



HAL
open science

**Évaluation concomitante des signatures fonctionnelles
des réponses lymphocytaires T spécifiques des Antigènes
Associés aux Tumeurs et des Cellules Tumoraes
Circulantes : Impact sur le pronostic des patients
atteints de carcinome épidermoïde des voies
aéro-digestives supérieures**

Xianglei Wu

► **To cite this version:**

Xianglei Wu. Évaluation concomitante des signatures fonctionnelles des réponses lymphocytaires T spécifiques des Antigènes Associés aux Tumeurs et des Cellules Tumoraes Circulantes : Impact sur le pronostic des patients atteints de carcinome épidermoïde des voies aéro-digestives supérieures. Cancer. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0037 . tel-01661482

HAL Id: tel-01661482

<https://theses.hal.science/tel-01661482>

Submitted on 12 Dec 2017

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale BioSE Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Xianglei WU

**Évaluation concomitante des signatures fonctionnelles des réponses lymphocytaires T
spécifiques des Antigènes Associés aux Tumeurs et des Cellules Tumorales Circulantes : Impact
sur le pronostic des patients atteints de carcinome épidermoïde des voies aéro-digestives
supérieures**

Soutenance le 02/06/2017

Membres du jury :

Rapporteurs :

Dr Béatrice GAUGLER, Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, INSERM UMR S938, Paris

Dr Yann GODET, Université de Franche-Comté, Inserm UMR 1098, Besançon

Examineur : Pr Gilbert FAURE, Université de Lorraine & CHRU de Nancy, Nancy

Invité : Dr Patrice GALLET, Université de Lorraine & CHRU de Nancy, Nancy

Directeur de thèse : Professeur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT, Université de Lorraine
& CHRU de Nancy, Nancy

CRAN: Centre de Recherche Automatique de Nancy (département Santé-Biologie-Signal)

Faculté de Médecine-9 avenue de la forêt de Haye-54505 Vandœuvre-lès-Nancy

A decorative graphic consisting of a vertical line on the left and a horizontal line extending to the right from its base, forming an L-shape. The word "REMERCIEMENTS" is positioned to the right of the vertical line, centered vertically between the top and bottom of the horizontal line.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour m'avoir encadré et soutenu tout au long de ces années d'étude, pour m'avoir fait confiance et encouragé. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils et votre patience. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre enthousiasme et votre dynamisme sans faille. Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur Patrice GALLET

Merci d'avoir consacré votre temps. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre sympathie, votre disponibilité, vos idées et conseils.

A Madame le Dr Béatrice GAUGLER

Merci pour votre disponibilité, vos idées et conseils, ainsi que pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Soyez assurée de toute mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur le Dr Yann GODET

Merci pour votre disponibilité, vos idées et conseils. Merci également d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Gilbert FAURE.

Ancien chef du laboratoire d'immunologie, coordinateur du programme Nancy - Wuhan, merci d'avoir accepté de codiriger cette thèse. Merci pour votre sympathie, votre disponibilité, vos idées et conseils, ainsi que pour votre aide précieuse de tous les jours. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mes travaux :

A Monsieur le Professeur Roger JANKOWSKI.

Chef du Service oto-rhino-laryngologie et chirurgie cervico-faciale, merci pour votre disponibilité pour cette collaboration précieuse entre votre service et le laboratoire d'immunologie.

A Madame le Docteur Chantal KOHLER.

Merci pour votre sympathie, votre disponibilité, ainsi que pour votre aide sur les corrections dans mon manuscrit. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre enthousiasme et votre dynamisme sans faille.

A Madame le Docteur Christine ANDRE-BOTTE.

Merci pour l'intérêt que vous avez toujours porté à ce travail et pour votre gentillesse et votre collaboration précieuse.

A toute l'équipe du Laboratoire d'Immunologie.

Merci pour tous les échanges techniques, scientifiques et pour votre sympathie, votre accueil chaleureux pendant ces quatre ans de thèse. Je pense entre autres à Catherine, Ghislaine, Yolande, Elisabeth, Dominique et Emma. Grâce à vous, j'ai pu passer mes 4 ans de thèse dans une ambiance super agréable.

A toute l'équipe du laboratoire CRAN.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire CRAN pour m'avoir encadré, mais plus particulièrement merci à Madame Monique BILON pour sa gentillesse et aide pour les affaires administratives.

A toutes les personnes qui contribuent à la collaboration entre Nancy et Wuhan.

A Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ.

Merci pour votre mobilisation pour faire vivre la collaboration franco-chinoise.

A Monsieur le Professeur ZHOU Yunfeng.

Merci pour votre soutien et vos encouragements.

Un grand merci également :

A Monsieur le Professeur Jacques HUBERT.

A Monsieur le Professeur Alain GERARD.

A Madame Irmie BOUILLON.

A Madame Mariama TRAORE.

A tous mes amis Chinois.

Merci à mes amis pour votre amitié et votre compagnie en France, pour tout ce que nous avons partagé.

Au China Scholarship Council (CSC)

Merci pour me permettre de réussir mes études en France par la bourse accordée et tous les autres soutiens.

A Madame Patricia SOBALACK et sa famille.

Merci à ma tante française et sa famille qui m'ont accompagné depuis 10 ans. Grace à leur soutien, j'ai pu vaincre plus facilement des difficultés dans ma vie d'étude en France. Un grand merci à Patricia pour les modifications rédactionnelles qui font la thèse plus facile à lire.

A MING

Merci d'être immortel dans les souvenirs du reste de ma vie.

Merci à tous les autres que je ne peux citer tant la liste est longue, mais que je n'oublie pas...

A ma famille.

A mes parents.

A ma grande mère.

A mes sœurs et leurs maris.

Merci pour votre soutien et votre amour inestimable. Sans vous, je n'aurais pas pu finir mes études.



REMERCIEMENTS	1
PLAN	7
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	9
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	16
<i>Partie 1. Les carcinomes des voies aérodigestives supérieures</i>	17
<i>Partie 2. Les cellules tumorales circulantes (CTC)</i>	21
<i>Partie 3. Immunothérapie des cancers</i>	37
<i>Partie 4. Signatures fonctionnelles des réponses immunitaires anti-tumorales</i> ...	42
OBJECTIFS	51
RÉSULTATS	53
<i>Article 1 Résumé</i>	54
<i>Article 2 Résumé</i>	56
<i>Article 3 Résumé</i>	58
<i>Article 4 Texte intégral</i>	60
DISCUSSION	87
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	96
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99
ANNEXES	113
<i>Annexe 1 - Article 1</i>	114
<i>Annexe 2 - Article 2</i>	123
<i>Annexe 3 - Article 3</i>	131
RÉSUMÉ	
ABSTRACT	

***LISTE DES
PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS***

Publications

Article 1: Diagnostic and prognostic value of circulating tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis.

Wu, X. L., Tu, Q., Faure, G., Gallet, P., Kohler, C., & Bittencourt, M. D. C.

Scientific reports, 2016, 6.

Article 2: A rare case of extremely high counts of circulating tumor cells detected in a patient with an oral squamous cell carcinoma

Wu, X., Mastronicola, R., Tu, Q., Faure, G. C., Bittencourt, M. D. C., & Dolivet, G.

BMC cancer, 2016, 16(1): 552.

Article 3: CellSearch[®] technology applied to the detection and quantification of tumor cells in CSF of patients with lung cancer leptomeningeal metastasis

Qian Tu; Xianglei Wu; Emilie Le Rhun; Marie Blonski; Basile Wittwer; Luc Taillandier; Marcelo De Carvalho Bittencourt; Gilbert C Faure.

Lung Cancer, 2015, 90(2): 352-357.

Article 4: Prognostic value of the concomitant evaluation of tumor-associated immune responses and circulating tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma

Xianglei WU, Patrice GALLET, Qian TU, Gilbert FAURE, Roger JANKOWSKI, Chantal KOHLER, Christine ANDRE-BOTTE, Phi Linh NGUYEN-THI, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT.
(En préparation).

Communications

1. 14th Euroconference on Clinical Cell Analysis, Lisbon, Portugal, 2014. Communication orale.
2. 9ème Forum du Cancéropôle Grand-Est, Strasbourg, France, 2015. Communication affichée.
3. Journée d'Echanges sur la Recherche en Cancérologie, Nancy, France, 2015. Communication orale.
4. 18th European Cancer Congress, Vienna, Austria, 2015. Communication affichée.
5. BIT's 9th International Symposium of Cancer Immunotherapy, Nanjing, China, 2016. Communication orale.



LISTE DES ABREVIATIONS

AAT:	Antigènes associés aux tumeurs
ADN:	Acide désoxyribonucléique
BIRC5:	Inhibiteur baculoviral de l'apoptose contenant 5
CCR7:	Chemokine (C-C motif) Receptor 7
CEC :	Cellules Endothéliales Circulantes
CK:	Cytokératine
CMC :	Cellules de Mélanome Circulantes
CMF:	Cytométrie en flux
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV:	Cytomegalovirus
CPA:	Cellule présentatrice d'antigène
CRC:	Cellules Rares Circulantes
CSFTC:	Cellules tumorales du LCR
CTC:	Cellules tumorales circulantes
CTL:	Cytotoxic T Cell (lymphocyte T cytotoxique)
CTM :	Microémbolies tumorales circulants
DAPI:	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DFS:	Disease Free Survival (survie sans récurrence)
DTC:	Disseminated Tumor Cells
EBV:	Epstein–Barr virus
EDTA:	Disodium Salt of Ethylenediaminetetraacetic acid
EMT:	Epithelial–Mesenchymal Transition
EpCAM:	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FDA:	Food and Drug Administration
GM-CSF:	Granulocytes-macrophages de mammifère
HNSCC:	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV:	Virus du papillome humain
HR:	Hazard Ratio
HSV:	Herpes Simplex Virus

IAP:	Inhibiteur de la famille d'apoptose
IFN-γ:	Interferon- γ
IL-2:	Interleukin-12
IRM:	Imagerie par résonance magnétique
LCR:	Liquide céphalo-rachidien
LM:	Leptomeningeal Metastases/ métastase leptoméningées
LT:	Lymphocyte T
MET:	Mesenchymal-Epithelial Transition
MIP-1β:	Macrophage inflammatory protein-1 β
ORL:	Oto-rhino-laryngologie
OS:	Overall Survival
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononuclées du sang périphérique)
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PD-1:	Programmed Cell Death Protein 1
PDL-1:	Programmed Cell Death Protein 1 Ligand
PFS:	Progression-Free Survival
PMA:	Phorbol Myristate Acetate
PSA:	Prostate-specific antigens
RT-PCR:	Reverse Transcription-PCR
STAT5:	Signal et activateur de transcription 5
SUR:	Survivine
SVF:	Sérum de veau fœtal
TCR:	Récepteur des cellules T
TCM:	T Central Memory
TEFF:	T-Effector Cells
TEM:	T Effector Memory
TERT:	Transcription boursière de la télomérase
Th1:	T helper 1, cellule T auxillaire 1

TNF-α:	Tumor Necrosis Factor- α
TNM:	Tumor Nodes Metastasis
TRAIL:	TNF-related apoptosis inducing ligand
TSCM:	T Memory Stem Cells
UCP:	Universal Cancer Peptide
UICC:	Union for International Cancer Control
VADS:	Voies aérodigestives supérieures
VIH:	Virus de l'immunodéficience Humaine
VPH:	Virus Papillomavirus Humain

***INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE***

Partie 1. Les carcinomes des voies aérodigestives supérieures.

1.1. Introduction générale.

Les voies aérodigestives supérieures (VADS) sont l'ensemble des cavités orales, nasales, le nasopharynx (ou cavum), l'oropharynx, l'hypopharynx et le larynx (**Figure 1**).

Il existe de nombreux cancers des voies aérodigestives supérieures : carcinomes épidermoïdes le plus souvent (plus de 95 % des tumeurs), adénocarcinomes (cancers glandulaires), lymphomes, sarcomes (rarement), tumeurs nerveuses, mélanomes. Il est bien connu qu'une exposition prolongée au tabac, aux produits de tabac, et l'alcool augmente le risque de développement de carcinomes épidermoïdes des VADS (« Head and Neck Squamous Cell Carcinoma », HNSCC, en anglais) [Marur, S.].

Au cours de la décennie passée un changement dans la distribution du site primaire a été décrit, avec une augmentation du carcinome épidermoïde de l'oropharynx et une diminution des cancers du larynx et de l'hypopharynx [Marur, S.]. Ce changement a été observé parallèlement à une diminution du tabagisme et à l'identification de l'exposition au virus du papillome humain (HPV) oncogène comme un facteur de risque pour le développement du carcinome épidermoïde de l'oropharynx.

La présentation clinique varie selon le lieu d'origine. Lors de la présentation initiale, 40% des patients ont une atteinte ganglionnaire régionale et une maladie classée comme stade IVa ou IVb, et 10% présentent des métastases à distance considérées comme étant IVc [Vermorken, J. B.]. Le pronostic diffère significativement en fonction du site de la tumeur, du statut du HPV du tissu tumoral et du stade global. La survie globale est relativement faible en raison des taux

élevés de métastases régionales et à distance lors du diagnostic ou au début de l'évolution de la maladie. Le taux de survie à 5 ans pour tous les stades combinés est d'environ 40-50% [Marur, S.].

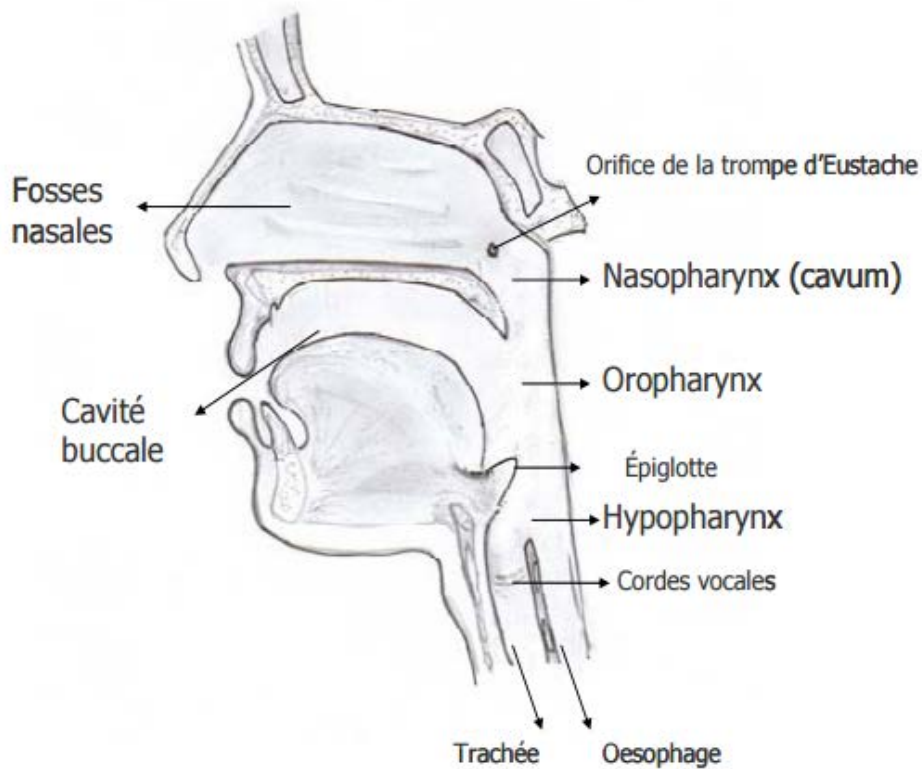


Figure 1. Schéma des voies aérodigestives supérieures (d'après [Guide ALD 30 « Cancer des voies aérodigestives supérieures »]).

1.2. Épidémiologie.

1.2.1. Épidémiologie mondiale.

Dans le monde, plus de 500 000 nouveaux cas de HNSCC sont signalés annuellement [Torre, L. A.]. Le cancer de la bouche et du pharynx ont été regroupés ensemble comme le sixième cancer le plus fréquent dans le monde. Il existe une variabilité géographique large (environ 20 fois) de la fréquence de HNSCC. Les zones caractérisées par des incidences élevées se

trouvent dans le Sud et le Sud-Est d'Asie (notamment le Sri Lanka, l'Inde, le Pakistan et Taiwan), régions de l'Ouest d'Europe (France) et en Europe de l'Est (Hongrie, Slovaquie et Slovénie), des parties de l'Amérique latine et les Caraïbes (Brésil, Uruguay et Porto Rico) et dans les régions du Pacifique [Warnakulasuriya, S.].

1.2.2. Épidémiologie en France.

Avec une estimation en 2008 s'élevant à 16 000 nouveaux cas par an, les cancers des VADS se situent au cinquième rang des cancers les plus fréquents en France. Ces cancers sont principalement masculins (80 % des nouveaux cas) et notamment dans le nord du pays qui semble détenir des records nationaux et mondiaux, probablement en raison d'une consommation combinée et forte d'alcool et de tabac à laquelle s'ajoute une exposition plus importante à de nombreux polluants [ALD n°30].

Les cancers épidermoïdes de larynx (30-35%), hypopharynx (25-30%), cavité buccale (20-25%), et de l'oropharynx (10-15%) représentent en France plus de 90 % des cancers des VADS [ALD n°30]. Avec environ 10 000 décès annuels, ils correspondent en France à 15 % des cancers mortels chez l'homme (en faible diminution) et à 2 % des cancers mortels de la femme (en augmentation, probablement en raison de l'augmentation du tabagisme féminin et de la consommation d'alcool par les femmes).

1.2.3. Épidémiologie en Chine.

Une étude épidémiologique de 72 registres tumoraux en Chine a révélé que l'incidence de cancer de la cavité buccale et du pharyngolarynx était de 3,28 pour 100 000 avec une mortalité de 1,37 pour 100 000 et que l'incidence du cancer du nasopharynx était de 3,61 pour 100 000 avec une mortalité de 1,99 pour 100 000 [Lang, J.].

Aux États-Unis et dans plusieurs pays occidentaux, environ 60 à 80% des cancers oropharyngés sont liés à l'infection par le HPV, mais dans la population chinoise le taux d'infection par le HPV est relativement faible [Chaturvedi, A. K. ; Hammarstedt, L.].

1.3. Biomarqueurs.

Souvent dans la démarche diagnostique des néoplasies, un examen histopathologique invasif de la lésion suspecte est nécessaire pour exclure une maladie tumorale ou métastatique. Par conséquent, il y a une grande demande pour une méthode moins invasive, par exemple une analyse sanguine, pour déterminer l'état de la maladie, en particulier pour les patients avec un risque élevé de récurrence locorégionale ou de métastase à distance. L'utilisation de biomarqueurs est donc un enjeu majeur dans le management clinique des patients atteints de cancers. Ils ont le potentiel d'améliorer le diagnostic précoce, le traitement et le pronostic des atteintes néoplasiques [Goossens, N.].

Plusieurs nouveaux outils sont en développement, utilisant des outils génomiques, protéomiques et métabolomiques [Marimuthu, A. ; Yamashita, T. ; Offermann, A.]. Ils sont basés majoritairement sur la détection indirecte des cellules cancéreuses, mais ne sont très efficaces qu'en présence de tumeurs assez volumineuses qui peuvent être détectées cliniquement. Afin d'apporter un vrai plus pour le diagnostic précoce et pour le suivi après traitement, les biomarqueurs doivent avoir une sensibilité et une spécificité suffisantes pour détecter des tumeurs très précoces.

Partie 2. Les cellules tumorales circulantes (CTC).

2.1. Définition

Les tumeurs se disséminent par un processus connu sous le nom de métastase : des cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire et pénètrent dans la circulation sanguine, qui à son tour transporte ces cellules à des sites distants, tels que les os, le foie, le cerveau et les poumons. Les cellules tumorales détectées dans la circulation sanguine sont appelées des CTC (Cellules Tumorales Circulantes). Certaines de ces cellules peuvent ainsi établir de nouvelles tumeurs dans des sites distants (**Figure 2**). Les CTC très agressives pourraient non seulement établir des métastases dans des organes éloignés, mais aussi être capables d'auto-ensemencer leurs organes d'origine.

La migration des cellules tumorales à travers les barrières biologiques constitue l'événement dynamique majeur de l'invasion tumorale. Cependant, lors de la migration dans la circulation sanguine, trois possibilités pour le devenir des cellules tumorales sont possibles. Ces cellules tumorales devenues des CTC peuvent soit entrer rapidement en extravasation pour établir des métastases, soit constituer des micro-métastases en dormance jusqu'à un éventuel facteur activateur et se transformer en métastase ensuite, ou encore mourir par apoptose. Il est important de souligner donc que toutes les CTC ne donnent pas de métastases.

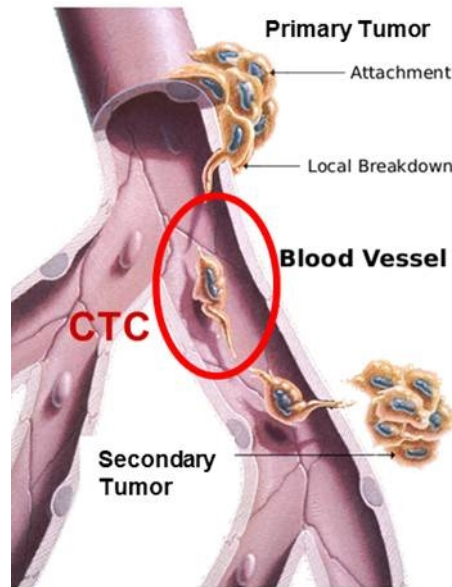


Figure 2. Cellules tumorales circulantes (d'après National Cancer Institute website).

2.2. Intérêt de la détection des CTC en oncologie.

La détection des CTC dans le sang veineux, central ou périphérique, et sa corrélation avec des caractéristiques clinico-pathologiques sont à l'étude depuis plusieurs années. Comme un événement intermédiaire important dans le processus de métastases, l'hypothèse a été faite que le nombre de CTC pourrait refléter la métastase en cours [Goodman, O. B., Jr.].

La plupart de résultats actuels ont montré une corrélation entre le nombre de CTC et les paramètres cliniques tels que la survie sans progression (PFS, Progression-Free Survival) et la survie globale (OS, Overall Survival). Les CTC ont été identifiées comme un facteur pronostique de différentes tumeurs solides, surtout pour le cancer du sein métastatique, le cancer de la prostate et le cancer colorectal [Cohen, S. J.; Cristofanilli, M.; Danila, D. C.].

Tout au long de la thérapie, les tests de CTC par CellSearch® peuvent être utilisés pour surveiller l'état d'un patient en montrant si son pronostic sur la thérapie donnée est favorable ou défavorable à tout moment. Chez les patients atteints du cancer du sein et de la prostate métastatique, une réduction des nombres de CTCs jusqu'à moins de 5 CTCs après l'initiation

de la thérapie a prédit une survie globale plus longue, cependant, une augmentation des nombre à 5 ou plus de CTCs a prédit une survie globale plus courte. Pareil, chez les patients atteints du cancer colorectal métastatique, le seuil pour séparer le pronostic favorable et défavorable est 3 CTCs. Une diminution ou une disparition des CTC peuvent indiquer une réponse favorable au traitement. Inversement, la présence persistante de CTC peut suggérer une résistance au traitement et une élimination incomplète des cellules cancéreuses, même s'il n'y a pas de tumeur métastatique détectée cliniquement [Sun, Y. F.].

Cependant, les marqueurs sériques ou la technique d'imagerie à haute résolution actuels sont incapables d'identifier les micrométastases au cours de la progression du cancer et donner des informations précises concernant la réponse aux traitements.

2.3. Intérêt de la détection des CTC en HNSCC.

Comparé à d'autres biomarqueurs, l'impact des CTC chez les patients HNSCC n'a pas encore été extensivement clarifié ni appliqué en routine clinique. Cependant, des données récentes ont révélé une forte implication de leur importance dans la pathogenèse de HNSCC [Buglione, M.; Jatana, K. R.; Nichols, A. C.]. Buglione, M. et al. ont observés que la détection des CTC est un paramètre pronostique fort et peut être prédictive de l'efficacité du traitement. Jatana, K. R. et al. ont trouvés que si aucune CTC n'était présent, une survie sans cancer statistiquement significative a été observée dans le HNSCC. Un test sanguin avec une telle capacité pronostique pourrait avoir des implications importantes dans le traitement des patients atteints de HNSCC. Nichols, A. C ont constatés que les CTC peuvent être isolés avec succès chez les patients atteints de HNSCC avancé utilisant le système CellSearch[®]. La détection de la CTC peut être importante pour le pronostic, l'évaluation des résultats du traitement et la détermination de l'efficacité des traitements adjuvants.

Le nombre des CTC détectées dépend de la méthode utilisée et de divers facteurs clinico-pathologiques. Les CTC peuvent être absentes chez les patients atteints de la maladie au stade T1 alors qu'elles ont été détectées plus fréquemment chez ceux avec les stades T2 à T4. Ainsi, la positivité des CTC lors du diagnostic était plus fréquente chez les patients atteints de tumeurs de stade avancé (taille élevée et ganglion envahi), c'est-à-dire avec une charge tumorale plus lourde. Par conséquent, dans les études de HNSCC, la proportion de patients avec de CTC positives varie de façon importante de 6,5 à 87,5%. La plupart des études ont révélé une fourchette autour de 30-40% des patients atteints de HNSCC [Wu XL].

Peu d'informations concernant la relation entre la réponse clinique à un traitement non chirurgical et les modifications de la quantité des CTC sont disponibles chez les patients atteints de HNSCC. Une corrélation statistiquement significative entre la négativité des CTC et la survie sans évolution du cancer a été démontrée par deux études [Buglione, M. ; Jatana, K. R.]. Ces études démontrent la corrélation entre l'absence de CTC au diagnostic et la réponse partielle ou la réponse complète ou encore l'absence de l'évolution du cancer au cours du traitement. Ces résultats suggèrent donc une meilleure survie chez les patients sans CTC.

2.4 Lien entre CTC et lymphocytes T.

Les données actuelles concernant la relation entre les CTC et le système immunitaire sont limitées. Dans le cancer du sein non métastatique, une augmentation significative des cellules T CD4+CD95+ périphériques a été observée chez les patients avec CTC [Gruber, I.]. Les auteurs suggèrent que, comme la réponse immunitaire de l'hôte est modulée par l'interaction CD95 - CD95 ligand et que les cellules cancéreuses induisent une apoptose également par cette voie, cette augmentation du nombre de LT helpers positifs pour CD95 pourrait conduire

à une échappée immunitaire des cellules tumorales par l'augmentation des cellules T CD4+ apoptotiques [Gruber, I.].

Une autre étude récente a montré que les patients atteints de cancer du sein inflammatoire avec des CTC présentaient des anomalies dans l'immunité adaptative, avec des pourcentages baissés des lymphocytes T CD3+, des CD3+CD4+ et des LT CD8+activés produisant TNF- α et IFN γ ainsi qu'une augmentation des pourcentage des LT régulateurs dans le sang périphérique [Mego, M. 2016]. Les CTC représentent une population hétérogène de cellules ayant des phénotypes et des valeurs biologiques différentes [Mego, M. 2011]. Des données expérimentales et cliniques suggèrent que la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) joue un rôle important dans la génération de CTC et l'acquisition de résistance au traitement. Des données récentes ont montré que les sous-populations de CTC ont un phénotype EMT partiel ou complet [Yu, M.; Mego, M; Giordano, A.]. L'EMT est étroitement liée à l'immunité et l'activation de l'EMT induit des cellules T-régulatrices et des cellules dendritiques altérées (ref?).

2.5. Système CellSearch®: rationnel à son utilisation en HNSCC.

Les CTC peuvent être identifiées dans le sang périphérique par l'expression de marqueurs épithéliaux spécifiques du cancer. Il existe plusieurs approches pour détecter les CTC : par des méthodes morphologiques (immunohistochimie, immunocytochimie), par cytométrie en flux ou encore par RT-PCR. Cependant, la sélection immunomagnétique, suivie de l'identification et la numération des CTC d'origine épithéliale dans le sang total à l'aide du système CellSearch® (Veridex LLC, Raritan, NJ) est la seule technique de détection des CTC qui est autorisée actuellement pour une utilisation clinique par la US FDA (Food and Drug Administration).

2.5.1 Historique.

Le système CellSearch® Veridex a été développé par la compagnie Janssen Diagnostics. Depuis la reconnaissance de la valeur potentielle des CTC comme un outil de surveillance il y a plus de deux décennies, Janssen Diagnostics a décidé de développer une technique innovante pour l'obtention, la différenciation, et l'énumération des CTC, et ainsi aider à établir le rôle prédictif des CTC dans le pronostic à n'importe quel moment au cours de la maladie néoplasique. Ainsi, en 2004, le système CellSearch® Veridex a été validé chez les patients atteints de cancer du sein pour détecter les CTC par l'US FDA. La figure 3 récapitule l'historique du développement de cette technique.

A l'heure actuelle, ce système est réservé à la recherche clinique en France et n'est présent que dans une dizaine de laboratoires et notamment sur la Plate-forme NANCYTOMIQUE au CHRU de Nancy.

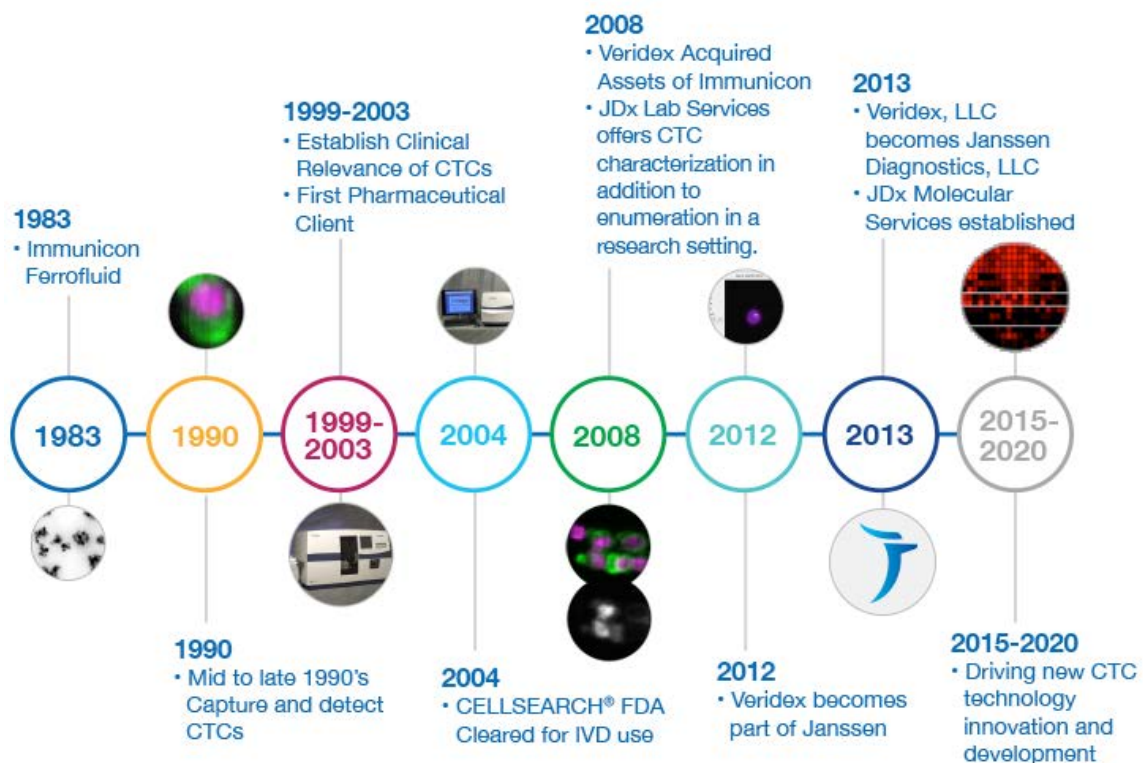


Figure 3. Historique du développement du système CellSearch® (d'après www.CellSearchctc.com).

2.5.2 But de la méthode.

Le CellSearch® Veridex est un système de haute technologie destiné à la recherche de Cellules Rares Circulantes (CRC) dans le sang. C'est un système extrêmement sensible, capable de détecter jusqu'à une cellule cible dans 7,5 ml de sang, soit une cellule parmi environ 35 milliards. Cet outil innovant peut être utilisé dans plusieurs domaines médicaux comme la cancérologie, les maladies cardiovasculaires ou encore les maladies génétiques rares. Le système CellSearch® est caractérisé par un taux de récupération de 93% et une limite de détection d'une CTC dans 7,5 ml de sang total. Dans une lignée cellulaire de HNSCC (FaDu), le système CellSearch® a déjà montré son efficacité pour détecter les cellules avec EpCAM et CK intracellulaire à des niveaux significatifs de 95 et 99% de ces cellules [Nichols, A. C.].

Actuellement plusieurs trousseaux visant à la détection de CRC sont commercialisés par la société Veridex et donnent accès à 2 applications majeures :

- Le dénombrement et l'enrichissement des CRC à partir du sang ;
- L'isolement des CRC en vue d'une analyse ultérieure des cellules cibles par une autre technique (biologie moléculaire, microscopie électronique, cytométrie en flux...).

Les Cellules Rares Circulantes auxquelles s'intéresse notre laboratoire peuvent être réparties en trois types :

- Les Cellules Tumorales Circulantes (CTC), cellules cancéreuses d'origine épithéliale circulant dans le sang (cancer du poumon, du sein, de la prostate...) et exprimant le marqueur membranaire EpCAM et les marqueurs cytoplasmiques (CK 8, 18 et 19) spécifiques ;

- Les Cellules Endothéliales Circulantes (CEC) qui forment la paroi interne des vaisseaux sanguins. Elles peuvent se décrocher et circuler dans le sang dans certaines circonstances, notamment lors de phénomènes inflammatoires ou de la formation d'une nouvelle trame vasculaire associée à une pathologie cancéreuse (néo-angiogénèse). Leur phénotype est CD146+ (marqueur membranaire) et CD105+ (marqueur cytoplasmique) ;

- Les Cellules de Mélanome Circulantes (CMC), cellules cancéreuses issues de mélanome circulant dans le sang et exprimant le marqueur CD146, et un antigène humain associé au mélanome de poids moléculaire élevé (HMW-MAA).

2.5.3 Différentes étapes de la méthode CellSearch[®]

Le système CellSearch[®] Veridex est composé de deux automates (Figure 4) :

- Un système CellTracks[®] Autoprep[®] (préparation de l'échantillon) ;
- Un CellTracks Analyzer II[®] (analyse de l'échantillon).

Le premier système permet la préparation de l'échantillon et utilise une technique basée sur le principe d'une séparation immunomagnétique permettant une purification des cellules d'intérêt, associée à des immunomarquages fluorescents. L'analyseur II permet la quantification des cellules cibles en imagerie photonique automatisée.



Gauche : CellTracks[®] Autoprep[®] système ; Droite : CellTracks Analyzer II[®].

Figure 4. Les deux automates constituant le système CellSearch[®] (d'après www.CellSearchctc.com).

L'étude des CRC par le système CellSearch[®] nécessite que le prélèvement sanguin soit effectué sur des tubes de 10 ml spécifiques (tubes CellSave[®]), spécialement conçus pour la collecte et la préservation des cellules rares circulantes dans l'échantillon sanguin à analyser. Ces tubes permettent de stabiliser et de conserver l'échantillon jusqu'à 96h après prélèvement à température ambiante.

L'utilisation de ces tubes est importante car les CRC sont des cellules extrêmement sensibles et fragiles. Chaque tube contient 300µL d'un anticoagulant (Na₂EDTA) et un mélange de réactifs de préservation (composition non spécifiée par le fabricant), permettant ainsi de maintenir la morphologie des cellules et l'expression des antigènes par les cellules cibles.

Avant passage de l'échantillon sur le CellTracks[®] Autoprep[®] System, il est nécessaire d'en transférer un volume défini dans un tube conique de 15 ml et de le diluer dans une solution tampon fournie avec la trousse.

La dilution est fonction des cellules recherchées :

- CTC : 7,5 ml de sang + 6,5 ml de tampon de dilution ;
- CMC : 7,5 ml de sang + 6,5 ml de tampon de dilution ;
- CEC : 4 ml de sang + 10 ml de tampon de dilution.

L'échantillon est ensuite centrifugé à 800×g pendant 10 min à température ambiante de façon à séparer les cellules totales du plasma dilué. Les trousse Veridex de dénombrement des CRC présentent des caractéristiques similaires puisqu'elles sont toutes composées d'un carrousel portant les différents réactifs nécessaires à l'analyse, de tubes coniques, et de cartouches permettant la réalisation de 16 analyses. Les trousse sont soigneusement conservées à 4°C, mais nécessitent une mise à température ambiante d'une demi-heure avant utilisation. Cette étape permet d'éviter aux cellules un choc thermique.

Pour les trousse de dénombrement des CTC (CellSearch[®] CTC Kit), le carrousel est composé de 7 flacons de réactifs :

Pour la purification, 2 flacons contenant :

- Les anticorps couplés au ferrofluide et spécifiques de marqueurs membranaires (EpCAM ou CD146 selon la trousse). Ils permettent de purifier les cellules en les rendant magnétisables ;
- Amplificateur : réactif permettant d'augmenter et de favoriser la fixation du ferrofluide.

Pour les immunomarquages, 5 flacons contenant :

- Le mélange des anticorps de sélection positive, spécifiques des Cytokératines 8, 18 et 19 ou de CD105 selon la trousse et couplés à la Phycoérythrine (PE) et d'anticorps anti-CD45 (marqueur pan leucocytaire) couplés à l'Allophycocyanine (APC) ;
- Le DAPI : sonde fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN ;
- Le tampon de dilution ;
- L'agent fixateur qui stabilise les immunomarquages ;

- Le tampon de perméabilisation : permettant aux anticorps dont la cible est cytoplasmique de pénétrer dans la cellule.

Selon la trousse et l'application (dénombrement des CTC, des CEC ou des CMC), les réactifs sur le carrousel diffèrent au niveau des anticorps utilisés car ce sont des cellules différentes qui sont recherchées et donc porteuses d'antigènes membranaires et cytoplasmiques spécifiques (Tableau 1).

Tableau 1. Comparaison de la composition des trousse CTC, CEC et CMC.

Marqueurs	CellSearch[®]	CellSearch[®]	CellSearch[®]
	CTC Kit	CEC Kit	CMC Kit
Anticorps de purification ferrofluide	Anti-EpCAM	Anti-CD146	Anti-EpCAM
Marqueur cytoplasmique (PE)	Anti-CK 8, 18, 19	Anti-CD105	Anti-HMW-MAA
Marqueur nucléaire	DAPI	DAPI	DAPI
Marqueur leucocytaire (APC)	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45, CD34

Pour les trousse de dénombrement, il est possible d'ajouter un anticorps monoclonal couplé au FITC afin d'affiner la sélection et de suivre l'expression d'un marqueur au cours d'un traitement, par exemple : HER2 et EGFR.

Le *CellTracks[®] Autoprep[®] System* automatisé permet une standardisation de la préparation des échantillons sanguins. Dans un premier de temps il effectue une purification par

immunomagnétisme des cellules marquées puis dans un deuxième temps par un immunomarquage fluorescent des cellules ciblées.

La première étape du dosage consiste à détecter la couche de globules rouges en vue de l'aspiration du plasma, ensuite le réactif ferrofluide et le réactif de capture sont ajoutés. Ensuite les aimants sont appliqués contre le tube et amènent le ferrofluide à se déplacer dans l'échantillon vers la paroi. A intervalles réguliers au cours du cycle, les aimants sont dégagés, le tube de prélèvement tourne et l'aimant est réappliqué. Ceci permet de mélanger délicatement l'échantillon et d'augmenter au maximum le contact du ferrofluide avec les cellules d'intérêt contenues dans l'échantillon. Après une incubation magnétique, un aimant est appliqué et recueille les cellules marquées au ferrofluide contre la paroi du tube. L'échantillon est aspiré, ce qui a pour effet d'éliminer les cellules non marquées. Cette opération termine la première étape d'enrichissement.

Les cellules marquées au ferrofluide sont ensuite remises en suspension dans le tampon. Le volume est d'environ 3 ml. Ensuite, le deuxième cycle d'enrichissement est réalisé et des réactifs de coloration, un colorant des acides nucléiques, un réactif de perméabilisation et un tampon sont ajoutés. Le volume est d'environ 850 μL . Après une incubation des réactifs de coloration, des tampons sont ajoutés et mélangés. Un aimant est appliqué, le fluide est aspiré et un tampon frais est ajouté et mélangé. Le volume est d'environ 900 μL . Après une incubation pour permettre la sédimentation des cellules, le ferrofluide libre est éliminé en appliquant un aimant et en aspirant l'excès de tampon. Ensuite, un fixateur cellulaire est ajouté. L'échantillon final de 375 μL est transféré dans la cartouche à l'intérieur du dispositif de présentation cellulaire MagNest[®] (Figure 5). Le MagNest[®] est un boîtier composé de deux aimants en position inclinée où s'insère une cartouche d'un volume de 375 μL . Lors de

l'incubation du MagNest[®] pendant une durée de 20 minutes à 24h, les aimants vont permettre de placer sur un même plan focal les cellules cibles marquées au ferrofluide. Ainsi l'objectif du CellTracks Analyzer II[®] pourra faire la mise au point sur le plan focal. Le MagNest[®] contient une puce électronique où toutes les informations concernant le patient, la trousse et le déroulement de l'expérience sont conservés. Cette sécurité permet d'éviter l'inversion des prélèvements au moment du passage du préparateur à l'analyste.

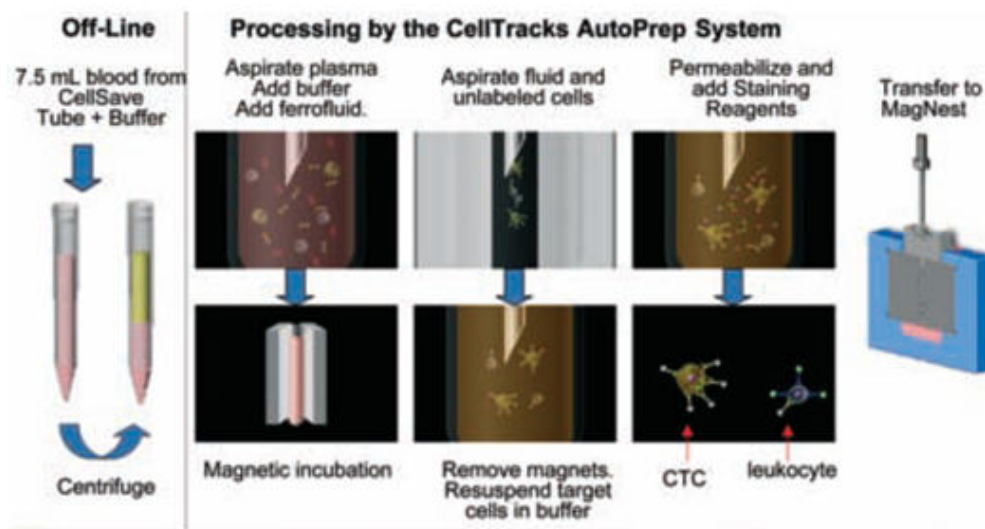


Figure 5. Préparation des échantillons pour capturer et colorer les CTCs en utilisant le système CellTracks[®] AutoPrep[®]

(d'après <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communiqu/2011/01.html>).

Le CellTracks Analyzer II[®] est un microscope semi-automatique basé sur l'immunofluorescence optique. Il permet de compter et de caractériser les cellules rares sélectionnées par le CellTracks[®] Autoprep[®] System et de stocker des images des cellules d'intérêt. Un logiciel dédié trie les données et les propose à l'opérateur pour validation.

La lampe utilisée est une lampe à vapeur de mercure. La longueur d'onde d'émission du mercure s'approche de 420 nm tout en produisant une quantité d'ultraviolets (100-380 nm) importante.

Lors du scan, le CellTrack Analyzer II[®] analyse la totalité de la surface de la cartouche en la fractionnant en 175 champs distincts sur lesquels sont appliqués 4 filtres. Chaque filtre permet l'observation du signal d'un marqueur fluorescent :

- DAPI (marqueur nucléaire) ;
- PE (marqueur cytoplasmique) ;
- APC (marqueur leucocytaire) ;
- FITC (artefact ou anticorps supplémentaire).

Après intégration des différents signaux fluorescents, le logiciel associé présente les résultats sous forme d'un tableau d'images où un événement proposé est caractérisé par ses différents marquages.

Le tableau est composé de plusieurs colonnes (Figure 6) :

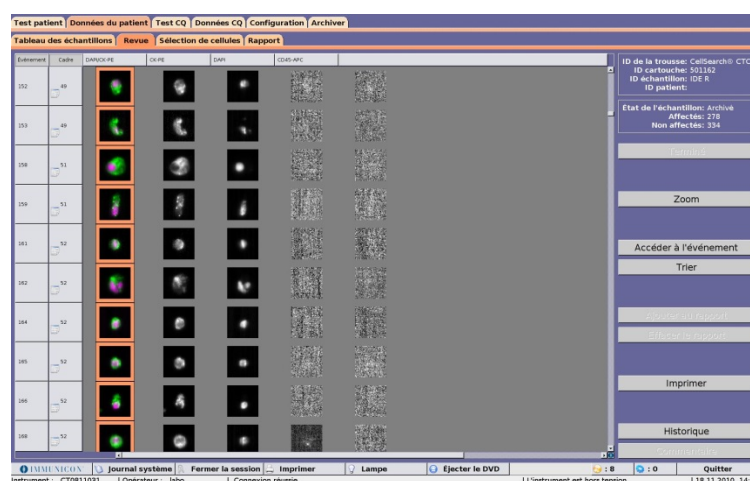


Figure 6. Résultats affichés par CellTrack Analyzer II[®].

La première correspond à une image composite correspondant à la superposition des images colorisées des canaux PE (vert) et DAPI (rose). La deuxième colonne présente le signal fluorescent correspondant au marquage PE (cytoplasmique). La troisième indique le marquage nucléaire correspondant au marquage DAPI. La quatrième colonne correspond à l'image observée avec la fluorescence APC correspondant au marquage anti-CD45 (antigène pan leucocytaire). Pour finir une cinquième colonne présente la fluorescence FITC.

L'opérateur doit sélectionner visuellement les cellules cibles parmi les événements proposés dans la galerie, car des éléments indésirables peuvent être présents tels que des artefacts ou des leucocytes. Il est fréquent que des cellules non marquées au ferrofluide soient observées au niveau du plan focal car elles sont entraînées par les cellules marquées au ferrofluide. Le marquage anti-CD45 permet alors de les différencier des cellules d'intérêt. La durée d'incubation des cellules dans le champ magnétique du MagNest[®] est très importante car plus elle est longue (dans la limite de 24h), plus les cellules marquées auront le temps de monter au plan focal et plus les cellules non marquées auront le temps de sédimenter dans la cartouche. La galerie proposée sera ainsi plus "propre".

La sélection se fait selon plusieurs critères. Les premiers critères de sélection sont basés sur le phénotypage des cellules : En effet, pour être sélectionnée, une cellule doit présenter un marquage nucléaire (DAPI) associé à un marquage cytoplasmique spécifique de la cellule recherchée (PE).

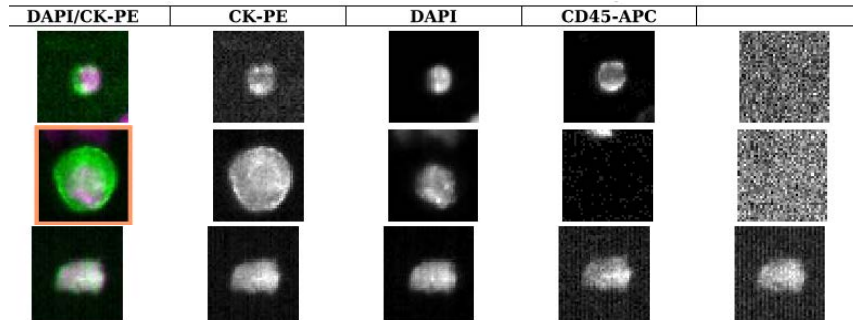
Un exemple est montré dans la figure 7 : la CTC dans la ligne du milieu ne présente pas de signal fluorescent dans les canaux APC et FITC, indiquant qu'il ne s'agit ni d'un leucocyte, ni d'un artefact.

Les phénotypes des cellules recherchées peuvent ainsi être résumés :

- DAPI⁺, CK⁺, CD45⁻ pour les CTC ;

- DAPI⁺, CD105⁺, CD45⁻ pour les CEC.

La qualité de l'image est également un autre critère de sélection. Une cellule peut correspondre aux critères de phénotypage, mais si son image est pixélisée elle ne doit pas être prise en compte.



Du haut vers le bas : un leucocyte, une CTC, un artéfact.

Figure 7. Evénements représentatifs détectés par CellSearch[®].

La taille de la cellule doit être supérieure à 4 microns (la taille est indiquée par la forme du curseur). Le dernier critère de validation d'une CRC est la localisation du noyau par rapport au cytoplasme de la cellule. Pour valider une cellule comme une cellule cible, il faut que le noyau soit à 50% à l'intérieur du cytoplasme dans l'image composite.

Si le canal FITC n'est pas employé, il peut être utilisé pour distinguer les artéfacts, car aucune fluorescence FITC n'est censée y être émise.

Partie 3. Immunothérapie des cancers

3.1 Généralités.

Le rôle de l'immunité cellulaire contre le cancer a été établi il y a plus de vingt ans. Cette réponse immunitaire antitumorale est caractérisée essentiellement par le développement d'une réaction lymphocytaire cytolytique spécifique contre les cellules malignes. La reconnaissance de la cellule ciblée par les lymphocytes T cytolytiques (CD8+) est un phénomène hautement spécifique qui nécessite la présentation d'un antigène tumoral. Cette présentation à la surface de la cellule se fait par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH classe I), qui fixe et présente l'antigène. Une fois la reconnaissance établie, elle génère la sécrétion de multiples cytokines, l'activation et la prolifération de cellules effectrices, et la destruction de la cellule cible. Cet ensemble compose la réaction cytolytique antitumorale.

3.2 La réponse antitumorale dans les carcinomes épidermoïdes.

On distingue deux types d'approches permettant d'induire puis d'étudier une réponse immunitaire antitumorale :

La première dirige la réponse contre la cellule tumorale dans sa totalité. Elle est donc considérée comme non spécifique. Des extraits de cellules tumorales souvent associés à des mélanges de cytokines activatrices, comme le GM-CSF, sont utilisés afin de stimuler la réponse immune. Un avantage apparent de cette approche est la couverture d'une large population de patients, indépendamment de l'expression d'un antigène spécifique par la tumeur visée. Cependant, l'élaboration d'un vaccin est difficile à standardiser et, de plus, l'évaluation de l'efficacité de la vaccination est essentiellement clinique et nécessite par

conséquent une cohorte très importante de patients et de longues années avant de connaître les résultats.

Différentes approches ont été tentées sur ce modèle, soit en procédant d'abord à l'activation du système immunitaire *in vitro* puis en injectant au patient des lymphocytes stimulés (immunisation passive), soit par l'injection directe au patient d'extraits de cellules tumorales (immunisation active). Globalement, les résultats cliniques ont été relativement décevants, quels que soient le type de cancer étudié et la technique utilisée [Rosenberg, S.A.]. Dans les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures, quelques études ont décrit l'activation en culture de lymphocytes provenant des patients, suivie d'une réinjection (transfert adoptif) [Ikawa, T.; Ishikawa, T.]. Sans générer d'effets secondaires notables, l'effet clinique n'a pas été significatif. Une stabilisation de la croissance tumorale ainsi que la régression transitoire de métastases pulmonaires ont été décrites chez certains patients. Une amélioration de la survie ou du contrôle local n'a par contre jamais pu être démontrée [Ishikawa T].

Le deuxième type d'approche consiste à cibler un antigène spécifique exprimé par les cellules de la tumeur visée. L'antigène étant exprimé à la surface de la cellule par une molécule spécifique du CMH, le nombre de patients susceptibles d'être étudiés est limité. Par contre, grâce au développement des méthodes de laboratoire, cette approche, plus expérimentale, permet une analyse détaillée des mécanismes de la réponse immunitaire antitumorale et contribue de façon significative à la compréhension de l'interaction entre la tumeur et le système immunitaire. Ainsi de nombreux groupes se sont intéressés à l'étude de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte à différents antigènes tumoraux.

Il n'existe encore que peu de corrélations entre les phénomènes immuno-histologiques et l'évolution clinique de la maladie. Quelques rapports semblent néanmoins confirmer le rôle du système immunitaire dans le contrôle de la tumeur. Le degré d'infiltration lymphocytaire de certains carcinomes des voies aéro-digestives supérieures prédit un meilleur pronostic de la maladie à moyen terme [Schumacher, K.; Reichert, T.E.].

Malgré la présence d'une réponse immune antitumorale dans la plupart des cancers, la tumeur semble fréquemment échapper au contrôle du système immunitaire en bloquant les mécanismes de reconnaissance de la cellule tumorale, par inhibition directe de la réponse immune ou par stimulation des mécanismes inhibiteurs de l'hôte. L'inhibition de l'expression du CMH classe I par la cellule tumorale [Grandis, J.R.], la diminution du taux de lymphocytes circulants, probablement liée à une tendance accrue à l'apoptose [Kim, J.W.; Kuss, I.], la sécrétion de cytokines inhibitrices sont autant de mécanismes utilisés par le carcinome épidermoïde pour échapper au contrôle du système immunitaire [Young, M.R.].

3.5 Check-point inhibiteurs.

Une caractéristique importante du système immunitaire est sa capacité à discriminer entre les cellules normales dans le corps et celles considérées comme "étrangères". Cela permet au système immunitaire d'attaquer les cellules étrangères tout en laissant les cellules normales intactes. Parmi les mécanismes expliquant cette capacité de discrimination on identifie les « points de contrôle » - des molécules sur certaines cellules immunitaires qui doivent être activées (ou inactivées) pour commencer une réponse immunitaire.

Les cellules cancéreuses trouvent parfois des moyens d'utiliser ces « points de contrôle » (ou « immune checkpoints ») pour éviter d'être attaqués par le système immunitaire. L'identification de ce mécanisme d'échappement immunitaire a mené au développement de médicaments qui visent justement ces points de contrôle. Ces médicaments sont essentiellement des anticorps monoclonaux ciblant l'interaction des immune checkpoints avec leurs ligands et sont donc appelés « checkpoint inhibitors ». Cette classe thérapeutique est porteuse de beaucoup de promesses en tant que traitement contre le cancer.

La remarquable efficacité des inhibiteurs de checkpoint immunitaire PD-1/PD-L1 et CTLA4 a mené à de nombreuses autorisations de mise sur le marché dans les mélanomes, les cancers du poumon, les cancers du rein et d'autres cancers.

3.5.1 PD-1/PDL-1 : Significations distinctes suivant les mécanismes responsables de l'épuisement CTL.

PD-1 (« programmed cell death protein 1 », CD279) est une molécule inhibitrice qui module l'activation lymphocytaire T. PD-1 est secondairement induite sur les LT et va, après interaction avec son ligand, inhiber différentes fonctions lymphocytaires T (Figure 8). PDL-1, un des ligands de PD-1, est constitutivement exprimé sur les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules souches mésenchymateuses et son expression est modulable en fonction de l'environnement immunitaire [Balar, A. V.].

Dans les infections chroniques virales ou maladies néoplasiques, la libération antigénique chronique régule à la hausse les réseaux d'inhibition, tels que la voie PD-1/PDL-1. La motilité des LT est diminuée à cause de l'augmentation de la stabilité de la synapse immunitaire entre PD-1 lymphocytaire et PDL-1 exprimé par la CPA (cellule présentatrice d'antigène) [Porichis,

F.]. Donc, l'utilisation d'anticorps anti-PDL-1 ou anti-PD-1 bloquants permet d'éviter cette interaction ligand-récepteur LT-CPA pendant la stimulation antigénique *in vivo* et *ex vivo*.

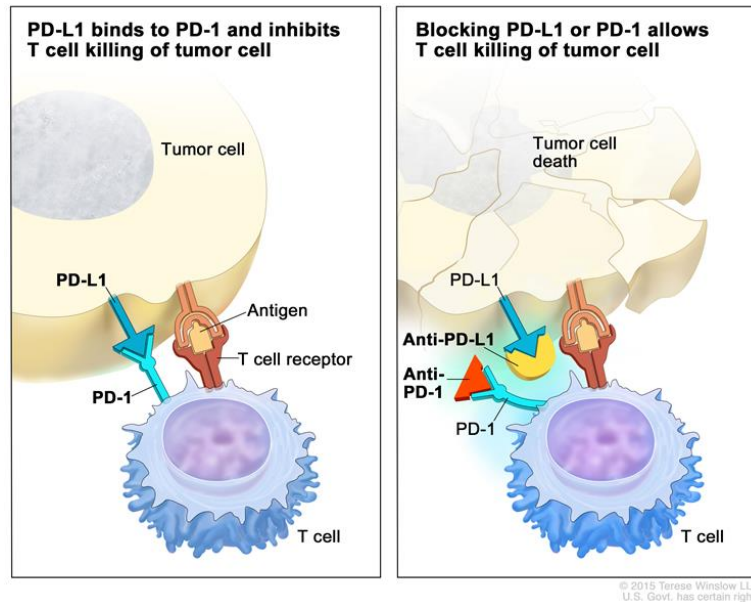


Figure 8. Check-point inhibiteur. La liaison de PD-L1 à PD-1 empêche les cellules T de tuer des cellules tumorales. (D'après <https://siteman.wustl.edu/>)

Partie 4. Signatures fonctionnelles des réponses immunitaires anti-tumorales.

4.1 Généralités.

Au cours des dernières décennies il est devenu de plus en plus clair que le système immunitaire joue un rôle important dans la prévention du cancer grâce à un processus appelé surveillance immunitaire [Dunn, G. P.]. La pression sélective exercée par le système immunitaire résulte dans le développement par la tumeur de multiples mécanismes pour échapper à la détection immunitaire, y compris l'induction de la tolérance immunitaire, la suppression locale de la réponse immunitaire et la perturbation systématique de la signalisation des lymphocytes T [Farkona, S.].

L'induction d'une immunité antitumorale systémique optimale implique l'amorçage des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques pour les antigènes associés aux tumeurs. Le rôle des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (TH) dans cette réponse a été largement attribué à la fourniture de signaux nécessaires à l'amorçage optimal des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, lesquelles sont considérés comme les cellules effectrices dominantes.

Après reconnaissance de l'antigène et activation, les lymphocytes T CD4⁺ prolifèrent et une partie du clone devient des lymphocytes effecteurs ou auxiliaires. Ils recrutent et activent des cellules de l'immunité innée, et favorisent l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et des lymphocytes B spécifiques de l'antigène.

Les lymphocytes T CD4 activés présentent une hétérogénéité fonctionnelle, avec différents profils de sécrétion cytokinique. Les lymphocytes T CD4⁺ sécrétant majoritairement de l'Interféron-gamma (IFN- γ), du TNF- α (Tumour Necrosis Factor - alpha) et de l'Interleukine

2 (IL-2) ont été appelés TH1 (T helper 1). Ces lymphocytes induisent les réponses immunes cellulaires les plus efficaces contre les virus et bactéries intracellulaires. Cependant, les TH1 jouent également un rôle antitumoral important en orchestrant l'immunité à médiation cellulaire contre les cellules cancéreuses [Kennedy, R.]. L'IFN- γ sécrété par les cellules TH1 exerce des actions anti-prolifératives, pro-apoptotiques et inhibe l'angiogenèse dans les cellules tumorales [Ikeda, H.]. En outre, les cellules TH1 recrutent et activent les cellules inflammatoires (macrophages, granulocytes, éosinophiles et cellules NK) dans la tumeur [Kennedy, R.]. En outre, IFN- γ induit la régulation positive des molécules du CMH sur les cellules tumorales conduisant à leur reconnaissance améliorée par les cellules T effectrices [Ikeda, H.]. Ce mécanisme permet l'élimination des cellules tumorales de façon indépendante des lymphocytes B, NK ou d'autres cellules T [Xie, Y.]. En effet, certaines cellules CD4 TH1 ont également une capacité de reconnaissance directe de tumeurs [Matsuzaki, J.]. Elles sont capables de tuer les tumeurs CMH II+ à travers les voies de perforine et de granzyme, TRAIL et Fas/Fas ligand [Kennedy, R.]. Enfin, l'interaction TH-TH permet aussi l'activation de cellules T CD4+ spécifiques dans un cas d'un épitope peu immunogène [Zanetti, M.].

4.2 Les lymphocytes T mémoire : différenciations et fonctions.

Au-delà de l'identification et de la quantification des réponses lymphocytaires T spécifiques, il existe des différences qualitatives entre les différentes réponses immunitaires se développant soit en présence de quantités différentes d'antigènes, soit en fonction des stratégies mises en place par l'agent infectieux ou la tumeur pour contrer cette réponse. La qualité de la réponse immune a été démontrée comme étant un facteur crucial déterminant le caractère protecteur ou non de ces réponses dans le contexte infectieux [Seder, R. A.]. Ainsi, plusieurs études ont démontré que pour des maladies virales persistantes (par exemple infections par VIH, CMV, EBV ou HSV), la charge antigénique module l'hétérogénéité

phénotypique et fonctionnelle des réponses lymphocytaires T anti-pathogènes [Betts, M. R.]. Les réponses immunes anti-virales protectrices sont ainsi associées à des charges virales basses et sont des réponses polyfonctionnelles associant par exemple une sécrétion concomitante d'IL-2, d'IFN- γ , de TNF- α , de MIP-1 β , la prolifération et le développement de réponses cytotoxiques par les mêmes cellules. Par opposition, en présence d'une charge antigénique élevée, les réponses immunes associées sont monofonctionnelles, sans prolifération des LT spécifiques et avec une sécrétion isolée massive d'IFN- γ [Pantaleo, G.].

Cependant, le mécanisme concernant l'acquisition de la polyfonctionnalité reste peu connu. Une étude suggère que l'IL-7 pourrait potentialiser l'efficacité de l'immunothérapie adoptive en améliorant la fonctionnalité des cellules T [Murphy, W.J.].

IL-2, IL-7 et IL-15, trois cytokines souvent utilisées dans l'immunothérapie du cancer, peuvent activer le transducteur de signal et activateur de transcription 5 (STAT5). IL-7 peut conférer une polyfonctionnalité aux cellules T CD4⁺ activées. Dans une étude sur l'immunothérapie adoptive par cellules T, des cellules T CD4⁺ générées par IL-7 ont démontré des effets antitumoraux robustes, en corrélation avec l'épandage de l'épitope antigénique et la persistance de TSCM (LT cellule-souche mémoire) [Ding, Z.C.].

En plus de ces aspects fonctionnels, des différences immunophénotypiques sont également à considérer dans l'évaluation des réponses immunes spécifiques d'antigène. Lors de la première rencontre entre un lymphocyte T et son antigène, on observe une réponse primaire, c'est-à-dire l'activation et la multiplication des cellules spécifiques de cet antigène. Ces lymphocytes « naïfs » se différencient en lymphocytes « effecteurs » (capables de sécréter des cytokines, des substances cytotoxiques, etc. nécessaires à l'élimination de l'antigène), ou en lymphocytes auxiliaires. Une fois l'antigène éliminé, la plupart des lymphocytes T, devenus

inutiles, meurent par apoptose. C'est la phase de contraction clonale. Une petite partie, environ 5 %, restent viables. Ils correspondent aux lymphocytes T mémoire. Les lymphocytes T mémoire font partie des lymphocytes T jouant un rôle vital dans la réponse immunitaire secondaire contre un antigène déjà rencontré. Le pourcentage de lymphocytes mémoire représente cependant une population supérieure en nombre à la population initiale des lymphocytes T naïfs. La réponse secondaire est une caractéristique fondamentale et spécifique de l'immunité adaptative. Cette réponse est caractérisée par sa rapidité, intensité et efficacité accrues par rapport à la réponse primaire.

L'expression différentielle de CD45RA, CCR7 et CD95 par les LT permet l'identification de diverses sous-populations: LT naïfs ($CCR7^+CD45RA^+CD95^-$), LT cellule-souche mémoire ou TSCM ($CCR7^+CD45RA^+CD95^+$), LT mémoires centraux ou TCM ($CCR7^+CD45RA^-$), LT mémoires effecteurs ou TEM ($CCR7^-CD45RA^-$) et LT effecteurs en phase terminale de différenciation ou TEF ($CCR7^-CD45RA^+$). D'autres marqueurs immunophénotypiques sont également utiles pour la discrimination des LT mémoires, comme CD27, CD28, CD57, CD62L et CD127 [Betts, M. R.]. Ces sous-populations diffèrent dans leur capacité de migration vers les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et dans leurs fonctions effectrices (prolifération, sécrétion cytokinique et cytotoxicité). Au moins pour les réponses anti-virales, les réponses lymphocytaires T polyfonctionnelles sont majoritairement le fait de cellules à immunophénotype TCM ou TEM, tandis que les cellules monofonctionnelles sont majoritairement l'apanage des cellules de phénotype TEF. La combinaison des différentes caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des réponses spécifiques d'antigène définit le concept de « signatures fonctionnelles », caractérisant la qualité de ces réponses. Ce concept a été appliqué également à l'allogreffe et aux réponses immunitaires anti-cancer [Inokuma, M.].

4.3 Changements immunitaires chez les patients atteints de HNSCC.

Les patients atteints de cancer et non-traités par des thérapies conventionnelles ne sont généralement pas lymphopéniques. Néanmoins, des proportions accrues de LT circulants pré- ou apoptotiques ont été observés chez des patients atteints de HNSCC ainsi que par le mélanome et le cancer du sein [Dworacki, G. ; Hoffmann, T. K. ; Saito, T.; Reichert, T. E.]. En raison de cette apoptose étendue dans la circulation périphérique et du repeuplement concomitant du compartiment sanguin avec les LT provenant du réservoir de cellules immatures, un renouvellement rapide des cellules effectrices a lieu, de façon similaire à celui décrit pour les patients atteints du VIH [Hellerstein, M. ; Neese, R. A.]. Ces observations suggèrent que l'évaluation des proportions et des nombres absolus des LT et de leurs sous-populations dans la circulation périphérique des patients cancéreux est importante et pourrait fournir un aperçu sur la redistribution des LT jouant un rôle dans la défense antitumorale.

Encore plus important, certaines études montrent des associations entre des anomalies de sous-populations des LT et des faibles survies chez des patients atteints de mélanome et de cancer du sein [Kay, N. E. ; Murta, E. F.]. Cependant, il n'y a pas actuellement de consensus sur l'ampleur des changements dans les différentes sous-populations de LT au cours de la progression du cancer ou leurs relations avec la réponse à la thérapie anti-tumorale spécifique ou encore avec la survie des patients.

4.4 Antigènes tumoraux dans les cancers HNSCC.

De nombreuses cellules tumorales produisent des antigènes, qui peuvent être libérés dans le sang ou rester à la surface de la cellule. Des antigènes ont été identifiés dans la plupart des cancers humains, y compris dans le lymphome de Burkitt, le neuroblastome, le mélanome

malin, l'ostéosarcome, le carcinome rénal, le carcinome du sein, le cancer de la prostate, les carcinomes pulmonaires et le cancer du côlon. Un rôle clé du système immunitaire est la détection de ces antigènes afin de permettre un ciblage ultérieur pour l'éradication. Cependant, malgré leur structure étrangère à l'organisme, la réponse immunitaire aux antigènes tumoraux varie et est souvent insuffisante pour prévenir la croissance tumorale.

Les antigènes tumoraux ne sont que relativement spécifiques des cellules tumorales, alors que les antigènes spécifiques des tumeurs sont spécifiques des cellules tumorales. Les antigènes spécifiques des tumeurs et les antigènes tumoraux sont généralement des portions de molécules intracellulaires exprimées à la surface cellulaire complexés au CMH.

Les mécanismes suggérés d'origine pour des antigènes tumoraux comprennent :

- L'introduction de nouvelles informations génétiques virales (p. ex., protéines du papillomavirus humain E6 et E7 dans le cancer du col de l'utérus) ;
- La modification des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs par des agents cancérigènes, qui génère une protéine de séquence nouvelle directement ou induit l'accumulation de protéines qui ne sont pas normalement exprimées ou exprimées à des niveaux très faibles (p. ex., ras, p53) ;
- Des niveaux anormalement élevés de protéines normalement présentes à de taux substantiellement inférieurs (p. ex., prostate-specific antigens [PSA], melanoma-associated antigens) ou qui ne sont exprimés que pendant le développement embryonnaire (antigènes carcino-embryonnaires) ;
- Le démasquage d'antigènes normalement enchâssés dans la membrane cellulaire du fait d'une homéostasie défectueuse de la membrane des cellules tumorales ;

- La production d'antigènes normalement séquestrés à l'intérieur de la cellule ou de ses organelles lorsque la cellule tumorale meurt.

Dans les carcinomes de la sphère ORL, la protéine p53, mutée dans plus de 80% de cas [Balz V, 12649174] aurait pu représenter une cible intéressante. Bien que capable de générer une réponse lymphocytaire cytotoxique spécifique *in vitro*, les mutations du gène ainsi que les protéines antigéniques sont très variées et presque spécifiques à chaque patient [Hoffmann, T.K.]. L'utilisation régulière de la protéine p53 comme cible nécessiterait donc le développement d'un vaccin spécifique par cas. Cette approche, beaucoup trop compliquée et de surcroît extrêmement coûteuse, n'est pas envisageable que dans le contexte d'essais cliniques de phase I.

Le virus du papillome humain (VPH) a un rôle démontré dans le développement du cancer des voies aérodigestives supérieures. Les sous-types au potentiel oncogénique sont les variantes -11, -16 et -18 [Gillison, M.L.]. L'association du VPH-16 avec les cancers de l'amygdale a été décrite selon les séries dans plus d'un tiers des cas. Ces tumeurs, infectées par le VPH-16, semblent avoir un meilleur pronostic que les mêmes tumeurs sans signe d'infection par le virus [Li, W.; Tran, N.]. Ces constatations cliniques sont extrêmement intéressantes, dans la perspective des résultats récents qui décrivent la présence de lymphocytes cytolytiques activés spécifiquement contre les protéines virales VPH (E6-E7), chez les patients infectés par le VPH-16 [Hoffmann, T.K.]. Le meilleur pronostic clinique chez les patients souffrant d'un cancer amygdalien VPH-16 positif pourrait donc être l'expression clinique de l'efficacité d'une réponse immunitaire antitumorale dirigée contre les antigènes viraux VPH. Cette piste se précise et de nombreuses études sont actuellement en cours afin de confirmer ces premiers résultats et d'envisager la conception d'un vaccin dirigé contre une des protéines virales du VPH.

La Survivine, également appelé inhibiteur baculoviral de l'apoptose contenant 5 (BIRC5), est une protéine qui, chez l'homme, est codée par le gène BIRC5. La Survivine est un membre de la famille « inhibiteur d'apoptose » (IAP). Cette protéine inhibe l'activation des caspases, conduisant ainsi à une régulation négative de l'apoptose ou de la mort cellulaire programmée. Ceci a été démontré par la perturbation des voies d'induction de Survivine conduisant à une augmentation de l'apoptose et à une diminution de la croissance tumorale. La Survivine est fortement exprimée dans la plupart des tumeurs humaines et du tissu fœtal, mais est totalement absente dans les cellules très différenciées [Sah, N.K.]. Ces données suggèrent que la Survivine pourrait constituer une nouvelle cible pour la thérapie contre le cancer qui discriminerait les cellules transformées et les cellules normales.

Une étude récente a montré que la transcription de la télomérase (TERT) est apparue comme une cible universelle prometteuse [Harley, C.B.]. TERT maintient la longueur des télomères après division cellulaire et son surexpression est le mécanisme prédominant développé par les cellules malignes pour échapper à la mort cellulaire [Martinez, P.]. Par conséquent, l'activité TERT a été observée dans toutes les formes de cancer étudiées, y compris les cellules tumorales de type cellules souches [Artandi, S.E.] et est donc une caractéristique des cellules cancéreuses [Hanahan, D.]. Les « UCP » (Universal cancer peptides) sont 4 nouveaux épitopes CD4 dérivés de TERT qui se lient aux allèles HLA-DR les plus couramment trouvés (Tableau 2). En étudiant prospectivement une cohorte de 84 patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (non-small cell lung cancer, NSCLC) avancés, une réponse immune spontanée à la CD4 spécifique à l'UCP dans 38% avant la chimiothérapie a été trouvée [Yann, G.]. La présence de cette réponse s'est révélée significativement associée à un meilleur résultat chez les patients recevant la chimiothérapie. Ces résultats confirment la

relation entre l'état immunitaire antitumoral et le traitement chimiothérapie dans le NSCLC. Cependant, aucune étude à ce jour n'a pas vérifié si les UCP pourraient éventuellement aussi fonctionner comme des antigènes tumoraux chez HNSCC.

Tableau 2. La capacité prévue de liaison des peptides UCP à des allèles DR a été testée en utilisant des essais de liaison ELISA compétitifs [d'après Yann, G.]

Peptides	Sequences	Relative avidity									
		DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
UCP1	PAAFRALVAQCLVCV	3	0.4	50	3	25	1	4	30	4	1
UCP2	KSVWSKLQSIGIRQH	0.2	144	112	1	4	231	8	154	229	1
UCP3	GTAFVQMPAHGLFPW	0.1	173	2	2	0.2	134	0.2	53	>500	0.2
UCP4	SLCYSILKAKNAGMS	0.3	>500	34	8	0.3	>500	3	154	>500	0.5



OBJECTIFS

Tel que mentionné précédemment, les caractéristiques des réponses immunitaires anti-tumorales spécifiques pourraient être variables en fonction de la charge tumorale, laquelle pourrait être évaluée à son tour par l'énumération des CTC. Nous avons donc dans ce travail vérifié cette hypothèse par l'évaluation concomitante des signatures fonctionnelles des réponses immunes lymphocytaires T spécifiques des antigènes tumoraux et du taux et les caractéristiques des CTC chez des patients atteints d'un HNSCC.

Objectif principal :

- Mettre en évidence des modifications dans l'amplitude (quantité) et le degré de polyfonctionnalité (qualité) des réponses immunes lymphocytaires T spécifiques des antigènes associés aux tumeurs chez des patients atteints d'un HNSCC.

Objectifs secondaires :

- Décrire les modifications dans l'amplitude et le degré de polyfonctionnalité de la réponse immune en fonction de la présence et énumération des CTC.
- Déterminer la valeur pronostique des modifications de la réponse immune et des CTC en termes de survie sans récurrence (DFS) dans les 18 mois.



RESULTATS

Article 1 (Annexe 1)

**Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor
Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma:
a systematic review and meta-analysis**

Valeur diagnostic et pronostique des cellules tumorales circulantes dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou: une revue systématique et méta-analyse.

Xiang-Lei Wu, Qian Tu, Gilbert Faure, Patrice Gallet, Chantal Kohler & Marcelo De Carvalho Bittencourt.

Scientific Reports. 2016, 2; 6:20210

Résumé.

Plusieurs techniques ont été développées pour détecter les cellules tumorales circulantes (CTC) chez les patients atteints de carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HNSCC), mais leur valeur diagnostique et pronostique n'est pas encore complètement établie. Une récupération informatisée de la littérature a été réalisée sans restriction de temps à l'aide de la base de données électronique en décembre 2014. Les variables de précision diagnostique ont été regroupées et analysées par le logiciel Meta-DiSc. Le Digitizer et le logiciel Stata ont été utilisés pour l'analyse de survie groupée. Vingt-deux études ont été retenues pour l'examen systématique, dont 9 pour la méta-analyse de test diagnostique et 5 pour la méta-analyse pronostique. L'analyse des sous-groupes concernant la précision de détection a montré une sensibilité combinée de 24,6% et une spécificité combinée de 100% à l'aide d'une stratégie de sélection positive, qui présentait en outre une faible hétérogénéité. La présence de CTC était significativement associée à une survie sans maladie plus courte (DFS, HR 4,62, IC 95% 2,51-8,52). En conclusion, la preuve actuelle identifie le test de détection de CTC comme un test extrêmement spécifique, mais de faible sensibilité dans les HNSCC. En outre, la présence de CTC indique une DFS inférieure.

Article 2 (Annexe 2)

A rare case of extremely high counts of circulating tumor cells detected in a patient with an oral squamous cell carcinoma

Un cas rare d'énumération extrêmement élevé de cellules tumorales circulantes détectées chez un patient présentant un carcinome épidermoïde de la cavité buccale.

Xianglei Wu, Romina Mastronicola, Qian Tu, Gilbert Charles Faure, Marcelo De Carvalho Bittencourt and Gilles Dolivet.

BMC Cancer (2016) 16:552

Résumé.

Contexte : Malgré les régimes agressifs, les résultats cliniques du traitement du carcinome épidermoïde de la tête et du cou demeurent médiocres. La détection de cellules tumorales circulantes (CTC) pourrait potentiellement améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer disséminé, y compris le diagnostic, les stratégies de traitement et la surveillance. Actuellement, CellSearch® est le système le plus largement utilisé et le seul autorisé par FDA (Food and Drug Administration) pour la détection des CTC chez les patients présentant un cancer métastatique du sein, du cancer colorectal ou de la prostate. Dans la plupart des cas de carcinome épidermoïde de la tête et du cou, seul un faible nombre de CTC a été signalé.

Présentation du cas : Un homme de 56 ans, blanc, sans antécédents médicaux particuliers, a été diagnostiqué avec un carcinome épidermoïde de la cavité buccale. Selon les résultats de l'imagerie (tomodensitométrie et tomographie par émission de positrons au fluorodeoxyglucose 18F / tomodensitométrie) et panendoscopie, le stade TNM a été classée T4N2M0. Une pelvimandibulectomie non interruptive a été réalisée selon les conseils de la réunion multidisciplinaire et les observations postopératoires étaient normales. Le patient se plaignait d'un œdème cervical douloureux et d'un trisme 6 semaines après la chirurgie. Une récurrence a été constatée par tomodensitométrie et le patient est décédé deux semaines plus tard. La détection de CTC dans le sang veineux périphérique en utilisant le système CellSearch® a trouvé un très grand nombre de ces cellules par rapport aux données publiées en trois temps différents de la prise en charge de la maladie (préopératoire, 400 ; intra-opératoire, 150 ; 7ème journée post-opératoire, 1400). Il est à noter que toutes les CTC détectées étaient négatives pour le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor).

Conclusion : Nous rapportons ici pour la première fois un cas rare d'énumération extrêmement élevée de cellules tumorales circulantes détectées chez un patient présentant un carcinome épidermoïde de la cavité buccale en utilisant le système CellSearch®. Le nombre absolu de CTC pourrait donc prédire une phase particulière de développement du cancer ainsi qu'une mauvaise survie, contribuant potentiellement à une prise en charge médicale personnalisée.

Mots-clés: Carcinome épidermoïde de la cavité buccale, cellules tumorales circulantes, Carcinome épidermoïde de la tête et du cou, Survie.

Article 3 (Annexe 3):

CellSearch® technology applied to the detection and quantification of tumor cells in CSF of patients with lung cancer leptomeningeal metastasis

Application de la technique CellSearch® pour la détection et la quantification de cellules tumorales dans le LCR chez les patients atteints de métastases leptoméningées et d'un cancer du poumon.

Qian Tu; Xianglei Wu; Emilie Le Rhun; Marie Blonski; Basile Wittwer; Luc Taillandier; Marcelo De Carvalho Bittencourt; Gilbert C. Faure.

Lung cancer, 2015 Nov;90(2):352-7

Résumé.

Objectifs : Le diagnostic des métastases leptoméningées (LM) repose sur la cytologie du liquide céphalo-rachidien (LCR) et / ou sur l'imagerie du neuraxis, mais tous les deux manquent d'une sensibilité suffisante. L'utilité du CellSearch®, une technologie approuvée par la FDA, dans l'évaluation des cellules tumorales du LCR (CSFTC) a été évaluée ici dans le diagnostic et le traitement des patients atteints de cancer du poumon avec LM.

Matériaux et méthodes : Dans le cadre de la prise en charge d'un cancer du poumon, 18 patients avec LM confirmé par IRM ont été recrutés. Un volume de 5ml de LCR a été recueilli dans un tube conservateur CellSave®, ce qui permet de détecter les cellules tumorales jusqu'à 96 h suivant le prélèvement. En utilisant une méthode CellSearch® préalablement adaptée, nous avons détecté, visualisé et énuméré les CSFTC et comparé les résultats avec la méthode cytologique classique. Chez 3 patients les cellules tumorales ont été évaluées séquentiellement pour explorer le rôle prédictif de l'énumération des CSFTCs dans le suivi de la réponse au traitement.

Résultats : Les CSFTC ont été détectées dans 14 échantillons (médiane 785CSFTCs / 5 mL CSF, gamme 1 à > 20 000), donnant une sensibilité de 77,8% contre 44,4% pour la méthode cytologique classique. Des grappes de CSFTC ont été observées chez 12 patients, semblables à celles décrites précédemment dans le sang sous forme de micro-embolus tumoraux circulants (CTM), et ont été énumérées séquentiellement avec des résultats reproductibles, qui ne correspondaient pas nécessairement à la réponse au traitement.

Conclusion : La technologie CellSearch®, appliquée à des volumes limités des échantillons et permettant une augmentation du temps pré-analytique, pourrait avoir un grand intérêt dans le diagnostic de métastases leptoméningées LM chez les patients atteints d'un cancer d'origine épithéliale. Mots clés :

CellSearch®; Cellule tumorale; Cancer du poumon; Métastases leptoméningées.

Article 4 (Annexe 4):

Prognostic value of the concomitant evaluation of tumor-associated immune responses and circulating tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma

Valeur pronostique de l'évaluation concomitante des réponses immunitaires associées aux tumeurs et des cellules tumorales circulantes dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou.

Xianglei WU, Patrice GALLET, Qian TU, Gilbert FAURE, Roger JANKOWSKI, Chantal KOHLER, Christine ANDRE-BOTTE, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT.

(en préparation)

Résumé

Objectif : Le phénotype et la fonction des lymphocytes T spécifiques aux antigènes associés aux tumeurs (AAT) pourraient être variables en fonction de la présence de cellules tumorales circulantes (CTC). Ces paramètres combinés pourraient être de nouveaux biomarqueurs et des facteurs pronostiques dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HNSCC).

Matériels et méthodes : Nous avons évalué de manière concomitante les réponses immunitaires anti-AAT et les CTC chez 24 patients avec HNSCC et 5 témoins appariés selon l'âge. Les PBMC ont été stimulées pendant la nuit avec du milieu seul ou des peptides chevauchants à partir de protéines de Survivine ou de Télomerase en présence de brefeldine-A et d'anticorps costimulateurs. La production de cytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-2) et les profils phénotypiques (CD3, CD4, CD8) ont été évalués par cytométrie de flux. Les CTC ont été détectées par la technologie CellSearch[®] Veridex.

Résultats : Ni les réponses immunitaires anti-AAT ni les CTC n'ont été détectés chez les témoins. Le taux positif de CTC était de 50% (12 sur 24 patients). Des lymphocytes T spécifiques aux AAT ont été détectés chez 14 des 24 patients. Ces lymphocytes T étaient en majorité CD4⁺ (67%). En outre, la majorité des lymphocytes T spécifiques aux AAT étaient soit monofonctionnels (47%) soit bifonctionnels (32%). Pour les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques aux AAT, les réponses TNF- α ou IFN- γ étaient proportionnellement plus élevés que la réponse IL-2 ($p = 0,001$). La répartition des sous-populations de mémoire des cellules T spécifiques aux AAT a été évaluée pour 9 patients: les lymphocytes T CD4⁺ étaient principalement des lymphocytes T mémoire centraux (TCM) et des lymphocytes T mémoire effecteurs (TEM), mais les lymphocytes T CD8⁺ étaient principalement des TEM uniquement. Les fractions monofonctionnelles de CD4⁺ TCM et TEM étaient significativement supérieures à celles des lymphocytes T souches mémoires (TSCM, $p < 0,01$) et des lymphocytes T effecteurs en phase terminale de différenciation (TEFF, $p < 0,05$). En outre, la fraction bifonctionnelle de TEM était également plus importante que les fractions de TSCM et TEFF ($p < 0,05$, pour les deux). Les fractions monofonctionnelles et bifonctionnelles des CD8⁺ TEM étaient significativement plus importantes que celles des lymphocytes T naïfs, TSCM et TEFF ($p < 0,01$ et $p < 0,05$, respectivement). Par rapport à la sous-population TSCM, les CD4⁺ TCM ($p = 0,04$) et CD8⁺ TEM ($p = 0,02$) étaient

plus multi-compétents. La présence de CTC était significativement associée à l'amplitude de la réponse des lymphocytes T spécifiques aux AAT ($p = 0,04$). Plus précisément, chez les 6 patients avec une réponse concomitante aux deux TAA, 5 avaient des CTC détectables. En outre, les patients avec des CTC et des lymphocytes T spécifiques aux AAT présentaient un nombre plus élevé de lymphocytes T CD4+IFN- γ + comparativement aux patients avec des lymphocytes T spécifiques aux AAT mais pas des CTC détectables ($p = 0,03$). L'absence de CTC, la présence de lymphocytes T spécifiques aux AAT, ou la combinaison de ceux-ci, étaient tous des paramètres montrant une tendance pour une meilleure survie globale ou une survie sans maladie, sans toutefois parvenir à des différences statistiquement significatives.

Conclusion : Les CTC pourraient être un indicateur indépendant de la charge tumorale immunogène. L'amplitude et les signatures fonctionnelles des lymphocytes T spécifiques aux AAT chez les patients atteints de HNSCC sont probablement influencées par la présence des CTC.

Prognostic value of the concomitant evaluation of tumor-associated immune responses and circulating tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma

Xianglei WU^{1, 2, 3}, Patrice GALLET⁴, Qian TU⁵, Gilbert FAURE^{2, 3}, Roger JANKOWSKI⁴, Chantal KOHLER³,
Christine ANDRE-BOTTE³, Phi Linh NGUYEN-THI⁶, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT^{2, 3 *}

¹: Eye and ENT Hospital of Fudan University, Shanghai, China

²: SBS Department, CRAN, UMR 7039 CNRS, University of Lorraine, France.

³: Laboratory of Immunology, Nancytomique platform, CHU of Nancy, France.

⁴: Department of Otolaryngology and Cervico-facial Surgery, CHU of Nancy, France.

⁵: Department of Geriatrics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

⁶: Platform of Clinical Research Support - PARC, CHRU Nancy, Nancy, F-54000, France.

* Corresponding author. Avenue du Morvan, 54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel: (+33) 0383157615.

Fax: (+33) 0383157660. E-mail: marcelo.decarvalho@univ-lorraine.fr.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

XW and QT conducted the manipulations and data analysis; PG and RJ were responsible for the clinical management; XW wrote the manuscript; PG, GF, and MCB were in charge of the concept and design of the study; XW and PLNT examined the data and conducted the statistical analysis. MCB, GF, CK, and CAB reviewed and edited the manuscript extensively. All of the authors were involved in revision of the manuscript and approved its final version.

Abstract

Object: The phenotype and function of tumor associated antigens (TAA)-specific T lymphocytes might be variable depending on the presence of circulating tumor cells (CTC). These combined parameters might be new biomarkers and prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

Methods: We concomitantly evaluated anti-TAA immune responses and CTC in 24 patients with HNSCC and 5 age-matched controls. PBMC were stimulated overnight with medium or overlapping peptides from Survivin or Telomerase proteins in the presence of brefeldin-A and costimulatory antibodies. Cytokine production (IFN- γ , TNF- α , and IL-2) and phenotype profiles (CD3, CD4, CD8, CD45, CD95, and CCR7) were evaluated by flow cytometry. CTC were detected by the CellSearch® Veridex.

Results: The CTC positive rate was 50% (12 out of 24 patients). TAA-specific T-cells were detected in 14 out of 24 patients. The majority of the TAA-specific T-cells were either monofunctional (47%) or bifunctional (32%). For both CD4+ and CD8+ TAA-specific T-cells, proportionally higher TNF- α or IFN- γ than IL-2 were produced ($p=0.001$). The distribution of memory subpopulations of TAA-specific T cells was evaluated for 9 patients: CD4+T cells predominantly exhibited central memory T cells (TCM) and effector memory T cells (TEM) phenotypes but CD8+T cells were predominantly TEM only. The monofunctional fractions of CD4+ TCM and TEM were significantly greater than those of the stem memory T cells (TSCM, $p < 0.01$) and T cells in terminal phase of differentiation (TEFF, $p < 0.05$). Moreover, the bifunctional fraction of TEM was also larger than the fractions of TSCM and TEFF ($p < 0.05$, for both). The monofunctional and bifunctional fractions of CD8+ TEM were significantly larger than those with naive T cells, TSCM and TEFF ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Compared with the TSCM subpopulation, CD4+ TCM ($p = 0.04$) and CD8+ TEM ($p = 0.02$) were more multi competent. The presence of CTC was significantly

associated with the width of TAA-specific T-cells response ($p=0.04$). Specifically, in the 6 patients with a concomitant response to both TAAs, 5 had detectable CTC. Also, the CTC positive patients with detectable TAA-specific T-cells had higher numbers of CD4+IFN- γ + cells compared with the patients with TAA-specific T-cells but no detectable CTC ($p=0.03$). The absence of CTC, the presence of TAA-specific T-cells, or the combination of these, were all parameters showing a trend for a better overall survival or disease-free survival, yet not reaching statistically significant differences.

Conclusion: CTC could be an independent indicator of immunogenic tumor-load. The width and functional signatures of TAA-specific T-cells in patients with HNSCC was associated with the presence of CTC.

Key words: tumor-associated immune responses, circulating tumor cells, head and neck squamous cell carcinoma, prognostic.

Introduction

Despite substantial advances in research and clinical practice, head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), the sixth common cancer worldwide, remain a serious public health problem [1, 2]. HNSCC patients are often diagnosed at advanced stages. Approximately 10 % of the newly diagnosed HNSCC patients already present with distant metastasis and for whom cure is unattainable [3]. Conventional therapies for HNSCC patients including surgery, radiotherapy and Cisplatin-based chemotherapy are always aggressive and with considerable side effects. The prognosis for patients at early stages is satisfactory, but for patients with advanced disease it has not much changed in the past 20 years. The overall 5-year survival remains at a disappointing 40%-50% [4].

There is an urgent need for new biomarkers to diagnose HNSCC at an early stage or even to provide alternative targeted therapeutic strategies. Also, at present, there are still no convincing histological or biological criteria to predict the risk of development of metastatic disease. Over the past 20 years, significant advances in the field of circulating tumor cells (CTC) identification resulted in a major role of this approach in early diagnosis, stage of disease, prognostic and therapy response of head and neck cancer [5].

In the case of persistent antigens release, the antigen loads regulate both the phenotype and functions of antigen-specific T-cells. The differential expression of CD45RA, CCR7 (CD197) and CD95 by T cell allows identification of various memory subpopulations: naive T cells (T naive, CCR7+CD45RA+CD95-), stem memory T cells (TSCM, CCR7+CD45RA+CD95+), central memory T cells (TCM, CCR7+CD45RA-), effector memory T cells (TEM, CCR7-CD45RA-) and effector T cells in terminal phase of differentiation (TEFF, CCR7-CD45RA+) [6]. These subpopulations differ in their ability to migrate to lymphoid and non-lymphoid tissues and their effector functions (proliferation, cytokine secretion and cytotoxicity) [7, 8]. These changes, also known as “functional signatures”, have been described in patients with viral infections (e.g. HIV, CMV, EBV, HSV) [6] or malignant diseases [9, 10]. Since the CTC might be an independent prognostic variable of tumor burden [11], it would be important to characterize tumor associated antigens (TAA)-specific T-cells under different charges of CTC. To our knowledge, currently no evidence has been described in this domain.

Therefore, we have herein quantified CTC and concomitantly evaluated the phenotype and function TAA-specific T-cells in HNSCC patients. We hypothesized that the characteristics of such TAA-specific immune responses might be variable depending on presence of CTC. We suggest that these concomitant evaluations might be potential biomarkers for new staging stratification and prognostic factors in patients with HNSCC.

Methods

Subjects

During the period from January 2014 to July 2015, in total 24 patients with HNSCC of advanced stages (clinical stage III-IV) have been included at the department of Oto-rhinolaryngology and head and neck surgery of University Hospital of Nancy.

Patients with a history of neoplasia, autoimmune disease, chemotherapy, HIV infection or recent (previous 15 days) corticosteroids treatment were not eligible. All patients included had no previous medical or surgical treatment specifically directed against cancer. According to the same procedure and exclusion criteria, 5 age-matched controls hospitalized for the management of non-cancerous ORL pathologies were recruited. The written informed consents have been obtained from all individuals participating in this study. The patients were then followed at least one year by their surgeon or family doctor.

CTC detection

The integral process of manipulations is summarized as in **Figure 1**. Peripheral venous blood (7.5mL) was collected in CellSave[®] tubes from each subject for CTC detection. Also, 15ml of blood in sodium heparin was collected for the evaluation of T-cell immune response by flow cytometry. The detection of CTC was conducted by using the CellSearch[®] system (Veridex LLC, NJ, USA). The samples were prepared according to the standard protocol [12]. The selection and enrichment of the suspected cells through an immunomagnetic method were carried out by the CellTracks[®] AutoPrep[®] system. In the final preparation step, the cells were resuspended in the MagNest[®] cell display device (Veridex) and were then analyzed by using the CellTracks Analyzer II[®] (Veridex) system.

The criteria for defining a CTC included a morphologically round to oval cell with a visible nucleus (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI positive), a positive fluorescence for cytokeratin 8, 18 and 19 in the cytoplasm and a negative fluorescence for CD45. The enumeration of CTC was expressed as the number of positive cells per 7.5 mL of blood. The results were analyzed by two independent operators.

Detection of intracellular cytokine by flow cytometry

PBMC were isolated by density gradient centrifugation. Cell concentration was adjusted between 2.5×10^6 and 5×10^6 PBMC per mL in AIM-V[®] culture medium (Gibco, UK) using fluorescent beads (FlowCount[®], Beckman Coulter, USA). A cell suspension containing 5×10^5 to 10^6 PBMC per well was then transferred to 96-well culture plates for stimulation by two tumor-associated antigens. Four different stimulations in independent wells were set: 1) positive control (phorbol myristate acetate - PMA at 50ng/mL, Sigma-Aldrich, USA) and Ionomycin at 0.5 μ g/mL, Sigma-Aldrich); 2) Negative Control (AIM-V medium alone); 3) Universal Cancer Peptides^{ref} (UCP, collaboration with O Adotévi, Besançon, France; 4 peptides from the Telomerase protein, synthesized by JPT Peptide Technologies, Germany); 4) Survivin peptides mix (PepMix[™], JPT). TAA-peptides were added at a final concentration of 5 μ g/ml. Anti-CD28/CD49d costimulatory antibodies (5 μ g/mL, BD Biosciences, USA) and anti-human CD274 (PDL-1, 5 μ g/mL, eBioscience, USA) were added to all wells excepting positive controls. Brefeldin A (10 μ g/mL, Sigma-Aldrich) was also added to all wells to block cytokine secretion. After incubation at 37°C, 5% CO₂ for 16 hours, the TAA-specific T lymphocytes were identified by multiparametric flow cytometry using the following antibodies and fluorochromes: CD3-APC-Alexa Fluor 750, CD8-APC-Alexa Fluor 700 (Beckman Coulter), CD4-PE-Cy[™]7, IFN- γ -V450 (BD Biosciences), IL-2-APC, TNF- α -FITC

(Miltenyi Biotec, USA) and Aqua amine-reactive viability dye (Invitrogen). For the evaluation of memory subpopulations of TAA-specific T cells, the following extra antibodies were added: CD45RA-PerCP-Cy5.5, CCR7-PE-CyTM7, and CD95-PE (all from BD Biosciences). Cells were firstly stained at the surface with viability marker and anti-CD3, CD4 and CD8 antibodies and then fixed and permeabilized (IntraStain[®] kit, Dako) before staining with anti-cytokine antibodies using a standard protocol. Fluorescence-labeled cells were acquired by using a Navios[®] cytometer (Beckman Coulter) and generated data was analyzed by a sequential gating strategy using the Kaluza[®] software (v1.3, Beckman Coulter) (Supplementary Figure S2). To be considered positive, TAA-specific T-cell responses needed to be at least twice the range of unstimulated background (without TAA).

Statistical analysis

The SPSS 20.0 software (IBM, USA) was used to analyze the data and draw the figures. The Fisher's exact test and non-parametric Kruskal-Wallis H test were used to assess the statistical relationship among the enumeration of CTCs, the clinical characteristics, and the presence of TAA-specific immune responses. The Kaplan-Meier estimate and Log-rank test were conducted for survival analysis. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Clinical characteristics are not associated with the presence of CTC

The clinical characteristics of the involved subjects and the results of CTC detections are presented in **Table 1**. The CTC positive rate was 50% (12 out of 24 patients). Morphologically, these CTCs had rather a fusiform aspect with irregular edge and the size of the cells was variable (5 μ m - 40 μ m, **Supplementary Figure S1**). No significant correlations

were found between tumor stages, lymph nodes metastasis and CTC presence. No CTC were detected in the five non-cancer controls.

The pattern of TAA-specific T-lymphocyte responses

In unstimulated negative control wells, very low-level spontaneous cytokine responses were detected (median = 0.5% of cytokine positive lymphocytes). Overall, in 14 out of 24 patients (58.3%) significant higher production of cytokines were identified after stimulations with TAAs. In response to UCP and Survivin peptides, the amplitude of total cytokine production by total CD3+lymphocytes were 4.0% and 3.5% respectively, with no significant differences found between the immune responses to these two TAA.

The overall detectable immune responses to the two TAA were therefore pooled for further analysis (9 patients responded to either UCP or Survivin, 5 patients responded to both). As shown in **Figure 2**, cytokines were secreted in majority by CD4+ lymphocytes (67%). Also, most of the cytokine producing lymphocytes were either monofunctional (47%) or bifunctional (32%). For both CD4+ and CD8+ lymphocytes, these cytokines consisted of proportionally higher TNF- α or IFN- γ than IL-2 ($p = 0.001$).

We then evaluated the immunophenotypic profiles of memory T cells for 9 patients. Representative dot-plot of TAA-specific memory T cells is shown in Supplementary Figure 2. TAA-specific CD4+T cells predominantly exhibited TEM and TCM phenotypes: (median 32.50%, range 18.30 - 70.41%). In contrast, CD8+T cells were predominantly TEM only (median 49.42%, range 17.65% - 76.70%). For both CD4+ and CD8+ T cells, TEM and TCM had more polyfunctional profiles than other subpopulations (**Figure 3**).

As presented in **Figure 3**, among the memory subpopulations of TAA-specific CD4+ lymphocytes, the monofunctional fractions of TCM and TEM were significantly greater than those of the TSCM and TEFF ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Moreover, the bifunctional fraction of TEM was also larger than the fractions of TSCM and TEFF ($p < 0.05$, for both). However, no significant differences were found between the monofunctional and bifunctional fractions of TCM and TEM. Among the memory subpopulations of TAA-specific CD8+ lymphocytes, the monofunctional and bifunctional fractions of TEM were significantly larger than those with T naive, TSCM and TEFF ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively).

The newly described polyfunctionality index numerically evaluates the degree and variation of polyfunctionality [13]. The polyfunctionality index for each TAA-specific memory subpopulation (CD4+ and CD8+) was established (Supplementary Figure S3). No significant differences were found between the overall CD4+ and CD8+ memory subpopulations. However, compared with the TSCM subpopulation, CD4+ TCM (median 33.61, vs CD4 + TSCM median 16.67, $p = 0.04$) and CD8+ TEM (median 36.38 vs. CD8 + median TSCM 23, $p = 0.02$) were more multi competent.

Correlation between the presence of CTC, TAA-specific immune response, and prognosis

The presence of CTC was significantly associated with the width of TAA-specific CD3+ lymphocytes response ($p = 0.04$). Specifically, in the 6 patients with a concomitant response to both TAAs, 5 had detectable CTC. Then, tumoral antigen load, as represented by CTC, was significantly associated with the magnitude of TAA-specific T-cell response.

Also, the CTC positive patients with a detectable immune response to TAA had higher numbers of CD4+IFN- γ + cells compared with the patients with detectable TAA-specific immune responses but no detectable CTC ($p = 0.03$, **Figure 4**). However, this correlation was not found concerning CD4+TNF- α +, CD4+IL2+ or CD8+CK+ T-cells.

A trend toward better overall survival (OS) or disease-free survival (DFS) was found for the absence of CTC, the presence of TAA-specific T-cells, or the combination of both. However, none of these parameters reached statistically significant differences for a correlation with survival (**Figure 5**).

Discussion

Personalized cancer immunotherapy would probably gain in efficacy if guided by a systematic view on tumor antigenic load and corresponding cancer-specific T-cell immunity. A better understanding of the interaction "tumor antigenic load - immune functional signatures" could contribute to the development of novel therapies inducing superior and sustainable protective immunity against cancers [14, 15]. Current TNM staging system based on imaging results lacks the potential to provide aforementioned information [16-18]. Recent studies have shown the superiority of a new approach, Immunoscore, over the AJCC/UICC-TNM classification through a composite analysis on the tissue immune contexture [19-20].

We herein show for the first time that CTC might be measured as an independent indicator, i.e. not associated with the TNM staging system, for evaluating the tumor antigen load in HNSCC patients. Moreover, we also show original findings that CTC modulated not only the magnitude but also the pattern of TAA-specific T-cell response.

Our pilot study was designed to enumerate CTC only at the baseline level, avoiding then the multiples variables present during the treatment. We described a positive rate of CTC detection at 50%, which is at almost the same level compared with recent published results [21-24]. As we have stated in a recent meta-analysis [25], although of extremely high specificity, this test should not be used as a screening or diagnostic tool due to the relatively low sensitivity. Cristofanilli M et al. found that CTC have an independent prognostic value of tumor burden and might represent an important marker of tumor biology in metastatic breast cancer [11]. The prognostic value of CTC in HNSCC has been found in association with DFS but not OS. In our study, with relative low numbers of patients, we could only describe a trend for a favorable impact of CTC and anti-TAA immune responses in survival. We have now begun a multicentric study with higher numbers of patients as wells as a longer follow-up to confirm these observations.

To date very little evidence have been described in the literature concerning the association between “functional signatures” of TAA-specific immune response and tumoral antigenic load.

Research on viral antigen-specific T-cells has found that polyfunctional profiles are associated with low viral load and a monofunctional profile when the viral load is elevated [26-28]. Monofunctional profiles reported in the literatures were variable: in the case of CMV, the proportion of CD8+IFN- γ + T-cells was highest; in influenza virus infections, CD8+IL-2+ T-cells dominated in memory subpopulations.

Several studies have shown that polyfunctionality of T cells is a major factor in predicting a clinically protective immune response, particularly in vaccine trials [29, 30]. There is very little data available for oncology, but there are indications that the similar mechanisms are

developed against tumor antigens as against viral antigens [10]. Indeed, it has been shown that a polyfunctional response of Th1 type is associated with greater sensitivity to tumor antigens [31]. Another study reported an increase of polyfunctional anti-tumoral T cells associated with a sustained clinical response in patients with melanoma and treated with CTLA-4 blocking antibody [32]. In the study of Inokuma et al. [10], in breast cancer patients, monofunctional CD8+IL-2+ T cells were shown to predominate in the TAA-specific T cells population. At the same time, less CD4+IFN- γ + and CD8+IFN- γ + T cells were found compared to anti-CMV or anti-influenza responses. Of note, as stated above, the patients enrolled in our study were evaluated before the onset of all treatment. The “functional signature” of these T-cell responses thus represented the initial status of their immunity. This might at least partly explain the observed differences of cytokine pattern in breast cancer and HNSCC, as the former patients had their TAA-specific immune responses evaluated later in their clinical evolution.

In our study we found that the TAA-specific CD4+ TCM, TEM and the CD8+ TEM contain significant higher proportion of monofunctional or bifunctional cells. In addition, they are the only subpopulations with trifunctional cells. The maturation of the memory TAA-specific T cells and corresponding functional profile therefore did not present a linear correlation, which seemingly contradicted the general cases observed in infectious diseases (Supplementary Figure 4, ref. 33). Furthermore, even in viral infections the study on functional signatures found that increased differentiation of maturation associated with decreased polyfunctionality of HIV-specific CD8+ T cells but not the one of CMV-specific cells [34]. Therefore the association between memory compartment and functional profile of antigen-specific T cells should be discussed case by case.

In conclusion, our results suggest that CTC could be an independent indicator of immunogenic tumor-load. The width and “functional signatures” of cytokine-positive T-cells in HNSCC patients was associated with the presence of CTC. The prognostic value of the combined evaluation of these two parameters must be evaluated in a larger cohort and longer follow-up studies.

References

1. Haddad RI, Shin DM: Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359:1143-54, 2008
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66:7-30, 2016
3. Vermorken JB, Specenier P: Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* 21 Suppl 7:vii252-61, 2010
4. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH: The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11:9-22, 2011
5. Mockelmann N, Laban S, Pantel K, et al: Circulating tumor cells in head and neck cancer: clinical impact in diagnosis and follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271:15-21, 2014
6. Pantaleo G, Harari A: Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 6:417-23, 2006
7. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-63, 2004
8. Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, et al: Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *J Clin Invest* 123:594-9, 2013

9. Mortarini R, Piris A, Maurichi A, et al: Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8⁺ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res* 63:2535-45, 2003
10. Inokuma M, dela Rosa C, Schmitt C, et al: Functional T cell responses to tumor antigens in breast cancer patients have a distinct phenotype and cytokine signature. *J Immunol* 179:2627-33, 2007
11. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, et al: Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer* 7:471-9, 2007
12. Janssen Diagnostics L: CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial) Instructions for Use.
13. Larsen M, Sauce D, Arnaud L, et al: Evaluating cellular polyfunctionality with a novel polyfunctionality index. *PLoS One* 7:e42403, 2012
14. Mandal R, Chan TA: Personalized Oncology Meets Immunology: The Path toward Precision Immunotherapy. *Cancer Discov* 6:703-13, 2016
15. Yarchoan M, Johnson BA, 3rd, Lutz ER, et al: Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 2017
16. Patel SG, Shah JP: TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 55:242-58; quiz 261-2, 264, 2005
17. O'Sullivan B, Shah J: New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Semin Surg Oncol* 21:30-42, 2003
18. Manikantan K, Sayed SI, Syrigos KN, et al: Challenges for the future modifications of the TNM staging system for head and neck cancer: case for a new computational model? *Cancer Treat Rev* 35:639-44, 2009

19. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al: Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29:610-8, 2011
20. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298-306, 2012
21. Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC, et al: Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck* 34:1440-4, 2012
22. Bozec A, Ilie M, Dassonville O, et al: Significance of circulating tumor cell detection using the CellSearch system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270:2745-9, 2013
23. Buglione M, Grisanti S, Almici C, et al: Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer* 48:3019-26, 2012
24. Grisanti S, Almici C, Consoli F, et al: Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One* 9:e103918, 2014
25. Wu XL, Tu Q, Faure G, et al: Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 6:20210, 2016
26. Alexander-Miller MA: Differential expansion and survival of high and low avidity cytotoxic T cell populations during the immune response to a viral infection. *Cell Immunol* 201:58-62, 2000
27. Mueller SN, Ahmed R: High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8623-8, 2009

28. Streeck H, Brumme ZL, Anastario M, et al: Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells. *PLoS Med* 5:e100, 2008
29. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, et al: Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* 204:1405-16, 2007
30. Thakur A, Pedersen LE, Jungersen G: Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine* 30:4907-20, 2012
31. Wilde S, Sommermeyer D, Leisegang M, et al: Human antitumor CD8+ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition. *J Immunol* 189:598-605, 2012
32. Yuan J, Gnjatic S, Li H, et al: CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci* 105:20410-5, 2008
33. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, et al: The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 43:2797-809, 2013
34. Riou C, Treurnicht F, Abrahams MR, et al: Increased memory differentiation is associated with decreased polyfunctionality for HIV but not for cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 189:3838-47, 2012

Tables

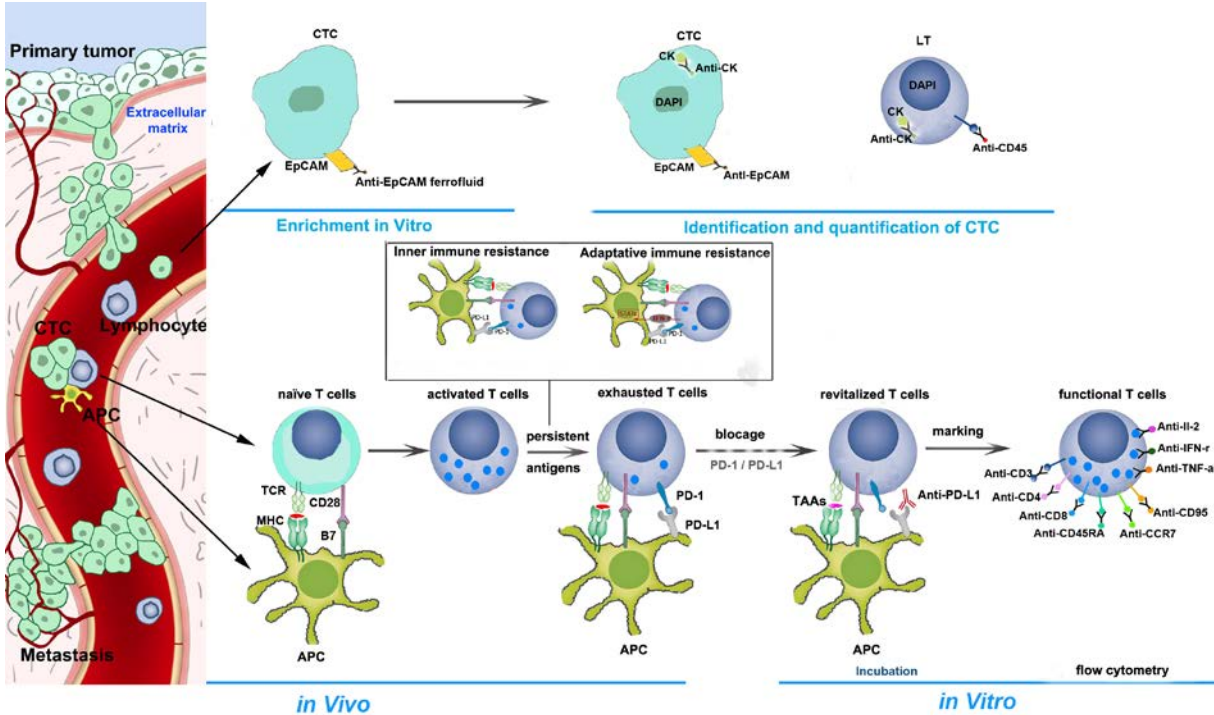
Table 1. Clinical features of patients and results of CTC detections

				CTC +	CTC -
Gender	Female	3			
	Male	21			
Age	61 [46 - 86]				
Clinical staging*	III			4	7
	IV			8	5
Regional lymph nodes*	N ₀			1	4
	N ₊			11	8
Tumor site					
	Oropharynx	11	(45.8%)	5	3
	Hypopharynx	8	(33.3%)	3	2
	Larynx	2	(8.3%)	1	1
	Oral cavity	2	(8.3%)	1	1
	Hypopharynx and larynx	1	(4.2%)	1	0

* Accordingly to American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging classifications (8th Edition).

Figures and legends

Figure 1. Overall experimental design.



APC, antigen-presenting cell; EpCAM, Epithelial cell adhesion molecule; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; CK, cytokeratin; TL, T lymphocyte; TCR, T-cell receptor; MHC, major histocompatibility complex.

Figure 2. HNSCC patients produce TAA-specific cytokine responses.

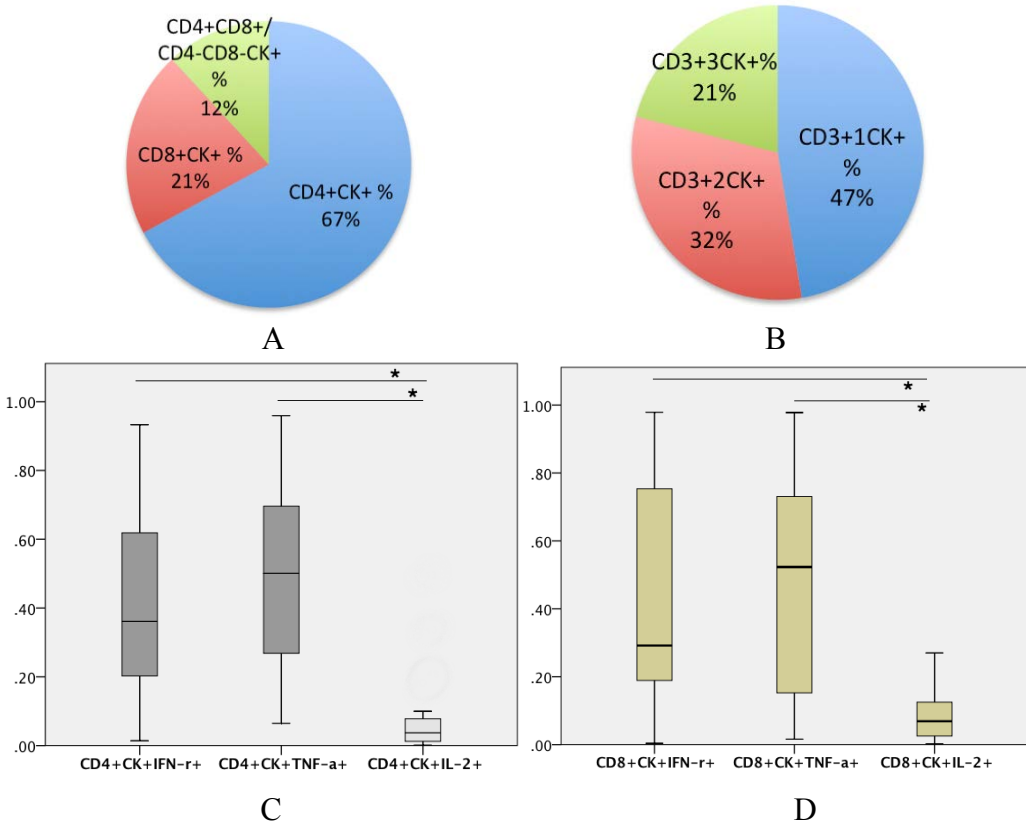
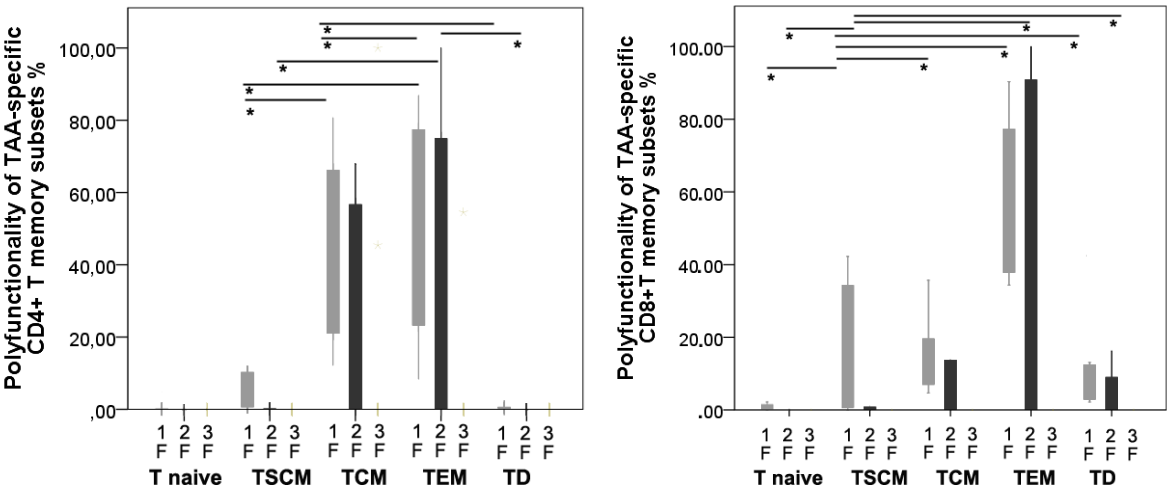


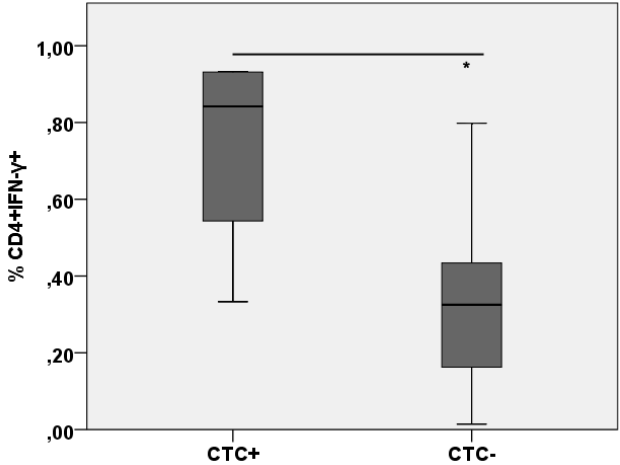
Fig.2A./2B. The phenotypic and functional repartition of cytokine-positive CD3+cells.
 Fig.2C./2D. The composition of cytokines produced by TAA-specific CD4+/CD8+T cells.
 Pooled cytokine responses to UCP and Survivin are shown. Note that all data are shown after subtraction of negative background. * $p = 0.001$, non-parametric Kruskal-Wallis H test.

Figure 3. Polyfunctionality and memory subpopulations of TAA-specific T lymphocytes.



The results are presented as Box-and-Whisker plots. The boxes indicate the average percent of each functional group (1F = monofunctional, 2F = bifunctional, 3F = trifunctional). The CD4+/CD8+ TCM and TEM, and the CD8+ TD had a more polyfunctional profile compared to other subpopulations. The nonparametric Kruskal-Wallis H test was used to compare the differences of functional signatures among different memory subpopulations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

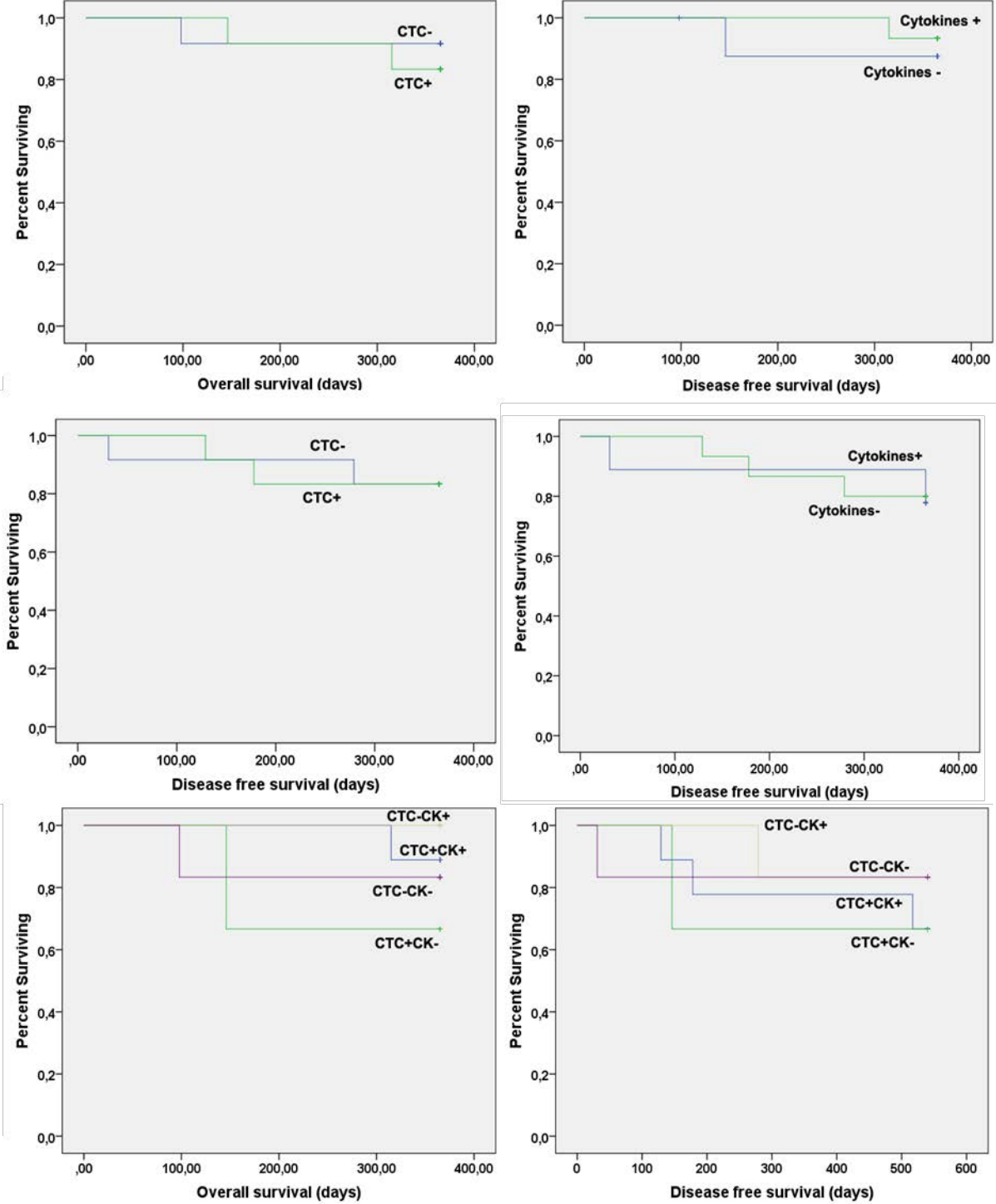
Figure 4. Production of IFN- γ by CD4+ T cells in patients with TAA-specific immune response.



The percent of CD4+IFN- γ + T cells is significantly higher in patients with detectable CTC.

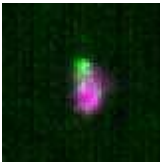
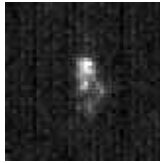
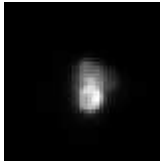

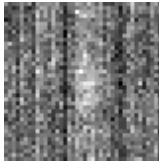
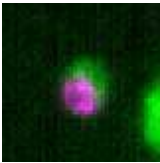
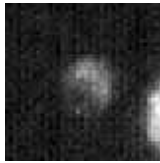


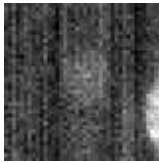
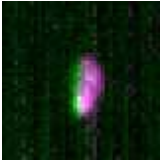
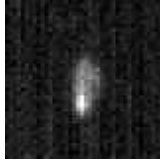
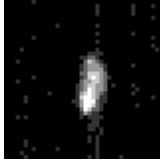

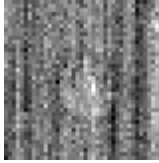
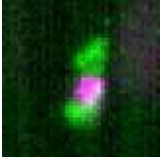




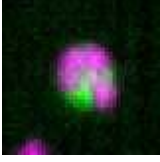
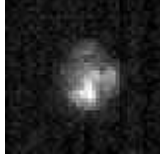



* $p = 0.03$.

Figure 5. Kaplan-Meier survival curves for correlations between CTC, TAA-specific T-cell response, and prognosis.



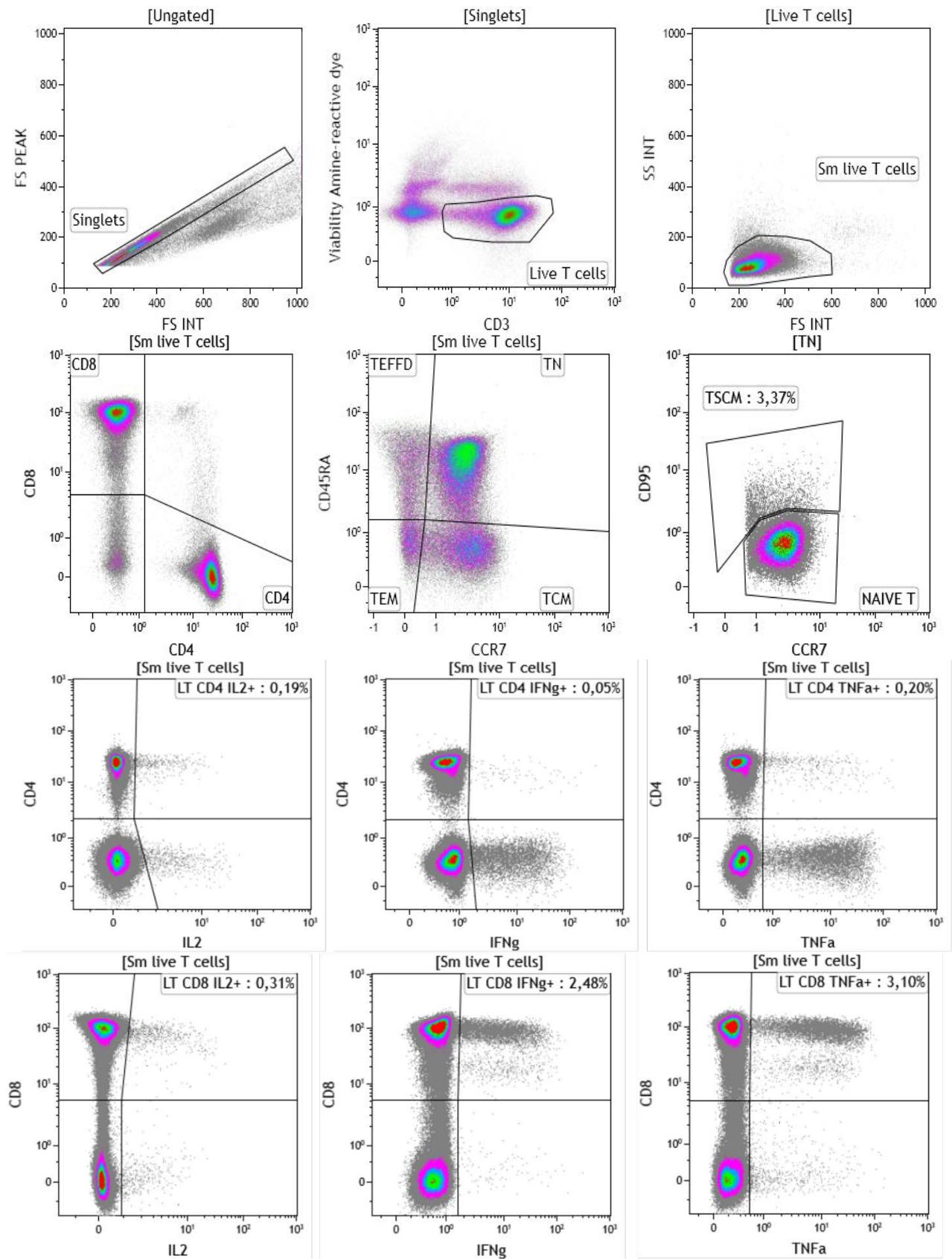
No statistically significant differences were found as assessed by the Log-rank test. CK+, cytokine positive.

Supplementary Figure S1. Representative CTC images from the CellSearch® system

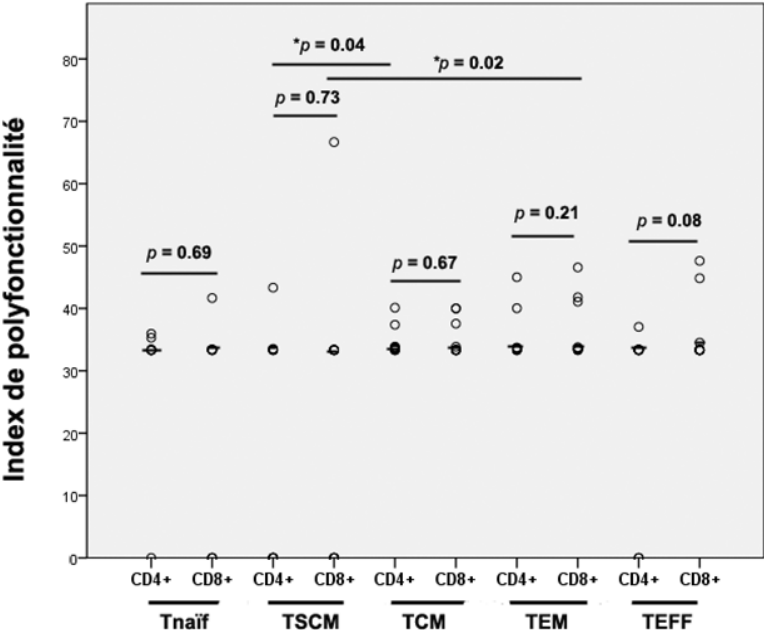
Composite	CK PE	DAPI	CD45 APC	Blank Chanel
				
				
				
				
				

Representative CTC images isolated from 7.5 ml blood of HNSCC patients. CK-PE, cytokeratin-phycoerythrin; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; APC, allophycocyanin.

Supplementary Figure S2. Strategy for the analysis of populations in flow cytometry.

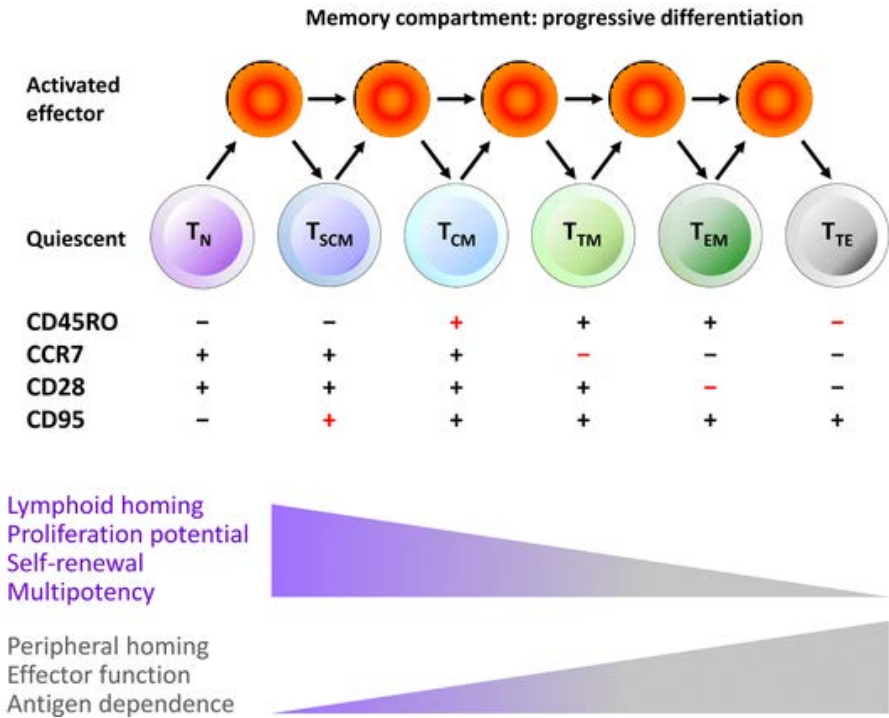


Supplementary Figure S3. Polyfunctionality index of TAA-specific CD4+ / CD8+ memory subpopulations.



The horizontal lines indicate the medians, and the *p* values were calculated using the nonparametric Kruskal - Wallis H test (* *p* < 0.05).

Supplementary Figure S4. Association between differentiation of memory T cell subpopulations and functional profile (modified by MAHNKE Y. D. et al., 2006).





DISCUSSION

Comparée à certaines études individuelles avec des conclusions plutôt encourageantes, nos résultats de méta-analyse (Article 1) suggèrent que la détection des CTC chez les patients atteints de HNSCC a une sensibilité limitée mais une spécificité extrêmement élevée pour le diagnostic [Wu XL].

Les différences significatives entre les sensibilités de la détection des CTC dans les différentes études évaluées dans notre méta-analyse proviennent probablement plus des facteurs techniques que d'autres variables. Nous avons observé que les trois études utilisant le système CellSearch[®] présentaient des sensibilités presque identiques (16,3 - 28,7%), qui étaient relativement plus faibles que la RT-PCR (10 - 96,2%) ou l'immunocytochimie (89,4 - 100%). La gamme d'énumération de CTC détectée par le système CellSearch[®] était de 1 à 5 / 7,5 ml de sang. Comme décrit brièvement préalablement, dans cette technologie les cellules EpCAM+ sont ciblées par tri immunomagnétique au cours du processus d'enrichissement puis les événements positifs pour les CK 8, 18 et 19, DAPI+ et négatifs pour CD45 sont identifiés comme des cellules tumorales circulantes [Cristofanilli, M. ; Riethdorf, S. ; Janssen Diagnostics.]. En tant que marqueur fiable de cellules épithéliales, EpCAM a été largement utilisé dans les études impliquées. L'expression d'EpCAM a été détectée dans 98 des 131 catégories tumorales et ce taux varie de 59% (cavité buccale) à 100% (pharynx) dans les HNSCC [Went, P. T.]. Comparativement à leurs tumeurs primaires, on a trouvé que son expression était fréquemment baissée dans les métastases [Takes, R. P.], ce qui suggère un changement potentiel de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT). EMT désigne le passage d'un groupe de cellules épithéliales à une forme mésenchymateuse. Ce phénomène peut être réversible, les cellules subissant la Transition Mésenchymo-Épithéliale (MET). Les cellules en TEM perdent leur adhésion cellule-cellule (par une diminution de l'expression des cadhérines) et acquièrent des propriétés adhésives nouvelles vis-à-vis de la matrice extracellulaire (par l'expression d'un nouveau répertoire d'intégrines). Les cellules dégradent

également la lame basale qui borde l'épithélium grâce à la sécrétion de métalloprotéinases [Sipos, F.;]. Bien que le rôle de l'EMT dans la métastase tumorale reste controversé, plusieurs études ont indiqué que l'expression par les CTC de l'EpCAM et des certaines des CK deviennent négatives pendant le processus de l'EMT [Mego, M. ; Konigsberg, R. ; Gorges, T. M. ; Mostert, B. ; Pecot, C. V. ; Raimondi, C.]. De plus, le profil d'expression des CK peut être différent en fonction des localisations anatomiques des carcinomes correspondants [Balm, A. J.s]. Ainsi, l'expression différentielle d'EpCAM et de CK, le processus d'EMT et l'utilisation de différents marqueurs d'identification pourraient expliquer l'hétérogénéité des études globales et la sensibilité plus faible des études utilisant des stratégies de séparation immunomagnétique des CTC. Dans notre méta-analyse nous avons également évalué l'impact pronostique des CTC dans la prise en charge clinique des patients atteints de HNSCC. Nous avons observé que les CTC détectables étaient importantes pour prédire une DFS plus courte mais n'étaient pas associées à la PFS ou l'OS. Cette différence pourrait s'expliquer par les différences intrinsèques entre ces évaluations de la survie. En effet, il existe différentes façons d'évaluer la survie et aucune norme de consensus international n'est établie *de facto* pour la DSF et les autres paramètres. Généralement, la DFS indique le pourcentage de personnes dans l'essai qui sont vivantes et sans cancer après une période spécifiée. La DFS est fréquemment utilisée lorsque toutes les tumeurs identifiables ont été réséquées et peut servir d'indicateur précoce de survie améliorée [Hudis, C. A.]. La PFS est définie comme le temps écoulé entre l'initiation du traitement et la progression tumorale métastatique, y compris, mais sans s'y limiter, les patients qui ont reçu un traitement curatif [Green, S.]. Avec la PFS les chercheurs s'intéressent surtout aux métastases distantes mais non locorégionales. Dans les études évaluées dans notre méta-analyse, par rapport à la DFS, plus de facteurs de confusion ont été impliqués dans la PFS ainsi que dans l'OS, et par conséquent affaibli leurs corrélations avec la présence de CTC. Même si dans ces études la précision diagnostique n'a pas été évaluée en

raison d'un manque de groupe de contrôle négatif, elles n'ont pas présenté d'hétérogénéité significative, comme confirmé par le test d'indice d'incohérence [Wu XL].

Nous avons également été les premiers, à notre connaissance, à décrire dans un cas de carcinome épidermoïde de cavité buccale un nombre extrêmement élevé de CTC (Article 2) [Wu, X.]. Comme indiqué dans la méta-analyse (Article 1), les rapports publiés indiquent que l'énumération de CTC en utilisant le système CellSearch[®] chez des patients atteints de HNSCC sont entre 0 et 5 CTC dans 7,5 ml de sang [Nichols, A. C. ; Bozec, A. ; Grobe, A. ; Grisanti, S. ; Buglione, M.]. Dans le cas rapporté ici (Article 2), le nombre initial (avant traitement) de CTC était des dizaines de fois supérieure au maximum connu. Le nombre de CTC a même atteint des centaines en quantification absolue au jour 7 post-opératoire. De plus, s'agissant d'une approche marqueur-dépendante, le système Cellsearch[®] pourrait avoir sous-estimé la quantité réelle de CTC en circulation en raison de l'existence éventuelle de cellules tumorales EpCAM négatives. En effet, en se basant sur le fait que le nombre absolu de cellules épithéliales circulantes positives à EpCAM était régulé à la hausse mais étaient négatives pour l'expression d'EGFR, on peut émettre l'hypothèse que ces CTC étaient probablement dans une phase particulière associée à la MET.

Comme les échantillons ont été détectés individuellement selon la procédure standard semi-automatisée, on peut raisonnablement exclure la possibilité de paramètres techniques confusionnels, comme les contaminations. En outre, les études utilisant la même méthode dans d'autres tumeurs malignes, comme le cancer du sein [Zhang, L.], la prostate [Moreno, J. G.], le colorectal [Negin, B. P.] et le cancer gastro-intestinal [Hiraiwa, K.] ont rarement constaté un tel taux de CTC. L'EGFR est surexprimé dans plus de 90% de HNSCC [Rubin Grandis, J.], mais avec une énorme discordance entre la tumeur primaire et les CTC. Grisanti

et al. ont constaté que l'EGFR était exprimé dans 45% des CTC chez des patients atteints de HNSCC récurrent ou métastatique. Dans ce travail, aucune CTC n'a été trouvée positive pour l'EGFR positif quel que soit le « timing » du prélèvement [Grisanti, S.]. En général, la MET est considérée comme le processus biologique inverse de la EMT (**Figure 3**), mais relativement peu de preuves ont été rapportées quant à son rôle dans le cancer par rapport aux études approfondies de EMT. Étant donné que la MET induit une régulation positive des marqueurs épithéliaux (par ex. EpCAM) et que la MET facilite le retour des cellules cancéreuses aux propriétés épithéliales, l'absence d'EpCAM+ EGFR+ CTC vis-à-vis de la quantité énorme d'EpCAM+EGFR- CTC pourrait suggérer le développement de la MET dans le cas décrit dans l'Article 2.

Des études génétiques ont révélé que les mutations de la famille des gènes EGFR sont en corrélation avec l'abondance de l'ARNm et le niveau de protéine chez les patients atteints de HNSCC [Nakazaki, K. ; Hama, T.]. Ainsi, dans le cas rapporté ici, le manque d'expression d'EGFR sur les CTC pourrait également être lié à un type rare de tumeur mutée. En outre, le plus grand nombre de CTC au 7^{ème} jour postopératoire pourrait être dû à la réintroduction de cellules tumorales disséminées dans les tissus mésenchymateux dans la circulation dû à la chirurgie [van Dalum, G.].

La survie très courte de ce patient (survie sans maladie, DFS et survie globale, OS) pourrait être associée au nombre absolu élevé de CTC. Même si le patient a été diagnostiqué à l'étape IVA, le DFS de 1 mois et l'OS de 2 mois indiquent encore une progression rapide. L'évaluation de routine, le stade TNM, semble ne pas avoir pu fournir une prédiction plausible de cette évolution clinique défavorable. Il est à noter que la présence de CTC a été signalée comme un facteur pronostique indépendant pour prédire la survie de patients HNSCC ayant

une sensibilité plus élevée à divers stades de la maladie que les procédures des stades courantes [Grisanti, S. ; Jatana, K. R. ; Tinhofer, I.]. Des niveaux postopératoires élevés de CTC ont également été rapportés pour prédire avec précision la récurrence tumorale [Galizia, G.].

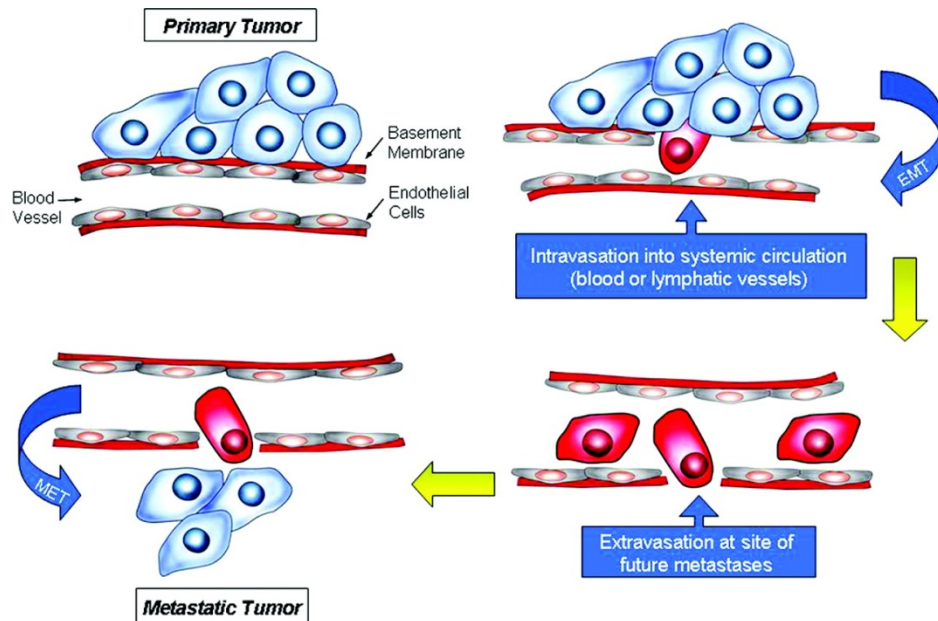


Figure 3. Schéma du processus de l'EMT et de la MET (d'après Dotan E, 2009)

Nous montrons ici pour la première fois (Article 3) que les CTC peuvent être considérées comme un indicateur indépendant, c'est-à-dire non associé au système de stade TNM, pour évaluer la charge d'antigène tumoral chez des patients atteints de HNSCC. De plus, de façon originale, nos résultats montrent que les CTC modulent non seulement la magnitude, mais aussi le profil de la réponse des lymphocytes T spécifiques aux TAA.

L'immunothérapie personnalisée contre le cancer gagnerait probablement en efficacité si elle était guidée par une vue systématique de la charge antigénique de la tumeur et de l'immunité correspondante des lymphocytes T spécifiques du cancer. Une meilleure compréhension de l'interaction «charge antigénique tumorale - signatures immunologiques fonctionnelles» pourrait contribuer au développement de nouvelles thérapies induisant une immunité protectrice supérieure et durable contre les cancers [Mandal, R; Yarchoan, M]. L'actuel système TNM basé sur les résultats d'imagerie n'a pas le potentiel de fournir des informations précitées [Patel, S. G.; O'Sullivan, B.; Manikantan, K.]. Des études récentes ont démontré la supériorité d'une nouvelle approche, « l'Immunoscore », sur la classification AJCC / UICC-TNM par une analyse composite sur la contextuelle immune tissulaire [Mlecnik, B.; Fridman, W. H.].

Notre étude pilote a été conçue pour énumérer les CTC seulement au diagnostic et avant tout traitement anti-cancer, en évitant ainsi les multiples variables présentes et/ou induites pendant ce traitement. Nous avons observé un taux positif de détection de CTC à 50%, ce qui est à peu près similaire aux résultats publiés récemment [Nichols, A. C.; Bozec, A.; Buglione, M.; Grisanti, S.]. Comme nous l'avons indiqué dans notre méta-analyse citée ci-dessus [Wu X. L.], bien que d'une spécificité extrêmement élevée, ce test ne devrait pas être utilisé comme un outil de dépistage ou de diagnostic en raison de la sensibilité relativement faible. Cristofanilli M et al. ont constaté que les CTC ont une valeur pronostique indépendante de la charge tumorale et pourraient représenter un marqueur important dans le cancer du sein métastatique [Cristofanilli, M.]. La valeur pronostique de CTC dans HNSCC a été trouvée en association avec la DFS mais pas l'OS. Dans notre étude, avec un nombre relativement faible de patients, nous n'avons pu identifier qu'une tendance à un impact favorable de l'absence de CTC et de la présence de réponses immunitaires anti-AAT dans la survie. Nous avons maintenant

commencé une étude multicentrique avec un nombre plus élevé de patients ainsi qu'un suivi plus long afin de vérifier et confirmer ces observations.

À notre connaissance, aucune étude n'a évalué les «signatures fonctionnelles» de la réponse immunitaire spécifique aux AAT et la charge antigénique tumorale. Les travaux s'intéressant aux LT spécifiques d'antigènes viraux décrivent une association entre les profils polyfonctionnels et une charge virale faible ; à l'opposé, lorsque la charge virale est élevée c'est un profil monofonctionnel qui est observé [Alexander-Miller, M. A.; Mueller, S. N.; Streeck, H.]. Les profils monofonctionnels rapportés dans la littérature sont variables: dans le cas du CMV, la proportion de LT CD8+IFN- γ + était la plus élevée; dans les infections par le virus de la grippe, les LT CD8+IL-2+ dominent dans les sous-populations LT mémoire. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que la polyfonctionnalité des LT est un facteur majeur pour prédire une réponse immune protectrice cliniquement, notamment dans des essais vaccinaux [Precopio, M. L.; Thakur, A.]. Très peu de données sont disponibles en cancérologie [Inokuma, M.], mais toute laisse à penser que les mêmes mécanismes sont développés contre les antigènes tumoraux que contre les antigènes viraux. En effet, il a été démontré qu'une réponse polyfonctionnelle de type TH1 était associée à une plus grande sensibilité aux antigènes tumoraux [Wilde, S.]. Une autre étude a reporté une augmentation des LT anti-tumoraux polyfonctionnels, associés à une réponse clinique durable chez de patients atteints d'un mélanome et traités avec un anticorps bloquant CTLA-4 [Yuan, J.]. Dans l'étude d'Inokuma et al, chez des patients atteints de cancer du sein, il a été montré que les LT CD8+IL-2+ monofonctionnels prédominaient parmi la population de lymphocytes T spécifiques aux AAT. En même temps, moins de LT CD4+IFN- γ + et CD8+IFN- γ + ont été trouvés par rapport aux réponses anti-CMV ou à virus grippal [Inokuma, M.]. Il est à noter que, comme indiqué ci-dessus, les patients inclus dans notre étude ont été évalués avant le début de

tout traitement. Les « signatures fonctionnelles » de ces réponses lymphocytaires T représentaient ainsi le statut initial de leur immunité. Cela pourrait expliquer au moins partiellement les différences observées entre l'étude dans le cancer du sein citée ci-dessus et nos résultats dans le HNSCC, car dans l'étude d'Inokuma les patients avaient leurs réponses immunitaires spécifiques aux AAT évaluées plus tard dans leur évolution clinique.

Dans notre étude, nous avons constaté que les CD4⁺ TCM, les CD4⁺ TEM et les CD8⁺ TEM contiennent une proportion significativement plus élevée de cellules monofonctionnelles ou bifonctionnelles. En outre, ils sont les seules sous-populations avec des cellules trifonctionnelles. Nous n'avons donc pas observé de corrélation linéaire entre la maturation des cellules T mémoire spécifiques aux AAT et les profils fonctionnels correspondant, ce qui semblait contredire les cas généraux observés dans les maladies infectieuses [Mahnke YD]. En outre, même dans les infections virales, l'étude sur les signatures fonctionnelles a révélé qu'une différenciation accrue de la maturation associée à un profil polyfonctionnel des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH, mais cette association n'était pas observée pour les lymphocytes T spécifiques au CMV [Riou C]. Par conséquent, l'association entre le compartiment mémoire et le profil fonctionnel des lymphocytes T spécifiques de l'antigène devrait être discutée au cas par cas.

***CONCLUSION
ET PERSPECTIVES***

1. Conclusion

Nous avons abordé dans l'ensemble de nos travaux deux paramètres importants pour l'immunomonitoring des patients atteints d'un cancer : les CTC comme un indicateur de la « charge antigénique tumorale » et la réponse immune lymphocytaire T spécifique d'antigènes associés aux tumeurs. Nos résultats suggèrent qu'une évaluation concomitante de ces deux paramètres pourrait être plus informative sur le pronostic et potentiellement sur l'impact des traitements (notamment dans la perspective d'un traitement par des « immune checkpoints »). Ainsi, certains points se dégagent :

- Le test de détection de CTC est un test extrêmement spécifique, mais de faible sensibilité dans les HNSCC. En outre, la présence de CTC implique une moins bonne DFS.
- Le nombre absolu de CTC pourrait prédire une phase particulière du développement du cancer ainsi qu'une mauvaise survie. Cette évaluation des CTC pourrait contribuer significativement à une prise en charge médicale personnalisée.
- Les CTC constituent potentiellement un indicateur indépendant de la charge tumorale immunogène. L'amplitude et les signatures fonctionnelles des lymphocytes T spécifiques aux AAT chez les patients atteints de HNSCC sont associées à la présence de CTC.

2. Perspectives

Dans la continuité de ce travail, une étude multicentrique avec un recrutement plus important est déjà mise en route. Nous espérons ainsi valider les observations issues des travaux de cette Thèse :

- Étude CORISAT (promoteur CHRU de Nancy) : non-thérapeutique, non interventionnelle, prospective, multicentrique (CHRU Nancy, ICL Alexis Vautrin, CHRU Strasbourg, CHRU Dijon, CHRU Reims, CHRU Besançon).
- Patients pris en charge pour un carcinome épidermoïde des VADS, à l'issue du bilan d'extension, quel que soit le stade clinique (stade TNM UICC de I à IV) avant tout traitement médical ou chirurgical spécifiquement dirigé contre le cancer (radiothérapie, chirurgie, chimiothérapie ou thérapie ciblée).
- Objectif principal: décrire les profils des réponses immunitaires anti-tumorales en général et selon le stade clinique et la survie sans récurrence (locale ou à distance, 2 ans).
- Objectifs secondaires : étudier la relation entre la réponse immunitaire anti-tumorale et la présence qualitative (oui/non) et quantitative (nombre) de CTC; étudier les relations entre la présence qualitative (oui/non), quantitative (nombre) de CTC et le stade clinique ainsi que la DFS; étudier les relations entre d'une réponse immunitaire anti-tumorale et le stade clinique ainsi que la DFS.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alexander-Miller MA: Differential expansion and survival of high and low avidity cytotoxic T cell populations during the immune response to a viral infection. *Cell Immunol* 201:58-62, 2000
2. Artandi SE, DePinho RA: Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31:9-18, 2010
3. Balar AV, Weber JS: PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother*, 2017
4. Balm AJ, Hageman PC, van Doornewaard MH, et al: Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 253:227-33, 1996
5. Betts MR, Nason MC, West SM, et al: HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 107:4781-9, 2006
6. Bozec A, Ilie M, Dassonville O, et al: Significance of circulating tumor cell detection using the CellSearch system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270:2745-9, 2013
7. Buglione M, Grisanti S, Almici C, et al: Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer* 48:3019-26, 2012
8. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, et al: Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 26:612-9, 2008
9. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al: Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:3213-21, 2008

10. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781-91, 2004
11. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al: Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23:1420-30, 2005
12. Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al: Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13:7053-8, 2007
13. Ding ZC, Liu C, Cao Y, et al: IL-7 signaling imparts polyfunctionality and stemness potential to CD4(+) T cells. *Oncoimmunology* 5:e1171445, 2016
14. Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, et al: Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges. *Oncologist* 14:1070-82, 2009
15. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-8, 2002
16. Dworacki G, Meidenbauer N, Kuss I, et al: Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 7:947s-957s, 2001
17. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM: Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med* 14:73, 2016
18. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298-306, 2012
19. Galizia G, Gemei M, Orditura M, et al: Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. *J Gastrointest Surg* 17:1809-18, 2013
20. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92:709-20, 2000

21. Giordano A, Gao H, Anfossi S, et al: Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 11:2526-34, 2012
22. Godet Y, Fabre E, Dosset M, et al: Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 18:2943-53, 2012
23. Goodman OB, Jr., Fink LM, Symanowski JT, et al: Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:1904-13, 2009
24. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, et al: Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res* 4:256-269, 2015
25. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, et al: Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 12:178, 2012
26. Grandis JR, Falkner DM, Melhem MF, et al: Human leukocyte antigen class I allelic and haplotype loss in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical and immunogenetic consequences. *Clin Cancer Res* 6:2794-802, 2000
27. Grisanti S, Almici C, Consoli F, et al: Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One* 9:e103918, 2014
28. Grobe A, Blessmann M, Hanken H, et al: Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 20:425-33, 2014

29. Gruber I, Landenberger N, Staebler A, et al: Relationship between circulating tumor cells and peripheral T-cells in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res* 33:2233-8, 2013
30. Hama T, Yuza Y, Suda T, et al: Functional mutation analysis of EGFR family genes and corresponding lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 29:19-25, 2012
31. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, et al: Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 119:2620-3, 2006
32. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74, 2011
33. Harley CB: Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 8:167-79, 2008
34. He S, Li P, Chen X, et al: Fluid biopsy for circulating tumor cells in an occult ovarian cancer patient exhibiting bilateral supraclavicular lymph node metastases: A case report. *Oncol Lett* 6:448-452, 2013
35. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, et al: Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 5:83-9, 1999
36. Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, et al: Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 15:3092-100, 2008
37. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihiro T, et al: Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 8:2553-62, 2002
38. Hoffmann TK, Nakano K, Elder EM, et al: Generation of T cells specific for the wild-type sequence p53(264-272) peptide in cancer patients: implications for immunoselection of epitope loss variants. *J Immunol* 165:5938-44, 2000

39. Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, et al: Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system. *J Clin Oncol* 25:2127-32, 2007
40. Ikawa T, Eura M, Fukiage T, et al: [Adoptive immunotherapy by intra-arterial infusion of ATLAK or Allo-TLAK cells in patients with head and neck cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 16:1438-47, 1989
41. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:95-109, 2002
42. Inokuma M, dela Rosa C, Schmitt C, et al: Functional T cell responses to tumor antigens in breast cancer patients have a distinct phenotype and cytokine signature. *J Immunol* 179:2627-33, 2007
43. Ishikawa T, Ikawa T, Eura M, et al: Adoptive immunotherapy for head and neck cancer with killer cells induced by stimulation with autologous or allogeneic tumour cells and recombinant interleukin-2. *Acta Otolaryngol* 107:346-51, 1989
44. Jatana KR, Balasubramanian P, Lang JC, et al: Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: initial results. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136:1274-9, 2010
45. Kay NE, Leong TL, Bone N, et al: Blood levels of immune cells predict survival in myeloma patients: results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial for newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 98:23-8, 2001
46. Kennedy R, Celis E: Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 222:129-44, 2008
47. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, et al: Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 11:1010-20, 2005

48. Konigsberg R, Obermayr E, Bises G, et al: Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol* 50:700-10, 2011
49. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, et al: Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv Otorhinolaryngol* 62:161-72, 2005
50. Lang J, Gao L, Guo Y, et al: Comprehensive treatment of squamous cell cancer of head and neck: Chinese expert consensus 2013. *Future Oncol* 10:1635-48, 2014
51. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, et al: Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 106:553-8, 2003
52. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, et al: The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 43:2797-809, 2013
53. Mandal R, Chan TA: Personalized Oncology Meets Immunology: The Path toward Precision Immunotherapy. *Cancer Discov* 6:703-13, 2016
54. Manikantan K, Sayed SI, Syrigos KN, et al: Challenges for the future modifications of the TNM staging system for head and neck cancer: case for a new computational model? *Cancer Treat Rev* 35:639-44, 2009
55. Marimuthu A, Chavan S, Sathe G, et al: Identification of head and neck squamous cell carcinoma biomarker candidates through proteomic analysis of cancer cell secretome. *Biochim Biophys Acta* 1834:2308-16, 2013
56. Martinez P, Blasco MA: Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer* 11:161-76, 2011
57. Marur S, Forastiere AA: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 91:386-96, 2016

58. Matsuzaki J, Tsuji T, Luescher I, et al: Nonclassical antigen-processing pathways are required for MHC class II-restricted direct tumor recognition by NY-ESO-1-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol Res* 2:341-50, 2014
59. Mego M, Mani SA, Cristofanilli M: Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 7:693-701, 2010
60. Mego M, De Giorgi U, Dawood S, et al: Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. *Int J Cancer* 129:417-23, 2011
61. Mego M, Gao H, Cohen EN, et al: Circulating Tumor Cells (CTC) Are Associated with Defects in Adaptive Immunity in Patients with Inflammatory Breast Cancer. *J Cancer* 7:1095-104, 2016
62. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al: Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29:610-8, 2011
63. Moreno JG, O'Hara SM, Gross S, et al: Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology* 58:386-92, 2001
64. Mostert B, Kraan J, Sieuwerts AM, et al: CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. *Cancer Lett* 319:49-55, 2012
65. Mueller SN, Ahmed R: High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8623-8, 2009
66. Murphy WJ, Back TC, Conlon KC, et al: Antitumor effects of interleukin-7 and adoptive immunotherapy on human colon carcinoma xenografts. *J Clin Invest* 92:1918-24, 1993

67. Murta EF, de Andrade JM, Falcao RP, et al: Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori* 86:403-7, 2000
68. Nakazaki K, Kato Y, Taguchi T, et al: Heterozygous mutation (G/G-->G/A) at nt 2607 of the EGFR gene is closely associated with increases in EGFR copy number and mRNA half life, but impaired EGFR protein synthesis in squamous cell carcinomas of the head and neck - implication for gefitinib efficacy. *Oncol Lett* 1:1017-1020, 2010
69. Neese RA, Siler SQ, Cesar D, et al: Advances in the stable isotope-mass spectrometric measurement of DNA synthesis and cell proliferation. *Anal Biochem* 298:189-95, 2001
70. Negin BP, Cohen SJ: Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Curr Treat Options Oncol* 11:1-13, 2010
71. Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC, et al: Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck* 34:1440-4, 2012
72. Offermann A, Shaikhibrahim Z, Perner S: MED15: a potential biomarker for head and neck squamous cell carcinoma? *Biomark Med* 9:939-41, 2015
73. O'Sullivan B, Shah J: New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Semin Surg Oncol* 21:30-42, 2003
74. Pantaleo G, Harari A: Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 6:417-23, 2006
75. Patel SG, Shah JP: TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 55:242-58; quiz 261-2, 264, 2005
76. Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA, et al: A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discov* 1:580-6, 2011

77. Porichis F, Hart MG, Zupkosky J, et al: Differential impact of PD-1 and/or interleukin-10 blockade on HIV-1-specific CD4 T cell and antigen-presenting cell functions. *J Virol* 88:2508-18, 2014
78. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, et al: Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* 204:1405-16, 2007
79. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al: Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 130:449-55, 2011
80. Reichert TE, Scheuer C, Day R, et al: The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 91:2136-47, 2001
81. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, et al: Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:3137-45, 2002
82. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 13:920-8, 2007
83. Riou C, Treurnicht F, Abrahams MR, et al: Increased memory differentiation is associated with decreased polyfunctionality for HIV but not for cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 189:3838-47, 2012
84. Rosenberg SA: Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411:380-4, 2001

85. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, et al: Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 90:824-32, 1998
86. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al: Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 244:164-71, 2006
87. Saito T, Kuss I, Dworacki G, et al: Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5:1263-73, 1999
88. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, et al: Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 61:3932-6, 2001
89. Seder RA, Darrah PA, Roederer M: T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8:247-58, 2008
90. Sipos F, Galamb O: Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol* 18:601-8, 2012
91. Streeck H, Brumme ZL, Anastario M, et al: Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells. *PLoS Med* 5:e100, 2008
92. Sun YF, Yang XR, Zhou J, et al: Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:1151-73, 2011
93. Takes RP, Baatenburg De Jong RJ, Alles MJ, et al: Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128:512-8, 2002
94. Thakur A, Pedersen LE, Jungersen G: Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine* 30:4907-20, 2012

95. Tinhofer I, Korschak R, Stromberger C, et al: Detection of circulating tumor cells for prediction of recurrence after adjuvant chemoradiation in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 25:2042-7, 2014
96. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87-108, 2015
97. Tran N, Rose BR, O'Brien CJ: Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head Neck* 29:64-70, 2007
98. Tu Q, Wu X, Le Rhun E, et al: CellSearch technology applied to the detection and quantification of tumor cells in CSF of patients with lung cancer leptomeningeal metastasis. *Lung Cancer* 90:352-7, 2015
99. van Dalum G, van der Stam GJ, Tibbe AG, et al: Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery. *Int J Oncol* 46:407-13, 2015
100. Vermorken JB, Specenier P: Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* 21 Suppl 7:vii252-61, 2010
101. Warnakulasuriya S: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45:309-16, 2009
102. Went PT, Lugli A, Meier S, et al: Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 35:122-8, 2004
103. Wilde S, Sommermeyer D, Leisegang M, et al: Human antitumor CD8⁺ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition. *J Immunol* 189:598-605, 2012
104. Wu X, Mastronicola R, Tu Q, et al: A rare case of extremely high counts of circulating tumor cells detected in a patient with an oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 16:552, 2016

105. Wu XL, Tu Q, Faure G, et al: Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 6:20210, 2016
106. Xie Y, Akpınarlı A, Maris C, et al: Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med* 207:651-67, 2010
107. Yamashita T, Shimada H, Tanaka S, et al: Serum midkine as a biomarker for malignancy, prognosis, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 5:415-25, 2016
108. Yarchoan M, Johnson BA, 3rd, Lutz ER, et al: Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 2017
109. Young MR: Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault. *Head Neck* 28:462-70, 2006
110. Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al: Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 339:580-4, 2013
111. Yuan J, Gnjatic S, Li H, et al: CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20410-5, 2008
112. Zanetti M: Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. *J Immunol* 194:2049-56, 2015
113. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al: Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res* 18:5701-10, 2012
114. Zier BA, Pimlott JF: Mechanical plaque control: are concepts changing? *Probe* 21:123-9, 1987



ANNEXES

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review and meta-analysis

Received: 09 September 2015

Accepted: 23 December 2015

Published: 02 February 2016

Xiang-Lei Wu^{1,2,3}, Qian Tu^{2,3}, Gilbert Faure^{2,3}, Patrice Gallet⁴, Chantal Kohler³ & Marcelo De Carvalho Bittencourt^{2,3}

Several techniques have been developed to detect circulating tumor cells (CTC) in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), but their diagnostic and prognostic value are not yet fully established. A computerized retrieval of literatures was conducted without time restrictions using the electronic database in December 2014. Diagnostic accuracy variables were pooled and analyzed by the Meta-DiSc software. Engauge Digitizer and Stata software were used for pooled survival analysis. Twenty-two retrieved studies were eligible for systematic review, of which 9 conformed for the diagnostic test meta-analysis and 5 for the prognostic analysis. Subgroup analysis showed 24.6% pooled sensitivity and 100% pooled specificity of detections by using positive selection strategy, which moreover presented low heterogeneity. The presence of CTC was significantly associated with shorter disease free survival (DFS, HR 4.62, 95% CI 2.51–8.52). In conclusion, current evidence identifies the CTC detection assay as an extremely specific, but low sensitive test in HNSCC. Also, the presence of CTC indicates a worse DFS.

In cancer diseases, tumor cells eventually detach from the primary site and disseminate in the blood, the lymphatic fluid, the bone marrow or even in the cerebrospinal fluid. Circulating tumor cells (CTC) designate mainly the ones circulating in the peripheral blood. Under certain circumstances, like immune escape or immunoevasion, these cells can establish a new tumor in distance sites, a process known as metastasis¹. Increasing evidences suggest that CTC are released long before the development of metastasis, sometimes even before the formation of apparent primary tumors^{2,3}. A considerable number of studies aimed to develop a reliable CTC-detection technique have been conducted in recent years. Several researchers believe that information derived from CTC might play a “liquid biopsy” role in clinical assessment of patients with cancer^{4,5}. Indeed, CTC was validated as a prognostic factor of metastatic breast, colorectal, and prostate cancer^{6–8}. Therefore, CTC could also potentially represent an ideal diagnostic and prognostic biomarker in the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

However, compared with aforementioned entities, the clinical value of CTC in HNSCC, the sixth leading cancer by incidence worldwide⁹, has not been summarized yet. The overall survival of patient with HNSCC is relatively low due to the high rate of regional and distant metastases at diagnosis. The five-year survival rate for all stages combined is approximately 40–50%. There is still a risk of local recurrence in 20% of cases even if the resection margins are negative in anatomopathological analysis. The disseminated tumor cells are therefore generally suspected to be responsible for this minimal residual disease through a micro-metastasis pathway^{10,11}. For the same reason, previous studies also hoped to overcome the deficiency of current TNM staging system by detecting the presence of CTC.

¹Department of Otolaryngology - Head and Neck surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, China. ²SBS Department, CRAN, UMR 7039 CNRS, University of Lorraine, France. ³Laboratory of Immunology, Nancytomique platform, CHU of Nancy, France. ⁴Department of Otolaryngology and Cervico-facial Surgery, CHU of Nancy, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.D.C.B. (email: marcelo.decarvalho@univ-lorraine.fr)

As studies concerning CTC assays in HNSCC accumulate, it becomes increasingly important to evaluate all of the relevant studies in order to develop a more reliable overall and also quantitative assessment. In the present study, we conducted a systematic review and meta-analysis to pool together the available evidence of CTC evaluation in patients with HNSCC, related to its diagnostic and prognostic value. We hope this approach will facilitate the understanding of present discrepancy, and also contribute to reveal the eventual translational utility of this test in HNSCC clinical management.

Materials and Methods

Literature search. A computerized retrieval of literature was conducted without time restrictions using the electronic database in December 2014. Information sources include Pubmed (contains MEDLINE and PreMEDLINE), Google Scholar, EMBASE, Scopus and Web of Science. The search strategy involved the use of keywords “circulating tumor cells”, “epithelial cells”, and “rare cells” variably combined with one of the following terms: “head and neck”, “squamous cell carcinoma”, “HNSCC”, “Nose”, “nasal sinus”, “oral cavity”, “oropharynx”, “nasopharynx”, “hypopharynx”, “laryngopharynx”, “larynx”, “trachea”, “oral”, “oropharyngeal”, “nasopharyngeal”, “laryngopharyngeal”, “laryngeal”, “cervical tracheal”, and “cervical esophagus”.

Eligibility Criteria. *Inclusion criteria.* 1) original research published in a peer-reviewed journal; 2) only English language papers were included; 3) to avoid ambiguity in the definition of CTC, only techniques using peripheral blood but not bone marrow or other body fluids of patients were considered eligible; 4) patients with histologically confirmed squamous cell carcinoma originating from sphere of head and neck (i.e. oral cavity, nose, ear, pharynx, larynx, cervical trachea and cervical esophagus); 5) clinical stage of disease provided; 6) clear information about techniques used for CTC tests: strategy of enrichment and identification, targeted markers, sample volume, etc...; 7) only studies that included negative controls were eligible for the meta-analysis of diagnostic test; 8) hazard ratios (HR) with 95% confidence intervals (CI) or at least Kaplan-Meier curves for survival analysis should be noted in the reports for inclusion in the meta-analysis of prognostic value.

Exclusion criteria. 1) other sources of data, i.e. letters to the editor, communications, meetings abstracts or reviews were excluded; 2) studies involving merely spiking-experiments, animal models, or other pathological types of cancer were not included; 3) publications including patients populations already included in previous papers; 4) studies with a poor size of sample, defined here as ≤ 10 patients enrolled, were excluded for meta-analysis.

Data extraction. The searched articles were sorted and managed by the software EndNote X7 (Thomson Reuters, USA). Two independent investigators have evaluated the eligibility of studies by the reading sequence of title, abstract, and fulltext. The following data were recorded from the identified articles: title, first author, journal, year of publication, features of patients (i.e. sample size, clinical stage, distribution of carcinoma, source of negative controls), timing of detection (baseline, ongoing, or post treatment), details of techniques (including blood sample volume, method of enrichment and identification, target markers), accuracy of *in vitro* test (sensitivity and specificity, if measured). In case where survival analysis was evaluated, data of clinical outcomes (disease-free survival, DFS; progression-free survival, PFS; overall survival, OS) were also exported. Of note, only the results of baseline detection were used if serial blood samples were collected.

Statistical Analysis. Diagnostic accuracy variables [i.e. sensitivity (Sen.), specificity (Spe.), likelihood ratios (LR+ and LR-), diagnostic odds ratios (DOR) and area under curve (AUC) of the receiver operating characteristic curve (ROC)] were pooled and analyzed by using the Meta-DiSc software, version 1.4¹². The sensitivity was defined as the proportion of patients with positive CTC detection (CTC+) among all patients diagnosed with HNSCC. The specificity was defined as the proportion of control subjects with negative CTC detection (CTC-) among all subjects without HNSCC. Positive likelihood ratios (LR+), which was calculated as $Sen./(1-Spe.)$, and negative likelihood ratios (LR-), which was calculated as $(1-Sen.)/Spe.$, express how much more frequent the respective result is among subjects with disease than among subjects without disease. DOR, which is calculated as $LR+/LR-$, indicates how much greater the odds of having the HNSCC are for the subject with a CTC+ than for the subject with a CTC-. The AUC is computed by numeric integration of the curve equation by the trapezoidal method. If any study had a table with a zero value in any cell, the solution used in our study was adding 0.5 to all cells. The threshold effect was not evaluated since all included studies stratified the results as negative/absence and positive/quantification, which eliminated the potential variations. Publication bias was evaluated only when there were at least 10 studies included in the meta-analysis¹³.

The Stata v.12.0 software was used to estimate the pooled HR and 95% CI for DFS, PFS, and OS. For studies that had not shown the corresponding results, the Engauge Digitizer v.4.1 software was used to extract survival data from the Kaplan-Meier curves^{14,15}. In the case where a study stratified the survival by different CTC thresholds, we reorganized the data as CTC+ vs. CTC- and then compared it with other studies according to methods used in other meta-analysis^{16,17}. An observed HR >1 implied a worse survival for patients positive for CTC detection.

The association between the presence of CTC and clinical features of patients were assessed by visual inspection because of unreported values and/or an obvious trend. Between-study heterogeneity was assessed by the inconsistency index (I^2). For interpreting I^2 , values of 25%, 50%, and 75% were assigned as low, moderate, and high heterogeneity as suggested by Higgins *et al.*¹⁸. Because of small number of studies involved and anticipated inter-study heterogeneity, a random effects model¹⁹ was applied in all pooled calculations performed to provide more conservative estimates.

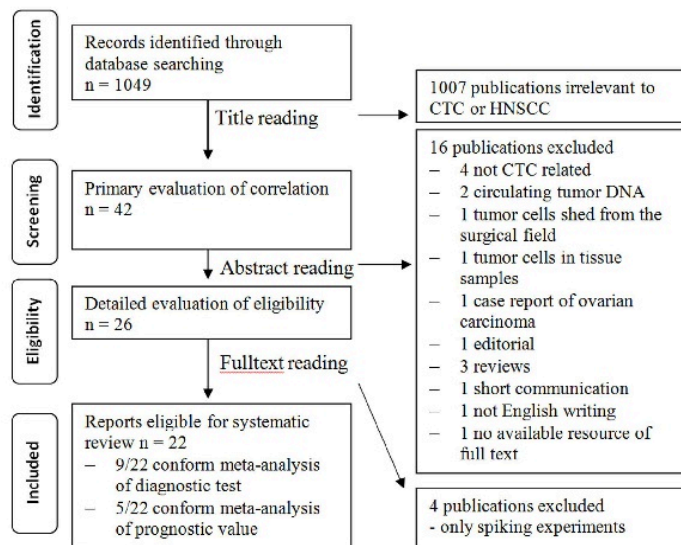


Figure 1. Flow diagram of the strategy used for the selection of reports. Flow diagram created according to PRISMA guidelines.

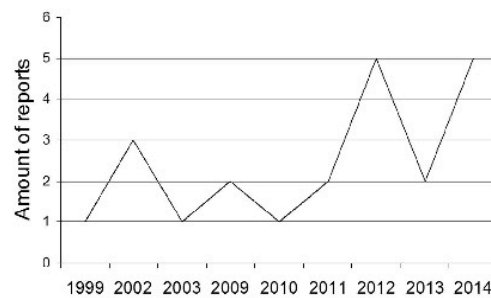


Figure 2. Amount of reports presented in chronological order. The amount of publications eligible for systematic review is graphically illustrated.

Results

Study characteristics. As shown in Fig. 1 [drawn according to ref. 20], we have retrieved 22 studies eligible for systematic review^{21–42}. The initial research on CTC detection in HNSCC was published in 1999²¹ and the amount of subsequent publications is graphically illustrated in Fig. 2. The general descriptions and calculated sensitivity/specificity (if not indicated in the study) of CTC assays of these studies are summarized in Supplementary Table S1.

The overall amount of patients involved in these studies was 857 and the mean sample size was 39 (range 7–144). In these 22 studies, 6 (27.3%) exclusively focused on locally advanced stage (clinical stage III–IV)^{22–27}. The proportion of patients with clinical stage I–III was calculated as 36.5% (313 out of 857) and the one with stage IV was 60.8% (521 out of 857). With regard to the set-up of negative controls, only 11 reports recruited healthy donors and the mean number was 19 (range 3–61)^{21,22,25–32,34}.

Except for one report without detailed description³⁵, the others indicated that HNSCC principally originated from the oral cavity (313 cases, 36.5%) and oropharynx (163 cases, 19.0%), followed by nasopharynx (124 cases, 14.5%), hypopharynx (72 cases, 8.4%), and larynx (62 cases, 7.2%).

We have classified the timing of detection as baseline (before all treatment), ongoing (during surgery, chemotherapy or radiotherapy) and post-treatment (end of treatment). As shown in Fig. 3, most studies detected CTC at baseline level (8 of 22 studies, 36.4%) or compared it with post-treatment level (5 out of 22 studies, 22.7%).

Techniques of CTC detection. The blood sample used for detection varied in volume between 2–30 ml. A volume of 7.5 ml was most frequently taken (10 out of 22 studies, 45.5%).

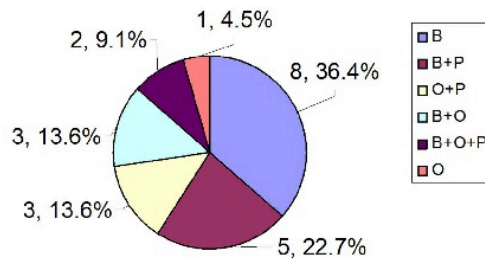


Figure 3. Distribution of studies according to timing of detection. Results presented as “number of reports, percentage”. Timing of detection: B = baseline; O = ongoing; P = post-treatment.

The technique of CTC enrichment included two strategies: marker-independent and -dependent. The former one was applied in 7 studies^{21,22,24,28,29,38,41}, which involved the erythrocyte lysis with/without density gradient centrifugation. The latter one was used in the remaining 15 studies^{23,25–27,30–37,39,40,42}, which applied the immunomagnetic cell separation (positive immunomagnetic separation, PIMS or negative immunomagnetic separation, NIMS). During this step, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) was used as a marker for 7 PIMS cases^{23,26,30,32,37,39,42} and CD45 was the one for all 8 NIMS cases^{25,27,31,33–36,40}. Moreover, CellSearch[®] the only clinically validated, FDA-cleared blood test for enumerating CTC, was used in 71.4% (5/7) PIMS cases. Although the reagents employed for NIMS cases were variable, the overall enrichment process was essentially similar. Actually, the centrifugation techniques were also used as a necessary procedure for PIMS, like erythrocyte lysis for NIMS.

CTC enumerated were identified also by two ways in these 22 studies: 68.1% (15/22) by direct evidence (morphological methods, i.e. immunocytochemistry, CellSearch[®] system based on fluorescence optics, flow cytometry) and 31.9% (7/22) by indirect evidence (i.e. RT-PCR).

Meta-analysis of diagnostic accuracy. Due to the absence of negative control group or little sample size, 13 out of 22 studies were excluded of meta-analysis of diagnostic accuracy. The 9 remaining studies eligible^{21,25–30,32,34} were pooled for the meta-analysis of diagnostic test (grey backgrounds in Supplementary Table S1). As presented in Fig. 4, the overall Sen. and Spe. of pooled studies was 44.4% (0.393–0.497, 95% CI; $I^2 = 95.6%$) and 92.9% (0.882–0.962, 95% CI; $I^2 = 45.6%$), respectively.

Since significant heterogeneity was observed for the 9 studies, subgroup analysis was done according to different variates: PIMS or NIMS as enrichment method; direct or indirect evidence as identification method; blood sample volume \leq or $>$ 7.5ml; various thresholds of target markers (2, 3, or 4). However, only the subgroup categorized by enrichment method, which included 3 studies^{26,30,32} using CellSearch[®] technique has presented low heterogeneity ($I^2 = 26.8%$ for Sen. and $I^2 = 0%$ for Spe.). In this case, the pooled Sen. and Spe. was 24.6% and 100%, respectively (Fig. 4). The other measures of diagnostic accuracy (i.e. LR+, LR-, DOR, and AUC) for overall studies and the PIMS subgroup are summarized in Table 1.

Meta-analysis of prognostic value. In total, five reports with calculated survival data or available Kaplan-Meier curves were included for meta-analysis of prognostic value. Of these studies, 2 analyzed both the DFS and OS^{33,42}, 2 evaluated both PFS and OS^{32,34} and 1⁴⁰ just assessed the DFS. Since one study³² stratified the survival by cut-off value of CTC as 3 subgroups (enumeration = 0, 1, or 2), we have extracted and reorganized the data as CTC+ vs. CTC-. The recalculated HR was 1.88 (1.21–2.91, 95% CI) for PFS and 2.04 (1.29–3.22, 95% CI) for OS.

As shown in Fig. 5, 3 eligible studies were pooled into the DFS meta-analysis, which showed an overall HR 4.62 (2.51–8.52, 95% CI) with low heterogeneity ($I^2 = 25.4%$). Follow-up period of these reports were quite similar, from 30 to 38 months.

Analysis performed in 2 studies concerning PFS and 3 studies concerning OS showed no significant HR but a high heterogeneity was detectable (PFS: HR = 1.32, 0.71–2.44, 95% CI, $I^2 = 87.5%$; OS: HR = 1.63, 0.85–3.13, 95% CI, $I^2 = 86.6%$).

Association of CTC detection with clinico-pathological features of patients. Available in 10 studies, multiple clinico-pathological characteristics were evaluated related with CTC detection. The results are summarized in Table 2. If the threshold of significant p -value was set as <0.01 , only one study suggested that metastasis stage (M of TNM staging system) was significantly associated with detectable CTC. Also, in the case the p value was set as <0.05 , one study showed a significant association of CTC detection with each of following features: tumor size, nodal involvement, and lung nodules infiltration. Taking into account poor evidence and unavailable original data, these studies therefore cannot lead to any confirmative finding.

Discussion

Since the first observation of CTC in 1869 in a patient with metastatic cancer⁴³, its critical role in the spread of carcinomas has been demonstrated over the succeeding one hundreds years⁴⁴. However, the diagnostic or prognostic potential of CTC has only been exploited in the last decade^{1,7,45–47}. After the development of new technologies, especially the application of CellSearch[®] system, researchers showed more ambitions on this test. Recently, a meta-analysis including 8 studies, which aimed to evaluate the predictive role of CTC in HNSCC has found that

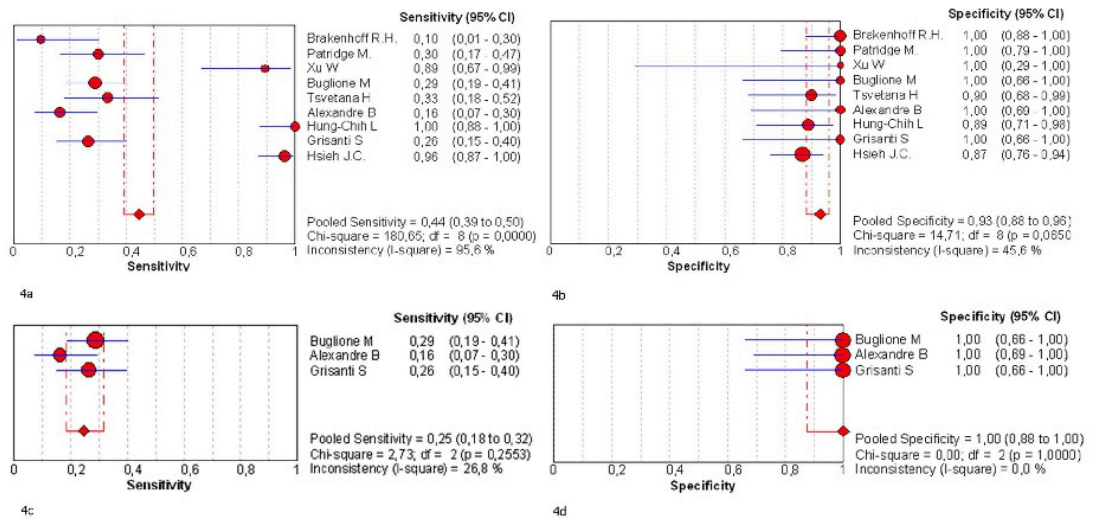


Figure 4. Diagnostic accuracy forest plots (a) Forest plots of overall sensitivity (b) Forest plots of overall specificity (c) Forest plots showing sensitivity of PIMS subgroup (d) Forest plots showing specificity of PIMS subgroup. Forest plots illustrated by Meta-DiSc software. Studies are identified by names of the first author. PIMS, positive immunomagnetic separation.

First author	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)	DOR	AUC
Overall				
Brakenhoff R.H.	6.82 (0.34–135.06)	0.90 (0.77–1.05)	7.56 (0.34–166.20)	
Patridge M.	10.37 (0.65–165.36)	0.72 (0.58–0.89)	14.47 (0.80–260.69)	
Xu W	7.00 (0.52–94.07)	0.14 (0.04–0.48)	49.00 (1.91–1258.70)	
Buglione M	5.81 (0.38–88.65)	0.75 (0.61–0.92)	7.78 (0.43–139.69)	
Tsvetana H	3.33 (0.82–13.52)	0.74 (0.56–0.98)	4.50 (0.88–22.98)	
Alexandre B	3.74 (0.23–60.07)	0.87 (0.73–1.04)	4.30 (0.23–80.67)	
Hung-Chih L	7.86 (2.95–20.97)	0.02 (0.01–0.34)	399.00 (19.63–8110.80)	
Grisanti S	5.37 (0.35–82.94)	0.77 (0.62–0.96)	6.98 (0.38–127.62)	
Hsieh J.C.	7.34 (3.84–14.03)	0.04 (0.01–0.17)	168.94 (34.23–833.81)	
pooled	6.65 (4.20–10.55)	0.55 (0.35–0.84)	19.98 (5.90–67.71)	
I ²	0.00%	95.2%	51.6%	0.95
PIMS				
Buglione M	5.81 (0.38–88.65)	0.75 (0.61–0.92)	7.78 (0.43–139.69)	
Alexandre B	3.74 (0.23–60.07)	0.87 (0.73–1.04)	4.30 (0.23–80.67)	
Grisanti S	5.37 (0.35–82.94)	0.77 (0.62–0.96)	6.98 (0.38–127.62)	
pooled	4.90 (1.00–23.93)	0.80 (0.71–0.90)	6.18 (1.15–33.11)	0.97
I ²	0.00%	0.00%	0.00%	

Table 1. Diagnostic measures of overall and subgroup. PIMS, positive immunomagnetic separations; LR+, positive likelihood ratios; LR-, negative likelihood ratios; DOR, diagnostic odds ratios; AUC, area under curve; I², inconsistency index.

the recurrence/metastasis rate in the CTC-positive patients was significantly higher compared to patients without disease progression, suggesting that the detection of CTC in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck has a predictive value for tumor progression⁴⁸. However, the diagnostic role of CTC was not evaluated in this study and the effect of CTC on survival time could not be analyzed due to incomplete data in the included studies. Furthermore, studies with disseminated tumor cells (DTC) in the bone marrow were also included in the meta-analysis. These discrepancies may help to explain the different overall conclusions between our study (a decreased DFS when CTC were present) and Wang’s meta-analysis concerning only the prognostic value of CTC detection in the HNSCC setting.

Most HNSCC arise in the oral cavity, pharynx and in the larynx, and patients often display signs and symptoms of locally advanced disease at the time of diagnosis^{7,49}. Carcinoma originated from the head and neck region has a high propensity to metastasize from its rich lymphatic system^{50–52}. The consequence of this process

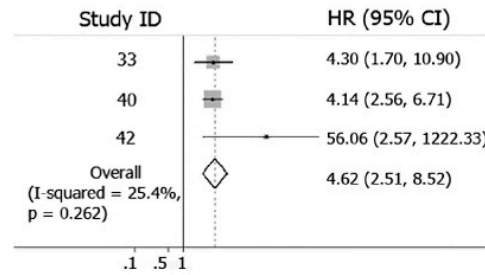


Figure 5. Forest plots showing prognostic value of CTC detection on DFS. ■: Individual HR, designed proportionally to the amount of patients included; - - -: Combined HR of the studied subgroup through meta-analysis; ◇: The centre of the diamond gives the combined HR and its extremities the 95% CI. DFS, Disease Free Survival; Study ID, serial number of reference.

ID	T stage	N stage	M stage	Clinical stage	Others
21	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns	N/S	<i>p</i> = 0.04 lung nodules
22	N/S	N/S	N/S	N/S	<i>p</i> = ns (tumor site, induction chemotherapy)
25	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns	N/S	N/S	<i>p</i> = ns (gender, patient's height and weight, performance status, ASA score, alcohol and tobacco consumption, tumor site, tumor differentiation, anemia and thrombopenia)
26	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns	N/S	N/S	<i>p</i> = ns (tumor differentiation)
28	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns	N/S	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns (tumor site, tumor differentiation)
30	N/S	N/S	N/S	N/S	<i>p</i> = ns (age, sex, weight loss, smoking, alcohol, tumor differentiation, prior radiotherapy, prior chemotherapy, Argiris factors;)
31	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns	N/S	<i>p</i> = ns (age, smoking history, surgical margins, human papillomavirus status)
34	<i>p</i> = ns	N0-2a vs. N2b+, <i>p</i> = 0.013	N/S	N/S	<i>p</i> = ns (tumor volume, human papillomavirus status)
38	N/S	<i>p</i> = ns	N/S	<i>p</i> = ns	<i>p</i> = ns (age, sex, tumor site, adjuvant therapy, smoking, and alcohol)
39	<i>p</i> = 0.04	N/S	<i>p</i> = 0.004	N/S	N/S

Table 2. Frequency of CTC and clinico-pathologic characteristics of patients. *p* value extracted directly from reports. ID = serial number of reference; ns = no significant; N/S = non specify; TNM and Clinical stage: according to AJCC staging system; ASA score, score according to American Society of Anaesthesiologists physical status classification system.

represents as a worse prognostic, such as a high incidence in recurrence⁵³. These might be the epidemiological reasons for designing the recruitment of patients in present studies. Despite considerable efforts that have been made to relate positive CTC identification with clinico-pathological features, very poor evidence was found^{23,25,27,28,30,32,33,36,40,41}. Of note, the TNM staging provides crucial information of tumor burden and an advanced stage generally expected to associate with more CTC⁵⁴⁻⁵⁶. However, such a trend has not been found in HNSCC or in some investigations done in colon⁵⁷, prostate⁵⁸ and lung cancer^{59,60}.

Compared with certain individual studies with encouraging conclusions, our results of meta-analysis suggest that CTC detection in patients with HNSCC have limited sensitivity but extremely high specificity for diagnosis. This test therefore should not be used as screening or first-line diagnostic test but might have great interest for confirming suspicious cases or searching cancer of unknown primary site⁶¹. The significant differences among sensitivities of CTC detection most likely derived from technique factors more than other variables.

We have found that the three studies using CellSearch[®] system had sensitivities almost at similar levels (16.33–28.77%), which were relatively lower than RT-PCR (10–96.22%) or immunocytochemistry (89.47–100%). The range of CTC enumeration detected by CellSearch[®] was 1–5/7.5 ml of blood. To briefly explain its principles, EpCAM+ cells were targeted immunomagnetically during the enrichment process and then the events with cytokeratins (CKs) 8+, 18+, 19+ 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) + CD45- were identified as circulating tumor cells^{7,62,63}. As a reliable epithelial cell marker, EpCAM was widely used in involved studies. The expression of EpCAM was detected in 98 of 131 tumor categories and this rate varies from 59% (oral cavity) to 100% (pharynx) in HNSCC⁶⁴. Compared with their primary tumors, its expression was found to be more frequently lower than higher in metastases⁶⁵, which strongly suggest a potential switch of epithelial–mesenchymal transition (EMT). Although the role of EMT in tumor metastasis remains controversial, several studies have indicated that expression of EpCAM and some of the CKs are lost from CTC during EMT⁶⁶⁻⁷¹. Moreover, the pattern of CKs also presents regional differences in corresponding carcinomas⁷². Thus, the differential expression of EpCAM

and CKs, the EMT process, and the utilization of various identification markers, could explain the heterogeneity in overall studies and the lower sensitivity of studies using positive immunomagnetic cell separation strategies.

The negative depletion enrichment, which is not an EpCAM-based capture, was also explored in HNSCC^{25,27,34}. These non-EpCAM based essays hoped to overcome aforementioned inefficiency and indeed showed a relatively higher sensitivity (43–100%). However, regrettably they have not been taken into our meta-analysis due to poor sample size or no negative control group set-up.

On the other hand, we have conducted the meta-analysis of studies on prognostic factors to develop an overall assessment of CTC in clinical management of patients with HNSCC. We have found that detectable CTC was important for predicting a shorter DFS but was not associated with PFS or OS. Such difference would be more likely associated with the intrinsic differences among survival end points. There are different ways of evaluating survival and in fact no international consensus standards are given for DFS and other endpoints. Generally, DFS indicates the percentage of people in the trial who are alive and without cancer after a specified period. DFS is frequently employed where all identifiable tumor has been resected and can be served as an early indicator of improved survival⁷³. Meanwhile, PFS is defined as the time elapsed between treatment initiation and metastatic tumor progression⁷⁴, including but not limited to the patients that received curative treatment. With PFS therefore, researchers are mostly concerned with distant but not locoregional metastasis. In our meta-analysis, compared with DFS, more confounding factors were involved into PFS as well as OS and consequently weakened their correlations with the presence of CTC. Even though in these studies the diagnostic accuracy has not been evaluated due to a lack of negative control group, they did not present significant heterogeneity, as confirmed by the inconsistency index test.

Notably, in the present meta-analysis, we have extracted merely the data at baseline as the timing of the assessment. Indeed, too many confounders exist during treatment: different therapeutic options; transient dissemination of CTC during the surgical and invasive procedure^{75,76}; destruction or conversion of CTC induced by chemotherapy⁷⁷. The diagnostic accuracy and prognostic value of CTC therefore should only be interpreted for the initial evaluation of tumor burdens. Besides, the bias related to an aggregation of survival data should also be enlightened. The present results are based on either reported data through univariate survival analysis, or recalculated HR for subgroups, or extrapolation from the survival curves, hence making assumptions on the censoring process. Finally, the publication bias has not been evaluated because neither the meta-analysis of diagnostic accuracy nor prognosis involved more than 10 studies. Of 10 studies that reported survival analysis, 5 were excluded for the meta-analysis due to insufficient data and 3 represented negative association between detectable CTC and DFS. Thus, in regard to 3 positive versus 3 negative, a potential bias could not be completely ruled out.

In conclusion, current evidence identifies the CTC assay as an extremely specific, but low sensitive test in HNSCC. Presence of CTC indicates a worse DFS for patient with HNSCC, whatever the biological approaches used. In spite of potential bias, the role of CTC in clinical management should still be valued but also the interpretation needs to be done in conjunction with individual clinical information. This observation requires update by further investigation with a more rigorous experimental design, such as a negative control group set-up and a standardized format on survival analysis reporting.

References

- Pantel, K. & Alix-Panabieres, C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med.* **16**, 398–406 (2010).
- Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* **9**, 302–312 (2009).
- Green, S., Benedetti, J., Smith, A. *et al.* Clinical trials in oncology. CRC press, 2012. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* **148**, 349–361 (2012).
- Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* **59**, 110–118 (2013).
- Heitzer, E., Auer, M., Ulz, P., Geigl, J. B. & Speicher, M. R. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med.* **5**, 73 (2013).
- Cohen, S. J. *et al.* 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 (2008).
- Cristofanilli, M. *et al.* Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* **23**, 1420–1430 (2005).
- Danila, D. C. *et al.* Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **13**, 7053–7058 (2007).
- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. *Cancer Statistics.* 2015. CA. **65**, 5–29 (2015).
- Gath, H. J. & Brakenhoff, R. H. Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 109–126 (1999).
- Mocellin, S., Keilholz, U., Rossi, C. R. & Nitti, D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med.* **12**, 130–139 (2006).
- Zamora, J., Abraira, V., Muriel, A., Khan, K. & Coomarasamy, A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol.* **6**, 31 (2006).
- Higgins, J. P., Thompson, S. G., Deeks, J. J. & Altman, D. G. Measuring inconsistency in meta-analyses. *Bmj.* **327**, 557–560 (2003).
- Parmar, M. K., Torri, V. & Stewart, L. Extracting summary statistics to perform meta-analyses of the published literature for survival endpoints. *Stat Med.* **17**, 2815–2834 (1998).
- Tierney, J. F., Stewart, L. A., Ghersi, D., Burdett, S. & Sydes, M. R. Practical methods for incorporating summary time-to-event data into meta-analysis. *Trials.* **8**, 16 (2007).
- Bonequi, P., Meneses-Gonzalez, F., Correa, P., Rabkin, C. S. & Camargo, M. C. Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis. *Cancer Causes Control.* **21**, 217–231 (2013).
- Dong, J. Y., Zhang, Y. H., Tong, J. & Qin, L. Q. Depression and risk of stroke: a meta-analysis of prospective studies. *Stroke.* **43**, 32–37 (2012).
- Higgins, J., Thompson, S., Deeks, J. & Altman, D. Statistical heterogeneity in systematic reviews of clinical trials: a critical appraisal of guidelines and practice. *J Health Serv Res Policy.* **7**, 51–61 (2002).
- DerSimonian, R. & Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials.* **7**, 177–188 (1986).
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G. & Group, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med.* **151**, 264–269 (2009).

21. Brakenhoff, R. H. *et al.* Sensitive detection of squamous cells in bone marrow and blood of head and neck cancer patients by E48 reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res.* **5**, 725–732 (1999).
22. Kao, R. H. & Huang, L. C. High false-positive rate of cytokeratin-19 in detecting circulating tumor cells for nasopharyngeal carcinoma. *Chang Gung Med J.* **25**, 238–244 (2002).
23. Nichols, A. C. *et al.* Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck.* **34**, 1440–1444 (2012).
24. Tinhofer, I., Hristozova, T., Stromberger, C., Keilhoiz, U. & Budach, V. Monitoring of circulating tumor cells and their expression of EGFR/phospho-EGFR during combined radiotherapy regimens in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **83**, e685–690 (2012).
25. Hristozova, T., Korschak, R., Budach, V. & Tinhofer, I. A simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers. *Cytom Part A.* **81**, 489–495 (2012).
26. Bozec, A. *et al.* Significance of circulating tumor cell detection using the CellSearch system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-L.* **270**, 2745–2749 (2013).
27. Lin, H. C. *et al.* A negative selection system PowerMag for effective leukocyte depletion and enhanced detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells. *Clin Chim Acta.* **419**, 77–84 (2013).
28. Partridge, M. *et al.* Detection of rare disseminated tumor cells identifies head and neck cancer patients at risk of treatment failure. *Clin Cancer Res.* **9**, 5287–5294 (2003).
29. Wang, X. *et al.* Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles. *Cancer Res.* **71**, 1526–1532 (2011).
30. Buglione, M. *et al.* Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer.* **48**, 3019–3026 (2012).
31. Balasubramanian, P. *et al.* Multiparameter analysis, including EMT markers, on negatively enriched blood samples from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One.* **7**, e42048 (2012).
32. Grisanti, S. *et al.* Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One.* **9**, e103918 (2014).
33. Tinhofer, I. *et al.* Detection of circulating tumor cells for prediction of recurrence after adjuvant chemoradiation in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol.* (2014).
34. Hsieh, J. C. *et al.* Prognostic value of circulating tumor cells with podoplanin expression in patients with locally advanced or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* **37**, 1448–1455 (2015).
35. Yang, L. *et al.* Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnol Bioeng.* **102**, 521–534 (2009).
36. Hristozova, T. *et al.* The presence of circulating tumor cells (CTCs) correlates with lymph node metastasis in nonresectable squamous cell carcinoma of the head and neck region (SCCHN). *Ann Oncol.* **22**, 1878–1885 (2011).
37. Wirtschafter, A. *et al.* Micrometastatic tumor detection in patients with head and neck cancer: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **128**, 40–43 (2002).
38. Lin, J. C., Chen, K. Y., Wang, W. Y., Jan, J. S. & Wei, Y. H. PCR detection of circulating tumor cells in nasopharyngeal carcinoma patients with distant metastasis: effect of enzyme and sampling. *Head Neck.* **24**, 591–596 (2002).
39. Winter, S. C. *et al.* Long term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* **9**, 424 (2009).
40. Jatana, K. R. *et al.* Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: initial results. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **136**, 1274–1279 (2010).
41. Weller, P. *et al.* Detection of circulating tumor cell subpopulations in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS One.* **9**, e113706 (2014).
42. Grobe, A. *et al.* Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res.* **20**, 425–433 (2014).
43. R, A. T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J.* **14**, 146–149 (1869).
44. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer.* **3**, 453–458 (2003).
45. Scher, H. I. *et al.* Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol.* **10**, 233–239 (2009).
46. Hayes, D. F. & Smerage, J. Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? *Clin Cancer Res.* **14**, 3646–3650 (2008).
47. Tanaka, F. *et al.* Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res.* **15**, 6980–6986 (2009).
48. Wang, Z., Cui, K., Xue, Y., Tong, F. & Li, S. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Med Oncol.* **32**, 164 (2015).
49. Kamangar, F., Dores, G. M. & Anderson, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* **24**, 2137–2150 (2006).
50. Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A. & Sidransky, D. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* **345**, 1890–1900 (2001).
51. Shah, J. P., Candela, F. C. & Poddar, A. K. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* **66**, 109–113 (1990).
52. Kuriakose, M. A. & Trivedi, N. P. Sentinel node biopsy in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* **17**, 100–110 (2009).
53. Leemans, C. R., Tiwari, R., Nauta, J. J., van der Waal, I. & Snow, G. B. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer.* **73**, 187–190 (1994).
54. Beije, N., Jager, A. & Sleijfer, S. Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: The clinician's guide to breast cancer treatment? *Cancer Treat Rev.* **41**, 144–150 (2015).
55. Resel Folkersma, L., San Jose Manso, L., Galante Romo, I., Moreno Sierra, J. & Olivier Gomez, C. Prognostic significance of circulating tumor cell count in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Urology.* **80**, 1328–1332 (2012).
56. Onstenk, W. *et al.* Improved Circulating Tumor Cell Detection by a Combined EpCAM and MCAM CellSearch Enrichment Approach in Patients with Breast Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* **14**, 821–827 (2014).
57. Allen, J. E. *et al.* Apoptotic circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of metastatic colorectal cancer patients are associated with liver metastasis but not CTCs. *Oncotarget.* **5**, 1753–1760 (2014).
58. Loh, J. *et al.* Circulating tumor cell detection in high-risk non-metastatic prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* **140**, 2157–2162 (2014).
59. Hofman, V. *et al.* Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer.* **129**, 1651–1660 (2011).
60. Wendel, M. *et al.* Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early- and late-stage non-small cell lung cancer: a glimpse into lung cancer biology. *Phys Biol.* **9**, 016005 (2012).
61. He, S., Li, P., Chen, X. & Yu, Z. Fluid biopsy for circulating tumor cells in an occult ovarian cancer patient exhibiting bilateral supraclavicular lymph node metastases: A case report. *Oncol Lett.* **6**, 448–452 (2013).

62. Riethdorf, S. *et al.* Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* **13**, 920–928 (2007).
63. Janssen Diagnostics, L. CELLSEARCH[®] Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial) Instructions for Use.
64. Went, P. T. *et al.* Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol.* **35**, 122–128 (2004).
65. Takes, R. P. *et al.* Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol.* **194**, 298–302 (2001).
66. Mego, M. *et al.* Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. *Int J Cancer.* **129**, 417–423 (2011).
67. Konigsberg, R. *et al.* Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* **50**, 700–710 (2011).
68. Gorges, T. M. *et al.* Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* **12**, 178 (2012).
69. Mostert, B. *et al.* CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. *Cancer Lett.* **319**, 49–55 (2012).
70. Pecot, C. V. *et al.* A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discov.* **1**, 580–586 (2011).
71. Raimondi, C. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* **130**, 449–455 (2011).
72. Balm, A. J., Hageman, P. C., van Doornwaard, M. H., Groeneveld, E. M. & Ivanyi, D. Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* **253**, 227–233 (1996).
73. Hudis, C. A. *et al.* Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system. *J Clin Oncol.* **25**, 2127–2132 (2007).
74. Green, S., Benedetti, J., Smith, A. *et al.* *Clinical trials in oncology*. CRC press (2012).
75. Koutsilieris, M., Lembesis, P., Luu-The, V. & Sourla, A. Repetitive and site-specific molecular staging of prostate cancer using nested reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen and prostate specific membrane antigen. *Clin Exp Metastasis.* **17**, 823–830 (1999).
76. Sawabata, N. *et al.* Circulating tumor cells in peripheral blood caused by surgical manipulation of non-small-cell lung cancer: pilot study using an immunocytology method. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* **55**, 189–192 (2007).
77. Lembesis, P. *et al.* Combined androgen blockade therapy can convert RT-PCR detection of prostate-specific antigen (PSA) and prostate-specific membrane antigen (PSMA) transcripts from positive to negative in the peripheral blood of patients with clinically localized prostate cancer and increase biochemical failure-free survival after curative therapy. *Clin Chem Lab Med.* **45**, 1488–1494, (2007).

Author Contributions

X.W. and M.D.C.B. were responsible for the concept and design of the study. X.W. and Q.T. conducted the retrieval and evaluation of literature. X.W. and Q.T. extracted and analyzed the data. C.K. helped the statistical analysis. X.W. and M.D.C.B. wrote the manuscript. G.F., P.G. and C.K. reviewed and edited the manuscript extensively. All of the authors were involved in revision of the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Xiang-Lei, W.U. *et al.* Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **6**, 20210; doi: 10.1038/srep20210 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

CASE REPORT

Open Access



A rare case of extremely high counts of circulating tumor cells detected in a patient with an oral squamous cell carcinoma

Xianglei Wu^{1,2,3}, Romina Mastronicola^{2,4}, Qian Tu^{1,2}, Gilbert Charles Faure^{1,2}, Marcelo De Carvalho Bittencourt^{1,2*†} and Gilles Dolivet^{2,4†}

Abstract

Background: Despite aggressive regimens, the clinical outcome of head and neck squamous cell carcinoma remains poor. The detection of circulating tumor cells could potentially improve the management of patients with disseminated cancer, including diagnosis, treatment strategies, and surveillance. Currently, CellSearch[®] is the most widely used and the only Food and Drug Administration-cleared system for circulating tumor cells detection in patients with metastatic breast, colorectal, or prostate cancer. In most cases of head and neck squamous cell carcinoma, only low counts of circulating tumor cells have been reported.

Case presentation: A 56-year-old white male with no particular medical history, was diagnosed with a squamous cell carcinoma of oral cavity. According to the imaging results (computed tomography and ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography / computed tomography) and panendoscopy, the TNM staging was classified as T4N2M0. A non-interruptive pelvimandibulectomy was conducted according to the multidisciplinary meeting advices and the postoperative observations were normal. The patient complained of a painful cervical edema and a trismus 6 weeks after the surgery. A relapse was found by computed tomography and the patient died two weeks later. The search for circulating tumor cells in peripheral venous blood by using the CellSearch[®] system revealed a very high count compared with published reports at three time points (pre-operative: 400; intra-operative: 150 and post-operative day 7: 1400 circulating tumor cells). Of note, all detected circulating tumor cells were epidermal growth factor receptor negative.

Conclusion: We report here for the first time a rare case of oral squamous cell carcinoma with extremely high circulating tumor cells counts using the CellSearch[®] system. The absolute number of circulating tumor cells might predict a particular phase of cancer development as well as a poor survival, potentially contributing to a personalized healthcare.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, Circulating tumor cells, Head and neck squamous cell carcinoma, Survival

* Correspondence: marcelo.decarvalho@univ-lorraine.fr

† Equal contributors

¹Laboratory of Immunology, Nancytomique platform, CHRU of Nancy, rue du Morvan, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

²SBS Department, CRAN, UMR 7039 CNRS, University of Lorraine, Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Head and neck cancer, the sixth leading cancer by incidence worldwide [1], develops from the mucosal linings of the upper aerodigestive tract. Approximately 95 % of head and neck cancers have a squamous cell histological aspect [2], also known as HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma). Despite aggressive treatment regimens, many HNSCC patients (20–30 %) develop locoregional recurrence (local recurrence / cervical lymph node metastasis) or distant metastases. In addition, even in cases where the resection margins were negative in histopathological examination, there is still a risk of local recurrence in 20 % of cases [3, 4]. Consequently, the five-year survival rate for all stages combined is 40–50 %. Of note, human papillomavirus (HPV)-positive HNSCC patients have a significantly better prognosis than HPV-negative patients, for instance lower disease specific mortality and recurrence rate [5].

Circulating tumor cells (CTC), which eventually detach from the primary tumor and disseminate in the blood and other body fluids, have been considered as a “liquid biopsy” in the clinical assessment of cancer patients [6, 7]. The diagnostic and prognostic values of CTC detection have been established in some cancers, like breast, colorectal and prostate cancers [8–10], but not yet in HNSCC. Recent studies in HNSCC with small patient cohorts have shown the potential clinical utility of CTC [11]. However, further evidence is needed for evaluating comprehensively its application, such as unusual cases. Here, we report extremely

high enumerations of CTC detected in a patient with an oral squamous carcinoma, which might also explain his quick relapse and short survival.

Case presentation

A 56-year-old white male, former pipefitter, 68 kg /169 cm, with no particular personal or familial medical-surgical history, presented with a lesion of oral cavity of recent apparition. The cancer risk factors included unweaned smoking, valued at about 40 pack-years, and alcohol consumption (weaned for 3 years). Physical examination revealed an ulcerative lesion on the right anterolateral floor of oral cavity, which was adherent to the gingival fibro mucosa. Several leukoplakias were also observed on the gingival mucosa. The rest of the otorhinolaryngology examination was unremarkable.

A biopsy confirmed the lesion as an invasive well- / moderately-differentiated squamous cell carcinoma. A contrasted computer tomography (CT) scan showed a tumoral process involving the muscles of the anterolateral floor of oral cavity, which extended about 3 cm in the long axis and remained lateralized to the right (Fig. 1). The lesion was in contact with the mandible and furthermore developed a suspicious bone notch. No cervical lymph nodes of significant size and no other suspicious lesions on the cervical-thoracic level were present in this CT scan. A ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography / computed tomography

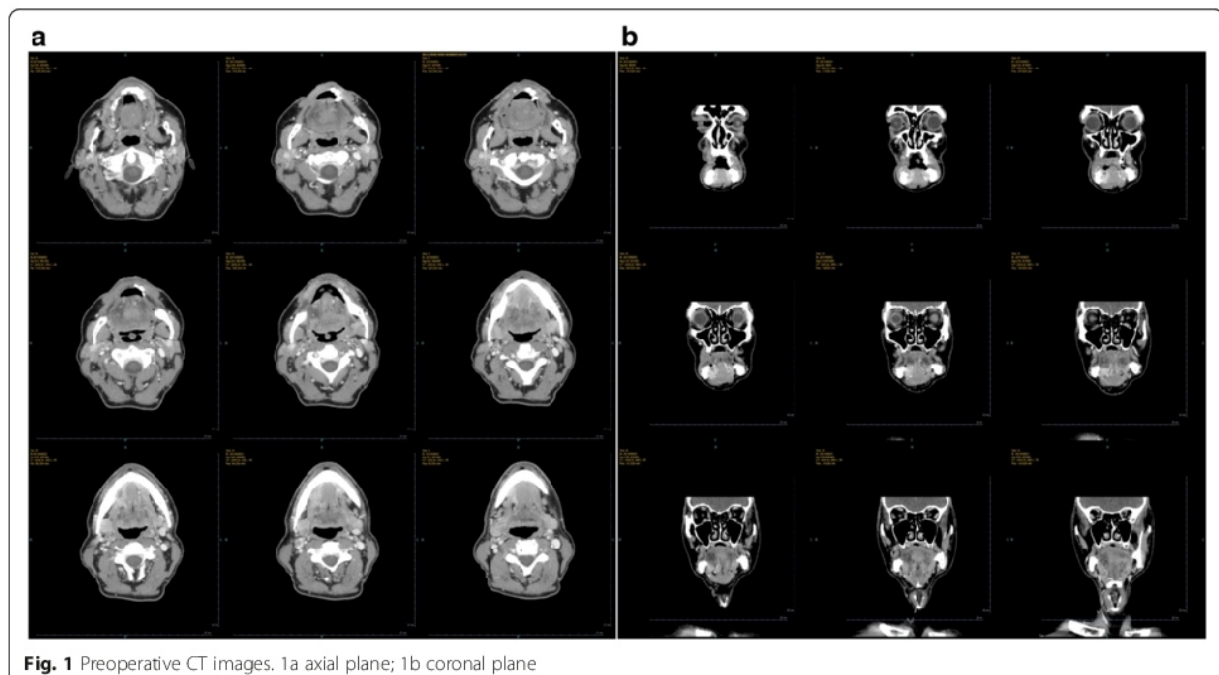


Fig. 1 Preoperative CT images. 1a axial plane; 1b coronal plane

(^{18}F -FDG PET/CT) scan found a lesion of intense hyper-metabolism next to the right genio-glosse triangular muscles and lips, which seemed to repel the omohyoid muscle without infiltrating it (Fig. 2). A lytic aspect of the cortical bones of the mandible body suggested a bone extension. ^{18}F -FDG uptakes were perceptible in lymph nodes of right groups Ib and II. The patient received a panendoscopy under general anesthesia. The upper gastrointestinal endoscopy and the bronchoscopy did not find any abnormalities.

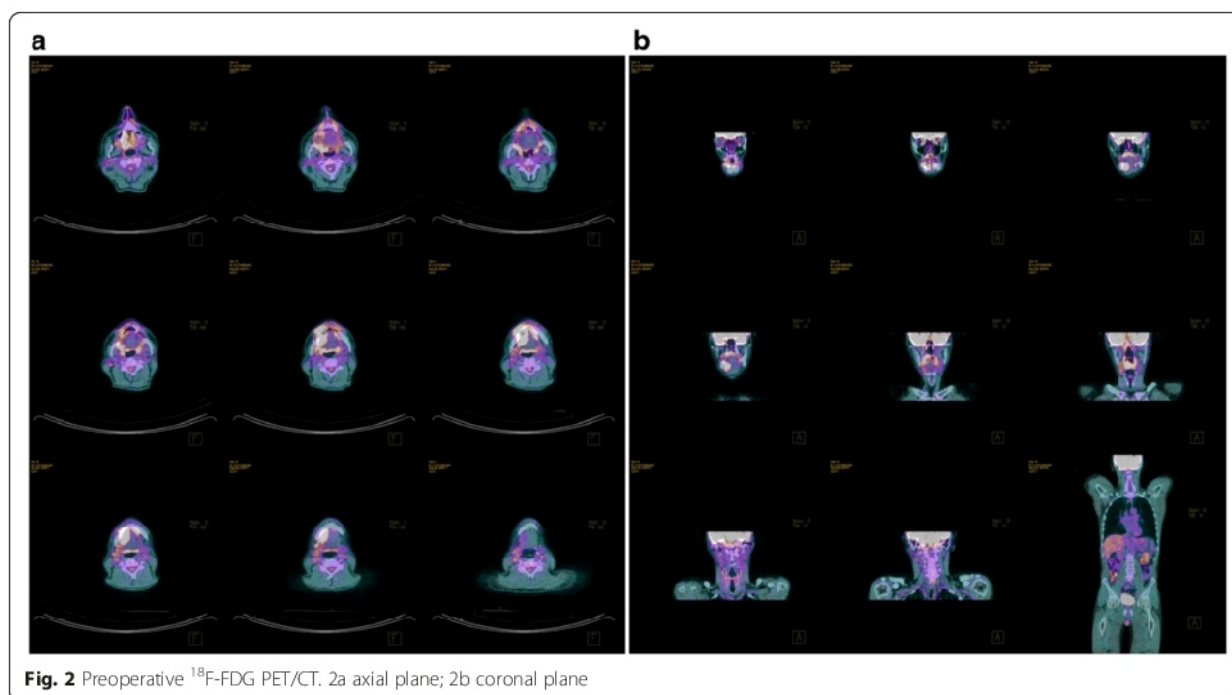
The TNM staging was classified as T4N2M0 (according to American Joint Committee on Cancer 2009) [12] and noninterruptive pelvimandibulectomy was validated as the primary treatment by a multidisciplinary meeting. The surgery was performed in a satisfactory manner 2 months after the first consultation. The post-operative care was performed by standard procedures without abnormalities. The pathological analysis of excised specimens confirmed the squamous cell carcinoma histology as well as the lymph node metastases (Fig. 3), suggesting the definitive TNM stage as pT4aN2cM0. In addition, the margins were negative but multiple tumor nodules were found in the muscle. Immunohistochemical analysis for HPV showed the staining of p40 but no expression of p16.

At the end of 6 weeks postoperative follow-up, the patient complained of a painful cervical edema as well as a trismus. A CT scan was ordered, which found regional

multiple recurrences (Fig. 4). A multidisciplinary meeting updated the treatment strategy including a surgical retake, followed by radiochemotherapy. However, the patient died 2 weeks later due to cancer related complications.

Detection of CTC

The patient was recruited into a clinical research program (VADS - EudraCT N°: 2010-A00586-33, approved by the regional ethic committee "Comité de Protection des Personnes Est III"), which aimed to evaluate the prognostic value of CTC in HNSCC. Venous blood samples were collected at three time points (preoperative day-1, intraoperative, and postoperative day 7) for the detection of CTC. The manipulations were performed by using the CellSearch[®] system (Veridex LLC, Raritan, NJ) according to a standard protocol [13]. The commercially available CellSearch[®] Tumor Phenotyping Reagent Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) kit (Veridex LLC, Raritan, NJ, USA) was used on the fourth channel of fluorescence of the CellSearch[®] system following the manufacturer's instructions. The pre-, intra-, and post-operative enumerations of CTC are shown in Fig. 5. A high count of CTC was already detected at baseline (400 CTC), decreasing by 67.5 % at the intra-operative time point (150 CTC), after which it increased significantly (1400 CTC). In particular, all CTC were EGFR negative. Typical images of CTC are shown in Fig. 6.



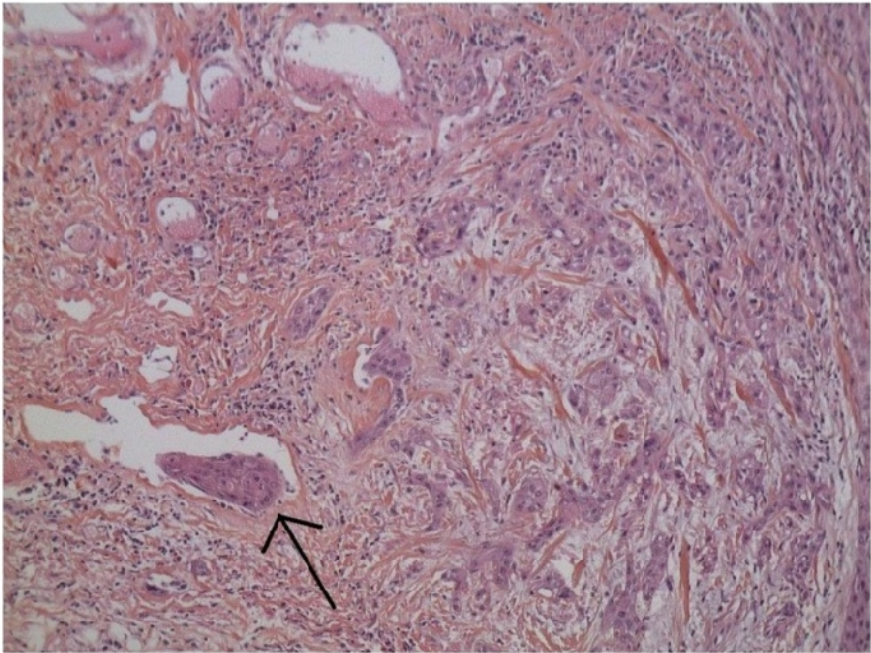


Fig. 3 Fixed HE-stained pathology of excised tissue (original magnification 20x). The tissue corresponds to an infiltrative poorly-differentiated squamous cell carcinoma. Arrow indicates an embolus in the vessel

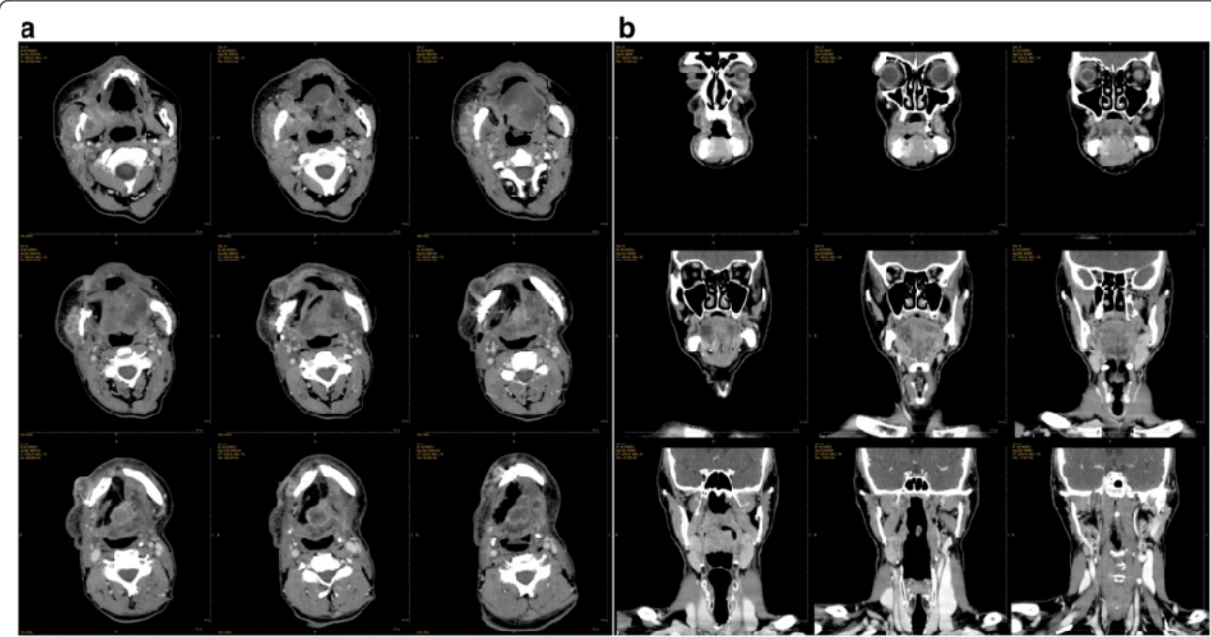


Fig. 4 Postoperative CT images. 2a axial plane; 2b coronal plane

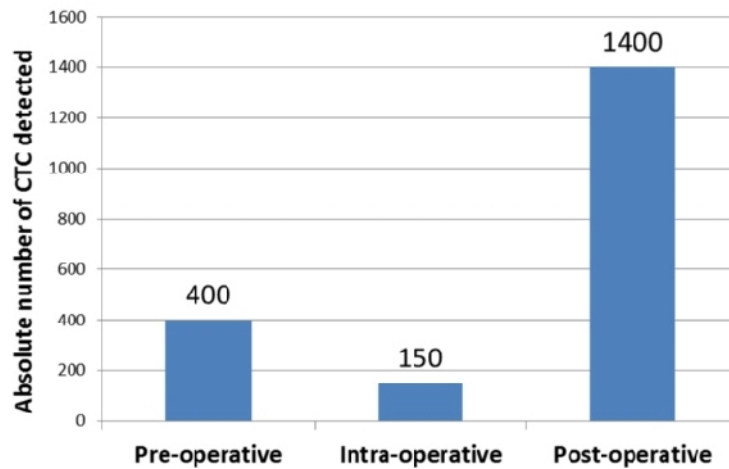


Fig. 5 CTC enumeration per time point

Discussion

To our knowledge, this is the first report of extremely high numbers of CTC in a case of squamous cell carcinoma of oral cavity. At present, the CellSearch[®] System is the most commonly used and the only Food and Drug Administration (FDA)-cleared CTC detection technique, working on an EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) based-capture enrichment. Current published data on CTC count using the CellSearch[®] System in HNSCC patients reported a range of 0–5 CTC in 7.5 ml blood, associated with the clinical features or survival [14–18]. In the case reported here, the initial CTC count was already dozens of times higher than the known published maximum. The CTC count achieved even several hundred numbers at post-operative day 7. Moreover, as a label-dependent approach, the Cellsearch[®] might have underestimated actual CTC load in circulation owing to the possible existence of EpCAM negative tumor cells.

Based on the fact that the absolute number of EpCAM positive circulating epithelial cells was upregulated and were negative for EGFR expression, one can hypothesize that the CTC were probably in a particular phase associated with mesenchymal–epithelial transition (MET). Since the samples were detected individually according to the standard semi-automated procedure, we can exclude the possibility of technical confounders, such as contaminations. Besides, studies using the same method in other malignancies, like breast [19], prostate [20], colorectal [21], and gastrointestinal cancer [22] have rarely found such high CTC counts. EGFR is overexpressed in over 90 % of HNSCC [23] but with a huge discordance between the primary tumor and CTC. Grisanti et al. [17] found that EGFR was expressed in

45 % of CTC from patients with recurrent or metastatic HNSCC. In this work, no CTC was found to be EGFR positive regardless of time point. Generally, MET is thought as the reverse biological process of epithelial-mesenchymal transition (EMT), but relatively poor evidence has been found about its role in cancer when compared to the extensive studies of the latter. Given that MET induce upregulation of epithelial markers (E.g. EpCAM) and that MET facilitates allowing cancerous cells to regain epithelial properties, the absence of EpCAM + EGFR + CTC vis-a-vis the enormous amount of EpCAM + EGFR-CTC might suggest the development of MET. Genetic studies revealed that mutations of the EGFR gene family correlate with mRNA abundance and protein level in patients with HNSCC [24, 25]. Thus, in the case reported here, the lack of EGFR expression on CTC could be also related to a rare mutated tumor type. In addition, the higher count of CTC at the post-operative day 7 could be due to the re-entry of disseminative tumor cells in mesenchymal tissues into the circulation [26].

The very short survival of this patient (disease-free survival, DFS and overall survival, OS) might be associated with the high absolute number of CTC. Even if the patient was diagnosed at stage IVA, the DFS of 1 month and the OS of 2 months still indicate a rapid progression. The routine evaluation, TNM staging, seemingly could not provide a plausible prediction of this clinical outcome. Of note, the presence of CTC has been reported to be an independent prognostic factor for predicting survival of HNSCC patients with higher sensitivity at various disease stages than routine staging procedures [17, 27, 28]. High post-operative levels of CTC have also been reported to accurately predict tumor recurrence [29]

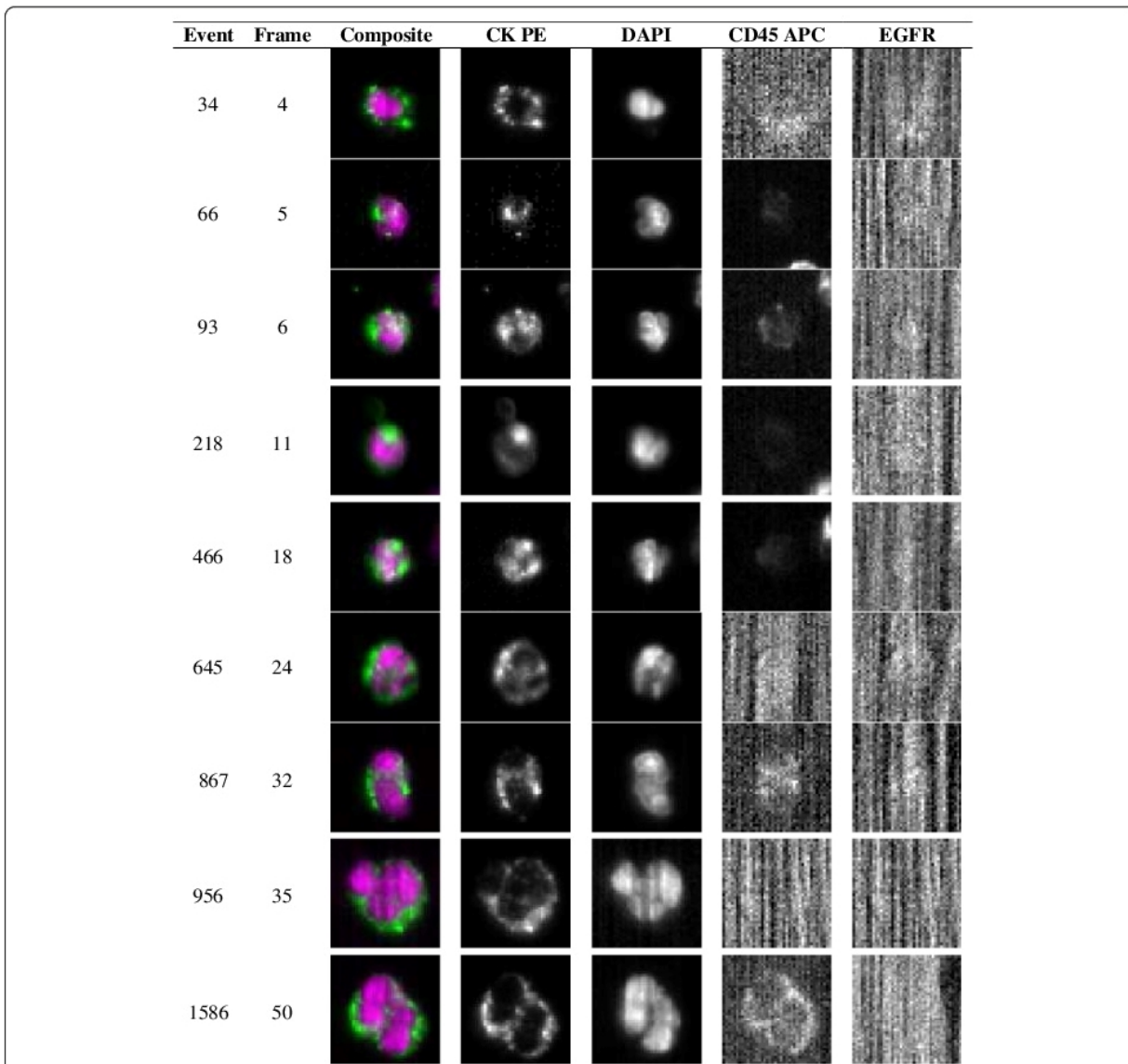


Fig. 6 Representative CTC images from the CellSearch® system. Representative pre-operative CTC images of 7.5 ml blood from the patient with an oral squamous cell carcinoma. DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; CK-PE, cytokeratin-phycoerythrin; APC, allophycocyanin

Conclusion

In conclusion, this is the first report of a rare case of extremely high CTC counts potentially associated with the short survival in the oral squamous cell carcinoma setting. The CTC detection constantly monitors the tumor biology changes as a “liquid biopsy”. We believe that such findings are of great significance in terms of personalized healthcare, although might not be frequent. Our data also might suggest a conceivable observation of MET, which requires confirmation by additional specific studies.

Abbreviations

¹⁸F-FDG PET/CT, 18 F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography / computed tomography; CT, computed tomography; CTC, circulating tumor cells; DFS, disease-free survival; EGFR, epidermal growth factor receptor; EMT, epithelial-mesenchymal transition; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; FDA, food and drug administration; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; HPV, human papillomavirus; MET, mesenchymal-epithelial transition; OS, overall survival; TNM, tumor nodes metastasis

Acknowledgements

A special thanks to technicians of laboratory of Immunology for their generous help.

Funding

This study has been supported by China Scholarship Council (201508070022).

Availability of data and materials

All datasets on which the conclusions of the manuscript rely are presented within this manuscript.

Authors' contributions

XW and QT conducted the manipulations and data analysis; RM was responsible for the clinical management; XW wrote the manuscript; RM, GCF, MDCB and GD were in charge of the concept and design of the study; MDCB and GD reviewed and edited the manuscript. All of the authors were involved in revision of the manuscript and approved its final version.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

The informed consent signed by the patient included an authorization to publish the corresponding results and any accompanying images of this Case report.

Authors' information

Xianglei Wu. Address: CHRU of Nancy, Laboratory of Immunology; rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Email: wxlthibaut@gmail.com

Romina Mastronicola. Address: Institut de Cancérologie de Lorraine, Head and Neck Surgery and Dental Units, Oncologic Surgery Department; 6 Avenue de Bourgogne, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Email: r.mastronicola@nancy.unicancer.fr

Qian Tu. Address: CHRU of Nancy, Laboratory of Immunology; rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Email: catherine.tu1986@gmail.com

Gilbert Charles Faure. Address: CHRU of Nancy, Laboratory of Immunology; rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Email: gilbert.faure@univ-lorraine.fr

Marcelo De Carvalho Bittencourt. Address: CHRU of Nancy, Laboratory of Immunology; rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Email: marcelo.decarvalho@univ-lorraine.fr

Gilles Dolivet. Address: Institut de Cancérologie de Lorraine, Head and Neck Surgery and Dental Units, Oncologic Surgery Department; 6 Avenue de Bourgogne, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Email: g.dolivet@nancy.unicancer.fr

Declarations

This study (VADS - EudraCT N°: 2010-107 A00586-33) has been approved by the regional ethic committee "Comité de Protection des Personnes Est III". A signed informed consent was obtained from the patient at his inclusion in the study (before any treatment). A copy of this written consent is available for review by the Editor of this journal.

Author details

¹Laboratory of Immunology, Nancytomique platform, CHRU of Nancy, rue du Morvan, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. ²SBS Department, CRAN, UMR 7039 CNRS, University of Lorraine, Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. ³Department of Otorhinolaryngology - Head and Neck surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, No. 169 Donghu Road, 430071 Wuhan, China. ⁴Head and Neck Surgery and Dental Units, Oncologic Surgery Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 Avenue de Bourgogne, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Received: 14 October 2015 Accepted: 20 July 2016

Published online: 27 July 2016

References

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5–29.
- Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4550–9.
- Looser KG, Shah JP, Strong EW. The significance of "positive" margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg*. 1978;1(2):107–11.
- Spiro RH, Guillaumondegui Jr O, Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck*. 1999;21(5):408–13.
- O'Rorke MA, Ellisonb MV, Murray LJ, Moranc M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2012;48(12):1191–201.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):110–8.
- Schmidt H, Kulasinghe A, Perry C, Nelson C, Punyadeera C. A liquid biopsy for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(2):165–72.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213–21.
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(7):1420–30.
- Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwartz L, Larson S, Fleisher M, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):7053–8.
- Kulasinghe A, Perry C, Jovanovic L, Nelson C, Punyadeera C. Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. *Int J Cancer*. 2015;136(11):2515–23.
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471–4.
- Janssen Diagnostics L. CELLSSEARCH® Circulating Tumor Cell Epithelial Kit (IVD) IFU No. e631600001-V 2013-08. 2013.
- Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC, Basnaji J, Dhaliwal S, Chapeskie C, Todorovic B, Read N, Venkatesan V, Hammond A, et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the Cell Search system. *Head Neck*. 2012;34(10):1440–4.
- Bozec A, Ilie M, Dassonville O, Long E, Poissonnet G, Santini J, Chamorey E, Ettaiche M, Chauviere D, Peyrade F, et al. Significance of circulating tumor cell detection using the Cell Search system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(10):2745–9.
- Grobe A, Blessmann M, Hanken H, Friedrich RE, Schon G, Wikner J, Effenberger KE, Kluwe L, Heiland M, Pantel K, et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):425–33.
- Grisanti S, Almici C, Consoli F, Buglione M, Verardi R, Bolzoni-Villaret A, Bianchetti A, Ciccarese C, Mangoni M, Ferrari L, et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One*. 2014;9(8):e103918.
- Buglione M, Grisanti S, Almici C, Mangoni M, Polli C, Consoli F, Verardi R, Costa L, Paiar F, Pasinetti N, et al. Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer*. 2012;48(16):3019–26.
- Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5701–10.
- Moreno JG, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Fritsche H, Gomella LG, Terstappen LW. Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology*. 2001;58(3):386–92.
- Negin BP, Cohen SJ. Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Curr Treat Options Oncol*. 2010;11(1–2):1–13.
- Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, Kumagai K, Irino T, Yoshikawa T, Matsuda S, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(11):3092–100.
- Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(11):824–32.

24. Nakazaki K, Kato Y, Taguchi T, Inayama Y, Ishiguro Y, Kondo N, Horiuchi C, Sakakibara A, Tsukuda M. Heterozygous mutation (G/G → G/A) at nt 2607 of the EGFR gene is closely associated with increases in EGFR copy number and mRNA half life, but impaired EGFR protein synthesis in squamous cell carcinomas of the head and neck—implication for gefitinib efficacy. *Oncol Lett.* 2010;1(6):1017–20.
25. Hama T, Yuza Y, Suda T, Saito Y, Norizoe C, Kato T, Moriyama H, Urashima M. Functional mutation analysis of EGFR family genes and corresponding lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2012;29(1):19–25.
26. van Dalum G, van der Stam GJ, Tibbe AG, Franken B, Mastboom WJ, Vermes I, de Groot MR, Terstappen LW. Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery. *Int J Oncol.* 2015;46(1):407–13.
27. Jatana KR, Balasubramanian P, Lang JC, Yang L, Jatana CA, White E, Agrawal A, Ozer E, Schuller DE, Teknos TN, et al. Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: initial results. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(12):1274–9.
28. Tinhofer I, Kanschak R, Stromberger C, Raguse JD, Dreyer JH, Johrens K, Keilholz U, Budach V. Detection of circulating tumor cells for prediction of recurrence after adjuvant chemoradiation in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol.* 2014;25(10):2042–7.
29. Galizia G, Gemei M, Orditura M, Romano C, Zamboli A, Castellano P, Mabilia A, Auricchio A, De Vita F, Del Vecchio L, et al. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(10):1809–18.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Contents lists available at ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan

CellSearch[®] technology applied to the detection and quantification of tumor cells in CSF of patients with lung cancer leptomeningeal metastasis

Qian Tu^a, Xianglei Wu^a, Emilie Le Rhun^b, Marie Blonski^c, Basile Wittwer^c,
Luc Taillandier^c, Marcelo De Carvalho Bittencourt^a, Gilbert C. Faure^{a,*}

^a Laboratory of Immunology, Nancytomique, Pôle laboratoires, CHU Nancy, CRAN UMR CNRS 7039, Avenue du Morvan, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b Oscar Lambret Center, Centre de Lutte Contre le Cancer (CLCC) de Lille, 3 Rue Frédéric Combemale BP 307, 59020 Lille Cedex, France

^c Department of Neurology, Center Hospital, CHU Nancy, 54000, Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2015

Received in revised form 15 July 2015

Accepted 10 September 2015

Keywords:

CellSearch[®]

Tumor cell

Lung cancer

Leptomeningeal metastasis

ABSTRACT

Objectives: The diagnosis of solid cancer leptomeningeal metastasis (LM) relies on the cytology of cerebrospinal fluid (CSF) and/or imaging evidence of neuraxis, yet both lack sufficient sensitivity. The utility of the CellSearch[®], an FDA-approved technology, in assessing CSF tumor cell (CSFTC) was evaluated here in the diagnosis and treatment of patients with lung cancer-related LM.

Materials and methods: In 18 patients with magnetic resonance imaging (MRI) confirmed LM due to lung cancer, 5 mL of CSF were collected in CellSave[®] preservative tubes, which allow performing the assay within 96 h after sampling. Using a previously adapted CellSearch[®] method, we detected, visualized and enumerated CSFTCs and compared the results with conventional cytology. In 3 patients, tumor cells were evaluated sequentially to explore the predictive role of CSFTCs enumeration in the treatment response monitoring.

Results: CSFTCs were disclosed in 14 of 18 MRI confirmed LM samples (median 785CSFTCs/5 mL CSF, range 1 to >20,000), yielding a sensitivity of 77.8%, compared with 44.4% for conventional cytology. CSFTC clusters were observed in 12 patients, similar to those previously described in blood as circulating tumor microemboli (CTM), and enumerated sequentially with reproducible results, which did not necessarily correlate with response to treatment.

Conclusion: The CellSearch[®] technology, applied to limited sample volumes and allowing delayed processing, could be of great interest in the diagnosis of LM in lung cancer patients.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leptomeningeal metastasis (LM) is a devastating metastatic complication of solid cancers with a dismal prognosis and high mortality rate [1]. During the past few decades, the incidence of LM appears to have increased through the improvement of imaging studies and of the better life expectancy of cancer patients receiving more effective treatments [2–6]. Lung cancer (LC) is responsible for

10–26% of LM [3,7], with an estimated incidence of 1% in non-small cell lung cancer (NSCLC) and of 10–25% in small cell lung cancer (SCLC) [7].

The diagnosis of LM, according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines [8], can be assessed by the identification of malignant cells in the cerebrospinal fluid (CSF) or by the association of characteristic signs and symptoms and typical magnetic resonance imaging (MRI) findings. However, it can be difficult to confirm a diagnosis of LM, as clinical features can be subtle and may be heterogeneous. The use of specific methodologies, which are not applied in the usual follow-up of solid tumour patients, namely brain and spinal gadolinium enhanced MRI and CSF cytological analyses, is implied in the diagnosis of LM. In fact, CSF cytology remains the gold standard for LM diagnosis with a high specificity (about 95%) but a low sensitivity (55% at the first lumbar

Abbreviations: LM, leptomeningeal metastasis; CSFTC, CSF tumor cell; CTC, circulating tumor cell; CTM, circulating tumor microemboli; LC, lung cancer; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; DAPI, 4'-diamidino-2-phenylindole; CK, cytokeratin.

* Corresponding author. Fax: +33 3 83 15 76 60.

E-mail address: g.faure@chu-nancy.fr (G.C. Faure).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.09.008>

10169-5002/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.



Fig. 1. Sagittal T1 postgadolinium image of the spine showing typical enhancing subarachnoid nodules considered in this study as unequivocal for the diagnosis of leptomeningeal metastasis (LM).

puncture) [3,7]. Several CSF samples may also be required to finally identify malignant cells. In a retrospective study [9], a large series of patients with LM were evaluated, and it was found that MRI led to the diagnosis of LM in 53% of patients while CSF cytology provided the diagnosis in 23%. As a consequence, more sensitive and precise techniques, preferably employing a robust approach, are needed in order to improve LM diagnosis.

The CellSearch[®] method provides a semi-automated cell analysis, based on the assessment of nuclear and surface markers, which has greatly improved the sensitivity, reliability, objectivity and accuracy of circulating tumor cell (CTC) detection and enumeration in peripheral blood [10]. With a high sensitivity (detection as low as one CTC in 7.5 mL of blood [11]), this method has been validated by the FDA for the clinical prognostic evaluation of breast, prostate and colorectal cancers [11–15]. Several studies have also demonstrated its potential interest in LC [16]. In recent studies, the CellSearch[®] has been shown to be performing well in the detection of malignant cells not only in blood samples, but also in fluid samples including CSF, hydrothorax or ascites, allowing for a precise enumeration of malignant cells whatever the cellularity of biological fluid samples [17–20]. In previous studies by our group [21,22], we described an easy and innovative adaptation of CellSearch[®], applied to the detection of malignant cells in the CSF of breast cancer patients with LM (CSF tumor cells, CSFTCs) [21] as well as of melanoma cells in the CSF of melanoma patients with LM (CSF melanoma cells, CSFMCs) [22].

In this report, we have continued these pilot studies to validate the feasibility of the CellSearch[®] technology for the diagnosis of LM in the context of LC. We have also explored the predictive role of CSFTCs in monitoring the response to treatment.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Ruled out the inflammatory or infectious condition, patients with MRI confirmed LC-related LM were enrolled between July 2012 and February 2014 from the Neurology Departments of Nancy University Hospital and Lille Oscar Lambret Center. All patients benefited from lumbar puncture after total spine and brain MRI evaluation. Unequivocal MRI findings were defined as leptomeningeal enhancement with subarachnoid nodules, enhancement in basal cisterns or enhancement/clumping of nerve roots. The CellSearch[®] technology was applied to the detection and quantification of CSFTCs in CSF samples (recommended volume: 5 mL) tested in parallel with CSF standard cytological analysis for visual cytomorphological examination of tumor cells. Conventional cytology was done on standard sampling tubes transported as quickly as possible to the Pathology Lab. Samples were cytocentrifuged (Cytospin4, Thermo Shandon, Thermo Life Sciences, Cergy Pontoise, France), stained (May Grunwald Giemsa) and examined (Olympus BX-60, Rungis, France) by cytologists. Standard CSF biochemical analyses were also recorded. Additionally, sequential CSF samples were obtained after diagnosis from 3 patients who agreed to CSF sampling during their intrathecal treatment and 1 patient had a concomitant blood sample for CTC detection. Conventional cytology of CSF was performed without knowledge of the results of CSFTC analysis and vice versa. The neuro-oncologist providing treatment and evaluating the patients was blinded to the CSFTC analysis.

All included patients provided written informed consent for an analysis of CSFTCs with the CellSearch[®] technology.

2.2. Identification of CSFTCs

The CellSearch CTC kit[®] (Veridex LLC, Raritan, NJ) was used to enumerate tumor cells of epithelial origin firstly by an immunomagnetic enrichment of cells expressing EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), followed by nuclear staining with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), and immunofluorescence detection of cytoplasmic cytokeratins (CK) 8, 18, and/or 19. Membrane CD45 staining was also performed for the detection of contaminating leukocytes. Samples were collected in CellSave[®] preservative-containing tubes which could be stored for up to 96 h at room temperature before processing. When the volume of the samples was less than 5 mL, PBS was used to top the CSF to 5 mL. The standard method of CellSearch[®] was used to detect CTCs in blood samples, and we applied our previously described method for the detection of CSFTCs [20,21]. Briefly, the CellSearch[®] technology requires red blood-colored specimens. Therefore, to allow for the analysis of a clear fluid sample such as the CSF, the outside of the tube was simply darkened with a black felt-tip up to the fluid level to mimic the level of sedimented erythrocytes. After deposition of 5 mL of CSF, 5 mL of dilution buffer were added, and the mixture was homogenized and centrifuged. The "lured-tube" was then placed into the preparation station of CellSearch[®] and submitted to automated preparation as for blood samples, up to the generation of image galleries of suspect cells for technical validation. Results were reported as numbers of CSFTCs/5 mL CSF. CSFTCs detection was considered positive if at least one CK⁺/DAPI⁺/CD45⁻ cell was identified in the processed sample.

3. Results

This pilot study included 18 LC patients with a MRI-confirmed diagnosis of LM (Fig. 1). Patients' clinical characteristics at the time

of enrolment are described in Table 1. The main histological subtype of LC was NSCLC, with 13 (72.2%) adenocarcinoma. Eight patients (44.4%) had concomitant parenchymal brain metastases.

LM diagnosis was assessed in all patients with both total spine and brain MRI and standard CSF cytology (Table 1). The MRI demonstrated unequivocal images of LM in all the 18 patients (100%). CSF samples volumes varied between 0.5 and 5.0 mL for standard cytomorphological analysis, with a median volume 2.0 mL and tumor cells were detected but not enumerated in 8 patients (44.4%). CSF from these patients contained 0.24 to 3.43 g/L protein and 0.15 to 0.86 g/L glucose.

CSF samples volumes for the detection of CSFTCs varied between 2.6 mL and 5.0 mL (median volume: 4.1 mL). Concomitant CSF analysis with the CellSearch® technology revealed CSFTCs in 14 patients (77.8%) including 6/10 with negative conventional cytology. Meanwhile, CSFTCs were not detected in five LC patients with brain metastases but without LM (data not shown). Table 1 summarizes the quantitative results of CSFTCs enumeration using the CellSearch® technology. The median number of CSFTCs was 785 CSFTCs/5 mL CSF (range 1 to >20 000). The sensitivity of conventional cytology on the first lumbar puncture was 44.4%, (95% confidence interval [CI]: 21.5–69.2%), while that of the CellSearch® technology from the same CSF puncture was 77.8% (95% CI: 52.4–93.6%). The specificity of CellSearch® technology was 100% (95% CI: 47.8–100%).

Fig. 2A shows representative epithelial tumour cells detected by the CellSearch® technology in a CSF sample. These cells have features similar to those reported for peripheral epithelial tumour cells described as CTCs in LC patients. They are round or oval in shape, with a moderate cytoplasm and a round nucleus. Fig. 2B shows peripheral CTCs from the same patient. Comparison of tumor cells in CSF and peripheral blood from this patient showed that CSFTC was larger, well-stacked, with a stronger fluorescence than CTC. Furthermore, CSFTCs presented as either individual cells in 2 of 14 CSFTC positive patients, or associated with aggregates of tumor cells similar to those described in blood from cancer patients as circulating tumor microemboli (CTM) in 12 patients.

CSFTCs were not detected in 4 LM patients for whom conventional cytology was also negative. Histologically, they were two adenocarcinomas, one large cell neuroendocrine carcinoma, and one small-cell carcinoma.

Among the three patients who benefited from sequential CSF sampling, as mentioned above, during LM treatment (Fig. 3A), two were studied twice and both exhibited a significant decline in the number of CSFTCs following initiation of intrathecal or systemic therapy (respectively from 20 000 to 10 000 CSFTCs/5 mL CSF, and from 600 to 163 CSFTCs/5 mL CSF). The third patient was studied three times, and has decreasing numbers of tumor cells, from 7000 to 683 CSFTCs/5 mL CSF. Fig. 3B shows three results from this patient at different times (before and after the first and second cycles of systemic treatment). Not only the numbers of CSFTCs had decreased, but also the proportions of isolated CSFTCs and aggregated CSFTCs changed after intrathecal treatment. Disappointedly, the decreasing numbers of CSFTCs did not correlate with a favourable treatment response for these patients who showed clinical evidence of worsening.

4. Discussion

In this study, CSF samples from 18 LC patients with MRI-confirmed LM were analysed using the immunomagnetic platform-based CellSearch® technology. The detection of CSFTCs was confirmed to be a robust diagnostic tool in this condition, confirming the diagnosis of LM in 14/18 cases and outperforming the standard diagnostic tool of conventional CSF cytology analysis.

There is an increasing interest in the direct identification of CTCs in peripheral blood as a potential robust marker in cancer diagnosis, prognosis and treatment. Several methods have been reported [23,24], including the FDA-approved CellSearch® technology [11–15], and they should be investigated in the detection of CSFTCs.

The CellSearch® technology vastly improves the sensitivity, reliability, objectivity and accuracy of CTC detection in peripheral blood compared to cytomorphology [14], and has recently allowed a precise enumeration of malignant cells in either rich or paucicellular biological fluid samples [17–20]. Patel et al. [17], by spiking normal blood with CSF, have shown that the CellSearch® technology could be used for the detection of malignant cells in the CSF of breast cancer patients with central nervous system metastases. In this small pilot study of five patients, the number of CSF tumor cells correlated with the tumor response to chemotherapy and was dynamically associated with disease burden while changes in CSF cytology did not necessarily correlate with response. How-

Table 1
CSF characteristics and MRI findings at the time of diagnosis in patients with lung cancer.

Patient no.	Histologic type of cancer	CSF results on first lumbar puncture			MRI findings	Brain metastasis	CSF volume for CellSearch® (mL)	CSFTCs on lumbar puncture (CSFTCs/5 mL)
		Glucose, g/L	Protein, g/L	Cytology				
1	Adenocarcinoma	0.54	1.44	–	+	+	5.0	203
2	Adenocarcinoma	0.42	3.31	+	+	–	3.9	855
3	Adenocarcinoma	0.51	0.24	–	+	+	4.2	1500
4	Adenocarcinoma	0.26	3.43	+	+	+	4.0	500
5	Adenocarcinoma	0.15	3.12	–	+	+	5.0	95
6	Adenocarcinoma	0.71	0.38	–	+	–	5.0	0
7 ^a	Adenocarcinoma	0.23	1.36	+	+	–	5.0	7000
8	Adenocarcinoma	0.86	0.30	–	+	–	5.0	0
9	Adenocarcinoma	0.58	1.31	+	+	+	5.0	3000
10	Adenocarcinoma	0.55	0.86	+	+	–	4.5	715
11 ^a	Adenocarcinoma	0.32	3.00	+	+	+	3.0	20000
12 ^a	Adenocarcinoma	0.45	1.38	+	+	–	3.0	600
13	Adenocarcinoma	0.57	0.89	–	+	–	4.0	380
14	Epidermoid	0.45	1.21	+	+	–	5.0	3200
15	Large cell neuroendocrine carcinoma	0.63	0.59	–	+	+	2.6	0
16	Small cell carcinoma	0.79	0.47	–	+	–	4.0	1
17	Small cell carcinoma	0.55	1.6	–	+	+	2.8	0
18	Unkown	0.27	0.83	–	+	–	4.0	1500

Abbreviations: LM: leptomeningeal metastasis; CSF: cerebrospinal fluid; CSFTC: CSF Tumor Cell.^a patients with sequential CSF samples after treatment.

ever, this spiking method requires blood samples from “healthy donors”, which renders this approach more difficult to standardize and therefore less suitable for a routine setting. Nayak et al. [18] have evaluated the utility of the CellSearch® technology in the diagnosis of LM from 51 solid tumors patients, including LC, through the identification of CSFTCs. In this study, CSF samples were analyzed using the “control” mode of the CellSearch® instrument. The “control” mode is customarily designed as quality control for this technology, using a specific breast cancer cell suspension with known quantity. Under this mode, CSF can be treated as a cell suspension with a definitive volume of 3.5 mL. Ultimately 15 patients fulfilled LM criteria, and 16 presented with CSFTCs, achieving a sensitivity of 100% as compared to 66.7% for conventional cytology and 73.3% for MRI. The detection of CSFTCs was confirmed as a robust diagnostic tool in a wide range of epithelial tumor types, including lung cancer [18].

Here, we focused on LM-confirmed LC patients with or without brain metastases, using a newly, easy, adapted CellSearch® method.

Besides a high specificity (100%), we confirmed a better sensitivity of the CellSearch® technology (77.8%) compared to conventional cytology which fared poorly in this setting (44.4%). Several points could explain this superiority. First, in conventional cytology, the tumor cells can die more easily after sampling while we used CellSave® tubes, which contain an appropriate preservative, authorizing a 4-days delay in sample processing with retained cellular features. With CellSave® tubes, samples handling is easier, allowing for multicentre studies with a centralized analysis. Secondly, inadequate volume is an intuitively obvious cause of false-negative CSF cytology, and many recommendations plead for the use of larger volumes for cytology. Theoretically, obtaining 10.5 mL or more of sample is an effective means to increase the sensitivity of conventional cytology [25]. In our study, the median volume of CSF for CellSearch® detection was larger than that for conventional cytology, which could be a possible reason for the higher sensitivity of CellSearch®. Thirdly, this technology has been validated because of its improved sensitivity, reliability, objectivity and accu-

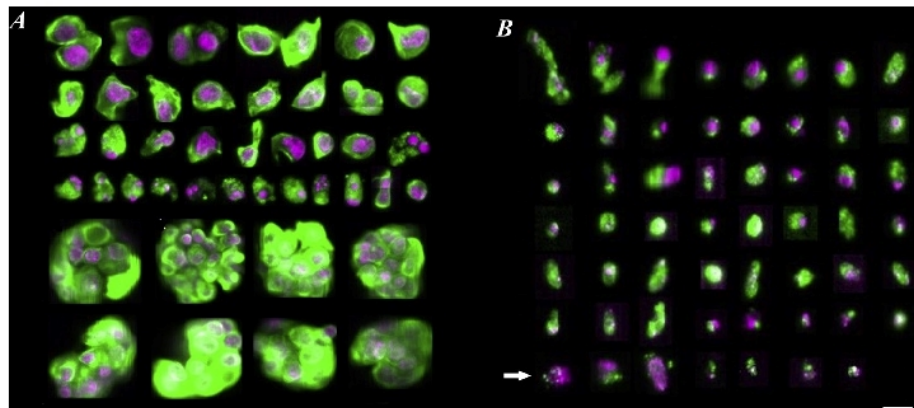


Fig. 2. Gallery of images of tumor cells in CSF (A) and peripheral blood (B) detected by CellSearch® technology. By definition, CTCs are nucleated (purple), express cytokeratin (green), and lack CD45 expression. In the CSF sample, CSFTCs were either isolated or in clusters and their morphology was similar to that of CTCs in the peripheral blood without morphologically apoptotic features, which were present in some of the CTCs in blood sample (arrow, shrunken cell containing CK inclusion). Scale bar 10 μm. CSF: cerebrospinal fluid, CTC: circulating tumor cell, CSFTC: CSF tumor cell, CK: cytokeratin (For interpretation of the references to colour/color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

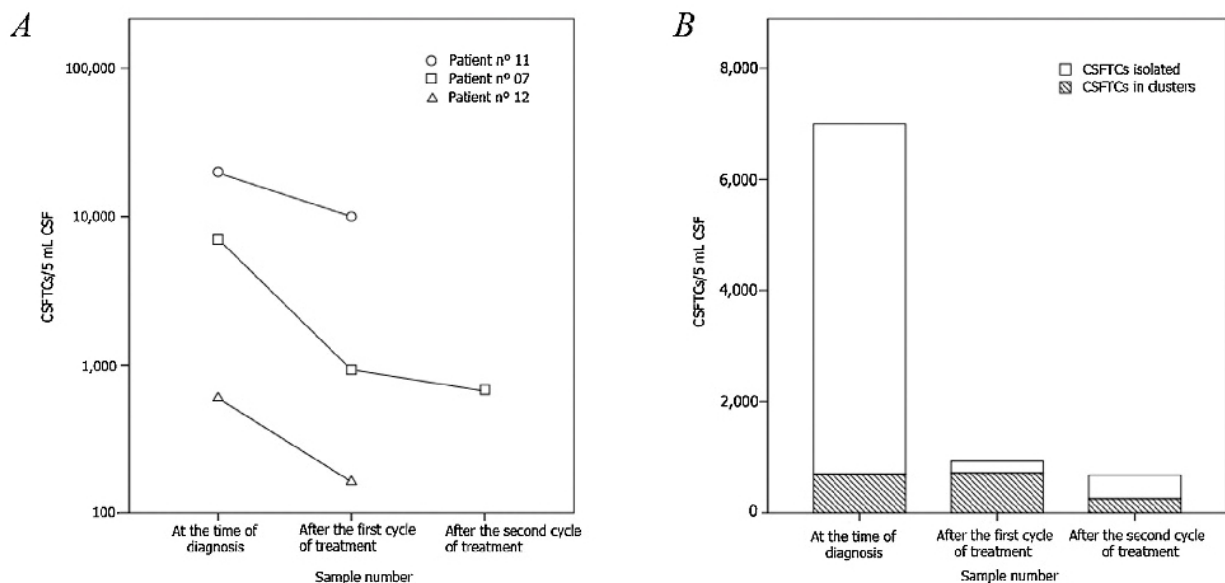


Fig. 3. Sequential CSFTCs detections in LM from LC patients. (A) Individual numbers of CSFTCs detected using the CellSearch® technology from 3 patients during follow-up. (B) Change of the numbers of total CSFTCs and aggregated CSFTCs in one patient. CSFTC: CSF tumor cell, LM: leptomeningeal metastasis, LC: lung cancer.

racy in CTC detection [10]. It depends on the magnetic selection with anti-EpCAM coated nanoparticles which could enrich EpCAM⁺ tumor cells with a high sensitivity. Among the different antigens expressed by epithelial tumor cells, EpCAM plays a central role in helping identify the underlying tumor and EpCAM expression in malignant effusions depicts the situation in the corresponding primary carcinoma [26]. EpCAM expression has been shown to be present in CSF tumor cells. Fourthly, with a semi-automatic method and a standard criterion (CK⁺ DAPI⁺ CD45⁻), interpretation of the CellSearch[®] technology results is more objective and much easier than conventional cytology which was highly dependent on experienced operators and cytologists. Additionally, with conventional cytology there is no quantification or characterization of tumor cells and clinicians must make judgments on the binary presence or absence of malignant cells as determined by cytology. In our adapted CellSearch[®] technology, the results were not only qualitative, but also quantitative and also recorded for possible revision at any time. Finally and most importantly, the presence of an additional free channel for other reagents in the CellSearch[®] also makes it possible to potentially investigate for other relevant markers expressed by CSFTCs. After enrichment by CellSearch[®], the possibility of performing analyses of CSFTCs, through genotyping or molecular characterization methods could open new insights for LM patients by tailoring therapeutic strategies and monitoring treatment efficacy. Recent studies have demonstrated great potential for using circulating cell-free DNA (cfDNA) in blood for cancer diagnosis, prognosis, and directed treatment [27]. In a recent study, Pan et al. [28] have demonstrated that tumor mutations were detectable in the CSF of patients with different types of brain tumors by using high-throughput sequencing-based methods. The development of such genotyping methods could be complement of CellSearch[®], the latter however providing results more rapidly.

In this study, CSF samples from LC patients with brain metastases but without LM who were included as negative control, displayed no CSFTCs, and there was no difference for CSFTC detection whether metastases were present or not.

CTMs are present in the blood of cancer patients, but their contribution to metastasis is not well defined. In some studies [29,30], peripheral CTMs are recognized as a “signature” of malignant metastases. In a recent study [31], using mouse models with tagged mammary tumors, it was demonstrated that CTMs arise from oligoclonal tumor cell groupings and not from intravascular aggregation events. Although rare in the circulation compared with single CTCs, CTMs have 23- to 50- fold increased metastatic potential. Here, in most of the patients, CSFTCs were presented as clusters, but the significance of this feature needs further research to be confirmed.

Moving forward, we evaluated the dynamical change of CSFTC counts with treatment response of three patients and found that a sequential quantitative monitoring of therapy can be obtained from CSF of LM, using the CellSearch[®] technology. Although decreased numbers of CSFTCs in consecutive samples can be observed, they were not necessarily correlated with clinical treatment response. However, it must be noted that LM is usually a terminal stage of cancer and that despite vigorous therapy, many patients do poorly and the median survival is only about several months. In this context, decreased numbers of CSFTCs could probably indicate the efficacy of the treatment, but their obvious presence in the CSF can always be a negative prognostic marker in these patients.

The limitation of study is its small number of studied patients, so the findings require validation. Also, we only enrolled LM patients with positive MRI. All patients with strong suspicion of LM, whatever the MRI result, should be included to fully evaluate the sensitivity of CellSearch. In addition, the therapeutic strategy here was still based on the binary result of conventional cytology. In the future, a stratification based on the quantitative results from

CellSearch[®] should be used to help in the management of LM patients. Finally, from this pilot study, we might observe false-negative results for CellSearch[®] which may be related to the low expression of EpCAM in lung cancer. This is the most important reason which hampers the validation of CellSearch[®] for the detection of CTCs in lung cancer after breast cancer, prostate cancer and colorectal cancer.

5. Conclusion

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study focused on detecting and enumerating CSFTCs from LM patients with LC, according to an adapted CellSearch[®] technology. This method is relatively simple, examiner-independent, with a high sensitivity, specificity and reproducibility. The preliminary evidence from our data suggests that this direct detection and quantification of CSFTCs using the CellSearch[®] technology may be a promising procedure for diagnosis, and therapy-monitoring of LM in LC patients. Further studies are needed to validate the detection of CSFTCs in large cohorts, to explore their use as a diagnostic and prognostic marker in the management of LM.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

Q.T. is supported by the China Scholarship Council. Nancy-tomique has been funded by French Ministry of Research, Ligue Contre le Cancer, CHU Nancy and the European Regional Development Fund (FEDER). The cancer projects were supported by Regional Lorraine Cancer research projects. Authors are grateful to Marie C Béné who helped revising the manuscript.

References

- [1] S. Taillibert, F. Laigle-Donadey, C. Chodkiewicz, M. Sanson, K. Hoang-Xuan, J.Y. Delattre, Leptomeningeal metastases from solid malignancy: a review, *J. Neuro-Oncol.* 75 (2005) 85–99.
- [2] M.C. Chamberlain, M. Glantz, M.D. Groves, W.H. Wilson, Diagnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease, identifying patient risk, and determining benefit of treatment, *Semin. Oncol.* 36 (2009) S35–S45.
- [3] J.C. Bendell, S.M. Domchek, H.J. Burstein, L. Harris, J. Younger, I. Kuter, et al., Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma, *Cancer* 97 (2003) 2972–2977.
- [4] R.J. Freilich, A.D. Seidman, L.M. De Angelis, Central nervous system progression of metastatic breast cancer in patients treated with paclitaxel, *Cancer* 76 (1995) 232–236.
- [5] S.T. Rosen, J. Aisner, R.W. Makuch, M.J. Matthews, D.C. Ihde, M. Whitacre, et al., Carcinomatous leptomeningitis in small cell lung cancer: a clinicopathologic review of the National Cancer Institute experience, *Medicine (Baltimore)* 61 (1982) 45–53.
- [6] R.S. Aroney, D.N. Dalley, W.K. Chan, D.R. Bell, J.A. Levi, Meningeal carcinomatosis in small cell carcinoma of the lung, *Am. J. Med.* 71 (1981) 26–32.
- [7] E. Le Rhun, S. Taillibert, M.C. Chamberlain, Carcinomatous meningitis: leptomeningeal metastases in solid tumors, *Surg. Neurol. Int.* 4 (2013) S265–S288.
- [8] S.S. Brem, P.J. Bierman, H. Brem, N. Butowski, M.C. Chamberlain, E.A. Chiocca, et al., National comprehensive cancer N: central nervous system cancers, *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 9 (2011) 352–400.
- [9] J.L. Clarke, H.R. Perez, L.M. Jacks, K.S. Panageas, L.M. Deangelis, Leptomeningeal metastases in the MRI era, *Neurology* 74 (2010) 1449–1454.
- [10] M. Cristofanilli, Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, *Semin. Oncol.* 33 (2006) S9–S14.
- [11] W.J. Allard, J. Matera, M.C. Miller, M. Repollet, M.C. Connelly, C. Rao, et al., Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases, *Clin. Cancer Res.: Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10 (2004) 6897–6904.
- [12] M. Cristofanilli, G.T. Budd, M.J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M.C. Miller, et al., Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 781–791.

- [13] S.J. Cohen, C.J. Punt, N. Iannotti, B.H. Saidman, K.D. Sabbath, N.Y. Gabrail, et al., Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.: Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26 (2008) 3213–3221.
- [14] J.S. de Bono, H.I. Scher, R.B. Montgomery, C. Parker, M.C. Miller, H. Tissing, et al., Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer, *Clin. Cancer Res.: Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14 (2008) 6302–6309.
- [15] H.I. Scher, X. Jia, B. de, J.S. DeBono, M. Fleisher, K.J. Pienta, D. Raghavan, et al., Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data, *Lancet Oncol.* 10 (2009) 233–239.
- [16] J.D. O'Flaherty, S. Gray, D. Richard, D. Fennell, J.J. O'Leary, F.H. Blackhall, et al., Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer, *Lung Cancer* 76 (2012) 19–25.
- [17] A.S. Patel, J.E. Allen, D.T. Dicker, K.L. Peters, J.M. Sheehan, M.J. Glantz, et al., Identification and enumeration of circulating tumor cells in the cerebrospinal fluid of breast cancer patients with central nervous system metastases, *Oncotarget* 2 (2011) 752–760.
- [18] L. Nayak, M. Fleisher, R. Gonzalez-Espinoza, O. Lin, K. Panageas, A. Reiner, et al., Rare cell capture technology for the diagnosis of leptomeningeal metastasis in solid tumors, *Neurology* 80 (2013) 1598–1605, discussion 603.
- [19] L. Schwed, D.E. ustgarten, J. Thompson, G. Yu, A. Vachani, B. Vaidya, C. Rao, et al., Use of circulating tumor cell technology (CELLSEARCH) for the diagnosis of malignant pleural effusions, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 10 (2013) 582–589.
- [20] Q. Tu, M. De Carvalho Bittencourt, H. Cai, C. Bastien, C. Lemarie-Delaunay, M.C. Bene, et al., Detection and quantification of tumor cells in peripheral blood and ascitic fluid from a metastatic esophageal cancer patient using the CellSearch technology, *F1000Res.* 3 (2014) 12.
- [21] E. Le Rhun, F. Massin, Q. Tu, F. Massin, J. Bonnetterre, C. Bittencourt Mde, G.C. Faure, Development of a new method for identification and quantification in cerebrospinal fluid of malignant cells from breast carcinoma leptomeningeal metastasis, *BMC Clin. Pathol.* 12 (2012) 21.
- [22] E. Le Rhun, Q. Tu, M. De Carvalho Bittencourt, I. Farre, L. Mortier, H. Cai, et al., Detection and quantification of CSF malignant cells by the CellSearch technology in patients with melanoma leptomeningeal metastasis, *Med. Oncol.* 30 (2013) 538.
- [23] R. Harouaka, Z. Kang, S.Y. Zheng, L. Cao, Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications, *Pharmacol. Ther.* 141 (2014) 209–221.
- [24] V. Hofman, M. Ilie, E. Long, N. Guibert, E. Selva, K. Washetine, et al., Detection of circulating tumor cells from lung cancer patients in the era of targeted therapy: promises, drawbacks and pitfalls, *Curr. Mol. Med.* 14 (2014) 440–456.
- [25] M.J. Glantz, B.F. Cole, L.K. Glantz, J. Cobb, P. Mills, A. Lekos, et al., Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results, *Cancer* 82 (1998) 733–739.
- [26] C. Patriarca, R.M. Macchi, A.K. Marschner, H. Mellstedt, Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 68–75.
- [27] M. Murtaza, S.J. Dawson, D.W. Tsui, D. Gale, T. Forshew, A.M. Piskorz, et al., Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA, *Nature* 497 (2013) 108–112.
- [28] W. Pan, W. Gu, S. Nagpal, M.H. Gephart, S.R. Quake, Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid, *Clin. Chem.* 61 (2015) 514–522.
- [29] S.L. Stott, C.H. Hsu, D.I. Tsukrov, M. Yu, D.T. Miyamoto, B.A. Waltman, et al., Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 18392–18397.
- [30] J.M. Hou, M. Krebs, T. Ward, R. Sloane, L. Priest, A. Hughes, et al., Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer, *Am. J. Pathol.* 178 (2011) 989–996.
- [31] N. Aceto, A. Bardia, D.T. Miyamoto, M.C. Donaldson, B.S. Wittner, J.A. Spencer, et al., Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis, *Cell* 158 (2014) 1110–1122.

Résumé

Nous avons abordé dans l'ensemble de nos travaux deux paramètres importants pour l'immunomonitoring des patients atteints d'un cancer : les cellules tumorales circulantes (CTC) comme un indicateur de la « charge antigénique tumorale » et la réponse immune lymphocytaire T spécifique d'antigènes associés aux tumeurs (AAT).

Nous avons évalué d'abord la valeur diagnostique et pronostique des CTC dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (« HNSCC » en anglais) par une revue systématique et meta-analyse de la littérature. Les preuves actuelles identifient le test de détection de CTC comme un test extrêmement spécifique, mais de faible sensibilité dans les HNSCC. En outre, la présence de CTC indique une DFS (« disease free survival ») inférieure.

Nous rapportons également pour la première fois un cas rare d'énumération extrêmement élevée de CTC détectées par le système CellSearch® chez un patient présentant un carcinome épidermoïde de la cavité buccale en utilisant. Le nombre absolu de CTC pourrait donc prédire une phase particulière de développement du cancer ainsi qu'une mauvaise survie, contribuant potentiellement à une prise en charge médicale personnalisée.

De plus, nous décrivons une adaptation de la méthode CellSearch® qui nous avons développée pour détecter les cellules tumorales dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de méningites carcinomateuses. Cette nouvelle approche permet une sensibilité nettement améliorée en comparaison avec la cytologie conventionnelle. La technologie CellSearch®, appliquée à des volumes limités des échantillons et permettant une augmentation du temps pré-analytique, pourrait ainsi avoir un grand intérêt dans le diagnostic de métastases leptoméningées chez les patients atteints d'un cancer d'origine épithéliale.

Par une évaluation concomitante des CTC et des réponses lymphocytaires spécifiques aux AAT chez 24 patients avec HNSCC, nous avons trouvé que les CTC pourraient être un indicateur indépendant de la charge tumorale immunogène. L'absence de CTC, la présence de lymphocytes T spécifiques aux AAT, ou la combinaison de ceux-ci, étaient tous des paramètres montrant une tendance pour une meilleure survie globale ou une survie sans maladie. L'amplitude et les signatures fonctionnelles des lymphocytes T spécifiques aux AAT chez les patients atteints de HNSCC étaient associées à la présence de CTC.

Ces résultats suggèrent qu'une évaluation concomitante de ces deux paramètres pourrait être plus informative sur le pronostic et potentiellement sur l'impact des traitements (notamment dans la perspective d'un traitement par des « immune checkpoints »).

Mots clés : cellules tumorales circulantes, CellSearch®, métastases leptoméningées, réponses lymphocytaires anti-tumorales, antigènes associés aux tumeurs.

Abstract

We have evaluated herein two important parameters in the immunomonitoring of cancer patients: circulating tumor cells (CTC) as an indicator of “tumoral antigenic load” and tumor-associated antigens (TAA) specific T-cells.

We firstly evaluated the diagnostic and prognostic value of CTC in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) by a systematic review and meta-analysis. We came to the conclusion that current evidence identifies the CTC detection test as an extremely specific but low sensitive test in HNSCC. In addition, the presence of CTC indicates a worse disease-free disease (DFS).

Also, we report for the first time a rare case of extremely high enumeration of circulating tumor cells detected in a patient with squamous cell carcinoma of the oral cavity using the CellSearch® system. The absolute number of CTC could therefore predict a particular phase of cancer development as well as a poor survival, potentially contributing to personalized health.

In addition, we describe an adaptation of the CellSearch® method that we have developed for detecting tumor cells in the cerebrospinal fluid of patients with carcinomatous meningitis. This new approach reaches a significantly improved sensitivity compared to conventional cytology. CellSearch® technology, applied to limited sample volumes and allowing an increased pre-analytical time, may be of great interest in the diagnosis of leptomeningeal metastases in patients with epithelial cancer.

By a concomitant evaluation of CTC and TAA-specific lymphocyte responses in 24 HNSCC patients, we describe that CTC could be an independent indicator of immunogenic tumor burden. The absence of CTC, the presence of TAA-specific T-cells, or the combination of these, were all parameters showing a trend for a better overall survival or DFS. The amplitude and functional signatures of TAA-specific T-lymphocytes in patients with HNSCC were associated with the presence of CTC.

These results suggest that a concomitant evaluation of these two parameters may be more pertinent for prognosis assessment as well as for treatment impact, especially in “checkpoint-inhibitors” new immunotherapies.

Keywords: circulating tumor cells, CellSearch®, leptomeningeal metastases, anti-tumor lymphocytes responses, tumor-associated antigens.