de culture proposé dans notre étude, d'abord mis au point avec une lignée de cellules de mélanome puis appliqués aux CTC de patients atteints de mélanome métastatique a abouti à un taux moyen de 14 % de succès de culture et a révélé des sous-populations distinctes.

Nous avons révélé que les CTC en culture avaient des profils prolifératifs ou invasifs. Les résultats obtenus sur des lignées cellulaires ont révélé le passage d'un profil prolifératif (expression de Melan-A) à un profil invasif (expression de Glut-1) au cours de la culture.

Ce caractère hétérogène des CTC a été confirmé avec les cellules issues de patients atteints de mélanome. Ce modèle de « switch » du mélanome a été largement décrit dans la tumeur primitive du mélanome et dans différentes lignées cellulaires de mélanome ([Eichhoff et al, 2010](#)), mais il est peu décrit dans les CTC. L'identification des CTC les plus invasives en culture pourrait faire le lien avec la sous-population de CTC qui serait responsables du développement des métastases. Cependant, ce lien reste à prouver, par exemple, en transplantant ces cellules invasives chez la souris afin de mesurer le potentiel tumorigène de ces cellules.

Les résultats de culture obtenus à ce stade et avec cette cohorte sont encourageant mais ne sont pas suffisants pour être compatibles avec un criblage pharmacologique. D'une part, le nombre de cellules obtenu n'est pas suffisant, d'autre part les cellules obtenues ne sont pas suffisamment stables dans le temps. Des améliorations sont indispensables, pour que la culture telle que nous l'avons pensée et développée puisse ouvrir sur de nouvelles applications cliniques pour le patient.

Ces cultures organoïdes dérivées des CTC de patients sont apparues comme une nouvelle alternative ([Praharaj et al. 2018](#)) pour acquérir des informations génétiques et épigénétiques sur la tumeur en temps réel et permettent les criblages pharmaceutiques.

2.2. Modèle *in vivo*

Les modèles expérimentaux de PDX (voir page 57) à partir de CTC imitent de façon plus fidèle l'hétérogénéité de la tumeur qu'une culture *ex vivo* en 2 dimensions. Ces modèles murins dérivés du patient sont apparus comme un nouveau modèle d'étude pour répondre aux besoins cliniques.

L'implantation des sous-populations de CTC potentiellement les plus agressives en culture chez des souris immunodéficientes est un autre axe de recherche afin d'évaluer le potentiel tumorigène des CTC ainsi que leur potentiel métastatique.

Cet axe de recherche, prévu initialement dans ce projet de thèse n'a pas pu être exploré comme prévu en raison de la difficulté à récupérer la sous-population d'intérêt afin de la transplanter chez la souris. Néanmoins, ces modèles une fois mis en place, contrairement aux modèles *ex vivo* de culture 3D, ne permettront pas le criblage pharmacologique.

3. Évaluation de nouveaux biomarqueurs sur les CTC

3.1. PD-L1

Les immunothérapies qui ont radicalement changé la prise en charge de nombreux cancers tels que le mélanome avancé, doivent leur action au blocage de la communication entre les deux protéines PD-1 et PD-L1, présentes respectivement à la surface des cellules tumorales et des lymphocytes T. L'immunothérapie permet d'obtenir des résultats significatifs, mais seulement chez les patients qui expriment PD-L1 (entre 10 et 30 %, selon les études et selon les cancers).

Dans le mélanome, après résection de la tumeur, et avant que les métastases puissent être identifiées et analysées, seules les CTC peuvent fournir une indication quant à l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, et donc donner une information sur l'éligibilité du patient à l'immunothérapie.

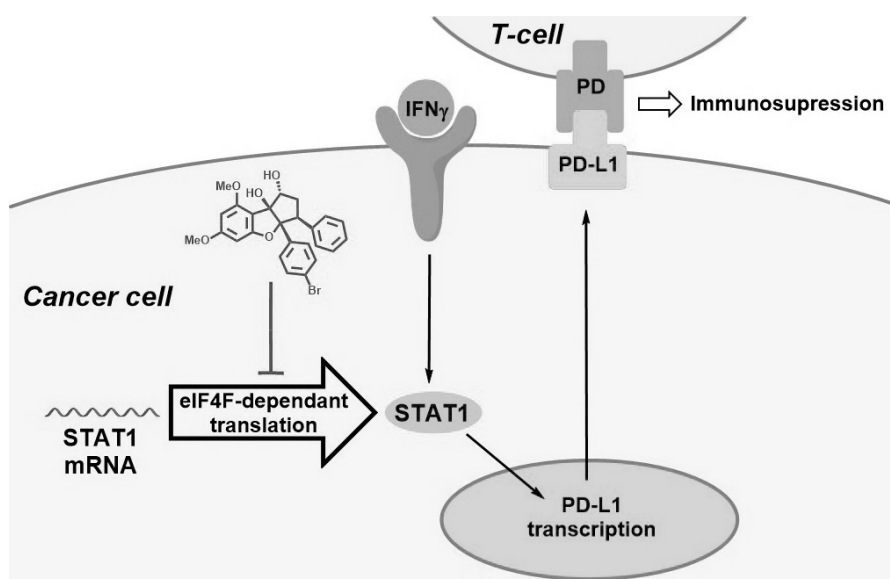


Figure 57 || Contrôle de l'échappement immunitaire par PD-L1

La transcription de PD-L1 est contrôlée par la protéine STAT1 elle-même dépendante du complexe eIF4F. L'expression membranaire de PD-L1 à la surface des cellules tumorale entraîne la reconnaissance par les lymphocytes T et donc l'inactivation du système immunitaire. Source : <http://desaubry.u-strasbg.fr>

L'expression de la protéine PD-L1 est utilisée depuis peu sur la tumeur primaire pour identifier les patients susceptibles de bénéficier d'une immunothérapie. L'analyse complémentaire de l'expression de PD-L1 au niveau des CTC a démontré qu'il était possible de suivre son expression au cours du temps et d'anticiper une éventuelle résistance aux traitements. Dans notre étude, nous avons démontré uniquement une expression PD-L1 au niveau des CTM. Aucune étude sur les CTC de mélanome et l'expression de PD-L1 n'est disponible dans la littérature et des analyses complémentaires sur les CTC isolées doivent être menées.

De plus, en travaillant sur les mécanismes qui régulent la production de la protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses, un nouveau complexe vient d'être mis en évidence, dans la littérature, afin de prédire l'efficacité de ces immunothérapies. La découverte du mécanisme d'action du complexe eIF4F, acteur dans la régulation de l'expression du gène PD-L1, permettra d'agir, avec un autre angle, au niveau du point de contrôle PD-L1 (Figure 57). Ce nouveau complexe, tout comme l'expression de CMTM6 (Mamessier et al. 2018), mérite également d'être analysé comme nouveau biomarqueur au niveau des CTC.

3.2. Le complexe eIF4F

En bloquant le complexe eIF4F dans les cellules cancéreuses, les chercheurs sont parvenus à stimuler de nouveau l'immunité anti-tumorale, un effet qui semble associé à une chute de la production de PD-L1 (Cerezo et al. 2018). Parallèlement, il a été démontré que le niveau d'expression du complexe eIF4F était lié à une meilleure efficacité des immunothérapies. En effet, si le complexe est actif, la production de la protéine PD-L1 inhibe le système immunitaire, mais il augmente dans le même temps la sensibilité aux immunothérapies.

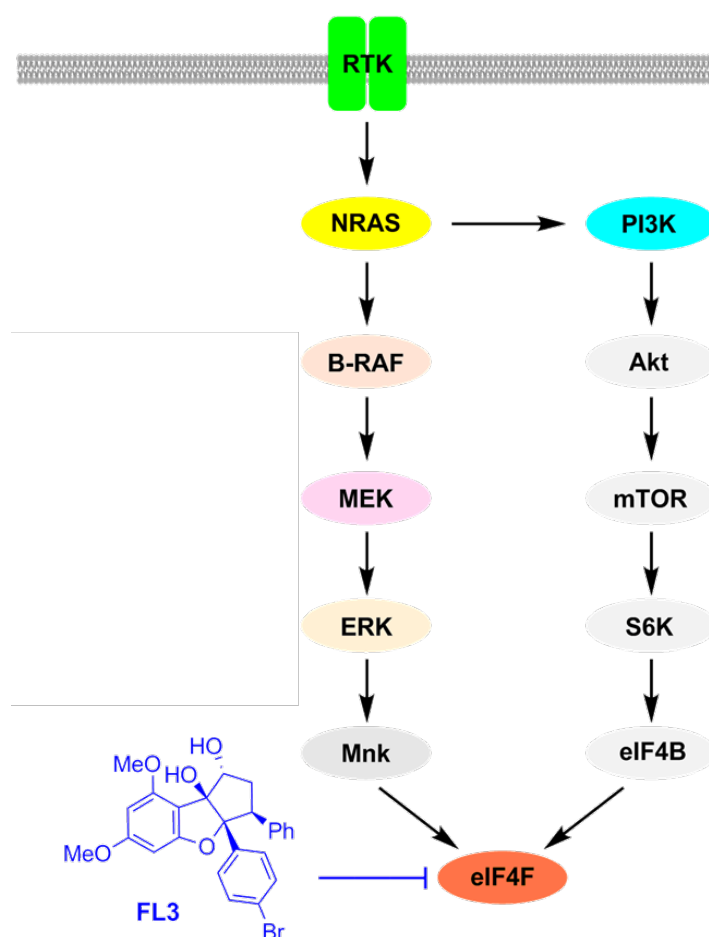


Figure 58 || Contrôle de l'échappement immunitaire par le blocage du complexe eIF4F

Le complexe eIF4F peut être ciblé par une nouvelle molécule, FL3, actuellement en développement pour bloquer la transcription de la protéine PD-L1. Ce complexe peut également servir de nouveau biomarqueur pour déterminer les patients éligibles aux traitements anti-PD-L1. Source : <http://desaubry.u-strasbg.fr>

Ce complexe constitue donc à la fois une nouvelle cible thérapeutique, si l'on bloque sa formation à l'aide de molécule pharmacologique (déjà en développement : FL3) (Figure 58), ou bien un nouveau biomarqueur, permettant d'indiquer si le patient est susceptible ou non de répondre aux immunothérapies existantes.

Les stratégies thérapeutiques mises en place au niveau des points de contrôle immunitaire sont loin d'avoir révélées tous leurs secrets et les CTC ont un rôle à jouer dans cette compréhension. Ce complexe responsable de la régulation positive de la traduction de PD-L1 serait intéressant, par exemple, à analyser au niveau moléculaire sur les CTC par puce à ADN ou par RNAseq comme cela a déjà été fait dans le cancer du sein (Bertucci et al. 2016), du pancréas (Birnbau et al. 2016) et dans des tumeurs plus rares telles que les sarcomes des tissus mous (Bertucci et al. 2017).

4. La valeur clinique des CTC

La valeur pronostique et l'utilisation clinique des cellules tumorales circulantes font toujours l'objet de nombreuses recherches et de nombreux essais cliniques. Pour le moment, la seule méthode approuvée par la FDA pour les CTC ne fournit que le compte des CTC pour pouvoir suivre l'évolution clinique des patients métastatiques. De nombreuses études cliniques réalisées avec cette méthode ont démontré le potentiel des CTC pour le diagnostic et le pronostic des patients. Cependant, de vastes études multicentriques sont encore nécessaires pour valider formellement la pertinence clinique des CTC (Abalde-Cela et al. 2019).

4.1. Mélanome

Dans notre étude, nous n'avons pas réussi à démontrer de façon significative l'intérêt pronostique des CTC pour prédire la survie des patients au stade métastatique, lorsque ces cellules sont quantifiées au diagnostic et avant traitement (baseline).

A l'inverse, d'autres études ([Li et al. 2018](#)) ont révélé que la numération des CTC en baseline était en corrélation avec un mauvais pronostic et était prédictive de la survie des patients. L'évolution du nombre de CTC avant et après le traitement était également un indicateur de la réponse thérapeutique et du pronostic et est un outil puissant pour surveiller la progression du mélanome. Des analyses approfondies doivent donc être poursuivies afin d'analyser l'ensemble des échantillons obtenus au cours du temps dans le cadre de ce projet et ainsi répondre aux questions que nous nous posions initialement. Les données très riches obtenues au cours du temps sur les 150 patients de notre cohorte permettront peut-être de déterminer les points de temps idéaux pour effectuer le suivi des patients atteints de mélanome métastatique.

4.2. Autre cancer : le cancer du sein

Le cancer pour lequel les CTC sont les plus étudiées reste aujourd'hui le cancer du sein. Les données nombreuses acquises au cours du temps dans ce cancer ont fait l'objet d'une étude approfondie. Un document de consensus regroupant divers experts internationaux dans le domaine vient d'être publié.

Ce document apporte des réponses concernant la prise en charge précise du cancer du sein métastatique. Une analyse rétrospective des données individuelles de 2436 patientes issues de 18 cohortes indépendantes ([Cristofanilli et al. 2019](#)) a mis en évidence l'importance du compte des CTC comme un outil clinique.

Dans cette étude, le seuil de 5 CTC a été utilisé pour stratifier les patients atteints de cancer du sein métastatique en 2 groupes distincts (Stade IV indolent et Stade IV agressif). Cette nouvelle classification a été comparée aux autres classifications réalisées sur la base de biomarqueurs standards du cancer du sein (statut HR, statut HER2, etc.).

Une analyse multivariée de ces différentes stratifications a révélé que les CTC étaient le biomarqueur le plus significatif pour prédire la survie des patients. Ainsi, cette étude suggère qu'à l'avenir le compte des CTC devrait être utilisé pour améliorer la classification clinique et moléculaire des patients atteints de cancer du sein. Ces travaux approfondis dans le cancer du sein ouvrent des perspectives pour l'ensemble des cancers solides.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abalde-Cela S, Piairol P, Diéguez L (2019) The Significance of Circulating Tumour Cells in the Clinic. *Acta Cytol* 1–13. doi: 10.1159/000495417
- Aceto N (2019) Fluctuating numbers of circulating tumor cells in cancer patients and the meaning of zero counts. *Oncotarget* 10:. doi: 10.18632/oncotarget.26850
- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al (2014) Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell* 158:1110–1122. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013
- Adams DL, Adams DK, Alpaugh RK, et al (2016) Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Differentiate Malignant Breast Cancer and Benign Breast Conditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25:1037–1042. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-1221
- Adams DL, Adams DK, He J, et al (2017) Sequential Tracking of PD-L1 Expression and RAD50 Induction in Circulating Tumor and Stromal Cells of Lung Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *Clin Cancer Res* 23:5948–5958. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0802
- Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, et al (2014) Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci* 111:3514–3519. doi: 10.1073/pnas.1320198111
- Adebayo Awe J, Xu MC, Wechsler J, et al (2013) Three-Dimensional Telomeric Analysis of Isolated Circulating Tumor Cells (CTCs) Defines CTC Subpopulations. *Transl Oncol* 6:51-IN4. doi: 10.1593/tlo.12361
- Alix-Panabières C (2012) EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer* 195:69–76. doi: 10.1007/978-3-642-28160-0_6
- Alix-Panabières C, Brouillet J-P, Fabbro M, et al (2005a) Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. *J Immunol Methods* 299:177–188. doi: 10.1016/j.jim.2005.02.007
- Alix-Panabieres C, Pantel K (2013) Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clin Chem* 59:110–118. doi: 10.1373/clinchem.2012.194258
- Alix-Panabières C, Rebillard X, Brouillet J-P, et al (2005b) Detection of circulating prostate-specific antigen-secreting cells in prostate cancer patients. *Clin Chem* 51:1538–1541. doi: 10.1373/clinchem.2005.049445
- Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA (2017) LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev* 276:80–96. doi: 10.1111/imr.12519
- Antolovic D, Galindo L, Carstens A, et al (2010a) Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies. *BMC Biotechnol* 10:35. doi: 10.1186/1472-6750-10-35

- Antolovic D, Galindo L, Carstens A, et al (2010b) Rheeseatrccehraorticgleeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies. 8
- Aparicio T (2018) Immunothérapie dans les cancers digestifs. 8
- Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, et al (2016) Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17:1248–1260. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30122-X
- Atkins MB, Tarhini A, Rael M, et al (2019) Comparative efficacy of combination immunotherapy and targeted therapy in the treatment of *BRAF* -mutant advanced melanoma: a matching-adjusted indirect comparison. *Immunotherapy* 11:617–629. doi: 10.2217/imt-2018-0208
- Awe JA, Saranchuk J, Drachenberg D, Mai S (2017) Filtration-based enrichment of circulating tumor cells from all prostate cancer risk groups. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 35:300–309. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.12.008
- Bailey, Martin (2019) Insights on CTC Biology and Clinical Impact Emerging from Advances in Capture Technology. *Cells* 8:553. doi: 10.3390/cells8060553
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, et al (2009) Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol* 27:6199–6206. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4799
- Barrière G, Riouallon A, Renaudie J, et al (2012) Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis. *BMC Cancer* 12:. doi: 10.1186/1471-2407-12-114
- Benali-Furet N, Ye F, Ezaoui S, et al (2013) Ex-vivo expansion of CTCs in culture isolated by size from patients with melanoma. 1
- Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D, Mamessier E (2016) The PD1/PDL1 axis, a promising therapeutic target in aggressive breast cancers. *Oncoimmunology* 5:e1085148. doi: 10.1080/2162402X.2015.1085148
- Bertucci F, Finetti P, Perrot D, et al (2017) PDL1 expression is a poor-prognosis factor in soft-tissue sarcomas. *Oncoimmunology* 6:. doi: 10.1080/2162402X.2016.1278100
- Bidard F-C, Brain E, Jacot W, et al (2016) First line hormone therapy vs chemotherapy for HR+ HER2- metastatic breast cancer in the phase III STIC CTC trial: clinical choice and validity of CTC count. *Ann Oncol* 27:. doi: 10.1093/annonc/mdw365.05
- Bidard FC, Ferrand FR, Huguet F, et al (2012) Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology. *Crit Rev Oncol Hematol* 82:103–115. doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.05.008
- Bidard FC, Huguet F, Louvet C, et al (2013) Circulating tumor cells in locally advanced pancreatic adenocarcinoma: the ancillary CirCe 07 study to the LAP 07 trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 24:2057–2061. doi: 10.1093/annonc/mdt176

- Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, et al (2014) Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 15:406–414. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70069-5
- Bünger S, Zimmermann M, Habermann JK (2015) Diversity of assessing circulating tumor cells (CTCs) emphasizes need for standardization: a CTC Guide to design and report trials. *Cancer Metastasis Rev* 34:527–545. doi: 10.1007/s10555-015-9582-0
- Burbidge TE, Bastian BC, Guo D, et al (2019) Association of Indoor Tanning Exposure with Age at Melanoma Diagnosis and BRAF V600E Mutations. *J Natl Cancer Inst.* doi: 10.1093/jnci/djz048
- Buscail E, Chiche L, Laurent C, et al (2019) Tumor-proximal liquid biopsy to improve diagnostic and prognostic performances of circulating tumor cells. *Mol Oncol.* doi: 10.1002/1878-0261.12534
- Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Herreros-Pomares A, Camps C (2016) Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer—which one will win? *Transl Lung Cancer Res* 5:466–482. doi: 10.21037/tlcr.2016.10.02
- Campillo N, Falcones B, Otero J, et al (2019) Differential Oxygenation in Tumor Microenvironment Modulates Macrophage and Cancer Cell Crosstalk: Novel Experimental Setting and Proof of Concept. *Front Oncol* 9:43. doi: 10.3389/fonc.2019.00043
- Cao H, Xu E, Liu H, et al (2015) Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract* 211:557–569. doi: 10.1016/j.prp.2015.05.010
- Cauley CE, Pitman MB, Zhou J, et al (2015) Circulating Epithelial Cells in Patients with Pancreatic Lesions: Clinical and Pathologic Findings. *J Am Coll Surg* 221:699–707. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.05.014
- Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, et al (2015) Establishment and Characterization of a Cell Line from Human Circulating Colon Cancer Cells. *Cancer Res* 75:892–901. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2613
- Cerezo M, Guemiri R, Druillennec S, et al (2018) Translational control of tumor immune escape via the eIF4F–STAT1–PD-L1 axis in melanoma. *Nat Med* 24:1877–1886. doi: 10.1038/s41591-018-0217-1
- Chaffer CL, Weinberg RA (2011) A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* 331:1559–1564. doi: 10.1126/science.1203543
- Chen C-L, Mahalingam D, Osmulski P, et al (2013) Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *The Prostate* 73:813–826. doi: 10.1002/pros.22625
- Chudasama D, Barr J, Beeson J, et al (2017a) Detection of Circulating Tumour Cells and Survival of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res* 37:169–174. doi: 10.21873/anticancer.11302

- Chudasama D, Burnside N, Beeson J, et al (2017b) Perioperative detection of circulating tumour cells in patients with lung cancer. *Oncol Lett* 14:1281–1286. doi: 10.3892/ol.2017.6366
- Chudasama D, Rice A, Anikin V, et al (2015a) Circulating Tumour Cells in Patients with Malignant Lung Tumors Undergoing Radio-frequency Ablation. *ANTICANCER Res* 4
- Chudasama D, Rice A, Soppa G, Anikin V (2015b) Circulating tumour cells in patients with lung cancer undergoing endobronchial cryotherapy. *Cryobiology* 71:161–163. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.06.001
- Coco S, Alama A, Vanni I, et al (2017) Circulating Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells as Prognostic and Predictive Biomarkers in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with First-Line Chemotherapy. *Int J Mol Sci* 18:1035. doi: 10.3390/ijms18051035
- Coget J, Borrini F, Susman S, Sabourin J-C (2014) Colorectal carcinomas in 2014: The search for powerful prognostic markers is still on the go! *Cancer Biomark* 14:145–150. doi: 10.3233/CBM-130378
- Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al (2008) Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 26:3213–3221. doi: 10.1200/JCO.2007.15.8923
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al (2005) Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 65:10946–10951. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2018
- Coumans FAW, Doggen CJM, Attard G, et al (2010) All circulating EpCAM+CK+CD45-objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 21:1851–1857. doi: 10.1093/annonc/mdq030
- Cristofanilli M, Pierga J-Y, Reuben J, et al (2019) The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit Rev Oncol Hematol* 134:39–45. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.12.004
- Cristofanilli M, Stopeck A, Reuben JM (2004) Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 11
- Croset M, Kan C, Clézardin P (2015) Tumour-derived miRNAs and bone metastasis. *BoneKEy Rep* 4:. doi: 10.1038/bonekey.2015.56
- Croset M, Pantano F, Kan CWS, et al (2018) miRNA-30 Family Members Inhibit Breast Cancer Invasion, Osteomimicry, and Bone Destruction by Directly Targeting Multiple Bone Metastasis-Associated Genes. *Cancer Res* 78:5259–5273. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3058
- Danila DC, Samoila A, Patel C, et al (2016) Clinical validity of detecting circulating tumor cells by AdnaTest assay compared to direct detection of tumor mRNA in stabilized whole

- blood, as a biomarker predicting overall survival for metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *Cancer J Sudbury Mass* 22:315–320. doi: 10.1097/PPO.0000000000000220
- de Albuquerque A, Kubisch I, Breier G, et al (2012) Multimarker gene analysis of circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: a feasibility study. *Oncology* 82:3–10. doi: 10.1159/000335479
- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al (2008) Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 14:6302–6309. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0872
- De Giorgi V, Pinzani P, Salvianti F, et al (2010) Application of a Filtration- and Isolation-by-Size Technique for the Detection of Circulating Tumor Cells in Cutaneous Melanoma. *J Invest Dermatol* 130:2440–2447. doi: 10.1038/jid.2010.141
- De Palma M, Venneri MA, Galli R, et al (2005) Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8:211–226. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.002
- De Roeck A, Cayrefourcq L, Garcia C, et al (2015) Mélanomes et cellules tumorales circulantes : intérêt de l'EPISPOT PS100. *Ann Dermatol Vénéréologie* 142:S518–S519. doi: 10.1016/j.annder.2015.10.207
- De Souza LM, Robertson BM, Robertson GP (2017) Future of circulating tumor cells in the melanoma clinical and research laboratory settings. *Cancer Lett* 392:60–70. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.023
- DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL (1988) Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44:837–845
- Deneve E, Riethdorf S, Ramos J, et al (2013) Capture of Viable Circulating Tumor Cells in the Liver of Colorectal Cancer Patients. *Clin Chem* 59:1384–1392. doi: 10.1373/clinchem.2013.202846
- Denis JA, Patroni A, Guillerme E, et al (2016) Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict *KRAS* mutations before surgery. *Mol Oncol* 10:1221–1231. doi: 10.1016/j.molonc.2016.05.009
- Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, et al (2011) A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells. *ANTICANCER Res* 15
- Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, et al (2003) Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 36:59–72. doi: 10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x
- Drapkin BJ, George J, Christensen CL, et al (2018) Genomic and Functional Fidelity of Small Cell Lung Cancer Patient-Derived Xenografts. *Cancer Discov* 8:600–615. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0935

- El-Heliebi A, Kroneis T, Zöhrer E, et al (2013) Are morphological criteria sufficient for the identification of circulating tumor cells in renal cancer? *J Transl Med* 11:214. doi: 10.1186/1479-5876-11-214
- Fargnoli MC, Gandini S, Peris K, et al (2010) MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 46:1413–1420. doi: 10.1016/j.ejca.2010.01.027
- Fina E, Necchi A, Bottelli S, et al (2017) Detection of Circulating Tumour Cells in Urothelial Cancers and Clinical Correlations: Comparison of Two Methods. *Dis Markers* 2017:1–11. doi: 10.1155/2017/3414910
- Fina E, Reduzzi C, Motta R, et al (2015) Did Circulating Tumor Cells Tell us all they Could? The Missed Circulating Tumor Cell Message in Breast Cancer. *Int J Biol Markers* 30:429–433. doi: 10.5301/jbm.5000166
- Fiorelli A, Accardo M, Carelli E, et al (2015) Circulating Tumor Cells in Diagnosing Lung Cancer: Clinical and Morphologic Analysis. *Ann Thorac Surg* 99:1899–1905. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.11.049
- Freidin MB, Tay A, Freydina DV, et al (2014) An assessment of diagnostic performance of a filter-based antibody-independent peripheral blood circulating tumour cell capture paired with cytomorphologic criteria for the diagnosis of cancer. *Lung Cancer* 85:182–185. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.05.017
- Gao D, Vela I, Sboner A, et al (2014) Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer. *Cell* 159:176–187. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.016
- Gao X, Zhang M, Tang Y, Liang X (2017) Cancer cell dormancy: mechanisms and implications of cancer recurrence and metastasis. *OncoTargets Ther* Volume 10:5219–5228. doi: 10.2147/OTT.S140854
- Gkoutela S, Castro-Giner F, Szczerba BM, et al (2019) Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell* 176:98–112.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.046
- Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al (2006) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 44:99–106. doi: 10.1136/jmg.2006.043802
- Haenssle HA, Fink C, Schneiderbauer R, et al (2018) Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists. *Ann Oncol* 29:1836–1842. doi: 10.1093/annonc/mdy166
- Hall CS, Ross M, Bowman Bauldry JB, et al (2018) Circulating Tumor Cells in Stage IV Melanoma Patients. *J Am Coll Surg* 227:116–124. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2018.04.026
- Hamilton G, Burghuber O, Zeillinger R (2015) Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer: Ex Vivo Expansion. *Lung* 193:451–452. doi: 10.1007/s00408-015-9725-7

- Hamilton G, Rath B, Klameth L, Hochmair MJ (2016) Small cell lung cancer: Recruitment of macrophages by circulating tumor cells. *OncoImmunology* 5:e1093277. doi: 10.1080/2162402X.2015.1093277
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR (2019) Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 20:71–88. doi: 10.1038/s41576-018-0071-5
- Helgadottir H, Höiom V, Jönsson G, et al (2014) High risk of tobacco-related cancers in *CDKN2A* mutation-positive melanoma families. *J Med Genet* 51:545–552. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102320
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al (2007) Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* 1:313–323. doi: 10.1016/j.stem.2007.06.002
- Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, et al (2016) Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17:1558–1568. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30366-7
- Hong Y, Fang F, Zhang Q (2016) Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol* 49:2206–2216. doi: 10.3892/ijo.2016.3747
- Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, et al (2011) Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 13:. doi: 10.1186/bcr2896
- Kandel M, Allayous C, Dalle S, et al (2018) Update of survival and cost of metastatic melanoma with new drugs: Estimations from the MelBase cohort. *Eur J Cancer* 105:33–40. doi: 10.1016/j.ejca.2018.09.026
- Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, et al (2012) Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 14:. doi: 10.1186/bcr3099
- Khoja L, Backen A, Sloane R, et al (2012) A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. *Br J Cancer* 106:508–516. doi: 10.1038/bjc.2011.545
- Khoja L, Lorigan P, Zhou C, et al (2013) Biomarker Utility of Circulating Tumor Cells in Metastatic Cutaneous Melanoma. *J Invest Dermatol* 133:1582–1590. doi: 10.1038/jid.2012.468
- Khoja L, Shenjere P, Hodgson C, et al (2014) Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 24:40–46. doi: 10.1097/CMR.0000000000000025

- Kim SA, Tai C-Y, Mok L-P, et al (2011) Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci* 108:9857–9862. doi: 10.1073/pnas.1019003108
- Kolostova K, Bobek V, Cegan M (2014) Circulating tumour cells in patients with urothelial tumours: Enrichment and in vitro culture. *Can Urol Assoc J* 8:715. doi: 10.5489/cuaj.1978
- Kruspe S, Dickey DD, Urak KT, et al (2017) Rapid and Sensitive Detection of Breast Cancer Cells in Patient Blood with Nuclease-Activated Probe Technology. *Mol Ther - Nucleic Acids* 8:542–557. doi: 10.1016/j.omtn.2017.08.004
- Kulasinghe A, Kenny L, Perry C, et al (2016a) Impact of label-free technologies in head and neck cancer circulating tumour cells. *Oncotarget* 7:. doi: 10.18632/oncotarget.12086
- Kulasinghe A, Perry C, Warkiani ME, et al (2016b) Short term *ex-vivo* expansion of circulating head and neck tumour cells. *Oncotarget* 7:. doi: 10.18632/oncotarget.11159
- Kulemann B, Liss AS, Warshaw AL, et al (2016) KRAS mutations in pancreatic circulating tumor cells: a pilot study. *Tumor Biol* 37:7547–7554. doi: 10.1007/s13277-015-4589-2
- Kulemann B, Pitman MB, Liss AS, et al (2015) Circulating Tumor Cells Found in Patients With Localized and Advanced Pancreatic Cancer: *Pancreas* 44:547–550. doi: 10.1097/MPA.0000000000000324
- Kulemann B, Rösch S, Seifert S, et al (2017) Pancreatic cancer: Circulating Tumor Cells and Primary Tumors show Heterogeneous KRAS Mutations. *Sci Rep* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-04601-z
- Kunter U, Buer J, Probst M, et al (1996) Peripheral Blood Tyrosinase Messenger RNA Detection and Survival in Malignant Melanoma. *JNCI J Natl Cancer Inst* 88:590–594. doi: 10.1093/jnci/88.9.590
- Kurihara T, Itoi T, Sofuni A, et al (2008) Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 15:189–195. doi: 10.1007/s00534-007-1250-5
- Kuvendjiska J, Bronsert P, Martini V, et al (2019) Non-Metastatic Esophageal Adenocarcinoma: Circulating Tumor Cells in the Course of Multimodal Tumor Treatment. *Cancers* 11:397. doi: 10.3390/cancers11030397
- Lapenna A, De Palma M, Lewis CE (2018) Perivascular macrophages in health and disease. *Nat Rev Immunol* 18:689–702. doi: 10.1038/s41577-018-0056-9
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645. doi: 10.1038/367645a0
- Latimer NR, Bell H, Abrams KR, et al (2016) Adjusting for treatment switching in the METRIC study shows further improved overall survival with trametinib compared with chemotherapy. *Cancer Med* 5:806–815. doi: 10.1002/cam4.643

- Li J, Fu W, Zhang W, Li P (2018) High Number of Circulating Tumor Cells Predicts Poor Survival of Cutaneous Melanoma Patients in China. *Med Sci Monit* 24:324–331. doi: 10.12659/MSM.904770
- Li WW, Li VW, Hutnik M, Chiou AS (2012) Tumor Angiogenesis as a Target for Dietary Cancer Prevention. *J Oncol* 2012:1–23. doi: 10.1155/2012/879623
- Lim CT, Hoon DSB (2014) Circulating tumor cells: Cancer’s deadly couriers. *Phys Today* 67:26. doi: 10.1063/PT.3.2275
- Lin HK, Zheng S, Williams AJ, et al (2010) Portable Filter-Based Microdevice for Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 16:5011–5018. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1105
- Lopresti A, Malergue F, Bertucci F, et al (2019) Sensitive and easy screening for circulating tumor cells by flow cytometry. *JCI Insight* 5:. doi: 10.1172/jci.insight.128180
- Maheswaran S, Haber DA (2015) Ex Vivo Culture of CTCs: An Emerging Resource to Guide Cancer Therapy. *Cancer Res* 75:2411–2415. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0145
- Maio M, Lewis K, Demidov L, et al (2018) Adjuvant vemurafenib in resected, BRAF V600 mutation-positive melanoma (BRIM8): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 19:510–520. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30106-2
- Mamessier E, Birnbaum DJ, Finetti P, et al (2018) CMTM6 stabilizes PD-L1 expression and refines its prognostic value in tumors. *Ann Transl Med* 6:. doi: 10.21037/atm.2017.11.26
- Manca G, Romanini A, Rubello D, et al (2014) A critical reappraisal of false negative sentinel lymph node biopsy in melanoma. 58:11
- Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704–715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027
- Marcucci F, Rumio C, Lefoulon F (2016) Anti-Cancer Stem-like Cell Compounds in Clinical Development – An Overview and Critical Appraisal. *Front Oncol* 6:. doi: 10.3389/fonc.2016.00115
- Mascalchi M, Falchini M, Maddau C, et al (2016) Prevalence and number of circulating tumour cells and microemboli at diagnosis of advanced NSCLC. *J Cancer Res Clin Oncol* 142:195–200. doi: 10.1007/s00432-015-2021-3
- Mascalchi M, Maddau C, Sali L, et al (2017) Circulating tumor cells and microemboli can differentiate malignant and benign pulmonary lesions. *J Cancer* 8:2223–2230. doi: 10.7150/jca.18418
- Mohme M, Riethdorf S, Pantel K (2017) Circulating and disseminated tumour cells — mechanisms of immune surveillance and escape. *Nat Rev Clin Oncol* 14:155–167. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.144

- Morbelli S, Alama A, Ferrarazzo G, et al (2017) Circulating Tumor DNA Reflects Tumor Metabolism Rather Than Tumor Burden in Chemotherapy-Naive Patients with Advanced Non–Small Cell Lung Cancer: ¹⁸F-FDG PET/CT Study. *J Nucl Med* 58:1764–1769. doi: 10.2967/jnumed.117.193201
- Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al (2014) Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med* 370:599–609. doi: 10.1056/NEJMoa1310460
- Mu Z, Benali-Furet N, Uzan G, et al (2016) Detection and Characterization of Circulating Tumor Associated Cells in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 17:1665. doi: 10.3390/ijms17101665
- Mu Z, Wang C, Ye Z, et al (2015) Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 154:563–571. doi: 10.1007/s10549-015-3636-4
- Nicolazzo C, Colangelo L, Corsi A, et al (2018) Liquid Biopsy in Rare Cancers: Lessons from Hemangiopericytoma. *Anal Cell Pathol* 2018:1–4. doi: 10.1155/2018/9718585
- Nicolazzo C, Raimondi C, Francescangeli F, et al (2017) EpCAM-Expressing Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer. *Int J Biol Markers* 32:415–420. doi: 10.5301/ijbm.5000284
- Pailler E, Oulhen M, Billiot F, et al (2016) Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells. *BMC Cancer* 16:477. doi: 10.1186/s12885-016-2461-4
- Palmirotta R, Lovero D, Silvestris E, et al (2017) Next-generation Sequencing (NGS) Analysis on Single Circulating Tumor Cells (CTCs) with No Need of Whole-genome Amplification (WGA). *Cancer Genomics Proteomics* 14:173–179. doi: 10.21873/cgp.20029
- Pantel K, Alix-Panabieres C (2016) Functional Studies on Viable Circulating Tumor Cells. *Clin Chem* 62:328–334. doi: 10.1373/clinchem.2015.242537
- Pantel K, Alix-Panabières C (2019) Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 16:409. doi: 10.1038/s41571-019-0187-3
- Pantel K, Alix-Panabières C (2013) Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 73:6384–6388. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2030
- Pinzani P, Scatena C, Salvianti F, et al (2013) Detection of Circulating Tumor Cells in Patients With Adrenocortical Carcinoma: A Monocentric Preliminary Study. *J Clin Endocrinol Metab* 98:3731–3738. doi: 10.1210/jc.2013-1396
- Pisapia P, Lozano MD, Vigliar E, et al (2017) ALK and ROS1 testing on lung cancer cytologic samples: Perspectives: *ALK* and *ROS1* Testing on Cytology. *Cancer Cytopathol* 125:817–830. doi: 10.1002/cncy.21899

- Praharaj PP, Bhutia SK, Nagrath S, et al (2018) Circulating tumor cell-derived organoids: Current challenges and promises in medical research and precision medicine. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1869:117–127. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.12.005
- Ramirez AB, Bhat R, Sahay D, et al (2019) Circulating tumor cell investigation in breast cancer patient-derived xenograft models by automated immunofluorescence staining, image acquisition, and single cell retrieval and analysis. *BMC Cancer* 19:. doi: 10.1186/s12885-019-5382-1
- Robert C, Schachter J, Long GV, et al (2015) Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 372:2521–2532. doi: 10.1056/NEJMoA1503093
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al (2011) Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 364:2517–2526. doi: 10.1056/NEJMoA1104621
- Rosenbaum MW, Cauley CE, Kulemann B, et al (2017) Cytologic characteristics of circulating epithelioid cells in pancreatic disease: CECs in Pancreatic Disease. *Cancer Cytopathol* 125:332–340. doi: 10.1002/cncy.21841
- Sample A, He Y-Y (2018) Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 34:13–24. doi: 10.1111/phpp.12329
- Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, et al (2015) Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 33:1889–1894. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2736
- Schatton T, Frank MH (2007) REVIEW ARTICLE: Cancer stem cells and human malignant melanoma: Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:39–55. doi: 10.1111/j.1755-148X.2007.00427.x
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11:426
- Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al (2014) Circulating Tumor Cells and Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol* 32:3483–3489. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2561
- Smith B, Selby P, Southgate J, et al (1991) Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet Lond Engl* 338:1227–1229
- Soura E, Eliades PJ, Shannon K, et al (2016) Hereditary melanoma: Update on syndromes and management. *J Am Acad Dermatol* 74:411–420. doi: 10.1016/j.jaad.2015.08.037
- Stott SL, Hsu C-H, Tsukrov DI, et al (2010) Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci* 107:18392–18397. doi: 10.1073/pnas.1012539107
- Tang C, Zhu P, Li S, et al (2018) Blood-based biopsies—clinical utility beyond circulating tumor cells. *Cytometry A* 93:1246–1250. doi: 10.1002/cyto.a.23573

- Tetzlaff F, Fischer A (2018) Control of Blood Vessel Formation by Notch Signaling. *Adv Exp Med Biol* 1066:319–338. doi: 10.1007/978-3-319-89512-3_16
- Thurston G, Kitajewski J (2008) VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 99:1204–1209. doi: 10.1038/sj.bjc.6604484
- Tzika E, Moura B, Romano E, Michielin O (2013) Nouvelles armes thérapeutiques contre le mélanome de stade IV. *Rev Médicale Suisse* 4
- van den Berg DLC, Snoek T, Mullin NP, et al (2010) An Oct4-Centered Protein Interaction Network in Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 6:369–381. doi: 10.1016/j.stem.2010.02.014
- Vargas G, Bouchet M, Bouazza L, et al (2019) $ERR\alpha$ promotes breast cancer cell dissemination to bone by increasing RANK expression in primary breast tumors. *Oncogene* 38:950–964. doi: 10.1038/s41388-018-0579-3
- Vegas H, André T, Bidard F-C, et al (2012) Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology. *Bull Cancer (Paris)* 535–544. doi: 10.1684/bdc.2012.1581
- Venneri MA, Palma MD, Ponzoni M, et al (2007) Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109:5276–5285. doi: 10.1182/blood-2006-10-053504
- Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, et al (2005) Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytometry A* 67A:144–150. doi: 10.1002/cyto.a.20159
- Vuagnat P, Champiat S (2018) Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux. *MISE AU POINT* 6
- Wang R, Chu GCY, Mrdenovic S, et al (2016) Cultured circulating tumor cells and their derived xenografts for personalized oncology. *Asian J Urol* 3:240–253. doi: 10.1016/j.ajur.2016.08.005
- Wang Y, Cui J, Wang L (2019) Patient-derived xenografts: a valuable platform for clinical and preclinical research in pancreatic cancer. *Chin Clin Oncol* 8:17–17. doi: 10.21037/cco.2019.02.04
- Wark L, Klonisch T, Awe J, et al (2017) Dynamics of three-dimensional telomere profiles of circulating tumor cells in patients with high-risk prostate cancer who are undergoing androgen deprivation and radiation therapies. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 35:112.e1–112.e11. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.10.018
- Wechsler (2015) Cellules tumorales circulantes des cancers solides - Janine Wechsler
- Wechsler J (2018) Les biopsies liquides : quel est leur apport en oncologie ? *Rev Médecine Interne* 39:886–890. doi: 10.1016/j.revmed.2018.04.012
- Weidele K, Stojanović N, Feliciello G, et al (2019) Microfluidic enrichment, isolation and characterization of disseminated melanoma cells from lymph node samples. *Int J Cancer* 145:232–241. doi: 10.1002/ijc.32092

- Williams ES, Rodriquez-Bravo V, Chippada-Venkata U, et al (2015) Generation of Prostate Cancer Patient Derived Xenograft Models from Circulating Tumor Cells. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/53182
- Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC (2011) The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer* 11:512–522. doi: 10.1038/nrc3080
- Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al (2017) Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 377:1345–1356. doi: 10.1056/NEJMoa1709684
- Wróbel S, Przybyło M, Stępień E (2019) The Clinical Trial Landscape for Melanoma Therapies. *J Clin Med* 8:368. doi: 10.3390/jcm8030368
- Yanagita M, Luke JJ, Hodi FS, et al (2018) Isolation and characterization of circulating melanoma cells by size filtration and fluorescent in-situ hybridization: *Melanoma Res* 28:89–95. doi: 10.1097/CMR.0000000000000431
- Yang M-H, Imrali A, Heeschen C (2015) Circulating cancer stem cells: the importance to select. *Chin J Cancer Res* 27:13
- Yu M, Bardia A, Aceto N, et al (2014) Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 345:216–220. doi: 10.1126/science.1253533
- Zhang J, Cunningham JJ, Brown JS, Gatenby RA (2017) Integrating evolutionary dynamics into treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Nat Commun* 8:1816. doi: 10.1038/s41467-017-01968-5
- Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, et al (2013) The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis. *Sci Transl Med* 5:180ra48-180ra48. doi: 10.1126/scitranslmed.3005109
- Zhu Z, Qiu S, Shao K, Hou Y (2018) Progress and challenges of sequencing and analyzing circulating tumor cells. *Cell Biol Toxicol* 34:405–415. doi: 10.1007/s10565-017-9418-5

Titre : Expansion *ex vivo* des Cellules Tumorales Circulantes comme modèle de pharmacologie prédictive des cancers

Mots clés : Cellules Tumorales Circulantes, CTC, Cancer, Culture 3D, Culture *ex vivo*

Résumé : L'émergence des thérapies ciblées dans le traitement des cancers a rendu indispensable la mise au point de marqueurs plus spécifiques et sensibles pour la surveillance des patients. Dès le stade invasif, des cellules tumorales peuvent passer dans le sang où elles constituent les Cellules Tumorales Circulantes (CTC). Les CTC sont accessibles par une simple prise de sang, évitant les biopsies invasives. De plus, elles représentent le seul matériel tumoral résiduel après traitement. C'est la raison pour laquelle les CTC constituent un axe de recherche très actif avec plus de 400 essais cliniques incluant ces cellules comme biomarqueurs. Ces essais apportent des renseignements importants sur le risque de récurrence ou de progression métastatique, et ont pour objectif de pouvoir gérer en temps réel la conduite thérapeutique.

Cependant, les CTC potentiellement métastatiques ne représentent qu'une fraction très minoritaire de ces cellules circulantes. Les technologies existantes, essentiellement basées sur une simple numération, ne suffisent pas pour guider efficacement la stratégie thérapeutique. Ce projet a évalué un ensemble de critères pouvant être utile pour la prise de décisions thérapeutiques pertinentes, adaptées à chaque patient, et la mesure de l'efficacité des traitements. Ce projet sera centré sur le mélanome. Les stades d'évolution de ce cancer sont bien définis, et dans les stades avancés, le risque de développer des métastases est très élevé et la détection précoce de celles-ci est un enjeu important. Par ailleurs, ce cancer bénéficie de rapides progrès thérapeutiques, les CTC constituent donc un outil intéressant pour tester l'efficacité de ces nouveaux traitements.

Title : *Ex vivo* expansion of Circulating Tumor Cells as pharmacology model to predict cancer

Keywords : Circulating Tumor Cells, CTC, Cancer, 3D culture, *ex vivo*

Abstract: The emergence of targeted therapies in cancer treatment has made essential the development of more specific and sensitive markers for monitoring patients. At the invasive stage, tumor cells can pass to blood. These cells are called Circulating Tumor Cells (CTC). CTCs are accessible through a simple blood test, avoiding invasive biopsies. Moreover, they represent the only residual tumor after treatment. It is why CTCs are a very active center of research with more than 400 clinical trials involving these cells as biomarkers. These tests provide important information on the risk of recurrence or metastatic progression and aim to manage in real time the therapeutic conduct.

But the CTC potentially metastatic represents only a fraction very minority of these circulating cells. Existing technologies, mainly based on simple enumeration, are not enough to effectively guide therapeutic strategy. This project has evaluated a set of criteria to make appropriate therapeutic decisions, adapted to each patient, and able to measure the effectiveness of treatments. This project will focus on melanoma. Evolution stages of this cancer are well defined, and in advanced stages, the risk of developing metastases is very high and the early detection is an important issue. Moreover, CTC could be is an interesting tool to test the effectiveness of these new treatments.