



*Intergroupe Francophone
de Cancérologie Thoracique*

5^{ème} Journée Médecine Translationnelle et cancer du poumon

Nouvelles cibles, nouveaux espoirs, nouveaux défis

**Paris, 17 janvier 2014
Espace Paris Victoire
09h30 - 17h30**

**Inscriptions et programme
www.ifct.fr**



Avec le soutien institutionnel de



Application théranostique de la détection cytopathologique des cellules tumorales circulantes isolées par ISET® et de leur caractérisation moléculaire

Theranostic application of cytopathological detection of circulating tumor cells isolated by ISET® and of their molecular characterization

Sophie Laget*, Patrizia Paterlini-Bréchet**

» Actuellement, la détection des biomarqueurs à valeur théranostique est conduite sur des échantillons de tissu tumoral, diagnostiqués par analyse pathologique. Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont une source de matériel tumoral obtenu de façon non invasive et potentiellement pertinente pour guider les choix thérapeutiques et détecter de manière précoce les résistances aux traitements. La méthodologie diagnostique de référence appliquée aux échantillons prélevés de manière invasive peut également être réalisée sur les CTC extraites du sang par la méthode ISET® (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells/trophoblastic cells). Cela comprend l'analyse cytopathologique, pour identifier les cellules malignes, ainsi que leur possible caractérisation immunologique et/ou moléculaire. En particulier, il est possible de rechercher, dans les CTC, la présence de protéines, telles que la vimentine, indiquant une malignité accrue et, donc, un risque métastatique plus important, et de biomarqueurs théranostiques, tels que les mutations des gènes *KRAS*, *EGFR*, *ALK* et *HER2*, prédictifs de la réponse au traitement.

Mots-clés : Cellules tumorales circulantes – ISET® – Cytopathologie – Théranostic – Oncogénétique.

Currently, the detection of theranostic biomarkers is performed on samples of tumor tissue, and diagnosed by pathological analysis. Circulating Tumor Cells (CTCs) are a noninvasive source of tumor material potentially relevant to guide therapeutic choices and for early detection of resistance to therapy. The reference diagnostic methodology, which is currently applied to tumor samples, can also be applied to CTCs extracted from blood by the ISET® (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells/trophoblastic cells) method. This includes a cytopathological analysis to identify the malignant cells, as well as their possible immunological and/or molecular characterization. In particular, it is possible to assess, in the CTC, the presence of proteins, such as vimentin, indicating their increased metastatic potential, and of theranostic biomarkers, such as mutations of *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, and *HER2* genes, predictive of response to therapy.

Keywords: Circulating tumor cells – ISET® – Cytopathology – Theranostics – Oncogenetics.

Biologie des CTC et impact sur la méthodologie d'isolement et de détection

Le détachement et la circulation sanguine spontanée de cellules cancéreuses (cellules tumorales circulantes [CTC]) constituent la première étape de la phase invasive du cancer (1-3). Du point de vue cytobiologique, l'appellation "CTC" regroupe en fait des cellules tumorales de natures très différentes : des cellules tumorales épithéliales, mésenchymateuses, à phénotype hybride épithélial et mésenchymateux, souches (ou initiatrices

de tumeurs) et des microembolus tumoraux (Circulating Tumor Microemboli [CTM]) [1].

L'invasion a longtemps été considérée comme un phénomène tardif dans le développement tumoral, or, sur la base d'études génétiques, épidémiologiques et expérimentales, il apparaît aujourd'hui que, chez l'animal dans le cas des cancers invasifs, la circulation des CTC peut commencer très tôt : dès le stade de carcinome in situ, avant même que la tumeur ou les micrométastases ne soient détectables par imagerie (1, 4). De plus, les cellules les plus invasives seraient 100 fois plus concentrées parmi les CTC qu'au sein de la tumeur primitive (4).

* Rarecells Diagnostics, Paris.

** Auteur correspondant. Unité Inserm U807, université Paris-Descartes, hôpital Broussais, pavillon Leriche, Paris.

Application théranostique de la détection cytopathologique des cellules tumorales circulantes isolées par ISET® et de leur caractérisation moléculaire

Le compartiment des CTC pourrait donc être "enrichi" en cellules invasives et jouer un rôle clé dans l'évolution métastatique du cancer, la réponse au traitement et l'émergence de clones cellulaires résistants à la thérapie. Ce caractère d'acteur de la métastase distingue les CTC d'un autre marqueur sanguin, l'ADN tumoral circulant, qui ne peut pas être acteur mais seulement, éventuellement, indicateur tumoral.

Isolement et détection des CTC

Considérations méthodologiques

Du point de vue technique, le domaine des CTC inclut 2 grands défis : sensibilité et spécificité. Les CTC sont des cellules extrêmement rares, de l'ordre, dans un millilitre de sang, de quelques-unes mélangées à environ 10 millions de leucocytes et 5 milliards d'érythrocytes (1). La sensibilité de leur détection est un facteur clé pour établir leur valeur pronostique chez les patients sans métastases, et pour obtenir suffisamment de cellules pour une utilisation théranostique. La spécificité est également un facteur clé du domaine des CTC, car il faut les distinguer des cellules épithéliales non tumorales (normales ou simplement atypiques), des cellules endothéliales et des cellules souches non tumorales. L'identification diagnostique des CTC est essentielle quand on veut les utiliser comme matériel cible pour rechercher les marqueurs théranostiques (1).

Une quarantaine de méthodes existent pour extraire du sang et détecter les CTC (5), mais peu sont reconnues pour leur sensibilité par des publications indépendantes. On distingue 2 approches différentes pour l'enrichissement du sang des CTC comme pour l'identification des CTC : avec et sans utilisation d'anticorps. Compte tenu de l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'utilisation d'anticorps lors de l'enrichissement ou de l'identification des CTC conduit à des biais (faux positifs et faux négatifs), car nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'anticorps "diagnostiques" pour les cellules tumorales (1, 5).

Principe et propriétés de la méthode ISET®

La méthode ISET® (*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells/trophoblastic cells*, Rarecells Diagnostics, France) repose sur un critère cytopathologique classique : la plus grande taille des cellules tumorales des cancers solides (diamètre supérieur à 16 µm) par rapport aux cellules sanguines. La technologie ISET® permet l'élimination rapide, par filtration, de la majorité des leucocytes sanguins (en moyenne 8 µm de diamètre) et la récupération des CTC enrichies sur un filtre sans utilisation d'anticorps (1) [figure, p. 196].

L'instrument et ses consommables (tampon de filtration, bloc contenant le filtre), qui ont fait récemment l'objet du marquage CE IVD (*In Vitro Diagnostic*), permettent de maîtriser une combinaison unique de plus de 30 paramètres, qui sont décisifs pour ses performances, aussi bien en matière de sensibilité que de collecte de CTC intactes en vue de l'analyse cytopathologique, immunologique et moléculaire (1, 6, 11, 14).

La possibilité de traiter efficacement 10 ml de sang et d'isoler les CTC sans étapes intermédiaires autres que la dilution du sang a permis d'obtenir une sensibilité particulièrement élevée in vitro et cliniquement : une seule cellule tumorale dans 10 ml de sang (1, 6, 7). Ainsi, il est possible de détecter des CTC chez des patients dont le cancer est localisé (7). ISET® est aussi capable d'isoler du sang les cellules trophoblastiques circulantes, qui sont rarissimes (8).

Par sa capacité à isoler les CTC intactes, ISET® est une méthode validée en recherche clinique permettant le diagnostic cytopathologique des CTC et des CTM par les critères cytopathologiques classiques utilisés dans les analyses "Pap test" et des liquides biologiques ou ponctions tissulaires (9). Par ailleurs, les microembolies tumorales, des agrégats de CTC à potentiel invasif très élevé, sont efficacement isolés par la méthode ISET®, et leur présence semble corrélée à un mauvais pronostic (6, 10, 11).

Y.C. Ma et al. ont récemment fait la synthèse des différents avantages d'ISET® et des études réalisées avec ISET® (7) : des CTC ont été détectées et étudiées chez des patients ayant des cancers d'origine épithéliale et touchant différents organes : foie, sein, prostate, côlon et rectum, rein, tête et cou, pancréas, poumon (à petites cellules et non à petites cellules). Il a également été possible d'identifier des CTC chez des patients ayant un sarcome ainsi qu'un mélanome cutané ou uvéal (7). Enfin, ISET® permet également la filtration du sang de rat (7) et le traitement de petits volumes de sang.

Comparaison des méthodes ISET® et CellSearch®

CellSearch® (Veridex, États-Unis) est la méthode pour CTC la plus diffusée. Comme la plupart des techniques immunologiques, elle se base sur la capture de cellules épithéliales avec des anticorps dirigés contre un antigène membranaire, l'EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*). Elle est donc spécifique des cellules épithéliales circulantes mais non diagnostique des CTC (11). Cette technique a fait l'objet de nombreuses études qui en ont démontré la valeur pronostique, avec autorisation de la Food and Drug Administration (FDA) limitée aux patients ayant un cancer métastatique du sein, du côlon ou de la prostate (5). L'utilité clinique de ce test

DOSSIER THÉMATIQUE

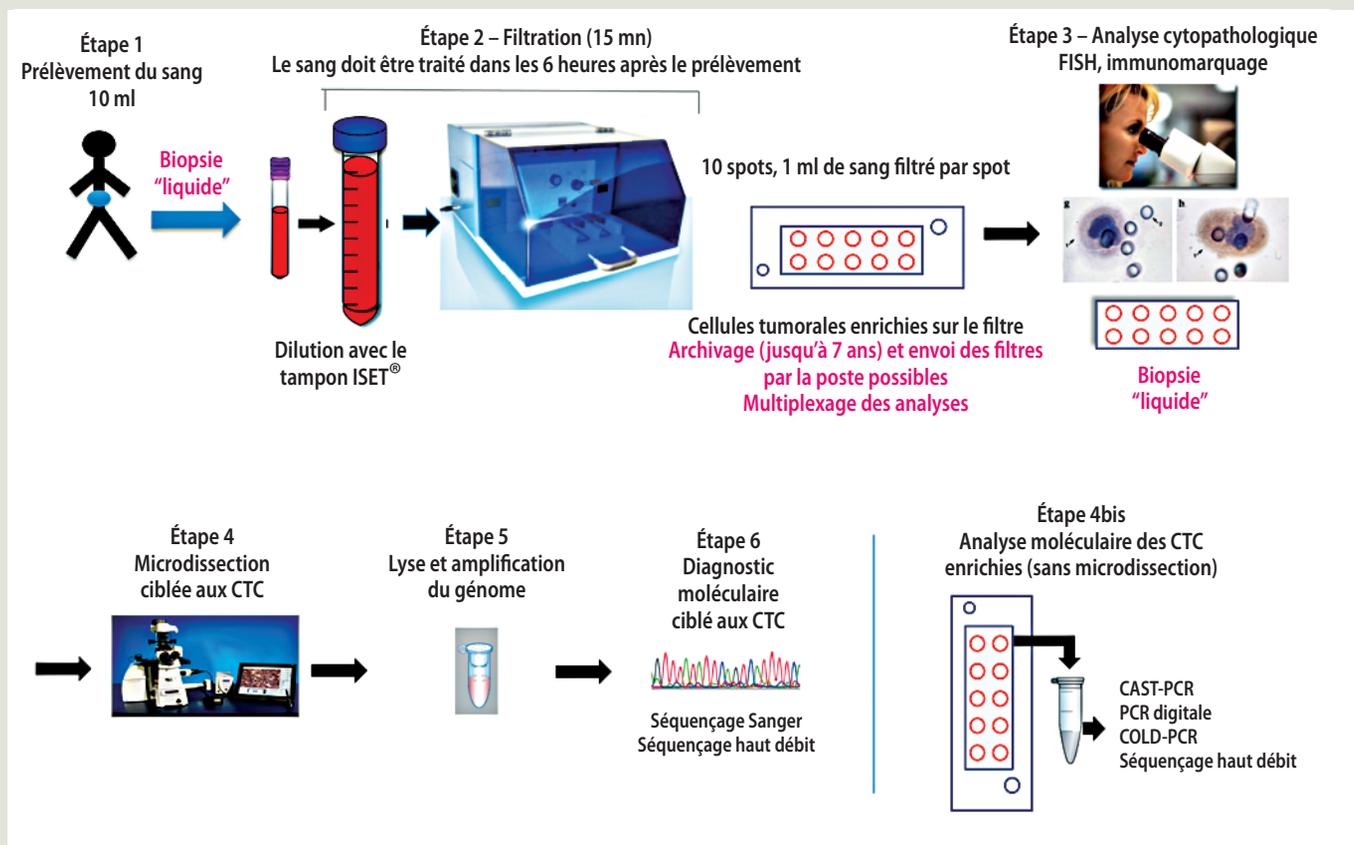


Figure. Enrichissement, identification et caractérisation des CTC par la méthode ISET®.

Tableau. Étude comparative des méthodes ISET® et CellSearch®.

Type de cancer	Nombre de patients	ISET® Patients avec CTC (%)	CellSearch® Patients avec cellules épithéliales circulantes (seuil) [%]	ISET® Médiane du nombre de CTC pour 7,5 ml de sang	CellSearch® Médiane du nombre de cellules épithéliales pour 7,5 ml de sang	Référence
Cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)	210 (non métastatique et métastatique)	50	39 % (≥ 1) 21 % (≥ 2)	34*	12*	(11)
	20 (métastatique)	100	45 % (≥ 1) 25 % (≥ 2)	5	0	(12)
	40 (IIIA-IV)	80	23 % (≥ 2)	23	0	(6)
	32 (métastatique)	100	55 % (≥ 1)	128	1	(14)
Cancer de la prostate	20 (métastatique)	100	90 % (≥ 1) 60 % (≥ 5)	17	8	(12)
Cancer du sein	20 (métastatique)	85	75 % (≥ 1) 40 % (≥ 5)	2	2	(12)
Cancer du pancréas	54 (non métastatique et métastatique)	93	40 % (≥ 1)	9	0	(13)

* Moyenne.

fait toutefois encore l'objet de débats, et il n'a pas été adopté en pratique clinique.

Plusieurs équipes indépendantes ont comparé l'application d'ISET® et de CellSearch® au cancer bronchique non à petites cellules, au cancer du sein, au cancer de la prostate et au cancer du pancréas (6, 11-14). Dans ces études, ISET® est plus sensible que CellSearch® (tableau).

Limitations de la méthode ISET® et nouveaux développements

De manière globale, le domaine des CTC est confronté aux défis de la rareté et de la fragilité des CTC. Aucun fixateur permettant de garder intactes la taille et la morphologie des cellules rares pendant plusieurs heures n'est actuellement disponible, ce qui contraint à traiter le sang le jour du prélèvement.

Par ailleurs, bien que le traitement du sang soit rapide (15 mn), ISET® n'est pas complètement automatisé. Ceci dit, l'utilisation de scanners et de logiciels d'analyse d'images pour la lecture automatisée des filtres est possible (6, 14). Le filtre ISET®, une fois traité par les colorants et des analyses variées (immunomarquages, FISH, etc.), peut être monté entre lame et lamelle et archivé comme une lame. Toutefois, pour son traitement, les chercheurs et pathologistes ne peuvent pas utiliser les automates d'analyse existants. Le filtre présente néanmoins l'avantage de pouvoir être facilement microdisséqué, y compris dans le cadre d'études cliniques (8).

Un point fréquemment discuté concerne la perte d'hypothétiques "petites" CTC à travers les pores de 8 µm. Bien que ce soit conceptuellement possible, il faut toutefois noter que, à ce jour, la taille minimale publiée d'une CTC étudiée par une méthode à la fois diagnostique et qui maintienne intactes la taille et la morphologie des cellules n'est pas bien connue. De plus, l'existence et l'intérêt clinique de ces petites CTC resteraient également à démontrer.

Caractérisation théranostique des CTC

Les échantillons tumoraux prélevés par méthode invasive sont systématiquement diagnostiqués par les pathologistes avant que les analyses complémentaires théranostiques ne soient réalisées (15). La caractérisation moléculaire des CTC isolées par la méthode ISET® peut reposer exactement sur la même méthodologie et assurer que les analyses moléculaires soient adressées à des cellules diagnostiquées comme cellules tumorales. Cet aspect est essentiel pour éviter des biais d'interprétation des résultats moléculaires et des erreurs théra-

peutiques grossières et potentiellement dramatiques. La quantité limitée d'ADN tumoral disponible est une contrainte importante pour l'analyse des mutations des gènes *BRAF*, *KRAS* et *EGFR*, gènes pertinents pour la prescription de thérapies ciblées dans le cancer colorectal, le cancer du poumon et le mélanome. Néanmoins, plusieurs groupes ont publié des données établissant que le diagnostic des mutations des gènes *KRAS* et *EGFR* est tout à fait applicable en routine à partir d'un très faible nombre de cellules tumorales provenant de lames cytologiques préparées après une biopsie, fixées, colorées, analysées par les pathologistes puis microdisséquées en vue d'analyses moléculaires (16).

Dans le cadre d'études cliniques, notre équipe a conduit des analyses d'ADN ciblées sur les cellules uniques isolées par ISET® et microdisséquées (8, 17). En particulier, après un diagnostic cytopathologique, les mutations ponctuelles du gène de la β -caténine ont pu être étudiées dans les CTC provenant de patients ayant un cancer du foie (17). De plus, chez 7 patientes porteuses d'un cancer du sein, l'amplification de *HER2* a été étudiée par PCR quantitative dans les CTC et dans la tumeur primitive. Dans cette étude, l'ADN des CTC a été extrait à partir de filtres immunocolorés avec un anticorps anticytokératine à large spectre puis microdisséqués (18).

Chez les patients ayant un mélanome métastatique, la mutation V600E du gène *BRAF* est un biomarqueur prédictif de la réponse au vémurafénib. V. Hofman et al. ont recherché, chez 98 patients, la présence de la mutation de *BRAF* dans le tissu tumoral (par pyroséquençage et immunohistochimie) et dans les CTC (par immunocytochimie seulement) [19]. Dans cette étude, la moitié des patients avait une tumeur mutée sur *BRAF*. Les résultats obtenus à partir du tissu tumoral ont été largement concordants avec les résultats obtenus dans les CTC. Ceci dit, sur les 87 patients chez qui des CTC ont été détectés, des CTC positives pour la mutation de *BRAF* par immunomarquage ont été détectées chez 8 patients alors qu'aucune mutation n'avait été détectée dans le tissu tumoral. Ce phénomène de discordance est bien connu et peut avoir pour origine une mauvaise évaluation initiale du profil de la tumeur à cause de l'hétérogénéité génétique intratumorale (20). Ces résultats pourraient également indiquer un changement de statut mutationnel durant le développement de la maladie (phénomène d'évolution bien connu entre la tumeur primitive et les métastases). Ces résultats alimentent la réflexion actuelle sur l'importance d'adapter le traitement au suivi mutationnel et personnalisé du patient et de sa tumeur (20).