



**HAL**  
open science

# Identification de biomarqueurs de sensibilité et de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules - Cas des remaniements ALK et ROS1

Emma Pailler

## ► To cite this version:

Emma Pailler. Identification de biomarqueurs de sensibilité et de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules - Cas des remaniements ALK et ROS1. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS410 . tel-02375325

**HAL Id: tel-02375325**

**<https://theses.hal.science/tel-02375325>**

Submitted on 22 Nov 2019

**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.

NNT : 2016SACLS410

THÈSE DE DOCTORAT

DE  
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY  
PRÉPARÉE À

**GUSTAVE ROUSSY**

ÉCOLE DOCTORALE N°582  
Cancérologie : biologie – médecine – santé

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
Sciences de la vie et de la santé

par

**Emma Pailier**

Identification de biomarqueurs de sensibilité et de résistance aux  
inhibiteurs de tyrosine kinase dans les cellules tumorales circulantes de  
patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules  
*Cas des remaniements ALK et ROS1*

Sous la direction du **Docteur Françoise Farace**

Thèse présentée et soutenue publiquement à Villejuif, le lundi 21 novembre 2016 à 14h30.

**Devant un jury composé de :**

Professeur Jean-Charles Soria  
Docteur Catherine Alix-Panabières  
Professeur Jean-Yves Pierga  
Professeur Jean-Paul Thiery  
Professeur François Dautry  
Docteur Françoise Farace

Praticien Universitaire – Praticien Hospitalier, Gustave Roussy, Villejuif  
Maitre de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, LCCRH, Montpellier  
Praticien Universitaire – Praticien Hospitalier, Institut Curie, Paris  
Directeur de Recherche Émérite CNRS, Université VII Diderot, Paris  
Directeur de Recherche Émérite CNRS – Praticien Universitaire, ENS, Cachan  
Directrice d'Équipe, Ingénieur de Recherche Biologiste, Gustave Roussy, Villejuif

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de Thèse

Travaux réalisés au sein du groupe « Cellules Tumorales Circulantes », INSERM U981 « biomarqueurs prédictifs et nouvelles stratégies moléculaires en thérapies anticancéreuses » – CNRC UMS3655-INSERM US23 AMMICA, Gustave Roussy, Villejuif, France



*« Cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse. »*

*Nelson Mandela*





# Remerciements

La thèse ! La thèse ! La thèse ! Un rêve qui devient aujourd'hui une réalité...

Quatre années se sont écoulées...entre rires et larmes, joie et doutes, le doctorat est une véritable aventure dans une vie qui ressemble à un chemin tortueux semé d'embûches, plutôt qu'à un long fleuve tranquille. Mais le doctorat est également une véritable expérience humaine qui m'a permis de « grandir » au contact de nombreuses personnes que je souhaite remercier chaleureusement.

Tout naturellement, je commence mes remerciements par une attention particulière au Docteur Françoise Farace, ma Directrice de Thèse, qui a encadré ce travail avec attention et rigueur. Merci Françoise de m'avoir fait confiance en m'acceptant en tant que « petite M2 » puis doctorante dans votre équipe et de m'avoir fait grandir dans le monde de la recherche. Vous avez su être disponible au quotidien et m'apprendre ce qu'est être une « apprentie-chercheur ». Certes, cela n'aura pas été facile tous les jours mais j'ai beaucoup appris auprès de vous, tout autant scientifiquement en découvrant le monde des CTC que pour tout ce qui entoure la recherche et pour lequel j'étais pleine d'illusions. Et oui, la recherche ce n'est pas que des expériences mais c'est aussi des recherches de financements, des projets européens, des collaborations... Vous m'avez également donné la chance de découvrir les grands congrès internationaux et de me « lancer », après une longue préparation, dans une présentation orale que je redoutais tant. Je vous remercie également pour votre relecture très « pointilleuse » de ce manuscrit qui m'a sans aucun doute permis de préciser mes idées. La fin de cette thèse approche et mes « gloussements d'après 18h » aussi !

J'exprime mes sincères remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer cette thèse :

Monsieur le Professeur Jean-Charles Soria qui a accepté, malgré son emploi du temps très chargé, d'être Président du jury. Merci Monsieur pour votre soutien.

Madame le Docteur Catherine Alix-Panabières et Monsieur le Professeur Jean-Yves Pierga qui ont accepté la charge exigeante d'être Rapporteurs et de prendre le temps de considérer mon manuscrit de thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Paul Thiery et Monsieur le Professeur François Dautry qui ont eu la gentillesse d'accepter d'être Examineurs.

Cette aventure n'aurait pu être possible sans le soutien financier *via* mon allocation doctorale du LabEx LERMIT et la Fondation pour la Recherche Médicale.

Je tiens également à remercier les différents intervenants extérieurs ainsi que les plateformes avec qui j'ai travaillé tout au long de ces années et qui ont permis de concrétiser ce projet :

À Integragen et à Ipsen avec qui nous avons réalisé nos toutes premières manipulations sur « *single cell* ». Quelle aventure ! Merci tout particulièrement à Charles qui a su partager simplement toutes ses connaissances en biologie moléculaire. Merci à vous également Sylvia et Valérie pour toutes ces discussions constructives et fructueuses.

À Leica Biosystems avec qui nous avons développé pendant de longs mois l'analyse semi-automatisée des filtres et l'export pour la microdissection. Merci à vous Francis, Alexandre et Anne.

À la plateforme de cytométrie et en particulier à Philippe et Yann avec qui nous avons mis au point le tri des CTC. Merci pour votre disponibilité quelle que soit l'heure d'arrivée du prélèvement (et

ce, même le vendredi soir !!).

A la plateforme de bio-statistique et tout particulièrement au Docteur Isabelle Borget.

À la plateforme de bio-informatique et en particulier à Marc pour sa patience à apporter des réponses à mes nombreuses questions « naïves ».

À la plateforme de génomique.

Faire de la recherche translationnelle, c'est être à l'interface entre la clinique et la recherche. Il est donc indispensable de collaborer au quotidien avec des cliniciens. Je tiens à remercier les médecins du comité thoracique et notamment le Docteur Benjamin Besse, le Professeur Jean-Charles Soria et le Docteur David Planchard. Je remercie tout particulièrement le Docteur Jordi Remon-Masip pour son aide et sa disponibilité.

Mais la recherche translationnelle sur les CTC, c'est avant tout des prélèvements. Maud, qu'aurions-nous fait sans toi ? Merci d'être toujours « à fond » et de tout faire pour que le « circuit CTC » fonctionne. Ton départ pendant quelques mois nous a bien inquiétés mais c'était sans compter sur Claudio qui a pris la relève haut la main mais également Jaouad. Merci à vous ! Merci également à Guillaume pour sa patience lorsque plusieurs fois dans une même journée, je changeais les fiches pour les prélèvements.

Je ne peux terminer ce paragraphe sans avoir une pensée très particulière pour tous les patients qui ont accepté de participer à ces projets de recherche.

La vie d'une unité c'est aussi une gestion administrative et logistique complexe. Merci à Nathalie et Stéphanie. Je remercie également Amélie et Claudine sans qui la vie au labo ne se ferait pas. Merci pour votre aide au quotidien qui nous simplifie sans aucun doute beaucoup de choses avant qu'elles ne deviennent des tracas !!!

De manière plus générale, je remercie les membres de l'unité 981 ainsi que ceux des plateformes de recherche translationnelle HCP et BMO. Je remercie tout particulièrement Céline pour sa disponibilité lorsque plus d'une fois je suis allée l'« embêter » pour les analyses bio-informatiques, Frédéric pour son aide bio-statistique et sa gentillesse, Virginie pour son dynamisme et sa disponibilité lors des recherches de biopsies sur le fameux logiciel Diamic (qui me semble toujours très obscur), Mélanie pour sa bonne humeur et sur qui j'ai pu compter pour de « superbes » manips de NGS sur le PGM et Roman pour nos conversations et son soutien lors de ces dernières semaines (tu as encore toute la motivation d'un jeune deuxième année ! Courage « plus que » deux ans !).

Je souhaite également remercier le Docteur Philippe Vielh et le Docteur Nathalie Auger pour nos étroites collaborations qui m'ont été très instructives.

Merci aux membres d'hier et aujourd'hui de l'équipe « CTC ». Je tiens particulièrement à remercier Fanny, véritable « mémoire » de cette équipe qui nous a abandonné depuis peu pour les montagnes suisses. Merci d'avoir supporté mes innombrables questions et pour tes « coups de pouce » lors des *rushs*. Merci également à Anne-Laure qui, même si tu peux parfois être « chon-chon » comme tu le dis si bien, est une collègue très sympathique et qui va énormément me manquer. Merci aux derniers arrivants post-docs, Cyril (ne t'inquiète pas, je pars bientôt !) et Ataillah. Mais cette aventure n'aurait probablement pas été la même sans mes coéquipiers du bureau 160. Marianne, après m'avoir mise très mal à l'aise lors de mon premier repas à la cantine (souvenir souvenir), j'ai appris à te connaître. Tu as su me transmettre toutes tes connaissances techniques, notamment avec la FA-FISH, et nous avons vécu ensemble une sacrée aventure (et ce, même le WE et les jours fériés !). Merci pour ton soutien et

ton amitié pendant toutes ces années mais également pour ton aide au quotidien. Vincent, mon compagnon de route de thèse, cette aventure n'aurait probablement pas été la même sans ta présence au labo. Malgré nos « galères *single cell* », nous avons vécu de bons moments pendant nos (très) longues journées au labo. Merci pour ta patience, ta joie de vivre mais surtout pour cette façon tellement apaisante que tu as de voir la vie et de relativiser. Tu m'as énormément appris tant scientifiquement que personnellement et je t'en suis très reconnaissante. Cette aventure se termine, mais je ne vais pas vous « lâcher » comme ça !

Mais, faire une thèse a été synonyme de quitter la Charente vers l'horizon parisien. Malgré la distance et mon peu de disponibilité lors de mes passages éclairs à Ruffec-city, je tiens à remercier Marine (ma BF de toujours). Il est bien loin le temps où nous « barbotions » dans ta piscine en écoutant la musique à fond ! Je ne peux écrire ces remerciements sans mentionner les « Loulous » de Poitiers pour qui la science n'est pas un « monde » complètement obscur et qui ont su me comprendre, me soutenir et me témoigner de leur amitié malgré la distance pour certains. Merci Emeline (alias ma Mélinou), Charlotte (miss Talbot, la pin-up pour les intimes qui nous a abandonné pour les Pays-Bas), Clémence (Crouf, ma binôme de TP), Jessica (Jessic\*\*\*\*\* oups ! c'est censuré), Félix (le rat-taupe) et Gregory (Gregounet, quand est-ce qu'on passe boire un café ?). Maintenant que la fin approche, il faut absolument qu'on se retrouve pour un WE comme au bon vieux temps. Cette vie parisienne a été aussi l'occasion de faire de nouvelles et très belles rencontres. Je pense particulièrement à toi ma petite Lou. Merci pour ton soutien et pour nos (très) longues discussions lors de soirée pour décompresser après les longues journées au labo. Merci également à mes co-équipiers de voyages, Julien, Marie et Valérie. Merci à vous la famille Marin qui m'avez accueillie chez vous pour mon tout début de « carrière scientifique » à la base aérienne de Cognac : c'était en 3<sup>ème</sup> !!!

Pour réussir une thèse, le soutien de son entourage me paraît essentiel, plus exactement, c'est un véritable pilier.

Un immense merci rempli d'amour à ma Maman sans qui je ne serais pas ici aujourd'hui. Ton soutien inconditionnel m'a été très précieux pendant toutes ces années d'études. Certes, tu es sûrement la personne qui a le plus subi mes humeurs et mes « coups de stress » mais tu as toujours su être là, me reconforter, me remotiver mais aussi me dire ce qui n'allait pas quand c'était nécessaire. Je t'en serai éternellement reconnaissante. Merci pour tout Moun et pour ce que tu représentes pour moi !

Mémé & Pépé, vous comptez tellement pour moi. Merci d'être toujours à mes côtés et d'avoir cru en moi. Malgré la distance, votre soutien et votre amour me portent chaque jour.

Un grand merci à toute la famille Pailler mais également aux Domineau-Sabou, aux Stro et particulièrement à ma filleule Romane, à Nadine & Pierre, à Marianne : à tous j'adresse mon affection.

Merci à vous, ma belle-famille, pour vos encouragements, et tout particulièrement à vous Dany, Bruno, Etienne et les « grumeaux Lu et Lou » comme vous appelle si bien votre grand frère. C'est un réel plaisir de vous connaître et de partager les joies d'une famille (très) nombreuse.

Maxime, ce (très) long périple de la thèse nous l'avons vécu à deux. Entre les instants de joie et ceux plus difficiles, tu as su être présent et me soutenir. Il me paraît très compliqué de t'exprimer ici, et seulement en quelques mots, toute ma reconnaissance. Je vais donc simplement t'écrire un immense merci rempli d'amour pour tout ce que nous partageons et pour tout ce que tu représentes pour moi.

Place maintenant à une nouvelle aventure...



# Sommaire

<b>Liste des publications et communications</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>17</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>19</b>
<b>Préface &amp; Objectifs</b>	<b>24</b>
<b>Introduction</b>	<b>28</b>
<b>A. LE PROCESSUS MÉTASTATIQUE : UN MODÈLE DE SURVIE ET D'ADAPTATION</b>	<b>29</b>
1. Les étapes clés du processus métastatique	29
a. Détachement cellulaire et invasion	30
b. Intravasation et transit dans le flux sanguin	32
c. L'extravasation	32
2. La transition épithélio-mésenchymateuse : une étape essentielle pour la progression métastatique ?	33
3. La théorie du « <i>seed and soil</i> »	37
4. L'inefficacité métastatique	39
5. La dormance tumorale	40
6. Les cellules initiatrices de tumeur (ou cellules souches cancéreuses) et la niche pré-métastatique	41
<b>B. LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES</b>	<b>45</b>
1. Détection et caractérisation des cellules tumorales circulantes	45
a. Méthodes d'enrichissement...	46
...grâce aux propriétés biologiques des cellules tumorales circulantes	46
...grâce aux propriétés physiques des cellules tumorales circulantes	47
b. Détection et caractérisation des cellules tumorales circulantes	49
c. Analyses comparatives des approches basées sur des propriétés biologiques et sur les propriétés physiques des cellules tumorales circulantes : exemple du CellSearch versus ISET	52
2. Pertinence clinique des CTC	53
a. La valeur pronostique des CTC	53
b. Les CTC : une « biopsie liquide » en temps réel ?	55
3. Modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> développés à partir de cellules tumorales circulantes	56
REVUE 1. Circulating Tumor Cells in Lung Cancer	58
REVUE 2. Cellules Tumorales Circulantes : isolement, caractérisation et intérêt en clinique	58
REVUE 3. Clinical utility of circulating tumor cells in <i>ALK</i> -positive non-small-cell lung cancer	58
REVUE 4. The potential diagnostic power of circulating tumor cells for non-small-cell lung cancer	58
<b>C. LE CANCER DU POUMON NON À PETITES CELLULES : LES REMANIEMENTS DES GÈNES <i>ALK</i> ET <i>ROS1</i></b>	<b>103</b>
1. La fonction biologie du gène <i>ALK</i>	103
2. Les gènes de fusion <i>ALK</i>	103
3. Caractéristiques clinico-biologiques des patients	106
4. Les méthodes de diagnostic permettant l'identification de <i>ALK</i> oncogénique	106
5. La prise en charge thérapeutique des cancers bronchiques non à petites cellules <i>ALK</i> remanié	106
a. Le crizotinib : un inhibiteur de première génération	107
b. Les mécanismes de résistance au crizotinib	108
c. Le ceritinib, l'alectinib et le lorlatinib : exemples d'inhibiteurs de deuxième et troisième générations	109
6. Les remaniements du gène <i>ROS1</i>	112
7. Identification de biomarqueurs circulants dans l'ADN tumoral circulant <i>versus</i> les cellules tumorales circulantes dans les cancers bronchiques non à petites cellules	113
<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	<b>118</b>
<b>A. PRÉLÈVEMENTS SANGUINS POUR L'ÉTUDE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES CHEZ L'HOMME</b>	<b>119</b>
<b>B. LIGNÉES CELLULAIRES</b>	<b>120</b>
<b>C. MÉTHODES D'ENRICHISSEMENT EN CELLULES TUMORALES CIRCULANTES</b>	<b>121</b>
1. La technique de filtration ISET	121
2. La méthode de sélection positive CellSearch	121

3.	La technique de sélection négative RosetteSep _____	121
<b>D.</b>	<b>DÉTECTION ET CARACTÉRISATION DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES ENRICHIES PAR FILTRATION ISET _____</b>	<b>123</b>
1.	Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET _____	123
2.	Caractérisation cytomorphologique des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET _____	123
3.	Scan et analyse d'image après marquage par immunofluorescence et coloration cytologique _____	123
5.	Caractérisation par immunofluorescence et FA-FISH des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET _____	125
7.	Scan et analyse d'images après marquage par immunofluorescence et FA-FISH _____	126
<b>F.</b>	<b>DÉTECTION, ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE CELLULES TUMORALES CIRCULANTES UNIQUES _____</b>	<b>128</b>
1.	Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET et isolement de cellules uniques par microdissection laser _____	128
a.	Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes _____	128
b.	Scan et analyse d'image après marquage par immunofluorescence _____	129
c.	Relocalisation des cellules tumorales circulantes et microdissection laser _____	129
2.	Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par RosetteSep et isolement de cellules uniques par tri cellulaire _____	131
a.	Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes _____	131
b.	Isolement des cellules tumorales circulantes par tri cellulaire _____	131
3.	Détection de cellules tumorales circulantes épithéliales par CellSearch et isolement en cellules uniques par le <i>puncher</i> _____	134
<b>G.</b>	<b>ANALYSE MOLÉCULAIRE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES ISOLÉES _____</b>	<b>136</b>
1.	Amplification totale du génome _____	136
2.	Contrôles de qualité _____	138
3.	Conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin _____	139
4.	Purification des échantillons de WGA _____	139
5.	Dosage des échantillons de WGA _____	140
6.	Approches de PCR multiplexes ciblées et séquençage à haut débit de nouvelle génération _____	140
a.	Technologie Access Array _____	140
b.	Technologie Ion AmpliSeq _____	142
7.	Approche de séquençage de l'exome _____	144
8.	Analyses bio-informatiques _____	146
a.	Approches de PCR multiplexes ciblées et séquençage haut débit de nouvelle génération _____	146
b.	Approche de séquençage de l'exome _____	146
<b>H.</b>	<b>ANALYSES STATISTIQUES _____</b>	<b>147</b>
	<b>Résultats _____</b>	<b>148</b>
<b>A.</b>	<b>LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES : BIOMARQUEURS DE SENSIBILITÉ ? _____</b>	<b>149</b>
1.	Développement de la méthode de FISH sur filtres ISET (FA-FISH) _____ Brevet PCT/FR2011/052688. Méthode de caractérisation de cellules tumorales circulantes et application au diagnostic _____	150
2.	Mise au point de protocoles combinés pour la caractérisation des cellules tumorales circulantes et développement de méthodes de microscopie semi-automatisée _____ Article 1. Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells _____	151
3.	Détection du remaniement de gène <i>ALK</i> dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules _____ Article 2. Detection of Circulating Tumor Cells Harboring a Unique <i>ALK</i> Rearrangement in <i>ALK</i> -Positive Non-Small-Cell Lung Cancer _____	172
4.	Détection du remaniement de gène <i>ROS1</i> dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules _____ Article 3. High Level of Chromosomal Instability in Circulating Tumor Cells of <i>ROS1</i> -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer _____	200
<b>B.</b>	<b>LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES : BIOMARQUEURS PHARMACODYNAMIQUES ? _____</b>	<b>221</b>
1.	Évaluation des cellules tumorales circulantes en tant que biomarqueur pharmacodynamique chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules porteurs du remaniement <i>ALK</i> _____ Article 4. Circulating Tumor Cells with Aberrant <i>ALK</i> -Copy Number Predicts Progression-Free Survival to Crizotinib in _____	221

ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. _____	221
<b>C. LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES : BIOMARQUEURS DE RÉSISTANCE ? _____</b>	<b>261</b>
1. Approches de PCR multiplexes ciblées et séquençage à haut débit de nouvelle génération : détection des mutations connues de résistance _____	261
a. Isolement de cellules tumorales circulantes uniques par microdissection laser et recherche de mutations connues de résistance par la technologie Access Array _____	261
Mises au point de l'approche sur lignée cellulaire _____	261
Recherche dans des CTC de mutations connues de résistance _____	269
b. Isolement de cellules tumorales circulantes uniques par microdissection laser et recherche de mutations connues de résistance par la technologie Ion AmpliSeq _____	272
Mises au point de l'approche sur lignée cellulaire _____	272
Recherche dans des CTC de mutations connues de résistance _____	278
c. Isolement de cellules tumorales circulantes uniques ALK positive par microdissection laser et amplification totale du génome _____	278
Mises au point de l'approche sur lignée cellulaire _____	278
d. Isolement de CTC uniques ALK positives par tri cellulaire, amplification totale du génome _____	279
Mises au point et validation de l'approche sur lignée cellulaire _____	279
Recherche dans des CTC de mutations connues de résistance _____	280
2. Approche de séquençage de l'exome : recherche de nouvelles mutations de résistance _____	281
Validation sur lignées cellulaires _____	282
Recherche d'altérations génomiques de résistance dans des CTC _____	283
<b>Discussion &amp; Conclusion _____</b>	<b>284</b>
<b>Bibliographie _____</b>	<b>292</b>





# Liste des publications et communications

## Articles scientifiques

Pailler E, Adam J, Barthélémy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, Borget I, Planchard D, Taylor M, André F, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F. *Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer*. **J Clin Oncol**. 2013 Jun 20;31(18):2273-81.

Pailler E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I, Ngo-Camus M, Planchard D, Soria JC, Besse B and Farace F. *High Level of Chromosomal Instability in Circulating Tumor Cells of ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer*. **Ann Oncol**. 2015 Jul;26(7):1408-15.

Pailler E\*, Oulhen M\*, Billiot F, Galland A, Auger N, Faugeroux V, Laplace-Builhé C, Besse B, Lorient Y, Ngo Camus M, Hemanda M, Lindsay CR, Soria JC, Vielh P, Farace F. *Method for Semi-Automated Microscopy of Filtration-Enriched Circulating Tumor Cells*. **BMC Cancer**. 2016 Jul 14;16(1):477.

Pailler E, Oulhen M, Borget I, Remon J, Ross K, Auger N, Billiot B, Ngo Camus M, Commo F, Lindsay R. C, Planchard D, Soria JC, Besse B and Farace F. *Circulating Tumor Cells with Aberrant ALK-Copy Number Predicts Progression-Free Survival to Crizotinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients*. Soumis.

## Revue générale

Young R, Pailler E, Billiot F, Drusch F, Barthelemy A, Oulhen M, Besse B, Soria JC, Farace F, Vielh P. *Circulating tumor cells in lung cancer*. **Acta Cytol**. 2012;56(6):655-60.

Pailler E, Young R, Farace F. *Cellules tumorales circulantes : isolement, caractérisation et intérêt en clinique*. **Correspondance en Onco-Théranostic**. 2013 Oct.-Nov.-Déc. Vol. II n°4 p 162-167.

Faugeroux V, Pailler E, Auger N, Taylor M, Farace F. *Clinical utility of Circulating Tumor Cells in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. **Front Oncol**. 2014 Nov 5;4:281.

Ross K, Pailler E, Faugeroux V, Taylor M, Oulhen M, Auger N, Planchard D, Soria JC, Lindsay CR, Besse B, Vielh P and Farace F. *The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer*. **Expert Rev Mol Diagn**. 2015;15(12):1605-29.

### **Chapîtres de livres**

Catelain C, Pailler E\*, Oulhen M, Faugoux V, Pommier AL, Farace F. *Detection and Characterization of gene rearrangements in Circulating Tumor Cells*. **Adv Exp Med Biol**. In press.

Oulhen M\*, Pailler E\*, Faugoux V, Farace F. *Filter-Adaptated-Fluorescent In Situ Hybridization (FA-FISH) for Filtration-Enriched Circulating Tumor Cells*. **Methods Mol Biol**. In press.

### **Communications**

ACTC (1<sup>st</sup> *Advances in Circulating Tumour Cells*) 2012, Athènes

✕ Résumé sélectionné pour une présentation orale. *Detection of Circulating Tumor Cells Harboring a Unique ALK-rearrangement in ALK Positive non-small-cell-lung cancer*.

Pailler E, Adam J, Barthélémy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, Planchard D, Taylor M, André F, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F.

AACR (*American Association for Cancer Research*) 2013, Washington

✕ Poster. *Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK-rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer*.

Pailler E, Adam J, Barthélémy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, Borget I, Planchard D, Taylor M, André F, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F.

4<sup>ème</sup> réunion des groupes français « Cellules Tumorales Circulantes » 2013, Paris

✕ Présentation orale. *Détection de CTC porteurs d'un remaniement unique ALK-EML4 dans les CBNPC ALK positifs*.

Pailler E

AACR (*American Association for Cancer Research*) 2014, San Diego

✕ Poster. *High Level of Chromosomal Instability revealed through Circulating Tumor Cells Analysis in ROS1-Positive Non-Small-Cell*.

Pailler E, Besse B, Zajac O, Coudet B, Soria JC, Farace F.

10<sup>ème</sup> journées scientifiques de l'école doctorale CBMS 2014, Roscoff

✕ Présentation orale. *Phenotypic and molecular characterization of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer bearing ALK or ROS1 rearrangement*.

Pailler E

ACTC (2<sup>nd</sup> *Advances in Circulating Tumour Cells*) 2014, Crête

✕ Résumé sélectionné pour une présentation orale. *Detection of Circulating Tumor Cells Harboring a Unique ALK-rearrangement in ALK Positive non-small-cell-lung cancer*.

Pailler E, Coudert B, Auger N, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I, Planchard D, Soria JC, Besse B, Farace F.

11<sup>ème</sup> journées scientifiques de l'école doctorale CBMS 2015, Roscoff

✕ Poster. *High Level of Chromosomal Instability in Circulating Tumor Cells of ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer.*

Pailler E

5<sup>ème</sup> colloque annuel LabEx LERMIT (Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique) 2015, Cachan

✕ Présentation orale. *Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK-rearrangement and analysis of resistance to targeted therapies in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer.*

Pailler E

ISMRC (10<sup>th</sup> International Symposium on Minimal Residual Cancer) 2016, Hambourg

✕ Présentation orale. *Number of ALK-Amplified Circulating Tumor Cells Predicts Progression-Free Survival in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated by Crizotinib.*

Pailler E, Oulhen M, Ross K, Billiot F, Auger N, Borget I, NgoCamus M, Remon-Masip J, Planchard D, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F.

AACR (American Association for Cancer Research) 2016, La Nouvelle-Orléans

✕ Résumé sélectionné pour une présentation orale. *Number of ALK-Amplified Circulating Tumor Cells Predicts Progression-Free Survival in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated by Crizotinib.*

Pailler E, Oulhen M, Ross K, Billiot F, Auger N, Borget I, NgoCamus M, Remon J, Planchard D, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F.

ASCO (American Society of Clinical Oncology) 2016, Chicago

✕ Résumé sélectionné en poster-discussion. *ALK-Amplified Circulating Tumor Cells are a Surrogate Marker for Crizotinib Benefit in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients.*

Pailler E, Remon J, Oulhen M, Borget I, Ross K, Auger N, Billiot F, NgoCamus M, Planchard D, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F.



# Liste des figures

Figure 1. Le processus métastatique. ....	30
Figure 2. L'importance de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le processus métastatique... ..	35
Figure 3. La complexité de l'ensemencement métastatique par les cellules tumorales – exemple du cancer de la prostate métastatique. ....	39
Figure 4 : La niche pré-métastatique.....	43
Figure 5. Méthodes d'enrichissement en cellules tumorales circulantes.....	46
Figure 6. Représentation schématique du gène de fusion <i>EML4-ALK</i> .....	104
Figure 7 : Liste des variants de fusion <i>ALK</i> .....	105
Figure 8. Représentation schématique de la protéine de fusion <i>EML4-ALK</i> . ....	105
Figure 9 : Chronologie des avancées thérapeutiques très rapides dans les cancers bronchiques non à petites cellules <i>ALK</i> remanié. ....	107
Figure 10 : Mode de progression et mécanismes de résistance décrits chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules porteurs du remaniement <i>ALK</i> et traités par l'inhibiteur de première génération crizotinib.....	109
Figure 11. Altérations génétiques de résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase présentes dans la protéine de fusion <i>ALK</i> chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules <i>ALK</i> remanié. ....	111
Figure 12. Altérations génomiques détectées dans l'ADN tumoral circulant. ....	114
Figure 13. Applications cliniques de l'analyse des cellules tumorales circulantes et de l'ADN tumoral circulant.....	116
Figure 14 : Méthode établie pour la détection et la caractérisation phénotypique et cytomorphologique des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET.....	124
Figure 15 : Méthode établie pour la détection et la caractérisation phénotypique et moléculaire des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET. ....	127
Figure 16 : Méthode établie pour la détection, la caractérisation phénotypique et l'isolement par microdissection laser des CTC enrichies par filtration ISET.....	130
Figure 17 : Méthode établie pour la détection, la caractérisation phénotypique et l'isolement par tri cellulaire des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET.....	132
Figure 18 : Stratégie de détection des cellules tumorales circulantes (Hoechst <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /ALK <sup>+/-</sup> / CK <sup>+/-</sup> ) lors du tri cellulaire.....	133

Figure 19 : Méthode établie pour la détection, la caractérisation phénotypique et l'isolement par le <i>puncher</i> des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET.....	135
Figure 20 : Étapes pour l'amplification totale du génome de type LM-PCR. ....	137
Figure 21 : Purification des échantillons de WGA par la technique d'immobilisation réversible de l'ADN sur phase solide.....	139
Figure 22. Principe des PCR réalisées pour la technologie Access Array. ....	142
Figure 23. Préparation des bibliothèques pour le séquençage à haut débit de nouvelle génération avec le PGM Ion Torrent. ....	143
Figure 24. Technique d'enrichissement pour le séquençage d'exomes avec l'approche Agilent SureSelect. ....	145
Figure 25. <i>Heatmap</i> présentant les moyennes de profondeur de lecture par cible pour le contrôle ADN génomique et pour chacun des huit échantillons de lignées cellulaires obtenues après séquençage haut débit de nouvelle génération avec le PGM Ion Torrent. ....	275
Figure 26. Visualisation avec le logiciel Alamut Visual de la mutation EGFR L858R dans un échantillon de lignée cellulaire NCI-H1975 (Pilote_ID2).....	276
Figure 27. Visualisation avec le logiciel Alamut Visual de la mutation TP53 R273H dans un échantillon de lignée cellulaire NCI-H1975 (Pilote_ID2).....	277
Figure 28. Visualisation avec le logiciel Alamut Visual de la mutation EGFR T790M dans un échantillon de lignée cellulaire NCI-H1975 (Pilote_ID2).....	277
Figure 29. Marquage par immunofluorescence avec les anticorps ALK et CK des cellules de lignées NCI-H2228 mélangées dans du sang de donneur sain et enrichies par filtration.....	279
Figure 30. Amplification par PCR des contrôles de qualité (QC1 et QC2) pour des cellules NCI-H2228 triées à différentes dilutions. ....	280
Figure 31 : Exemple de cellules tumorales circulantes Hoechst <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /ALK <sup>+</sup> /CK <sup>-</sup> isolées par tri cellulaire chez un patient atteint de cancer bronchique non à petites cellules <i>ALK</i> remanié.....	281
Figure 32 : Pourcentages de cibles non couvertes et couvertes à une profondeur de lecture de 10X pour chacun des cinq échantillons de lignée cellulaire engagés après séquençage de l'exome.....	282

# Liste des tableaux

Tableau 1. Concordance au diagnostic entre les mutations identifiées à partir d'un prélèvement tissulaire et d'ADN tumoral circulant dans les cancers bronchiques non à petites cellules. ....	115
Tableau 2. Avantages et limites des approches de « biopsie liquide » : cellules tumorales circulantes et ADN tumoral circulant. ....	117
Tableau 3. Liste des gènes de la PCR multiplexe pour les contrôles de qualité (QC1). ....	138
Tableau 4. Liste des gènes de la PCR multiplexe pour les contrôles de qualité (QC2). ....	139
Tableau 5. Liste des mutations ciblées avec l'approche Access Array. ....	141
Tableau 6. Listes des gènes ciblés par le panel Ampli1 CHPCustom Beta développé par Silicon Biosystems. ....	144
Tableau 7. Listes des gènes et des mutations ciblés par le panel NSCLC-ALK/EGFR développé au sein du laboratoire. ....	144
Tableau 8. Évaluation de la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération sur des échantillons de cellules de lignée A549 enrichies par filtration ISET. ....	265
Tableau 9. Évaluation de la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération sur des échantillons de cellules de lignée NCI-H1975 enrichies par filtration ISET. ....	266
Tableau 10. Fréquence allélique de la mutation KRAS G12S obtenu sur des échantillons de cellules de lignée A549 enrichies par filtration ISET suite à une amplification totale du génome et une analyse avec la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération. ....	267
Tableau 11. Fréquences alléliques des mutations EGFR L858R, EGFR T790M et TP53 R273H obtenus sur des échantillons de cellules de lignée NCI-H1975 enrichies par filtration ISET suite à une amplification totale du génome et une analyse avec la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération. ....	268
Tableau 12. Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et taux d'échec suite à l'Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération pour les pools de cellules tumorales circulantes isolées dans le prélèvement du Patient 4. ....	270
Tableau 13. Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et taux d'échec suite à l'Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération pour les pools de cellules	



tumorales circulantes isolées dans le prélèvement du Patient 12. ....	271
Tableau 14. Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et du séquençage haut débit de nouvelle génération (Picard) des échantillons de lignées cellulaires séquencés sur le PGM Ion Torrent. ....	273
Tableau 15. Fréquences alléliques des mutations décrites pour les échantillons de la lignée NCI-H1975 .....	276
Tableau 16. Contrôles de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et du séquençage de l'exome (Picard) pour les échantillons de lignées cellulaires séquencés sur le MiSeq Illumina. ....	282

# Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AF	alexa fluor
ALK	<i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
ALT1	<i>glutamic--pyruvic transaminase</i>
AMM	autorisation de mise sur le marché
APC	<i>allophycocyanin</i>
ARN	acide ribonucléique
BEAMing	<i>beads, emulsion, amplification and magnetics</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
CAM	<i>cell adhesion molecules</i>
CAPP-Seq	<i>cancer personalized profiling by deep sequencing</i>
CBNPC	cancer bronchique non à petites cellules
CBPC	cancer bronchique à petites cellules
CCL-X	chemokine C-C ligand-type X
CD11b	<i>integrin subunit alpha M</i>
CDH1 = E-cadhéine	<i>cadherin 1</i>
CDH2 = N-cadhéine	<i>cadherin 2</i>
CDX	<i>CTC derived xenograft</i>
CIN	<i>chromosomal instability</i>
CK	cytokératine
COSMIC	<i>catalogue for somatic mutations in cancer</i>
CTC	cellule tumorale circulante
CXCL-X	chemokine CXC motif ligand-type X
CXCR-X	chemokine CXC motif receptor-type X
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DEP	<i>dielectrophoresis</i>
DEP-FFF	<i>dielectrophoretic field-flow fractionation</i>
DFF	<i>dean flow fractionation</i>
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
dNTP	désoxyribonucléotides
DTC	cellules tumorales disséminées
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EML4	<i>echinoderm microtubule associated protein like 4</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
EPCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
EPISPOT	<i>EPithelial Immuno SPOT</i>
ERG	<i>ETS transcription factor</i>
EZR	<i>ezrin</i>

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FA-FISH	<i>filter-adapted FISH</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GII	<i>genome integrity index</i>
HER2=ERBB2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
IC50	<i>concentration inhibitrice médiane</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
IHC	<i>immunohistochimie</i>
ISET	<i>isolation by size of tumor cells</i>
kb	<i>kilobases</i>
KIF5B	<i>kinesin family member 5B</i>
KIT	<i>KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
KRAS	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
LM-PCR	<i>ligation mediated-PCR</i>
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i>
MET	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
MMP	<i>métalloprotéases matricielles</i>
MUC1	<i>mucin 1</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NPM	<i>nucleophosmin</i>
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
ORR	<i>overall response rate</i>
OS	<i>overall survival</i>
pb	<i>paire de base</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDX	<i>patient derived xenograft</i>
PGM	<i>personal genome machine</i>
PFS	<i>progression-free survival</i>
PI3KCA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PSA	<i>prostate specific antigen</i>
psi	<i>pound-force per square inch</i>
PTPRC = CD45	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type C</i>
QC	<i>contrôle de qualité</i>
ROS1	<i>ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase</i>
rpm	<i>rotations par minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>

SAM	<i>substrat adhesion molecules</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SCOMP	<i>single cell comparative genomic hybridization</i>
SLC34A2	<i>solute carrier family 34 member 2</i>
SLUG	<i>snail family transcriptional repressor 2</i>
SNAIL	<i>snail family transcriptional repressor 1</i>
SPRI	<i>solid-phase reversible immobilization</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TFG	<i>TRK-fused gene</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TKI	<i>tyrosine kinase inhibitor</i>
TNM	<i>tumor, node, metastasis</i>
TSA	<i>tyramide signal amplification</i>
TPM3	<i>tropomyosin 3</i>
TWIST	<i>twist family bHLH transcription factor 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
WGA	<i>whole genome amplification</i>
WES	<i>whole exome sequencing</i>
ZEB1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

# **Préface & Objectifs**

La recherche sur les cellules tumorales circulantes (CTC) est un large champ d'investigation susceptible de fournir des informations importantes tant cliniques que fondamentales. Les CTC représentent une population hétérogène de cellules en transit dans la circulation sanguine, provenant de tumeurs primitives ou métastatiques. Du fait de leur très grande rareté, évaluée à environ une CTC parmi des millions de cellules hématopoïétiques normales, la caractérisation moléculaire des CTC reste technologiquement complexe requérant des méthodes d'enrichissement et de détection très sensibles et spécifiques. Il n'existe aujourd'hui aucune méthode universelle capable de détecter tous les types de CTC.

La valeur pronostique du nombre de CTC a été démontrée à travers de nombreuses études cliniques menées notamment dans les cancers du sein et de la prostate. Actuellement, la question vise essentiellement à évaluer l'utilisation de ce facteur pronostique (nombre de CTC) en clinique. Un autre enjeu majeur des recherches sur les CTC est leur utilisation comme « biopsie liquide » afin d'identifier des anomalies moléculaires qui sont de potentielles cibles thérapeutiques (biomarqueurs de sensibilité), mais également de suivre ces CTC porteuses d'anomalies moléculaires en tant que biomarqueurs pharmacodynamiques de l'efficacité des traitements ainsi, qu'identifier des anomalies de résistance à ces traitements (biomarqueurs de résistance). Compte tenu des limites des biopsies tumorales, la caractérisation des CTC à l'échelle de cellule unique apparaît comme une alternative intéressante pour étudier l'hétérogénéité tumorale. Récemment, le développement de modèles *in vivo* et *in vitro* permet d'envisager l'étude d'aspects encore mal connus du processus métastatique. Ces modèles établis à partir de CTC, pourraient s'inscrire dans le cadre d'une médecine de précision visant à réaliser des tests pharmacologiques et à identifier les molécules les plus pertinentes à l'échelle de chaque patient.

Dans les cancers broncho-pulmonaires, notamment dans la famille histologique des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) (85 % des cas), les CTC ont un véritable intérêt car les tumeurs sont majoritairement non opérables. Les biopsies de tumeurs ou les ponctions-aspirations transbronchiques sont difficilement réalisables, invasives, souvent de mauvaise qualité et associées à des risques élevés ; elles ne permettent donc pas toujours de réaliser les analyses moléculaires nécessaires au choix du traitement.

J'ai initié en 2012 mon Doctorat dans le laboratoire « Cellules Tumorales Circulantes » dirigé par le Docteur Françoise Farace qui regroupe d'une part une activité de recherche au sein de l'unité INSERM 981 « Biomarqueurs prédictifs et nouvelles stratégies moléculaires en thérapeutique anticancéreuse » dirigée par le Professeur Fabrice André, et d'autre part une activité de plateforme translationnelle CNRS UMS3655-INSERM US23 AMMICA dirigée par le Professeur Jean-Yves Scoazec.

L'objectif de mon projet de thèse, qui est la poursuite du travail amorcé lors de mon stage de Master 2 (2011-2012), était d'identifier des anomalies génomiques connues pour être des biomarqueurs de sensibilité et de résistance dans les CTC de patients atteints de CBNPC porteurs des remaniements de gènes *ALK* (*anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*) ou *ROS1* (*ROS proto-oncogene 1 receptor tyrosine kinase*) et de caractériser ces CTC.

La question de la détection a été abordée par le développement de la technique d'hybridation *in situ* de l'ADN (*fluorescent in situ hybridization*, FISH ; acide désoxyribonucléique, ADN) que nous avons adaptée aux CTC enrichies par filtration (*filter adapted FISH*, FA-FISH) (demande de brevet PCT/FR2011/052688). Nous avons ensuite combiné cette méthode de FA-FISH à l'immunofluorescence sur filtre et développé une approche de microscopie semi-automatisée (Pailler E *et al.*, *Method for Semi-Automated Microscopy of Filtration-Enriched Circulating Tumor Cells*, BMC Cancer 2016 Jul 14;16(1):477).

Grâce à cette méthode, notre objectif a été d'identifier le remaniement du gène *ALK* dans les CTC de patients porteurs de ce réarrangement dans la tumeur biopsiée et de suivre ces cellules au cours du traitement par crizotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) de première génération (Pailler E *et al.*, *Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2013 Jun 20;31(18):2273-81). Notre objectif a ensuite été d'évaluer si notre méthode pouvait être étendue à la détection d'un autre remaniement, le remaniement du gène *ROS1* (Pailler E *et al.* *High Level of Chromosomal Instability in Circulating Tumor Cells of ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer*. Ann Oncol. 2015 Jul;26(7):1408-15).

Nous avons poursuivi les inclusions de patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement *ALK* et analysé les CTC sous traitement par crizotinib en cherchant à évaluer si certaines sous-populations de CTC présentant un statut anormal du gène *ALK* étaient corrélées à l'évolution clinique des patients (Pailler E *et al.*, *Circulating Tumor Cells with Aberrant ALK-Copy Number Predicts Progression-Free Survival to Crizotinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients*. Soumis).

Bien que les TKI induisent des taux élevés de réponse objective (*overall response rate*, ORR) chez des patients sélectionnés, leur efficacité à long terme est invariablement limitée par le développement de résistance. L'identification de biomarqueurs de résistance est un réel enjeu dans la prise en charge thérapeutique des patients mais également dans la compréhension de l'évolution de la maladie métastatique. Chez les patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement *ALK* et traités par TKI de première, deuxième ou troisième génération, la résistance acquise se manifeste par des altérations génomiques additionnelles du gène *ALK* (principalement des mutations), par l'activation de voies de signalisation alternatives ou par d'autres mécanismes encore non identifiés. Soumettre les patients à des biopsies tumorales répétitives pour détecter ces anomalies est compliqué : les CTC pourraient ainsi

répondre à ce besoin et faciliter l'accès des patients à un traitement personnalisé. Afin d'évaluer cette question, nous avons mis au point des approches permettant de caractériser phénotypiquement, isoler et analyser moléculairement (recherche d'anomalies moléculaires) des CTC à l'échelle de cellule unique. Nous avons choisi d'aborder cet axe sous deux angles. Le premier angle consiste à analyser des anomalies moléculaires de résistance connues aux TKI grâce à une approche de PCR (*polymerase chain reaction*) multiplexes ciblées suivie d'un séquençage haut débit de nouvelle génération (*next generation sequencing*, NGS). Le second consiste à rechercher de nouvelles anomalies moléculaires de résistance qui pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques et mettre en évidence de nouvelles anomalies de résistance grâce au séquençage de l'exome (*whole exome sequencing*, WES). Les premiers résultats des expériences sur des échantillons CTC sont présentés dans ce manuscrit.



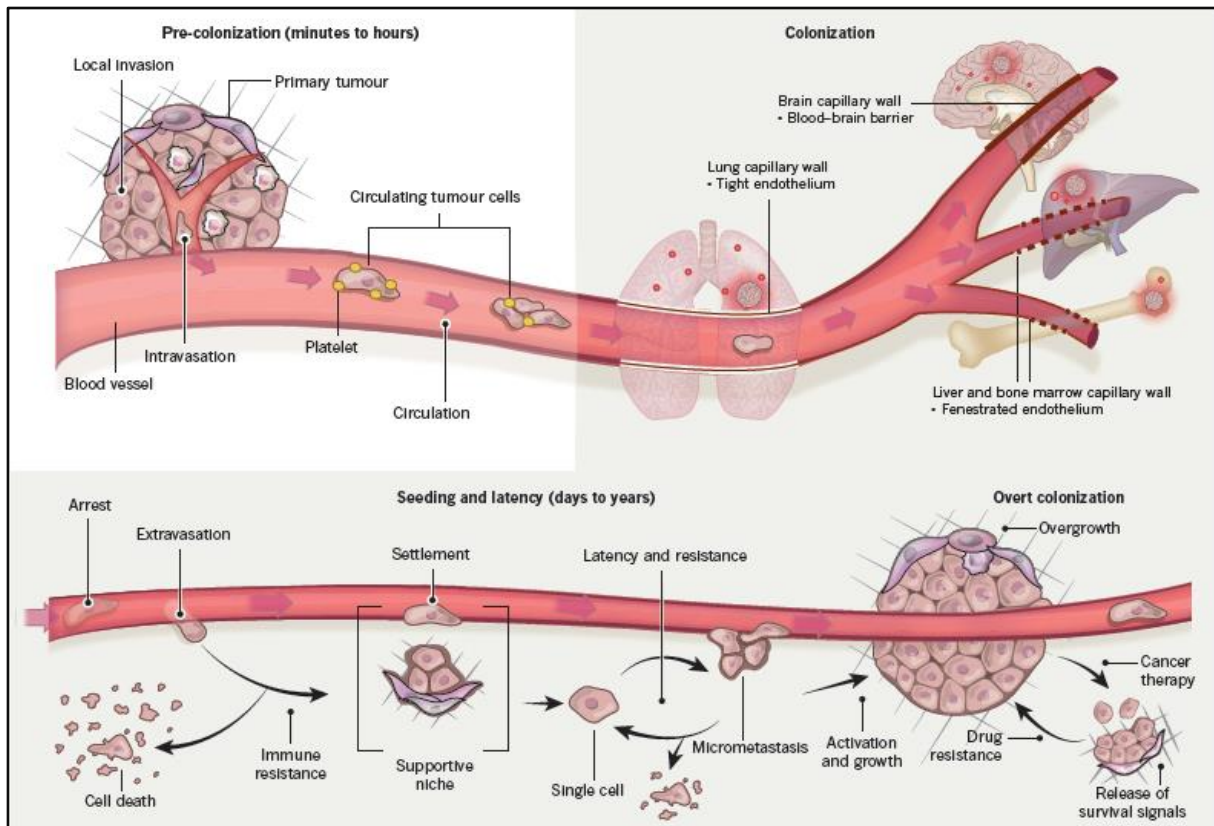
# Introduction

## A. LE PROCESSUS MÉTASTATIQUE : UN MODÈLE DE SURVIE ET D'ADAPTATION

L'apparition et la croissance de métastases disséminées sont la principale cause de décès chez les patients atteints d'un cancer et sont à l'origine de près de 9 décès sur 10 liés au cancer chez l'adulte [Blay, 2015]. Le terme de métastase est apparu au XVI<sup>ème</sup> siècle et a pour origine le mot grec μετάστας (*metastasis*) qui signifie « je change de place ». Le processus métastatique est défini comme « une dissémination de cellules néoplasiques dans un site secondaire (ou de plus grand ordre) non contigu et distant, au sein duquel ces cellules prolifèrent pour former une masse extravasculaire de cellules incomplètement différenciées » [Welch, 2006]. Très récemment, il a été montré que lors du diagnostic de la tumeur primaire, les cellules cancéreuses qui sont invasives et motiles, peuvent être déjà entrées dans la circulation afin de coloniser des organes distants. La plupart de ces cellules mourront mais une faible proportion aura la capacité de survivre et d'infiltrer des organes secondaires ; elles pourront être à l'origine d'une éventuelle rechute. Avant la colonisation proprement dite des organes distants, les cellules tumorales doivent surmonter de nombreux obstacles et franchir diverses étapes – détachement cellulaire des cellules adjacentes, invasion de la matrice extracellulaire, intravasation, survie dans le flux sanguin, extravasation, prolifération dans le tissu hôte – qui sont encore mal compris. Les recherches sur le processus métastatique ont été entravées par la complexité du processus lui-même mais également par l'absence de modèles expérimentaux adéquats. En effet, sa modélisation est un défi difficile et est très mal reproduit par les modèles *in vivo*. Les modèles les plus utilisés sont ceux des xénogreffes sous-cutanées, des implantations orthotopiques ou des injections intraveineuses de cellules tumorales humaines dans des souris immunodéprimées. Les cellules tumorales proviennent généralement de lignées cellulaires humaines immortalisées. Les modèles peuvent également être établis à partir de prélèvements de patients et sont dans ce cas appelé *patient derived xenograft* (PDX). Les événements moléculaires qui sous-tendent cette diffusion hématologique sont donc encore mal compris mais les progrès dans la détection des CTC et leur caractérisation tendent à améliorer nos connaissances dans ce domaine.

### 1. Les étapes clés du processus métastatique

La dissémination métastatique est le fruit d'une cascade d'étapes progressives et structurées qui doivent toutes être complètes afin qu'une métastase puisse être formée [Chaffer *et al.*, 2015 ; Blay, 2015 ; Massague *et al.*, 2016] (**Figure 1**).



**Figure 1. Le processus métastatique.**

Les interactions entre les cellules de la tumeur primaire vont être perdues. Ces cellules vont se détacher afin de pouvoir franchir la membrane basale par les voies guidées par les intégrines et les métalloprotéases. Les cellules tumorales qui ont intravasé et qui sont entrées dans la circulation sanguine sont nommées CTC ; elles peuvent circuler soit sous forme isolée soit sous forme de clusters. Elles peuvent s'associer à d'autres types cellulaires notamment les plaquettes afin d'échapper au système immunitaire et survivre dans le flux sanguin. L'arrêt des CTC pour coloniser un organe secondaire peut se faire par des déterminants mécaniques (anatomiques) et/ou moléculaires. La formation de métastases nécessite une niche pré-métastatique qui conditionnera leur développement dans un site secondaire. Les cellules tumorales peuvent rester dormantes avant de former des micro- ou des macro-métastases.

Figure reproduite avec l'autorisation de Macmillan Publishers, Nature [Massague *et al.*, 2016], copyright 2016.

### a. Détachement cellulaire et invasion

Dans les tumeurs, il existe des interactions complexes cellules-cellules mais également cellules-matrice extracellulaire, transitoires ou permanentes, induites respectivement par des molécules adhésives du système CAM (*cell adhesion molecules*) ou du système SAM (*substrat adhesion molecules*). Les cellules épithéliales composant la tumeur sont intimement jointives et soutenues par la membrane basale qui est composée d'un réseau dense de glycoprotéines et de protéoglycanes comme le collagène. La perte d'ancrage des cellules tumorales est en partie causée par une dérégulation des intégrines. Ce sont des récepteurs transmembranaires hétérodimères composés des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui ont une fonction d'adhésion par leur liaison à des ligands de la matrice extracellulaire et à des

protéines du cytosquelette d'actine. Elles ont un rôle clé dans les interactions entre les cellules tumorales et leur environnement et participent à toutes les étapes de la dissémination métastatique notamment lors de la régulation de la E-cadhérine (*cadherin 1*, CDH1) provoquant la perte d'adhérence cellulaire et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT). La membrane basale est une véritable barrière physique qui délimite la diffusion des cellules tumorales dans le stroma sous-jacent. Le remaniement du cytosquelette dans les cellules cancéreuses combiné à l'acquisition par celles-ci de capacités protéolytiques par synthèse de métalloprotéases matricielles (MMP), de cathepsines et de glycosidases, permet la rupture de la membrane basale [Hall, 2009 ; Quail *et al.*, 2013]. Lors de la rupture de cette membrane par les cellules tumorales, ces dernières entrent en contact avec le stroma, où sont présents des fibroblastes, des cellules endothéliales, des adipocytes et des cellules de la moelle osseuse qui constituent le microenvironnement de la tumeur [Hanahan *et al.*, 2012]. Les MMP, qui ont un rôle capital dans la rupture de la membrane basale, proviennent des cellules tumorales et des cellules de ce stroma environnant. De plus, les MMP contrôlent la biodisponibilité des facteurs pro- ou anti-angiogéniques et d'autres facteurs de croissance présents dans le stroma. L'angiogenèse, qui est définie comme l'ensemble des processus cellulaires et moléculaires aboutissant à la formation de néo-vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant est essentielle à la croissance et à la dissémination tumorale [Lebret *et al.*, 2008]. Ce phénomène permet un apport en nutriments et en oxygène assurant la croissance et/ou la survie des cellules tumorales. L'angiogenèse est finement régulée par des molécules pro-angiogéniques, comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor A*) ou le PDGF (*platelet derived growth factor*), et anti-angiogéniques, comme l'angiostatine ou la thrombospondine, qui proviennent des cellules tumorales mais également des cellules endothéliales, de la matrice extracellulaire et du stroma. De nombreux facteurs génétiques, métaboliques ou inflammatoires sont responsables de la fine régulation de la balance entre les molécules permettant le *switch* angiogénique et donc l'activation ou l'inhibition de l'angiogenèse [Carmeliet *et al.*, 2000]. Par exemple, l'activation de l'angiogenèse peut être due à l'hypoxie présente au sein des tumeurs et/ou à l'activation d'oncogènes qui vont stimuler l'activation de cytokines de l'angiogenèse (VEGF) et de MMP [Eccles *et al.*, 2007]. Cette activation de l'angiogenèse favorise la croissance tumorale et est déterminante lors de la diffusion métastatique. Ces nouveaux vaisseaux peuvent ainsi fournir une voie par laquelle les cellules vont « s'échapper » de la tumeur primaire afin d'entrer dans la circulation sanguine [Carmeliet *et al.*, 2011]. Cette étape est connue sous le nom d'intravasation.

### **b. Intravasation et transit dans le flux sanguin**

En réponse au relargage par les cellules du stroma de nombreuses protéines de signalisation cellulaire comme le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), les cellules cancéreuses peuvent subir un processus d'EMT qui va favoriser leur entrée dans le système vasculaire en les orientant vers un phénotype mésenchymateux [Thiery *et al.*, 2009] (*cf.* Introduction A.2). Les étapes décrites dans la section ci-dessus, permettent aux cellules cancéreuses de quitter la tumeur sous forme de cellules isolées et/ou de clusters [Talmadge *et al.*, 2010 ; Cheung *et al.*, 2016]. Le transit des CTC sous forme de clusters nécessiterait une organisation coopérative des CTC qui favoriserait leur survie et leur capacité pro-métastatique [Tabassum *et al.*, 2015]. Dans les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC), Hou *et al.* ont montré en 2012 que la présence de clusters de CTC en comparaison aux CTC isolées est associée à un moins bon pronostic de survie [Hou *et al.*, 2012]. De plus, il a été montré dans des modèles expérimentaux murins que les clusters polyclonaux de CTC permettent l'établissement de métastases de façon plus efficace que les CTC isolées [Aceto *et al.*, 2014]. Les CTC, pour survivre dans le flux sanguin, doivent exprimer des facteurs de survie ou anti-apoptotiques, des facteurs de « *homing* », des facteurs d'invasion ou encore des facteurs angiogéniques ; les CTC doivent également affronter un environnement hostile dû à l'anoikis (définie comme l'apoptose déclenchée suite à la perte de contact avec la matrice extracellulaire) ainsi qu'à la vitesse induite par les forces de cisaillement et échapper aux cellules du système immunitaire inné [Mocellin *et al.*, 2006]. Pour se protéger, les cellules peuvent s'associer aux fibroblastes, aux leucocytes, aux cellules endothéliales ou encore aux plaquettes afin de former des agrégats multicellulaires [Liotta *et al.*, 1974 ; Duda *et al.*, 2010 ; Labelle *et al.*, 2011]. Par exemple, Duda *et al.* ont démontré que l'association de fibroblastes avec les cellules tumorales augmente la viabilité et leurs confère un avantage lors de la colonisation métastatique [Duda *et al.*, 2010]. Également, les plaquettes jouent un rôle d'adaptateur entre macrophages CD11b<sup>+</sup> (*integrin subunit alpha M*) et cellules tumorales qui échappent ainsi à la pression sanguine et au système immunitaire [Joyce *et al.*, 2009 ; Blay, 2015].

### **c. L'extravasation**

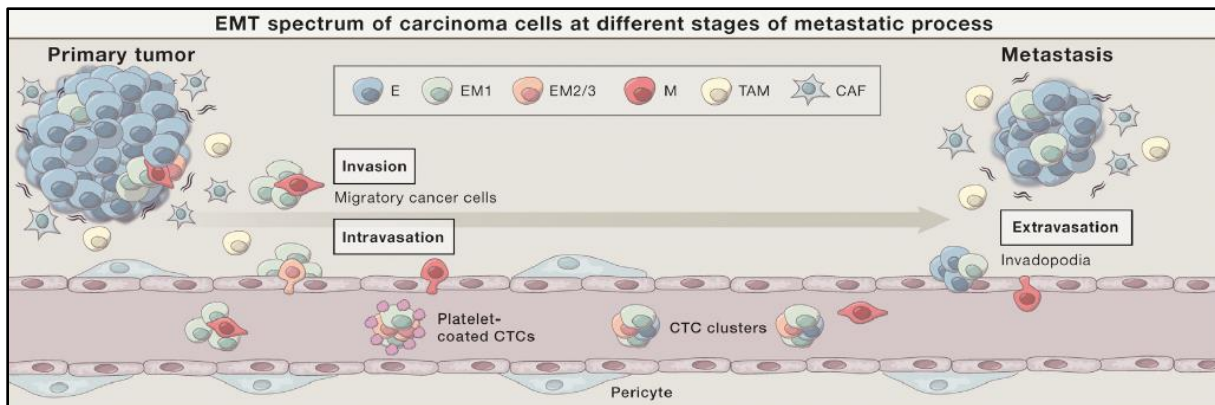
L'arrêt des CTC peut se faire pour des raisons mécaniques (déterminants anatomiques) avec un blocage passif des cellules tumorales lié à la restriction du diamètre des capillaires ou pour des raisons moléculaires avec des déterminants moléculaires qui « guident » sélectivement les cellules tumorales vers l'organe cible. Tous les capillaires n'ont pas des capacités identiques de rétention des CTC. En effet, dans la majorité des organes, la circulation veineuse conduit au ventricule droit du cœur et aux poumons, excepté la circulation veineuse de l'intestin qui conduit au foie. La forte incidence des métastases dans les poumons et le foie résulte donc de la rétention des CTC dans ces organes

[Deneve *et al.*, 2013]. Néanmoins, certaines CTC contournent ces « organes filtres » pour atteindre d'autres organes *via* la circulation artérielle. Les CTC retenues au sein des micro-capillaires peuvent proliférer pour former des embolies qui peuvent rompre le vaisseau ou extravaser à travers les parois vasculaires [Chaffer *et al.*, 2015]. La composition des parois vasculaires diffère selon les organes et est par conséquent un facteur influençant l'extravasation des CTC. Par exemple, les capillaires sinusoides du foie sont bordés par des cellules endothéliales fenestrées et une membrane basale discontinue ce qui peut faciliter l'extravasation des CTC et contribuer à la forte incidence des métastases hépatiques [Nguyen *et al.*, 2009]. Le tropisme des CTC, c'est-à-dire leur affinité pour un organe hôte, est également lié à l'expression de chimiokines. Les chimiokines sont de petites protéines se fixant sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G hétéro-trimériques. Les chimiokines CCL-5 (*chemokine C-C motif ligand - type 5*) sont sécrétées par les cellules tumorales et permettent le recrutement des cellules immunitaires comme les lymphocytes et les macrophages. Également, les cellules tumorales surexprimant les récepteurs CXCR-4 (*chemokine C-X-C motif receptor - type 4*) migrent préférentiellement vers les poumons, l'os et le foie car les cellules stromales de ces tissus sécrètent les chimiokines CXCL-12 (*chemokine C-X-C motif ligand - type 12*), le ligand de CXCR-4 [Muller *et al.*, 2001 ; Zlotnik *et al.*, 2011]. Le microenvironnement du site de colonisation constitue la niche pré-métastatique (*cf.* Introduction A.6). Afin de permettre leur adhésion et leur extravasation, les cellules cancéreuses vont exprimer des intégrines, ligands de la nouvelle matrice extracellulaire. En résumé, la combinaison des signaux d'amorçage provenant du stroma tumoral, la présence de CTC sous forme isolée ou de clusters et leurs caractéristiques propres, ainsi que les structures des parois vasculaires des organes cibles déterminent l'infiltration métastatique des organes. Une fois le site secondaire infiltré et la formation d'une micro-métastase, cette dernière doit être soutenue par la formation de nouveaux vaisseaux qui permettront la croissance tumorale de la métastase. Cependant, si le microenvironnement n'est pas favorable aux cellules cancéreuses infiltrées dans les organes distants, de nombreuses cellules vont mourir par apoptose. Certaines cellules peuvent entrer dans un état dit de dormance (*cf.* Introduction A.5).

## **2. La transition épithélio-mésenchymateuse : une étape essentielle pour la progression métastatique ?**

L'EMT est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée de subir de multiples modifications biochimiques qui lui permettent de se « transformer » en une cellule mésenchymateuse, qui a une capacité accrue de migration et d'invasivité [Kalluri, 2009]. Le processus inverse nommé transition mésenchymo-épithéliale (*mesenchymal-epithelial transition*, MET) est associé à la perte des

capacités migratoires ce qui implique une repolarisation apico-basale des cellules et une reformation des jonctions caractéristiques des cellules épithéliales [Thiery *et al.*, 2009]. Néanmoins, les mécanismes qui régulent la balance EMT/MET ne sont pas bien décrits [Bednarz-Knoll *et al.*, 2012]. Les cellules épithéliales s'associent les unes aux autres afin de former des structures cellulaires en monocouches jointes grâce aux jonctions serrées, aux jonctions adhérentes, aux jonctions communicantes ou encore aux desmosomes. Elles sont polarisées avec un pôle apical et un pôle basal ancré à la lame basale et ne peuvent pas se détacher au sein d'un même épithélium [Thiery *et al.*, 2006]. *A contrario*, les cellules mésenchymateuses ne sont pas polarisées et ne sont pas associées à une membrane basale. Elles ont une morphologie caractéristique de type fibroblastoïde. Historiquement, l'EMT est décrit comme une « transformation » des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses [Hay, 1995] ; ce processus est considéré comme un « changement » (*shift*) entre deux stades alternatifs. Le terme de « transformation » a ensuite été substitué par « transition » afin de mettre en lumière la réelle plasticité de ce processus. Cependant, considérer l'EMT comme une unique transition entre deux états – épithélial ou mésenchymateux – est une vision très réductrice. L'EMT est souvent considérée à tort comme un phénomène « tout ou rien » ; il s'agit en fait d'un processus d'une grande plasticité, dynamique et réversible [Nieto *et al.*, 2016]. Schématiquement, il est possible de borner l'EMT avec d'un côté un phénotype purement épithéliale et de l'autre un phénotype purement mésenchymateux (**Figure 2**). Les cellules en EMT partielle peuvent ainsi se situer dans n'importe quel stade intermédiaire entre ces deux bornes et donc avoir un phénotype qualifié d'« hybride » ou d'« intermédiaire » selon les auteurs [Kalluri, 2009 ; Nieto *et al.*, 2016]. Pendant l'embryogénèse, l'EMT implique la migration des cellules ectodermiques au sein de l'embryon au cours de la gastrulation afin de produire le mésoderme (EMT de type I) [Edelman *et al.*, 1983]. L'EMT est également décrite dans des phénomènes physiologiques tels que la cicatrisation des plaies ou dans des phénomènes pathologiques comme la fibrose (EMT de type II) [Kim *et al.*, 2006]. Ce concept a ensuite été étendu aux cancers métastatiques (EMT type III) [Thiery, 2002]. L'EMT partielle a été décrite dans les trois types d'EMT [Nieto *et al.*, 2016]. Elle correspond à une balance subtile entre les *drivers* transcriptionnels et les suppresseurs de l'EMT. Cet équilibre est modulé par des changements épigénétiques ainsi que par les principaux effecteurs du cytosquelette et de la machinerie cellulaire commandant la migration et l'invasion. L'EMT implique de nombreuses voies de signalisation incluant les voies du TGF- $\beta$ , Wnt/Notch, FGF (*fibroblast growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) ou encore HGF (*hepatocyte growth factor*). Les facteurs de transcription tels que SLUG (*snail family transcriptional repressor 2*), SNAIL (*snail family transcriptional repressor 1*), ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) sont activés et orientent la cellule vers un phénotype mésenchymateux.



**Figure 2. L'importance de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le processus métastatique.**

L'EMT est un processus d'une grande plasticité, dynamique et réversible. Les cellules tumorales peuvent être présentes sous différents phénotypes (épithélial, « hybride » ou mésenchymateux). Le stade « hybride » est un continuum entre les deux bornes de l'EMT que sont d'un côté le phénotype purement épithéliale et de l'autre un phénotype purement mésenchymateux.

Figure reproduite avec l'autorisation de Elsevier, Cell [Nieto *et al.*, 2016], copyright 2016.

L'importance de l'EMT dans le cancer a été largement débattue et son rôle dans la progression métastatique est encore loin d'être complètement compris. En effet, les modèles d'études ne permettent pas de refléter l'hétérogénéité intrinsèque des cellules tumorales et de leur microenvironnement ; ainsi la pertinence de l'EMT *in vitro* est fortement questionnable. L'analyse de la tumeur primaire et des sites métastatiques a permis de déterminer un panel de marqueurs spécifiques de l'EMT ; la perte des marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine, les occludines et les cytokératines (CK) et le gain des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la N-cadhérine (*cadherin 2*, CDH2) font partie des marqueurs les plus décrits [Thiery *et al.*, 2006]. Son importance est également soulignée dans des études de corrélation rapportant la présence de marqueurs mésenchymateux dans le tissu comme un mauvais facteur pronostique dans de multiples types de cancers incluant les CBNPC [Soltermann *et al.*, 2008]. Brabletz *et al.* ont mis en évidence l'hétérogénéité du processus d'EMT au sein des tumeurs montrant que le front de la tumeur présente un phénotype mésenchymateux tandis que la masse tumorale est largement épithéliale [Brabletz *et al.*, 2001]. Ainsi, il y a probablement un gradient de l'EMT au sein des tumeurs : certaines cellules du front de la tumeur ont subi une EMT totale tandis que ce n'est pas le cas des cellules de la masse tumorale [Huang *et al.*, 2013]. Cependant, ce gradient peut être plus ou moins prononcé selon le type de cancers en raison de leur hétérogénéité moléculaire intrinsèque. Le tissu d'origine peut aussi influencer l'EMT. Récemment, Tan *et al.* ont présenté un système de quantification de l'EMT basé sur les profils d'expression de gènes allant de -1.0 à +1.0 [Tan *et al.*, 2014]. Ils ont montré que chaque type de cancer a une propension distincte à avoir différents



états d'EMT ; les tumeurs solides du sein, de l'ovaire et du poumon présentent une large gamme d'EMT. Les auteurs ont également montré une corrélation entre le statut EMT et le mauvais pronostic des cancers ovariens et colorectaux.

Le processus d'EMT est activé dans les cellules tumorales lors de leur dissociation de la tumeur primaire et de leur intravasation dans la circulation sanguine [Thiery *et al.*, 2009 ; Thiery *et al.*, 2013 ; Yu *et al.*, 2013 ; Khoo *et al.*, 2015]. Une des premières publications rapportant une expression hétérogène de marqueurs de l'EMT dans les CTC a été réalisée par l'équipe de Caroline Dive dans une étude dans le cancer du poumon [Hou *et al.*, 2012]. Ces observations ont été confirmées par d'autres équipes dans différents types de cancers incluant la nôtre dans une étude dans les CBNPC [Lecharpentier *et al.*, 2011]. Kallergi *et al.* ont rapporté dans le cancer du sein que les CTC exprimant des marqueurs mésenchymateux sont plus fréquemment identifiées chez des patientes présentant un stade avancé de la maladie plutôt qu'une maladie localisée [Kallergi *et al.*, 2011]. Ces résultats suggèrent une association entre la progression de la maladie et l'EMT.

La dynamique du processus d'EMT entre la tumeur primaire et les métastases n'est pas clairement définie ; les CTC pourraient ainsi avoir le potentiel du « chaînon manquant » dans la compréhension de ce processus.

Un modèle alternatif mais non exclusif est également proposé. Il est basé sur la coopération entre les cellules qui vont former les métastases. Cette démonstration a été réalisée en utilisant des cellules épithéliales et mésenchymateuses dérivées de kératinocytes de hamster [Tsuji *et al.*, 2008]. Une population pure de cellules tumorales soit épithéliales soit mésenchymateuses a été injectée en sous-cutanée dans des souris et a formé des masses tumorales au niveau du site d'injection. Cependant, seules les cellules mésenchymateuses ont pu entrer dans la circulation sanguine mais elles n'ont pas eu la capacité de former des métastases pulmonaires. Lorsque ces mêmes populations ont été injectées par voie intraveineuse, cette fois-ci seules les cellules épithéliales ont formé des métastases pulmonaires. L'injection sous-cutanée d'un mélange contenant les deux populations a permis l'entrée des cellules dans la circulation et la formation de métastases pulmonaires ; ainsi les cellules mésenchymateuses ont permis l'intravasation et donc le passage des cellules épithéliales dans la circulation sanguine. Ces résultats suggèrent donc que la coopération cellulaire peut être requise dans le processus métastatique mais les mécanismes exacts qui sous-tendent cette coopération ne sont à l'heure actuelle pas compris.

### 3. La théorie du « *seed and soil* »

Il est connu depuis de nombreuses années que les cancers ont la capacité de former des métastases de façon préférentielle dans certains organes. Par exemple, les patientes atteintes d'un cancer du sein présentent fréquemment des métastases osseuses, hépatiques, cérébrales et pulmonaires, les patients atteints de cancer de la prostate des métastases osseuses, ou encore les patients atteints de cancer du poumon des métastases cérébrales, osseuses, surrénaliennes ou hépatiques [Nguyen *et al.*, 2009]. En 1889, le chirurgien anglais Stéphane Paget, a publié un article dans la célèbre revue *The Lancet* mettant en évidence que les cellules tumorales ont une affinité particulière avec le microenvironnement de certains organes [Paget, 1889 ; Fidler, 2003]. Ainsi, il propose avec sa théorie du « *seed and soil* » que les cellules tumorales par métaphore des « graines » (*seed*) ne forment une métastase que dans un tissu par métaphore du « sol » (*soil*) qui leur est favorable et compatible.

*« An attempt is made in this paper to consider 'metastasis' in malignant disease, and to show that the distribution of the secondary growths is not a matter of chance. »*

*« What is it that decides which organs shall suffer in a case of disseminated cancer? »*

*« When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions; but they can only live and grow if they fall on congenial soil. »*

Cette théorie a été remise en question par James Ewing dans les années 1920. Selon lui, la circulation entre la tumeur primaire et les organes secondaires spécifiques est suffisante pour expliquer la localisation des métastases [Ewing, 1928 ; Fidler, 2003]. Ainsi, il suggère que la dissémination métastatique ne se produit que grâce à des facteurs mécaniques, résultats de la structure anatomique même du système vasculaire.

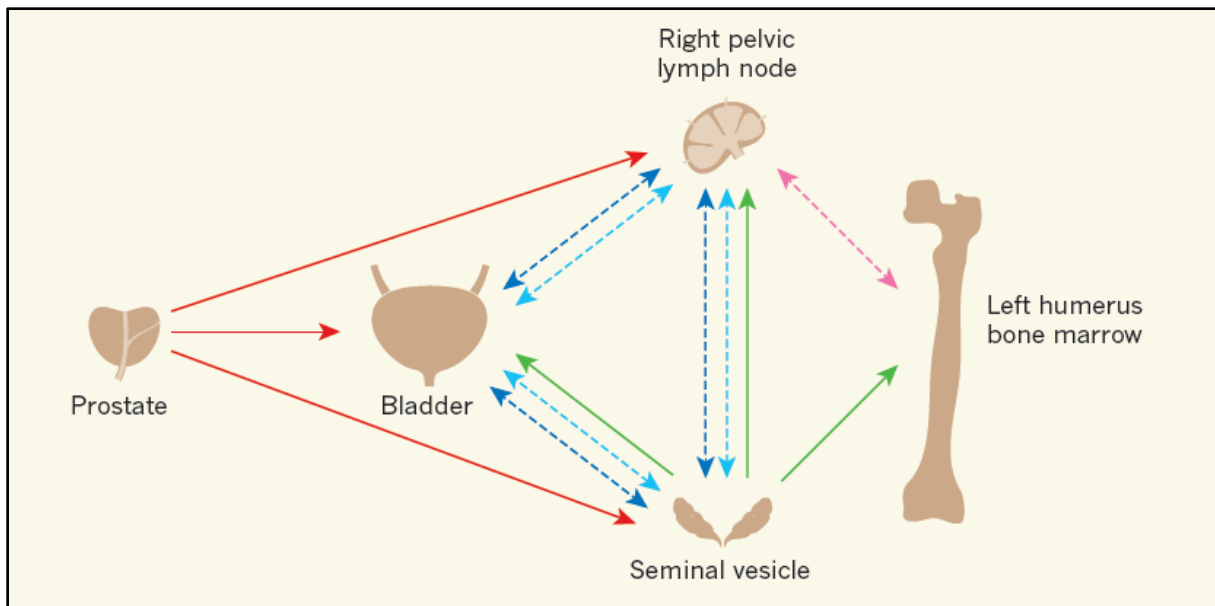
*« 'Genius loci,' or the particular susceptibility of a tissue to develop secondary tumors, is an interesting phase of study of metastases... The mechanisms of the circulation will doubtless explain most of these peculiarities, for there is as yet no evidence that any one parenchymatous organ is more adapted than others to the growth of embolic tumor cells. The spleen seems to escape with peculiar frequency. »*

Qu'en est-il de nos jours de ces théories ?

Nous savons que ces hypothèses, bien qu'innovantes pour l'époque, ne décrivent pas l'extrême complexité de la progression métastatique. Des analyses géniques et cytogénétiques approfondies montrent que les anomalies génomiques et la charge mutationnelle peuvent évoluer fortement au cours du temps et être variables entre la tumeur primitive et ses métastases.

Le groupe de Joan Massagué a montré dans un système expérimental murin que les CTC ont la capacité de recoloniser leur tumeur d'origine, selon un processus de réensemencement de la tumeur primaire plus classiquement appelé *tumor self-seeding* [Kim *et al.*, 2009]. Grâce à ce processus, des

CTC parmi les plus agressives qui ont survécu lors de la dissémination et donné une métastase, peuvent ré-infiltrer la tumeur primitive et accélérer sa croissance. Ce phénomène permet d'envisager un mécanisme de recirculation des CTC d'une métastase à l'autre chez des patients porteurs de cancer métastatique opérés de leur tumeur primitive. Il laisse aussi supposer que la charge tumorale mesurée dans la circulation pourrait être diminuée du fait de la présence de certaines CTC au sein de masses tumorales importantes. Bien que la théorie soit admise depuis de nombreuses années, le groupe de Steven Bova a montré en 2009 l'origine monoclonale du cancer de la prostate métastatique ; la dissémination métastatique proviendrait d'une cellule cancéreuse unique [Liu *et al.*, 2009]. Très récemment, ce même groupe a publié une vision plus contrastée du processus métastatique. Gundem *et al.* ont démontré grâce à une approche de séquençage de l'exome dans 51 tumeurs (tumeur primitives et métastases) provenant de 10 patients atteints de cancer de la prostate métastatique que les métastases présentent une évolution complexe et dynamique [Gundem *et al.*, 2015]. Dans cette étude, ils mettent en évidence l'ensemencement polyclonal (*polyclonal seeding*) des tumeurs ainsi que la relation clonale qu'il y a entre les métastases. La propagation des cellules entre les métastases peut provenir d'un ensemencement monoclonal *de novo* de métastases ou, dans certains cas, du transit de différents clones tumoraux entre les métastases. Ainsi, deux ou plusieurs clones peuvent ensemercer une même métastase. De plus, plusieurs clones peuvent être communs entre deux ou plusieurs métastases ce qui suggère que la progression métastatique peut être favorisée par la coopération entre les clones. Chez huit patients, certaines métastases ont pour origine un autre site métastatique plutôt que la tumeur primaire ; ce phénomène est nommé ensemencement croisé (*cross-seeding*). Ce phénomène pourrait se produire de façon linéaire c'est-à-dire de métastase à métastase ou de façon ramifiée avec une métastase qui ensemece au moins deux sites ; un système combinant les deux approches peut également être envisagé. Une étude similaire sur 26 biopsies provenant de quatre patients a été menée par Hong *et al.* et met également en évidence l'ensemencement croisé [Hong *et al.*, 2015]. De plus, ce groupe détecte, dans le sang collecté lors du décès, des clones de la tumeur primaire réséquée plusieurs années avant ; cela indique que des CTC ayant colonisé d'autres organes recirculent. Ces deux groupes ont utilisé une approche de phylogénie afin de mettre en évidence les liens entre les métastases : des mutations décrites comme *drivers* dans le cancer de la prostate sont retrouvées dans le tronc des arbres phylogénétiques ce qui est en accord avec leur présence dans la tumeur primaire. Cependant ces arbres ont de nombreuses ramifications dues aux différents clones présents portant des mutations secondaires (**Figure 3**).



**Figure 3. La complexité de l'ensemencement métastatique par les cellules tumorales – exemple du cancer de la prostate métastatique.**

Cette représentation schématique illustre la complexité de l'ensemencement métastatique chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique. Chaque population cellulaire clonale qui va coloniser un organe secondaire est représentée par une flèche. Les flèches pointillées indiquent que le sens de l'ensemencement n'est pas connu. Gunden *et al.* ainsi que Hong *et al.* ont rapporté que l'ensemencement des métastases provient des clones provenant de la tumeur primaire mais également des autres métastases [Gunden *et al.*, 2015 ; Hong *et al.*, 2015]. De plus, Gunden *et al.* ont rapporté l'ensemencement polyclonal des tumeurs (flèches bleues).

Figure reproduite avec l'autorisation de Macmillan Publishers, Nature [Shen, 2015], copyright 2015.

#### 4. L'inefficacité métastatique

Les cellules qui ont passé l'étape d'intravasation et qui sont en transit, ont une demi-vie relativement courte de l'ordre de quelques heures [Meng *et al.*, 2004]. Les cellules cancéreuses qui survivent après l'infiltration des organes distants sont appelées cellules tumorales disséminées (DTC) et peuvent être entre autres présentes dans la moelle osseuse [Pantel *et al.*, 2004 ; Kang *et al.*, 2013]. Néanmoins, seulement la moitié des patients atteints de cancer développeront des métastases. Ces observations cliniques suggèrent donc que le processus métastatique est hautement inefficace, ce qui est dû entre autres au fait que la plupart des cellules meurent dans la circulation ; seule une minorité survivra pour former des métastases. Les données expérimentales obtenues à partir de modèles murins sont en ligne avec les données cliniques. La première étude a été réalisée avec des cellules de mélanome B16F1 murin injectées dans la veine mésentérique afin de cibler le foie [Luzzi *et al.*, 1998]. Luzzi *et al.* ont ainsi montré que 87 % des cellules injectées ont extravasé dans le foie 90 minutes après l'injection. Trois jours après cette injection, les cellules sont présentes dans le parenchyme hépatique mais seulement 2 % forment des micro-métastases. En outre, l'ensemble des micro-métastases n'a pas persisté et le

décès des souris est lié à seulement 0,02 % des métastases croissantes. Ainsi, les auteurs ont démontré que les premières étapes de colonisation métastatique hématogène – arrêt dans un organe et extravasation – sont efficaces tandis que les phases d’initiation et de croissance des micro-métastases dans le site secondaire sont très inefficaces, ce qui indique que la croissance dans ce site est un régulateur clé de la capacité métastatique globale. D’autres études ont notamment montré que la plupart des cellules cancéreuses injectées par voie intraveineuse, et qui vont donc atteindre le poumon, vont mourir par apoptose lors des deux premiers jours [Wong *et al.*, 2001]. De telles observations, dans des modèles *in vivo* et en clinique, impliquent que les facteurs qui influent sur la survie et l’initiation de la tumeur sont des déterminants importants du processus métastatique. L’échec ou l’inachèvement d’une étape conduit à l’arrêt de la cascade et par conséquent à l’arrêt de la dissémination métastatique. Ainsi la présence de CTC est nécessaire mais non suffisante au développement de métastases.

## 5. La dormance tumorale

Après de nombreuses années de rémission, les patients atteints de cancer peuvent rechuter. Des données récentes montrent que la colonisation métastatique peut survenir très tôt dans l’histoire de la maladie, notamment pour des tumeurs de petite taille, et dépend de facteurs génétiques.

Dès 1934, le pathologiste australien Rupert Willis propose le concept de « cellules tumorales dormantes » après avoir étudié la propagation métastatique dans des autopsies de patients [Willis, 1934].

*« When long-delayed metastatic tumours appear in a patient in whom there is no local recurrence of the extirpated primary growth, it is clear that the secondary growths must have arisen from tumour-emboli disseminated from the primary growth before its removal. The neoplastic cells must have lain dormant in the tissues in which they were arrested, and their resumption of growth must be attributed to some alteration in the qualities of these tissues or to some release of growth-restraints exercised by them on tumour cells. The nature of these factors are wholly unknown, and it is for future research to explain the remarkably sudden change of behaviour exhibited by the tumours in the cases under discussion. »*

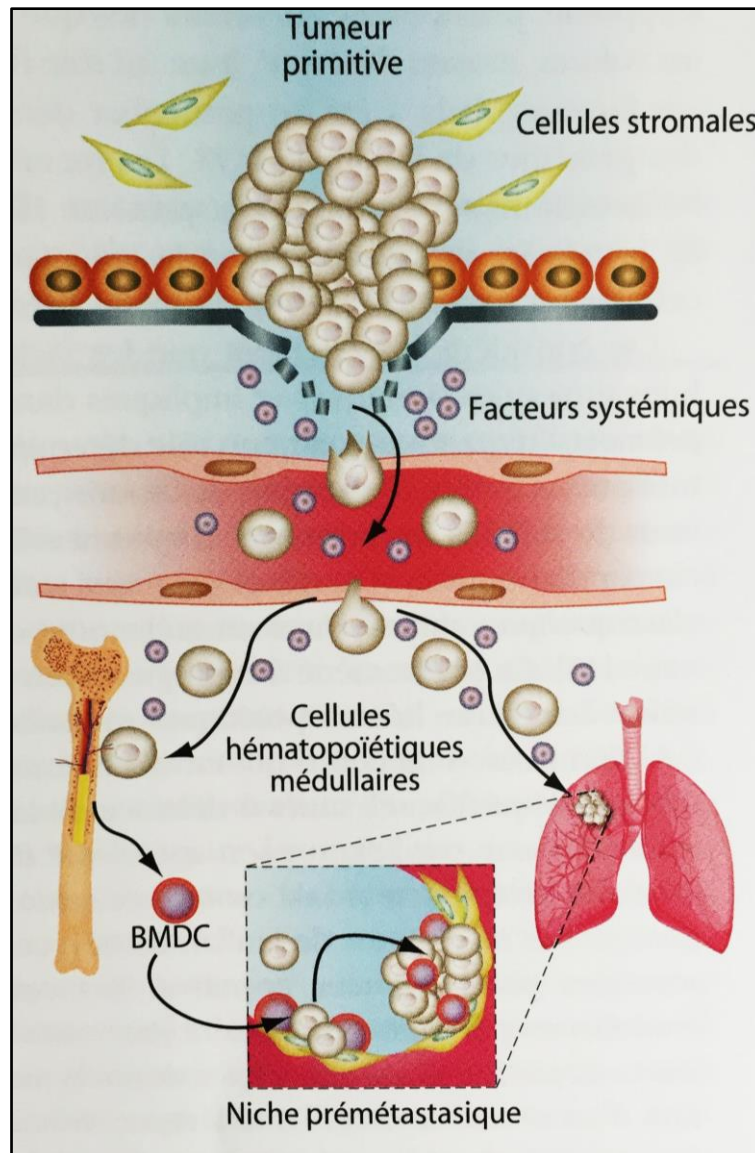
En clinique, un délai de plusieurs mois voire de plusieurs années est souvent observé entre la résection de la tumeur primaire et l’apparition de métastases [Karrison *et al.*, 1999 ; Vincent-Salomon *et al.*, 2008]. Meng *et al.* rapportent la détection de cellules néoplasiques circulantes chez des patientes en rémission complète jusqu’à 22 ans après le diagnostic initial de cancer du sein [Meng *et al.*, 2004]. Ce phénomène est difficilement explicable par le simple fait de la lenteur de la croissance tumorale dans l’organe secondaire. Ces observations peuvent cependant être expliquées par le concept de tumeur quiescente ou dormante. La dormance tumorale est définie comme un équilibre entre les cellules

tumorales et l'hôte pendant une période prolongée sans que la tumeur ne croisse. En effet, des cellules tumorales peuvent rester quiescentes dans l'organe secondaire et le terme de maladie résiduelle minime est alors utilisé ; ce phénomène est objectivé par des rechutes tardives, survenant plusieurs années après le diagnostic et la résection de la tumeur primitive. Afin d'expliquer le phénomène de dormance, plusieurs théories ont été proposées comme la surveillance immunitaire, la réversion du *switch* angiogénique, l'effet inhibiteur du nouveau microenvironnement tumoral ou la balance favorable à l'apoptose plus qu'à la prolifération cellulaire [Aguirre-Ghiso, 2007 ; Uhr *et al.*, 2011]. Ainsi, dans le cas de la dormance à l'échelle cellulaire, les DTC isolées entrent dans un stade de quiescence tandis que dans le cas de la dormance à l'échelle d'une masse tumorale, les micro-métastases cessent de croître à cause d'une vascularisation insuffisante ou par pression du système immunitaire [Sosa *et al.*, 2014]. L'existence de cette maladie résiduelle minime est un facteur prédictif de récurrence et de mortalité. En effet, Braun *et al.* ont montré que la détection de micro-métastases de cancer du sein dans la moelle osseuse des années avant l'émergence de métastases [Braun *et al.*, 2005]. Les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses entrent en dormance ainsi que les mécanismes qui permettent à ces cellules de reprendre leur croissance sont peu connus [Vanharanta *et al.*, 2013]. En effet, peu de modèles expérimentaux mettent en évidence cette phase de latence. Dans des modèles murins de xénogreffes, des signaux du stroma induisant la dormance ont été identifiés. Des membres de la famille du TGF- $\beta$  peuvent induire la quiescence des DTC et inhiber l'auto-renouvellement [Gao *et al.*, 2012 ; Bragado *et al.*, 2013]. La niche péri-vasculaire a également été décrite comme inducteur de la dormance des cellules cancéreuses [Ghajar *et al.*, 2013] tandis que les environnements riches en collagène de type I ou en fibronectine l'inhibent [Aguirre-Ghiso *et al.*, 2001 ; Barkan *et al.*, 2010]. Le manque de facteurs de croissance du stroma et l'abondance de signaux inhibiteurs de la croissance favorisent la dormance dans les modèles expérimentaux bien que ces signaux ne soient pas capables de maintenir cette latence dans le temps.

## **6. Les cellules initiatrices de tumeur (ou cellules souches cancéreuses) et la niche pré-métastatique**

Les cellules souches adultes sont présentes dans des microenvironnements spécifiques appelés niches qui maintiennent l'homéostasie tissulaire c'est-à-dire la régulation de la balance entre la prolifération, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation [Reya *et al.*, 2001]. Historiquement, Joseph Grinnell a proposé le terme de « niche » pour définir l'environnement et les conditions dans lesquelles vit une espèce. En 1978, Ray Schofield propose « l'hypothèse de la niche » pour décrire le microenvironnement physiologique qui permet la pérennisation des cellules souches hématopoïétiques.

La niche est le microenvironnement qui protège les cellules souches de *stimuli* de différenciation, d'apoptose ou de *stimuli* qui mettraient à l'épreuve leur réserve et qui limite aussi leur expansion excessive. C'est une structure anatomique comprenant des composants cellulaires et non cellulaires qui intègrent des facteurs locaux et systémiques contrôlant le « comportement » des cellules souches. Les niches favorables au développement des métastases sont riches en signaux de développement et d'auto-renouvellement incluant les membres de la famille du TGF- $\beta$  et les chimiokines CXCL-12. La formation de niches pré-métastatiques peut survenir très tôt lors de la progression tumorale (**Figure 4**). Kaplan *et al.* ainsi que Sceneay *et al.* ont mené des expériences montrant la présence de cellules hématopoïétiques médullaires dans les poumons des animaux une à deux semaines après l'injection de cellules tumorales [Kaplan *et al.*, 2005 ; Sceneay *et al.*, 2012]. De plus, les phénomènes précoces de néo-angiogenèse au sein de la tumeur primaire et d'hypoxie ont un rôle majeur dans la synthèse de facteurs favorisant les niches pré-métastatiques par les cellules tumorales [Kaplan *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2011]. Il est dorénavant admis que les facteurs sécrétés par les cellules tumorales de la tumeur primitive et impliqués dans la formation des niches pré-métastatiques joueraient un rôle déterminant dans le tropisme des métastases notamment par la mobilisation de cellules hématopoïétiques médullaires et par leur capacité à générer un environnement favorable au niveau d'organes secondaires spécifiques. Des modèles expérimentaux ont démontré que des signaux provenant de la tumeur primaire peuvent influencer le microenvironnement en créant des niches pré-métastatiques favorisant l'arrivée des CTC [McAllister *et al.*, 2014]. Néanmoins, il reste à déterminer si les niches pré-métastatiques restent activées lors de la phase de dormance ou si leur rôle est de permettre l'infiltration des cellules avant cette phase.



**Figure 4 : La niche pré-métastatique.**

La tumeur primitive est constituée de cellules tumorales et de cellules stromales qui créent un microenvironnement favorable au site tumoral primitif. Certains facteurs intervenant lors de la croissance tumorale comme l'hypoxie, favorisent la sécrétion par les cellules tumorales primitives de cytokines et facteurs de croissance mobilisant les cellules hématopoïétiques médullaires. Ces dernières vont être recrutées au niveau d'organes à distance pour favoriser la création d'un microenvironnement favorable à l'implantation de DTC : la niche pré-métastatique. Ce processus fait intervenir divers mécanismes impliquant le remodelage de la matrice extracellulaire, l'inflammation, l'immunosuppression et la modification de la perméabilité vasculaire.

Figure reproduite, John Libby Eurotext [Shen, 2015 ; Blay, 2015].

Seul un très petit nombre de cellules tumorales a la capacité d'initier des tumeurs : ce sont les cellules souches cancéreuses aussi appelées cellules initiateuses de tumeur [Reya *et al.*, 2001]. Elles ont été mises en évidence dans un premier temps dans les leucémies aiguës myéloïdes puis dans la plupart des cancers [Nguyen *et al.*, 2012]. Deux hypothèses sous-tendent leur origine : la première propose



que les cellules souches cancéreuses résultent de la transformation maligne d'une cellule souche adulte [Huntly *et al.*, 2005] tandis que la seconde propose qu'elles résultent de l'acquisition de la capacité d'auto-renouvellement d'une cellule différenciée à la suite d'accumulation de mutations génétiques [Krivtsov *et al.*, 2006]. Concernant leur caractérisation, plusieurs groupes ont montré que les cellules souches tumorales expriment de nombreux marqueurs de l'EMT ce qui leur confère la capacité d'initier la croissance tumorale lorsqu'elles sont transplantées dans des souris immunodéprimées [Ricci-Vitiani *et al.*, 2007 ; Mani *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2010]. Le groupe de Robert Weinberg a montré que des cellules souches résultant de cellules épithéliales mammaires immortalisées induites en EMT par l'expression ectopique des facteurs de transcription SNAIL ou TWIST (*twist family bHLH transcription factor 1*), peuvent initier des mammosphères *in vitro* [Mani *et al.*, 2008]. Ces cellules ont un phénotype CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> concordant avec le profil des cellules initiatrices de tumeur dans le cancer du sein et ont la capacité d'induire des tumeurs dans des souris immunodéprimées [Grimshaw *et al.*, 2008]. Les cellules souches cancéreuses disséminent vers les organes distants et leur survie ainsi que leur potentiel pro-métastatique peuvent être maintenus grâce aux interactions avec les niches spécialisées [Oskarsson *et al.*, 2014].

Les analyses des cellules souches cancéreuses dans les CTC sont très complexes compte tenu de la fréquence extrêmement faible de cellules souches dans le sang. De plus, leur caractérisation est d'autant plus compliquée du fait qu'il est nécessaire d'utiliser des panels de marqueurs qui diffèrent selon les tumeurs. Récemment, des études fonctionnelles ont été rapportées dans les CTC (Introduction B.3).

En conclusion, le développement de métastases est un processus extrêmement complexe résultant d'une interaction étroite entre des phénomènes de sélection clonale et des phénomènes aléatoires impliquant les cellules tumorales, leur microenvironnement et le stroma des organes à distance. Pour survivre, les cellules tumorales doivent s'adapter à leur environnement.

## B. LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES

En 1869, le médecin australien Thomas Ashworth a mis en évidence la présence de cellules inhabituelles dans le sang d'un patient atteint d'un cancer métastatique. Ces cellules n'avaient pas l'aspect des cellules hématopoïétiques normales et étaient semblables aux cellules retrouvées dans les sites tumoraux secondaires présents dans le corps de ce patient.

*« Cells identical with those of the cancer itself being seen in the blood may tend to throw some light upon the mode of origin of multiple tumours existing in the same person. »*

Il a ainsi proposé que ces cellules dérivent de tumeurs existantes et contribuent à expliquer la distribution des lésions secondaires multiples présentes chez ce patient.

*« One thing is certain, that if they came from an existing cancer structure, they must have passed through the greater part of the circulatory system to have arrived at the internal saphena vein of the sound leg. »*

Néanmoins, pendant toutes ces années, la recherche sur ces cellules tumorales circulant dans le sang n'a pas suscité l'intérêt de la communauté scientifique plus particulièrement focalisée sur la tumeur solide en elle-même. En 2004, le CellSearch (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, États-Unis) a été une véritable percée tant du point de vue technologique avec la détection des CTC que clinique avec la mise en évidence de la valeur pronostique du nombre de CTC dans certains cancers. La dernière décennie a vu l'avènement de nombreuses technologies de détection des CTC en tant que cellules entières. Les approches précédemment développées étaient des méthodes de PCR, et en particulier de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) quantitative en temps réel, basées sur l'amplification d'anomalies génétiques ou de transcrits de gènes spécifiques de tumeur ou de tissu [Mocellin *et al.*, 2006]. Depuis l'avènement du CellSearch, les recherches sur les CTC sont en pleine expansion. Les CTC sont devenues un champ d'investigation très prometteur tant pour l'intérêt clinique de ces cellules que pour une meilleure compréhension de leur rôle dans le processus de dissémination métastatique. A l'heure actuelle, la biologie des CTC est encore très mal connue.

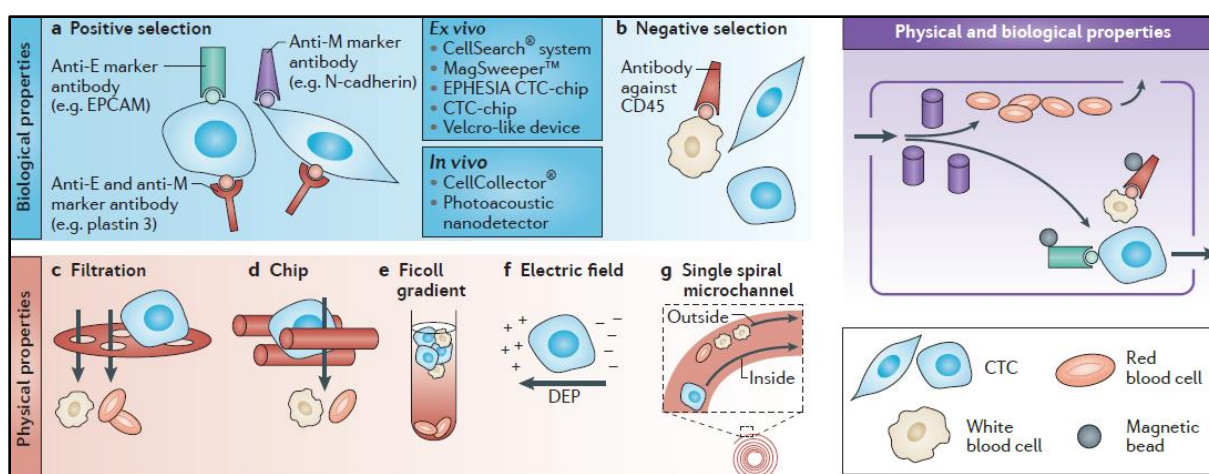
### 1. Détection et caractérisation des cellules tumorales circulantes

Du fait de la très grande rareté des CTC dans le sang périphérique (environ une CTC pour  $10^7$  lymphocytes par millilitre de sang), compter et caractériser moléculairement les CTC reste un défi technologique [van de Stolpe *et al.*, 2011]. De multiples technologies ont été développées afin de détecter les CTC. Ces technologies nécessitent un niveau de sensibilité et de spécificité élevé et requièrent deux étapes : une étape d'enrichissement suivie d'une étape de détection de ces cellules [Alix-Panabieres *et al.*, 2014]. Nos trois revues abordent la détection et la caractérisation des CTC et

sont plus particulièrement focalisées sur les CTC dans les CBNPC [Young *et al.*, 2012 ; Pailler *et al.*, 2013 ; Ross *et al.*, 2015].

### a. Méthodes d'enrichissement...

A l'heure actuelle, deux types de techniques d'enrichissement, c'est-à-dire de capture des CTC parmi les cellules hématopoïétiques, ont été développés et sont basés soit sur les caractéristiques biologiques (protéines de surface spécifiques), soit sur les caractéristiques physiques (taille, déformabilité, densité ou charge électrique) de ces cellules [Alix-Panabieres *et al.*, 2014 ; Ross *et al.*, 2015 ; Pailler *et al.*, 2013] (Figure 5).



**Figure 5. Méthodes d'enrichissement en cellules tumorales circulantes.**

Les méthodes d'enrichissement développées sont basées sur les caractéristiques biologiques, sur les caractéristiques physiques des CTC ou sur les deux combinées.

Figure reproduite avec l'autorisation de Macmillan Publishers, Nature Reviews Cancer [Alix-Panabieres *et al.*, 2014], copyright 2014.

### ...grâce aux propriétés biologiques des cellules tumorales circulantes

L'enrichissement basé sur les propriétés biologiques des cellules a largement été utilisé dans des procédures immunologiques avec des anticorps ciblant soit des antigènes tumoraux (sélection positive) soit l'antigène commun leucocytaire CD45 (*protein tyrosine phosphatase, receptor type C*, PTPRC) (sélection négative). Les systèmes immunomagnétiques ciblent un antigène avec un anticorps couplé à des billes magnétiques. Exposé à un champ magnétique, le complexe antigène-anticorps est isolé et les cellules couplées aux billes magnétiques sont ainsi capturées. La sélection positive est très souvent effectuée avec les anticorps anti-EPCAM (*epithelial cell adhesion molecule*). L'unique méthode approuvée par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*food and drug administration*, FDA) est la technologie CellSearch. Cette technologie semi-automatisée permet un

comptage reproductible des CTC après capture et caractérisation par des anticorps dirigés contre des marqueurs épithéliaux [Allard *et al.*, 2004]. Plus précisément, les CTC sont capturées à l'aide de billes magnétiques qui sont recouvertes avec un anticorps spécifique du marqueur épithélial EPCAM (clone VU1D9) puis marquées avec des anticorps anti-CK 8, 18, 19, anti-CD45 (marqueur leucocytaire permettant l'exclusion des cellules sanguines) et un marqueur nucléaire (4',6-diamidino-2-phénylindole, DAPI). Les cellules DAPI+/CD45-/CK+ sont détectées et analysées grâce à un analyseur, le CellTracks Analyzer II. Les CTC détectées par le CellSearch répondent à plusieurs critères : (i) la cellule doit être intacte avec une morphologie ronde ou ovale et de taille supérieure à 4  $\mu\text{m}$  ; (ii) avoir un noyau à l'intérieur du cytoplasme et une aire nucléaire inférieure à l'aire cytoplasmique ; (iii) être marquée positivement par les cytokératines et négativement par le CD45. Cette méthode ne s'adapte donc qu'à la détection de CTC de phénotype épithélial exprimant *EPCAM* de façon forte ou modérée, et est très peu flexible, n'autorisant qu'un seul marqueur phénotypique supplémentaire. De plus, la caractérisation moléculaire des CTC détectées par le CellSearch nécessite l'utilisation d'autres technologies et reste délicate.

Bien que de nombreuses technologies ont été et sont en cours de développement, aucune n'a actuellement le niveau de validation et de qualification du CellSearch qui permet de réaliser de grandes études multicentriques de façon fiable et reproductible. Le CellSearch reste donc aujourd'hui un standard auquel la plupart des nouvelles technologies sont comparées de façon quasi systématique. De nombreuses autres technologies basées sur un enrichissement EPCAM ont été développées notamment les puces micro-fluidiques (également appelées « laboratoire sur puce ») telles qu'Ephesia-Chip [Autebert *et al.*, 2015], CTC-chip [Nagrath *et al.*, 2007], Herringbone-chip (aussi appelé HB-Chip) (Massachusetts General Hospital Center, MA, États-Unis) [Stott *et al.*, 2010] et IsoFlux [Saliba *et al.*, 2010] (Fluxion Biosciences Inc, San Francisco, CA, États-Unis). Le dispositif MagSweeper (Stanford University, CA, États-Unis) permet d'enrichir les CTC à l'aide d'une tige magnétique recouverte de billes anti-EPCAM [Talasaz *et al.*, 2009]. Ce système a la capacité d'isoler les CTC vivantes. Le système AdnaTest permet d'enrichir les CTC par des billes magnétiques anti-MUC1 (*mucin 1*) et anti-EPCAM [Todenhofer *et al.*, 2012]. Le système GILUPI (Gilupi GmbH, Potsdam, Allemagne) quant à lui est placé directement dans la veine du patient pendant 30 minutes et permet de récupérer les CTC EPCAM positives grâce à un nano détecteur sur lequel circule environ 1,5 litres de sang [Saucedo-Zeni *et al.*, 2012].

#### ...grâce aux propriétés physiques des cellules tumorales circulantes

D'autres technologies d'enrichissement ont été développées qui ont l'avantage d'être basées sur une absence d'*a priori* sur le phénotype. Ces technologies permettent d'enrichir en CTC présentant un

phénotype EMT « hybride » ou mésenchymateux et qui ne sont pas capturées par les systèmes basés uniquement sur l'expression d'antigènes épithéliaux tumoraux. Les méthodes les plus développées permettent d'isoler les CTC en fonction de leur taille et/ou de leur déformabilité à travers un système de filtration. Ces méthodes permettent également de retenir les CTC agrégées en clusters. Plusieurs systèmes de filtration ont été développés notamment la méthode ISET (*isolation by size of tumor cells*) (RareCells Diagnostics, Paris, France) [Vona *et al.*, 2000 ; Paterlini-Brechot *et al.*, 2007], les micro-filtres développés par l'équipe de Richard J Cote [Lin *et al.*, 2010], le système ScreenCell (ScreenCell, Sarcelles, France) [Desitter *et al.*, 2011], les micro-filtres CellSieve (Creatv MicroTech Inc, Rockville, MD, États-Unis) [Adams *et al.*, 2015] et les membranes VyCAP Microsieve (VyCAP, Deventer, Pays-Bas) [de Wit *et al.*, 2015]. Ces systèmes diffèrent par plusieurs paramètres qui comprennent le matériau composant la membrane du filtre, l'espacement et la taille des pores, la nécessité de lyser ou non les érythrocytes avant la filtration et la possibilité de contrôler ou non la pression apposée sur le filtre. L'approche Clearbridge (Clearbridge Biomedics, Singapour) est basée sur une biopuce ClearCell qui utilise les propriétés physiques de taille et de déformabilité des cellules cancéreuses, qui sont considérées comme plus grandes et plus rigides que les cellules sanguines [Tan *et al.*, 2010]. La technologie Parsortix (Angle, Guildford, Royaume-Uni) est un système micro-fluidique qui permet la capture des CTC vivantes [Hvichia *et al.*, 2016]. Une autre approche largement utilisée lors de la sélection de fractions totales de cellules mononucléées est basée sur une centrifugation par gradient de densité, avec notamment l'approche Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) ou Oncoquick (Greiner Bio-One SAS, Les Ulis, France). D'autres technologies basées sur les propriétés physiques de charge électrique (*dean flow fractionation*, DFF et *dielectrophoretic field-flow fractionation*, DEP-FFF) des CTC ont été développées.

Des approches combinant l'enrichissement grâce aux caractéristiques biologiques et physiques ont également été développées comprenant notamment la puce i-CHIP qui allie le tri cellulaire hydrodynamique et la capture immunomagnétique [Ozkumur *et al.*, 2013]. La méthode combinant le RosetteSep (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) et le Ficoll-Hypaque permet quant à elle, grâce à des anticorps bispécifiques, de réticuler les cellules qui ne sont pas d'intérêt (par exemple les cellules hématopoïétiques CD45<sup>+</sup>) avec les érythrocytes afin de former des immunorosettes qui seront éliminées par centrifugation en gradient de densité.

En résumé, chaque système présente des avantages et des inconvénients qui font qu'aucune méthode à l'heure actuelle n'est un véritable « *gold standard* » dans l'isolement des CTC [Alix-Panabieres *et al.*, 2014]. La capture des CTC basée sur l'expression d'antigènes de surface associée à la tumeur comme

par exemple *EPCAM*, *MUC1* ou *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) ne permet pas de rendre compte de l'hétérogénéité tumorale. Néanmoins, cette approche peut être réalisée avec un cocktail de divers anticorps ciblant un large éventail d'antigènes mais cela engendrera une fraction enrichie en CTC moins « pure ». De nombreux systèmes sont basés sur l'hypothèse selon laquelle les CTC ont une grande taille et sont moins déformables que les cellules hématopoïétiques normales ; néanmoins, la taille des cellules tumorales varie et les CTC en EMT peuvent avoir des propriétés physiques différentes. Les systèmes micro-fluidiques ont l'avantage d'avoir des rendements élevés mais ces dispositifs posent des problèmes dans l'écoulement du sang dus notamment à la formation de bulles d'air ou aux caillots sanguins. La sélection négative quant à elle est une approche intéressante car elle a l'avantage de pouvoir couvrir l'hétérogénéité phénotypique et physique des CTC. A l'heure actuelle, mis à part le système CellSearch approuvé par la FDA, il est très difficile de déterminer quelle technique a une réelle supériorité pour capturer les CTC dans des échantillons cliniques.

À noter que cette liste ne se veut pas exhaustive mais permet d'avoir un aperçu du vaste panel de technologies proposé et développé au sein de la communauté scientifique.

#### **b. Détection et caractérisation des cellules tumorales circulantes**

Après enrichissement, les CTC peuvent être détectées par des techniques de cytométrie, d'immunocytochimie ou d'immunofluorescence avec des marqueurs spécifiques ou encore des techniques moléculaires [Krebs *et al.*, 2014].

Les approches d'amplification par RT-PCR des ARNm (acide ribonucléique messager) et plus spécifiquement de qRT-PCR, ont également été largement utilisées afin d'analyser les signatures d'expression de marqueurs spécifiques de cellules épithéliales tels que *EPCAM*, les cytokératines ou la mammoglobine [Benoy *et al.*, 2006]. Ce type d'analyse est réalisé sur du sang total d'où la nécessité d'établir une valeur seuil pour chacun des marqueurs utilisés car des niveaux faibles de transcrits peuvent être détectés dans les cellules normales hématopoïétiques. Des techniques récentes de multiplexage ont permis de détecter des marqueurs tels que *HER2* (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*) ou les récepteurs hormonaux [Fehm *et al.*, 2010].

La plupart des systèmes décrits dans la section Introduction B.1.a utilise une même étape de caractérisation qui consiste à marquer les cellules grâce à l'utilisation d'anticorps anti-CK et anti-CD45 couplés à des fluorochromes ainsi qu'avec le marqueur nucléaire DAPI. Des marqueurs spécifiques à un type tumoral peuvent être également ajoutés. Ces cellules peuvent également être caractérisées par une méthode d'analyse moléculaire qui consiste à mettre en évidence des remaniements et/ou des amplifications de gènes grâce à la technique de FISH [Leversha *et al.*, 2009 ; Swennenhuis *et al.*, 2009] ; dans le laboratoire, nous avons développé la FISH sur les cellules enrichies par filtration (FA-

FISH) [Pailler *et al.*, 2013 ; Pailler *et al.*, 2015 ; Massard *et al.*, 2016 ; Pailler *et al.*, 2016]. Des plateformes semi-automatisées ont été développées combinant l'enrichissement et la détection des CTC comme l'automate Siemens [Magbanua *et al.*, 2015] ou en combinant la détection et la caractérisation phénotypique et par FISH avec la plateforme Epic [Punnoose *et al.*, 2015]. Des systèmes automatisés de microscopie ont été développés pour détecter et caractériser les CTC [Ntouroupi *et al.*, 2008]. Nous avons récemment développé une approche de microscopie semi-automatisée permettant la digitalisation et l'analyse de ces CTC enrichies par filtration [Pailler *et al.*, 2016].

Afin de détecter des CTC viables, un test fonctionnel nommé EPISPOT (*EPithelial ImmunoSPOT*) a été développé suite à une étape d'enrichissement des CTC [Alix-Panabieres *et al.*, 2007 ; Alix-Panabieres *et al.*, 2015]. Cette méthode est basée sur un dosage immunoenzymatique qui permet de détecter les CTC qui sécrètent, clivent ou relarguent des protéines spécifiques (cytokératines, MUC1, PSA (*prostate specific antigen*)) pendant une culture à court-terme de 24 heures à 48 heures sur une membrane de nitrocellulose [Deneve *et al.*, 2013 ; Ramirez *et al.*, 2014]. Les protéines sécrétées sont capturées par les anticorps présents sur la membrane puis les protéines cibles sont détectées par immunofluorescence. Ce test est quantitatif et qualitatif. Seules les cellules viables peuvent donc être identifiées car elles produisent et sécrètent une quantité suffisante de protéines contrairement aux CTC apoptotiques [Alix-Panabieres *et al.*, 2009].

Au départ, la plupart des analyses moléculaires a été réalisé sur l'ADN ou l'ARN d'une fraction enrichie en CTC ; ce type d'analyse ne permet pas d'évaluer l'hétérogénéité tumorale et la sensibilité est limitée du fait de l'importante contamination de cellules hématopoïétiques. Punnoose *et al.* ont analysés les mutations d'*EGFR*, *KRAS* (*KRAS proto-oncogene*), *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene*), *NRAS* (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), *ALT1* (*glutamic--pyruvic transaminase*) et *PI3KCA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) chez des patients atteints de CBNPC après enrichissement des CTC par le CellSearch. Seulement une mutation dans le gène *EGFR* a été détectée chez un patient parmi les huit présentant des mutations *EGFR* dans la tumeur biopsiée [Punnoose *et al.*, 2010]. Ces résultats confirment la difficulté à détecter des anomalies génétiques dans une fraction enrichie de CTC. L'analyse génomique des CTC à l'échelle de cellule unique permet de limiter la contamination par les cellules hématopoïétiques mais également d'évaluer l'hétérogénéité tumorale. Étant donné qu'une cellule contient environ 6,6 pg d'ADN, une amplification totale du génome (*whole genome amplification*, WGA) est nécessaire. Le WGA doit être fiable et uniforme afin de pouvoir réaliser des analyses moléculaires approfondies. La preuve de concept de ce type d'analyse a été

réalisée dans le cancer colorectal [Gasch *et al.*, 2013]. Gash *et al.* ont isolés des CTC par micromanipulation après enrichissement par le système CellSearch. Après amplification du génome, des *hotspots* de mutations (*PI3KCA*, *KRAS* et *BRAF*) ont été analysés par séquençage Sanger. Des mutations *KRAS* ont été détectées dans les CTC d'un patient avec une concordance de 100 % avec la tumeur biopsiée. Des mutations *PI3KCA* ont été identifiées chez quatre patients ; chez un patient, deux mutations distinctes ont été détectées dans des CTC différentes ce qui démontre la capacité des CTC à apporter des éléments sur l'hétérogénéité mutationnelle. Après caractérisation par immunomarquage des CTC, il est possible de les caractériser d'un point de vue moléculaire. L'isolement manuel par micromanipulation est possible mais reste une technique délicate et fastidieuse, susceptible d'erreurs. Des systèmes automatisés de sélection de cellule unique ont été développés avec notamment le DEPArray (Silicon Biosystems, Bologne, Italie) qui permet de séparer, trier et récupérer les CTC à partir d'une population cellulaire en suspension. Les cellules sont isolées grâce à un principe d'électrocinétique appelé DEP (*dielectrophoresis*) [Fabbri *et al.*, 2013]. L'isolement des CTC peut également être réalisé par microdissection laser de filtres après enrichissement par filtration ou encore par tri cellulaire.

L'analyse à l'échelle de cellule unique nécessite après WGA, des techniques de génotypage sensibles et robustes ainsi qu'une analyse bio-informatique développée pour ce type d'approche. Pour chaque type de WGA, il est néanmoins nécessaire de faire la part des choses entre les polymorphismes, les altérations génétiques tumorales et celles dues aux erreurs de WGA (biais d'amplification ou encore distorsion allélique). Des contrôles internes comme les lymphocytes et/ou l'ADN constitutionnel du patient sont nécessaires. La question reste de savoir combien de CTC doivent être analysées afin d'avoir un « *snapshot* » de la maladie à l'instant du prélèvement selon le type de cancer et la méthode utilisée.

L'analyse transcriptomique d'une CTC unique reste quant à elle encore un véritable défi dû notamment à la conservation de l'ARN. Dans une étude menée dans le mélanome, Ramsköld *et al.* rapportent le développement du Smart Seq, une approche de séquençage de l'ARNm sur cellule unique reproductible et présentant une faible variation technique [Ramsköld *et al.*, 2012]. Les transcrits fortement exprimés ont été détectés et les profils d'expression des CTC sont similaires à ceux des mélanocytes et des lignées cellulaires de mélanome. Les profils d'expression des leucocytes sont quant à eux très différents. Dans les CTC, les antigènes associés au mélanome et aux marqueurs du cycle cellulaire sont fortement transcrits tandis que les gènes associés à la régulation de la mort cellulaire et au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I sont retrouvés à des niveaux faibles, ce qui laisse penser que les CTC contournent la mort cellulaire et la détection par le système immunitaire. Une étude similaire a été rapportée sur le séquençage des ARNm dans des CTC enrichies par la technologie



MagSweeper chez des patients atteints de cancer métastatique de la prostate [Cann *et al.*, 2012]. Dans des lignées cellulaires, cette technologie a peu d'impact sur les profils d'expression des gènes. En comparaison avec du tissu prostatique normal, 181 gènes sont surexprimés dans les CTC notamment des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore l'adhésion cellulaire. Ces études montrent la possibilité de réaliser des profils transcriptomiques sur des CTC uniques bien que les techniques ne soient pas encore optimisées.

L'apport des profils d'expression génique et protéique des CTC pourrait permettre une meilleure compréhension de l'hétérogénéité tumorale mais également de l'évolution de la maladie grâce à des prélèvements séquentiels. Cependant, quelle que soit la technologie et afin qu'elle puisse être utilisée en clinique, une validation robuste doit être réalisée pour vérifier sa reproductibilité et sa fiabilité. Pour cela, des études multicentriques prospectives doivent être mises en place.

***c. Analyses comparatives des approches basées sur des propriétés biologiques et sur les propriétés physiques des cellules tumorales circulantes : exemple du CellSearch versus ISET***

Comme certaines autres équipes, notre laboratoire a mené en 2011 une étude afin de comparer les deux systèmes CellSearch et ISET dans trois types de cancers métastatiques (sein, prostate et poumon) [Farace *et al.*, 2011]. L'intérêt essentiel de cette étude était d'évaluer le potentiel des deux techniques qui ont un principe d'enrichissement différent comme décrit dans la section ci-dessus. La performance technique de chaque système peut dépendre des caractéristiques intrinsèques de chaque tumeur. Afin de pallier cette différence, l'étude a été menée chez 60 patients atteints de cancers métastatiques du sein, de la prostate et du poumon. Les nombres de CTC ont été évalués de façon standard par la méthode CellSearch. Pour l'approche de filtration ISET, les cellules retenues sur les filtres ont été caractérisées avec un anticorps dirigé contre la cytokératine 7 (cancers du poumon et du sein) ou contre l'alpha-méthylacyl coenzyme A racémase (cancer de la prostate). Les CTC isolées par ISET ont été dénombrées en combinant l'approche cytomorphologique et le marquage en immunocytochimie. Des résultats concordants ont été observés chez 55 % des patientes atteintes de cancer du sein, 60 % des patients atteints de cancer de la prostate mais seulement 20 % des patients atteints de cancer du poumon. Globalement, un nombre de CTC sensiblement plus élevé est observé dans le cancer du sein avec l'approche CellSearch tandis que la tendance est inversée pour les cancers de la prostate et du poumon. Ces résultats sont particulièrement marqués dans le cancer du poumon puisque 55 % des patients ne présentent aucune CTC détectable par le CellSearch alors que l'ensemble des patients ont des CTC avec l'approche ISET. Ces données montrent que les nombres de CTC comptés dépendent fortement de la méthode d'énumération choisie, elle-même très dépendante

du type de cancer étudié. Le groupe de Paul Hofman a également mené une étude comparative – CellSearch *versus* ISET en combinaison avec l'immunocytochimie – chez des patients atteints de CBNPC en situation préopératoire [Hofman *et al.*, 2011]. Des CTC ont été détectées dans 69 % des prélèvements de patients par le CellSearch et/ou l'ISET ; dans 50 % des cas des CTC ont été détectées par ISET et dans 39 % des cas par CellSearch. L'équipe de Caroline Dive a également rapporté en 2012 des taux de CTC détectées plus élevés par l'approche ISET que par le CellSearch [Krebs *et al.*, 2012]. Au sein d'une cohorte de 40 patients atteints de CBNPC de stade IIIA ou IV, des CTC ont été détectées chez 80 % des patients par l'approche ISET et seulement chez 23 % des patients par le CellSearch. Une partie des CTC isolées par l'approche ISET n'exprimaient pas de marqueurs épithéliaux. Des clusters de CTC ont également été observés chez 43 % des patients mais n'ont pas été détectés par l'approche CellSearch. L'ensemble de ces résultats suggère que la mauvaise performance du CellSearch dans certains types de cancers pourrait être due au processus d'EMT. Hofman *et al.* ont rapporté la présence de CTC vimentine positive chez 11 % des patients [Hofman *et al.*, 2011]. L'équipe de Caroline Dive a également observé dans la même tumeur la présence de CTC ayant perdu la E-cadhérine et produisant la vimentine, la N-cadhérine [Hou *et al.*, 2011]. Notre équipe a mis en évidence chez des patients atteints de CBNPC métastatiques un contingent de CTC hybrides co-exprimant fortement des cytokératines et la vimentine [Lecharpentier *et al.*, 2011]. Aucune CTC exclusivement des cytokératines n'a été détectée ; des CTC exclusivement vimentines ont été détectées. Les taux plus élevés de CTC détectées par un enrichissement par filtration ISET ont orienté le choix de cette technique pour les analyses moléculaires menées au laboratoire dans les CBNPC et le cancer de la prostate.

## **2. Pertinence clinique des CTC**

De nombreuses études ont évalué l'utilité clinique de l'énumération de CTC en tant que biomarqueurs pronostique, prédictif et pharmacodynamique.

### **a. La valeur pronostique des CTC**

De larges études, dont les principaux résultats sont brièvement résumés ci-dessous, ont montré que les taux de CTC détectés par CellSearch (soit dans un volume de 7,5 mL de sang) ont un véritable intérêt clinique dans de nombreux cancers métastatiques.

Le cancer du sein est probablement le cancer où l'utilisation des CTC est la plus documentée. L'étude multicentrique princeps incluait 177 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. Les patientes ayant au moins cinq CTC détectées avant de débiter une nouvelle ligne de traitement ont un mauvais

pronostic avec une survie sans progression (*progression-free survival*, PFS) et une survie globale (OS) significativement plus courtes que les patientes avec moins de cinq CTC [Cristofanilli *et al.*, 2004]. Le nombre de CTC avant traitement est donc un facteur pronostique indépendant pour la PFS et l'OS dans les cancers du sein métastatiques. Des résultats similaires ont également été observés chez des patientes nouvellement diagnostiquées [Cristofanilli *et al.*, 2005]. La plupart des premières études ont été réalisées avec des cohortes de patientes présentant un stade avancé de la maladie. Il a été montré que les patientes ayant un cancer métastatique ont des nombres de CTC significativement plus élevés que ceux observés chez des patientes ayant un cancer localisé [Bidard *et al.*, 2014 ; Rack *et al.*, 2014]. Néanmoins, Pierga *et al.* ont étudié la présence de CTC dans le sang de patientes atteintes de cancer du sein opérable, avant et après une chimiothérapie néo-adjuvante [Pierga *et al.*, 2008]. Les résultats montrent que la détection de CTC, avant et/ou après chimiothérapie néo-adjuvante, est associée à un plus grand risque de rechute métastatique précoce et que le seuil de cinq CTC ne semble pas adapté car les analyses ont révélé un nombre plus faible de CTC dans ces échantillons [Rack *et al.*, 2014]. La méta-analyse menée par François-Clément Bidard et Jean-Yves Pierga montre que la détection des CTC chez 2000 patientes atteintes de cancer du sein avancé est un indicateur clé du taux de survie après traitement et que les variations en cours de traitement sont associées à l'efficacité de ces traitements [Bidard *et al.*, 2014].

Dans une étude pilote menée chez des patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration, Moreno *et al.* ont montré que l'OS des patients avec au moins cinq CTC était plus courte que pour ceux avec moins de cinq CTC [Moreno *et al.*, 2005]. Le nombre de CTC avant et après traitement a ensuite été cliniquement confirmé comme un marqueur indépendant de pronostic [de Bono *et al.*, 2008 ; Olmos *et al.*, 2009]. De plus, la valeur prédictive des CTC est supérieure au marqueur PSA classiquement mesuré dans les cancers prostatiques. Une étude récemment publiée du laboratoire rapporte que l'OS des patients présentant des CTC vimentines positives ou Ki67 positives est significativement diminuée [Lindsay *et al.*, 2016].

Des études dans le cancer colorectal ont également montré que les CTC sont un facteur pronostique. Une étude multicentrique incluant 430 patients indique que les patients avec au moins 3 CTC / 7,5 mL de sang ont une PFS et une OS significativement plus courtes que ceux avec moins de trois CTC [Cohen *et al.*, 2008].

Grâce à la robustesse et à la standardisation de la méthode CellSearch et en dépit des limites précisées dans la section Introduction B.1, les taux de CTC mesurés par cette approche sont un puissant biomarqueur pronostique dans plusieurs cancers métastatiques. L'utilisation du CellSearch est approuvée par la FDA dans les cancers métastatiques du sein, de la prostate et du colon ( $\geq 5$  CTC / 7,5 mL de sang dans les cancers du sein et de la prostate et  $\geq 3$  CTC / 7,5 mL de sang dans

le cancer du côlon) comme un marqueur indépendant de pronostic permettant d'identifier quel que soit le type de traitement des patients à haut risque de progression et avec une survie diminuée. Grâce aux nombreuses validations cliniques réalisées dans le cancer du sein, les CTC dans ce type de cancer ont été ajoutées en 2010 dans la nouvelle édition du manuel de stratification pathologique TNM (*tumor, node, metastasis*) des cancers avec la classification cM0(i+) c'est-à-dire qu'il n'y a pas de signes cliniques indiquant la présence de métastases mais des cellules tumorales sont détectées dans le sang, la moelle osseuses ou les ganglions lymphatiques [Bidard *et al.*, 2009 ; Alix-Panabieres *et al.*, 2014]. L'objectif de cette section n'est pas de faire une revue exhaustive de la littérature. Il est néanmoins important de noter que les CTC ne sont actuellement pas utilisées en routine clinique. Jean-Yves Pierga et François-Clément Bidard ont mis en place deux essais cliniques (essai STIC CTC et essai CirCé 01) permettant de comparer la prise en charge habituelle et celle guidée par la quantification des CTC chez des patientes atteintes de cancer du sein [Bidard *et al.*, 2013]. Les résultats de ces études prévus dans les deux prochaines années pourraient permettre d'envisager l'utilisation des CTC en routine [Bidard *et al.*, 2016].

Alors que différents travaux convergent pour montrer une faible sensibilité du CellSearch dans le cancer métastatique du poumon, le groupe de Caroline Dive a rapporté deux études montrant la valeur pronostique des CTC dans les CBPC ( $\geq 50$  CTC / 7,5 mL de sang) et les CBNPC ( $\geq 5$  CTC / 7,5 mL de sang) [Hou *et al.*, 2011 ; Krebs *et al.*, 2011].

Au-delà de l'utilisation du nombre de CTC en tant que biomarqueur pronostique, le suivi de ces CTC peut également être un biomarqueur pharmacodynamique. Par exemple, dans une étude de suivi longitudinale des CTC chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, Hayes *et al.* ont démontré que la diminution des CTC en dessous du seuil de 5 CTC / 7,5 ml de sang était associée à une meilleure PFS et OS [Hayes *et al.*, 2006]. Dans les CBPC, le nombre de CTC diminue sensiblement après un cycle de chimiothérapie et ce changement dynamique est associé de façon indépendante à un bon pronostic [Hou *et al.*, 2012].

### **b. Les CTC : une « biopsie liquide » en temps réel ?**

Un des enjeux actuels est de pouvoir utiliser les CTC comme une « biopsie liquide » qui permettrait de sélectionner un traitement personnalisé sur la base des caractéristiques (expression et/ou statut génomique) de la tumeur détectées grâce aux CTC et reflèterait la tumeur dans sa globalité. Le groupe de Daniel Haber a rapporté le géotypage des mutations activatrices du gène *EGFR* dans le cancer du poumon grâce à l'utilisation d'une puce microfluidique pour l'enrichissement des CTC combinée avec une détection par PCR [Maheswaran *et al.*, 2008]. Ils ont identifié dans les CTC de 19 des 20 patients positifs dans la tumeur biopsiée, les mutations activatrices d'*EGFR* c'est-à-dire les délétions dans

l'exon 19 et la mutation L858R. De plus, la mutation de résistance EGFR T790M a été détectée dans les CTC de 11 patients parmi 20, ce qui démontre la possibilité d'analyser les CTC sous traitement. Ainsi, cette première étude présente la possibilité d'identifier dans les CTC des biomarqueurs de sensibilité. D'autres études ont évalué l'utilisation des CTC pour détecter des biomarqueurs de sensibilité notamment avec l'expression de HER2 dans le cancer du sein [Liu *et al.*, 2013] ou l'expression du récepteur aux androgènes ou le remaniement *ERG* (*ETS transcription factor*) dans le cancer de la prostate [Attard *et al.*, 2009 ; Leversha *et al.*, 2009 ; Massard *et al.*, 2016]. Dans le cancer du sein, une discordance entre le statut HER2 de la tumeur (négative) et des CTC (positives) a été rapportée ; ces patientes bénéficient toujours de la thérapie ciblée trastuzumab. Ces résultats suggèrent que les caractéristiques propres aux CTC pourraient être plus pertinentes à un instant *t* que celles de la tumeur biopsiée. Trois équipes incluant celles de Paul Hofman, de Chwee Teck Lim et la nôtre, ont rapporté la détection du remaniement *ALK* dans les CTC chez des patients atteints de CBNPC métastatiques [Ilie *et al.*, 2012 ; Tan *et al.*, 2016 ; Pailler *et al.*, 2013]. Nous avons également rapporté la détection du remaniement *ROS1* dans les CTC chez des patients atteints de CBNPC métastatiques [Pailler *et al.*, 2015]. Très récemment, Zhang *et al.* ont rapporté dans un *case report* la détection du remaniement *ALK* et de la mutation de résistance au TKI crizotinib L1196M dans des CTC mises en culture à court terme chez un patient atteint de CBNPC porteur du remaniement [Zhang *et al.*, 2016]. Néanmoins, des études robustes évaluant la détection de marqueurs de sensibilité dans les CTC sont rares. L'émergence du génotypage à l'échelle « cellule unique » permettra prochainement d'évaluer la pertinence de l'hétérogénéité des CTC.

### **3. Modèles *in vivo* et *in vitro* développés à partir de cellules tumorales circulantes**

L'établissement de modèles murins xéno greffés à partir de CTC (*CTC derived explant*, CDX) ou de lignées cellulaires établies à partir de CTC sont des outils très prometteurs tant pour l'apport en clinique que pour la compréhension des mécanismes de la progression métastatique et la capacité des CTC à initier des tumeurs. En effet, ce type d'analyses n'est pas réalisable sur de petits nombres de CTC ; les modèles ouvrent donc de nouvelles perspectives.

La première étude fonctionnelle avec des CTC a été rapportée en 2013 par le groupe d'Andreas Trumpp dans le cancer du sein [Baccelli *et al.*, 2013]. Les prélèvements sanguins de 110 patientes atteintes de cancer du sein métastatique ont été recueillis et les CTC ont été enrichies par déplétion négative de type RosetteSep. La fraction enrichie a été injectée dans des souris immunodéprimées au niveau de la cavité médullaire du fémur. Dans trois souris xéno greffées, des

métastases osseuses, pulmonaires et hépatiques ont été détectées. Les prélèvements ayant permis la formation de xénogreffes contenaient plus de 1000 CTC dans 7,5 mL de sang, énumérées par la méthode CellSearch. Cette étude est la première confirmation qu'une sous-population de CTC possède des capacités tumorigéniques. Néanmoins, l'efficacité du modèle est faible car pour l'ensemble des prélèvements contenant moins de 1000 CTC dans 7,5 mL de sang, aucune xénogreffe n'a pu être obtenue. L'analyse par FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) du sang d'un prélèvement ayant donné une xénogreffe a permis de mettre en évidence une sous-population de CTC CD45-/EPCAM+/CD44+/CD47+/c-MET+ (*MET proto-oncogene*) qui a probablement permis la formation de métastases. Cependant, les auteurs soulignent que d'autres phénotypes de CTC peuvent avoir des capacités de cellules initiatrices de tumeur notamment les CTC EPCAM négatives. Ce dernier point a été confirmé par Zhang *et al.* qui ont démontré les caractéristiques « cellules souches » d'une sous-population de CTC EPCAM négatives dans un modèle à court terme de culture primaire *in vitro* [Zhang *et al.*, 2013]. L'établissement de CDX peut également permettre d'envisager un autre aspect de la « biopsie liquide ». En effet, l'émergence des modèles murins de xénogreffes dérivés de CTC sont cliniquement pertinents et peuvent permettre le développement et l'exploitation de ce type de modèles pour tester la sensibilité aux drogues des tumeurs. Le groupe de Caroline Dive a rapporté récemment l'établissement de modèles murins de xénogreffes à partir de CTC de patients atteints de CBPC chimio-sensibles ou non. Les tumeurs miment la réponse des patients à la chimiothérapie [Hodgkinson *et al.*, 2014]. Ce même groupe a rapporté en 2016 le premier modèle murin de xénogreffe à partir de CTC d'un patient atteint d'un CBNPC alors qu'aucune CTC n'était détectable par la méthode CellSearch [Morrow *et al.*, 2016]. Également, Girotti *et al.*, ont rapporté le développement de CDX à partir de CTC de patients atteints de mélanome [Girotti *et al.*, 2016].

D'autre part, le groupe de Catherine Alix-Panabières a rapporté l'établissement d'une lignée cellulaire à partir de la fraction enrichie en CTC d'un prélèvement de patient atteint d'un cancer du côlon [Cayrefourcq *et al.*, 2015]. Cette lignée a un pouvoir tumorigénique lorsqu'elle est injectée dans des souris SCID (*severe combined immunodeficiency*). De plus, les cellules ont des propriétés épithéliales avec des caractéristiques « cellules souches », un phénotype « hybride » c'est-à-dire à un stade intermédiaire de l'EMT et un potentiel pour induire *in vitro* l'angiogenèse. La lignée présente les mêmes caractéristiques que la tumeur primaire et les métastases ganglionnaires du patient dont elle est issue.

**REVUE 1. Circulating Tumor Cells in Lung Cancer  
(Acta Cytologica, 2012;56(6):655-60).**

Publication reproduite avec l'autorisation de Karger Material, Acta Cytologica, copyright 2012.

**REVUE 2. Cellules Tumorales Circulantes : isolement, caractérisation et intérêt en clinique  
(Correspondance en Onco-Théranostic, 2013 Oct.-Nov.-Déc. Vol. II n°4 p 162-167)**

Publication reproduite avec l'autorisation de Edimark SAS, Correspondance en Onco-Théranostic, copyright 2013.

**REVUE 3. Clinical utility of circulating tumor cells in *ALK*-positive non-small-cell lung cancer  
(Frontiers in Oncology, 2014 Nov 5;4:281).**

Publication en *open-access*.

**REVUE 4. The potential diagnostic power of circulating tumor cells for non-small-cell lung cancer  
(Expert Review of Molecular Diagnostic, 2015;15(12):1605-29).**

Publication reproduite avec l'autorisation de Taylor & Francis, Expert Review of Molecular Diagnostic, copyright 2015.

# Circulating Tumor Cells in Lung Cancer

Rachel Young<sup>a, b</sup> Emma Pailler<sup>a, b</sup> Fanny Billiot<sup>a, b</sup> Françoise Drusch<sup>c, d</sup>  
Amélie Barthelemy<sup>a</sup> Marianne Oulhen<sup>c, d</sup> Benjamin Besse<sup>b, e</sup>  
Jean-Charles Soria<sup>b, e</sup> Françoise Farace<sup>a, b, d</sup> Philippe Vielh<sup>c, d, f, g</sup>

<sup>a</sup>Biology of Circulating Cells Unit, <sup>b</sup>INSERM U981, <sup>c</sup>Histo-Cyto-Pathology Unit, <sup>d</sup>Translational Research Laboratory, <sup>e</sup>Department of Medicine, <sup>f</sup>Biobank, and <sup>g</sup>Department of Biopathology, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

© **Free Author Copy – for personal use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact [permission@karger.ch](mailto:permission@karger.ch)

## Key Words

Lung cancer · Circulating tumor cells · Cytology · Rare cells

## Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) have emerged as potential biomarkers in several cancers such as colon, prostate, and breast carcinomas, with a correlation between CTC number and patient prognosis being established by independent research groups. The detection and enumeration of CTCs, however, is still a developing field, with no universal method of detection suitable for all types of cancer. CTC detection in lung cancer in particular has proven difficult to perform, as CTCs in this type of cancer often present with nonepithelial characteristics. Moreover, as many detection methods rely on the use of epithelial markers to identify CTCs, the loss of these markers during epithelial-to-mesenchymal transition in certain metastatic cancers can render these methods ineffective. The development of personalized medicine has led to an increase in the advancement of molecular characterization of CTCs. The application of techniques such as FISH and RT-PCR to detect *EGFR*, *HER2*, and *KRAS* abnormalities in lung, breast, and colon cancer, for example, could be used to characterize CTCs in real time. The use of CTCs as a ‘liquid biopsy’ is therefore an exciting possibility providing information on

patient prognosis and treatment efficacy. This review summarizes the state of CTC detection today, with particular emphasis on lung cancer, and discusses the future applications of CTCs in helping the clinician to develop new strategies in patient treatment.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Circulating tumor cells (CTCs) have recently emerged as important potential biomarkers of patient prognosis in several epithelial cancers including lung carcinoma [1]. Since CTCs are cells shed from the primary tumor that circulate in the peripheral blood, their detection and quantification can give important information on tumor prognosis and, potentially, response to treatment [1]. It is now well accepted that CTCs also play a crucial role in metastasis formation, acting as a vector to establish a new malignancy in a distant site. The ‘seed and soil’ hypothesis, already proposed by Paget [2] in the late nineteenth century, described metastasis development by way of a

F. Farace and P. Vielh contributed equally to this work.

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2012 S. Karger AG, Basel  
0001-5547/12/0566-0655\$38.00/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/acy](http://www.karger.com/acy)

Correspondence to: Dr. Philippe Vielh  
Institut de Cancérologie Gustave Roussy  
114, rue Edouard Vaillant  
FR-94805 Villejuif Cedex (France)  
E-Mail [philippe.vielh@igr.fr](mailto:philippe.vielh@igr.fr)



tumor 'seed' that is capable of establishing tumors in the 'soil' of distant tissues. As CTCs form an intermediate between the primary tumor and metastases, they have the potential to act as a surrogate marker easily accessible through the blood. Although the number of CTCs in the blood is very low, i.e. as few as 1 CTC per  $10^6$  or  $10^7$  leukocytes, thus making their detection difficult, increasingly sensitive methods of detection have made their identification more feasible. The enumeration of CTCs in patients with metastatic carcinomas has revealed a correlation between the number of CTCs and disease prognosis, with an elevated level of CTCs in the blood being correlated with a poor patient prognosis [3–8]. In addition, CTCs can be detected in the blood before and after treatment, or during treatment to follow the progress of patients in response to therapy, allowing oncologists to monitor the disease state.

This paper is a brief overview of recent results, including our own, obtained in the field of CTCs in lung cancer. We also describe the potential future impact of their identification and characterization, using morphological and molecular methods, to guide clinicians to better treatment strategies.

### CTCs in Lung Cancer

Biopsies obtained from lung cancer patients are sometimes of poor quality. In addition, the need to perform repeat biopsies in patients, particularly in the case of developed resistance to treatment, has been highlighted in recent years. Biopsies are performed to facilitate further analysis of the tumor during its evolution and re-orientate the treatment strategy. In this setting, a noninvasive tool such as the study of CTCs could provide crucial information in the evaluation of the treatment response.

Studies on CTC detection in non-small cell lung cancer have identified a correlation between disease stage and number of CTCs, with a baseline of 5 CTCs per 7.5 ml of blood collected in the prediction of disease outcome: patients presenting more than 5 CTCs having a poorer prognosis than those presenting fewer than 5 [9]. In patients with small cell lung cancer, this baseline number of CTCs is 50 per 7.5 ml of blood and patients presenting with more than 50 CTCs per 7.5 ml blood have an overall survival (OS) of 5.4 months, whereas those with less than 50 CTCs have an OS of 11.5 months before chemotherapy [10].

Hybrid CTCs expressing both epithelial (cytokeratins) and mesenchymal (vimentin) cell markers have been

identified in patients with non-small cell lung carcinomas [11]. The characteristics of these CTCs make their detection by methods relying on EpCAM expression limited. We have compared the detection of CTCs in metastatic carcinomas by two different methods: one based on morphological features (isolation by size of epithelial tumor cells; ISET) and another based on EpCAM expression (CellSearch) [12]; these methods are described in more detail later. This study found more CTCs identified by the ISET method compared to CellSearch, with only 55% of patients negative for CTCs compared with 100% positive by ISET. Hofman et al. [13] compared the CellSearch and ISET methods to detect CTCs in patients with non-small cell lung cancer. The methods were either directly compared or used in combination to detect CTCs. They achieved the highest detection rate when the CellSearch and/or ISET methods were used (69%), followed by the ISET method alone (50%) or the CellSearch method alone (39%), and they concluded that combining the two methods could be more efficient than using only one. A very recent study by Krebs et al. [14] comparing the CellSearch and ISET methods in non-small cell lung cancer identified circulating tumor microemboli (CTM) in 38% of patients using ISET compared to no CTM detected by CellSearch. CTM are clusters of tumor cells found in the blood of patients suffering from different types of cancer. This phenomenon is thought to be a result of collective cell migration and a precursor to mechanisms of metastasis. In vivo studies have shown that injection of CTM in mice resulted in more metastases than injection of CTCs. CTM may have a survival advantage over single CTCs as they can escape cell anoikis due to their maintained cell contact.

### Difficulties in CTC Detection

Metastatic disease is responsible for over 90% of cancer-related deaths [15, 16]. A crucial step in the development of metastatic disease is the release and survival of tumor cells in the peripheral blood [17]. CTCs are disseminated from the primary tumor through the blood as a heterogeneous population of rare cells. Surviving CTCs successful in establishing distant metastatic disease are rare within an already rare population of CTCs. In a study reported in 1970 by Fidler [18], tumor cells administered intravenously in preclinical models showed only 0.1% viability after 24 h, and of these remaining viable cells less than 0.01% were capable of producing metastases. It is also believed that a subpopulation of CTCs with

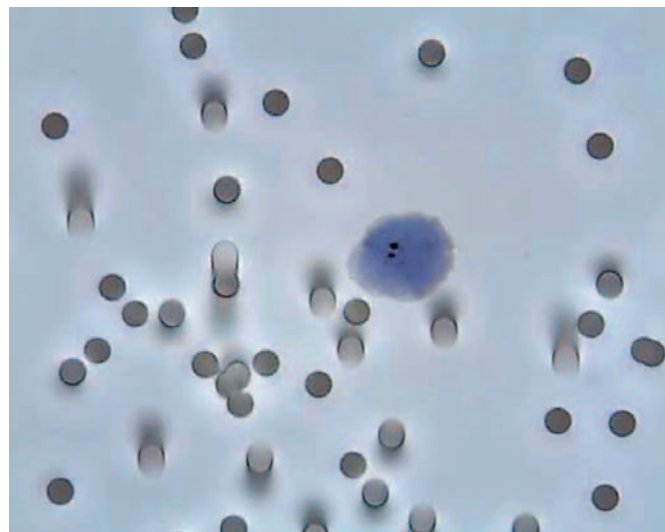
greater metastatic potential exists. In most carcinomas, tumor progression follows a loss of epithelial cell characteristics and a shift towards a mesenchymal phenotype [19, 20]. Experimental data suggests that biological processes associated with the acquisition of cancer stem cell properties and resistance to conventional therapy, such as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), may contribute to generate more aggressive subpopulations of CTCs [19, 21]. Tumor cells may undergo a reversible EMT by losing their epithelial characteristics and taking on a mesenchymal phenotype allowing them to enter the bloodstream and then may revert back to an epithelial phenotype on extravasation in a distant tissue (mesenchymal-to-epithelial transition) [22, 23]. Even hybrid CTCs expressing both epithelial and mesenchymal genes have been identified [11]. This dual epithelial-mesenchymal phenotype was observed in the majority of isolated or clustered CTCs detected in the non-small cell lung cancer patient cohort used in our study, suggesting that EMT is a relevant process for invasion and metastasis in these patients [11].

### Methods of CTC Detection

Detection of CTCs can be used to monitor tumor response to therapy, or in the selection of the appropriate therapy. Methods of enrichment and detection are based on either morphology of the CTCs, molecular biomarkers, antigens expressed, or a combination of these characteristics.

CTC enrichment methods based on their morphology include density gradient separation such as Ficoll [24], Oncoquick [25], or RosetteSep [26]. These methods separate CTCs and mononuclear cells from other blood cells based on their size using density gradient centrifugation. Ficoll gradients separate CTCs from other blood components in the peripheral blood mononuclear cell layer of the gradient. Further enrichment of CTCs can be achieved using magnetic beads coated with antibodies against epithelial cell markers such as EpCAM. Oncoquick uses a liquid separation medium that has been optimized to enrich CTCs based on their buoyant density. This technique has been shown to give a higher recovery rate of CTCs than Ficoll [27]. RosetteSep enriches CTCs in the blood by negative selection or depletion of blood cells using tetrameric antibody complexes that cross-link with blood cells causing rosettes, which are eliminated in a Ficoll gradient.

The ISET method isolates CTCs by filtration based on their large size ( $>8 \mu\text{m}$ ) compared to leukocytes using



**Fig. 1.** Microscopic analysis of hematoxylin-stained CTCs from a lung cancer patient after ISET filtration. CTCs are identified by certain cytomorphological criteria: nuclear size equal to or larger than 2 pores ( $16 \mu\text{m}$ ), irregularity of the nuclear contour, presence of a visible cytoplasm, and a high nucleus-to-cytoplasm ratio.

microporous polycarbonate filters (Metagenex). Once enriched by filtration, CTCs can be detected by immunocytological or immunofluorescent techniques. An example of hematoxylin-stained ISET-filtered CTCs from a lung cancer patient is shown in figure 1. As ISET is not a closed system, several different markers can be tested on cells isolated by this method, allowing the EMT phenomenon, observed in malignant tumors such as lung cancer, to be considered when identifying CTCs. After comparison of ISET with techniques dependent on the use of epithelial cell markers to identify CTCs, ISET has been shown to more efficiently detect CTCs in distinct types of cancers [12].

The CellSearch system (Veridex, Warren, N.J., USA) uses anti-EpCAM, anti-cytokeratin, and anti-CD45 antibodies to detect CTCs. It is the only assay approved by the US Food and Drug Administration to monitor patients with metastatic breast, colon, and prostate cancer. This system allows the enumeration of CTCs by semiautomated immunomagnetic enrichment and cytometric imagery. The criteria for detection of CTC by CellSearch are mainly based on the size of the cytokeratin fluorescent signal which should be superior to  $4 \mu\text{m}$  in diameter and superpose the DAPI signal which should be at least 50% inside the cytokeratin signal. Several research groups have shown an association between CTC counts and patients' clinical outcomes using the CellSearch system [3,

4, 7]. A study testing the external quality assurance of the CellSearch system, comparing the same 6 blood samples in 14 different laboratories, revealed that shipment and storage and instrument or assay variation was low, indicating high reproducibility of the analyses [28]. However, interlaboratory variation ranged from 45 to 64%, apparently due to problems arising from image interpretation.

The CellSearch system detects CTCs expressing epithelial cell markers such as EpCAM and various cytokeratins. Therefore, CTCs that have mostly or partially lost their epithelial features such as hybrid CTCs, which we recently identified in patients with metastatic non-small cell lung cancer [11], may be difficult or impossible to detect using the CellSearch system.

We have previously compared the ISET technique to the CellSearch system to detect CTCs from patients with metastatic carcinomas of breast, prostate, and lung origins [12]. This comparison highlighted important discrepancies in CTC detection between the two methods, with the differences being mainly tumor dependent. The CellSearch system showed limitations to detect CTCs in patients with metastatic lung and prostate cancer, as CTC capture is limited to EpCAM-positive cells. A recent study by Hofman et al. [13] detected a significant proportion of CTCs co-expressing cytokeratins and vimentin or vimentin alone using ISET filtration on blood samples from patients with resectable lung cancer. Perhaps the adaptability of the ISET system to different markers makes it a more attractive strategy in the detection of heterogeneous CTCs.

Microfluidic techniques use filters coated with anti-EpCAM antibody to capture epithelial cells in a blood sample. The captured cells can then be tested for cytokeratins, DAPI, and CD45 expression by immunofluorescence. This technique was used to isolate CTCs from the blood of patients with non-small cell lung cancer by Maheswaren et al. [8]. The CTCs collected were then analyzed by allele-specific PCR to detect *EGFR* mutations and compared to mutations present in primary tumors. The CTCs captured were also monitored for changes in tumor genotype during the course of treatment and this revealed the acquisition of *EGFR* mutations in some patients posttreatment. This work should be reproduced to confirm these results.

In a study by Katz et al. [29] in 2010, an antigen-independent FISH-based method was described to detect circulating genetically abnormal cells (CACs) in lung cancer. This FISH-based assay used probes to identify genetic aberrations known to exist in NSCLC on cytopsin preparation of Ficoll gradient-enriched peripheral blood mono-

nuclear cells. CAC number was reported to be correlated with disease stage and significantly different from controls. However, CACs were also detected in controls, highlighting a degree of nonspecific binding of the probes. The number of CACs detected was more than 1,000 times higher than that reported in previous studies of CTC detection using other methods. Further experiments should be done to identify the origin of CACs and evaluate whether the CAC cell fraction does contain true CTCs.

### **CTCs as a Tool for Evaluating the Patient's Prognosis**

CTCs can potentially serve as prognostic factors in the treatment of cancer patients. In patients with small cell lung carcinoma, Hou et al. [5] have shown that CTCs are detectable in much higher numbers than in other disease types. A study by Krebs et al. [9] evaluated the prognostic significance of CTCs in non-small cell lung cancer using CellSearch. A baseline number of 5 CTCs were detected by CellSearch in chemo-naïve patients suffering from metastatic or locally advanced lung cancer. Patients with fewer than 5 CTCs showed better progression-free survival (PFS) and OS than patients with more than 5 CTCs. The authors of this study concluded that the baseline CTC number was a confirmed independent prognostic factor for PFS and OS in non-small cell lung cancer. Hofman et al. [13] also studied the use of CTCs in the evaluation of patient prognosis in the case of resected non-small cell lung cancer. In this study, ISET was used to detect CTCs at different disease stages. They concluded that no correlation was found between the number of CTCs and disease stage. However, patients with more than 50 CTCs had shorter OS and disease-free survival (DFS). A second study by Hofman et al. [30] compared the prognostic value of CTC detection comparing CellSearch and ISET methods in resected non-small cell lung cancer patients. Here again, detection of CTCs was independent of disease stage. Patients with no preoperative CTCs showed significantly longer DFS than those with preoperative CTCs detected by either CellSearch or ISET.

### **Molecular Characterization of CTCs**

The molecular characterization of CTCs in lung cancer should aid the clinician in the identification of appropriate treatment regimens, based on the genotype of tumor cells in individual patients. The development of per-

sonalized medicine using CTCs as a source of ‘liquid biopsy’ could be used, for example, in the case of determination of the *EGFR* gene status. In patients with non-small cell lung carcinoma, studies have identified tumor-associated activating mutations in the *EGFR* gene highly associated with a dramatic response to *EGFR* tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment [31–33]. However, most patients have a relapse within 1 year of treatment [34]. Further studies in patients who recurred revealed a second mutation which was not present before TKI treatment in the primary tumor. This mutation is a substitution of methionine for threonine at position 790 (T790M), causing resistance to TKI treatment by inhibiting drug binding [35–37]. *EGFR* mutations have also been identified using CTCs collected from patients with non-small cell lung carcinoma [8]. Using CTCs as a means of testing patients for *EGFR* mutations could therefore deeply impact treatment choices and potentially predict patients’ response to treatment.

### Perspectives and Conclusions

Molecular characterization of CTCs has become an important goal in the study of CTCs and their role in metastasis. The main aims are to identify predictive biomarkers, targets for therapy, and mechanisms of resistance. Keeping in mind that heterogeneity between the primary tumor, CTCs, and metastases has been reported in lung cancer [38], molecular study of the primary tumor as well as CTC heterogeneity could reveal additional mutations leading to drug-resistant tumor cells, differences in gene expression that bring about more aggressive tu-

mors, and an increase in our knowledge of the mechanisms involved in metastatic development.

Although CTC detection in early stage disease is even more challenging than in metastatic disease, data suggests that CTC enumeration can be used to predict patient prognosis. For example, using the ISET filtration method, Hofman et al. showed that an elevated preoperative CTC level in patients with resectable non-small cell lung carcinoma was an indicator of a poor prognosis [13]. Characterizing CTCs in early stage disease could help the clinician to develop new appropriate treatment strategies tailored to individual cases. This type of ‘personalized medicine’ could exploit CTC detection followed by their molecular characterization as a surrogate marker for treating patients according to their current tumor phenotype and genotype instead of treating them according to the phenotype and genotype of the primary tumor.

In conclusion, although detection of tumor cells was already the subject of an extensive review in *Acta Cytologica* in 1965 [39], improved methods for detecting CTC are still progressing. These new methods now incorporate a variety of cell markers, and automated techniques applicable in a clinical setting are needed. In combination with cytomorphological parameters they would allow CTCs to be used as a ‘liquid biopsy’, being collected at different stages of disease from the early stage to pre- and posttreatment, metastatic, and follow-up during remission. It is therefore anticipated that morphological and molecular characterization of CTCs in real-time, giving a snapshot of the disease state, could be a very powerful tool in the diagnosis and treatment of patients with malignant tumors such as lung cancer.

### References

- 1 Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BG, Hicks RJ, Hampton GM, Amler LC, Pirzkall A, Lackner MR: Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res* 2012;18:2391–2401.
- 2 Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; 133:571–573.
- 3 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF: Circulating tumour cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781–791.
- 4 Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ: Relationship of circulating tumour cells to tumour response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213–3221.
- 5 Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, Cummings J, Ward T, Board R, Amir E, Hughes S, Krebs M, Hughes A, Ranson M, Lorigan P: Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Am J Pathol* 2009;175:808–816.
- 6 Gallagher DJ, Milowsky MI, Ishill N, Trout A, Boyle MG, Riches J: Detection of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer. *Ann Oncol* 2009;20:305–308.
- 7 De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D: Circulating tumour cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6302–6309.
- 8 Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV: Detection of mutations in *EGFR* in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366–377.



- 9 Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, Blackhall FH: Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;20:1556–1563.
- 10 Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, Priest LJ, Greystoke A, Zhou C, Morris K, Ward T, Blackhall FH, Dive C: Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:525–532.
- 11 Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchar d, Soria JC, Farace F: Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011;105:1338–1341.
- 12 Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, Laplanche A, Chachebeau A, Lacroix L, Planchar d, Le Moulec S, Andre F, Fizazi K, Soria JC, Vielh P: A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 2011;105:847–853.
- 13 Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Mourad N, Butori C, Selva E, Poudenx M, Sibon S, Kelhef S, Vénissac N, Jais JP, Mouroux J, Molina TJ, Hofman P: Preoperative circulating tumour cell detection using the isolation by size of epithelial tumour cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* 2011;17:827–835.
- 14 Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, Ward TH, Backen A, Clack G, Hughes A, Ranson M, Blackhall FH, Dive C: Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2012;7:306–315.
- 15 Wittekind C, Neid M: Cancer invasion and metastasis. *Oncology* 2005;69(suppl 1):14–16.
- 16 Weiss L: Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:193–383.
- 17 Sahai E: Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 2007;7:737–749.
- 18 Fidler IJ: Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labelled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:733–782.
- 19 Polyak K, Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009;9:265–273.
- 20 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–890.
- 21 Mego M, Mani SA, Cristofanilli M: Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:693–701.
- 22 Christiansen JJ, Rajesekaran AK: Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006;66:8319–8326.
- 23 Thiery JP, Sleeman JP: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:131–142.
- 24 Fizazi K, Morat L, Chauveinc L, Prapotnich D, De Crevoisier R, Escudier B, Cathelineau X, Rozet F, Vallancien G, Sabatier L, Soria JC: High detection rate of circulating tumor cells in blood of patients with prostate cancer using telomerase activity. *Ann Oncol* 2007;18:518–521.
- 25 Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwallner A, van der Kooi A, Tibbe AG, Doyle GV, Terstappen LW, Bauernhofer T: Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;68:25–30.
- 26 Naume B, Borgen E, Tøssvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM: Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy* 2004;6:244–252.
- 27 Gertler R, Rosenberg R: Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* 2003;162:149–155.
- 28 Kraan J, Sleijfer S, Strijbos MH, Ignatiadis M, Peeters D, Pierga JY, Farace F, Riethdorf S, Fehm T, Zorzino L, Tibbe AG, Maestro M, Gisbert-Criado R, Denton G, de Bono JS, Dive C, Foekens JA, Gratama JW: External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch system: a feasibility study. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:112–118.
- 29 Katz RL, He W, Khanna A, Fernandez RL, Zaidi TM, Krebs M, Caraway NP, Zhang HZ, Jiang F, Spitz MR, Blowers DP, Jimenez CA, Mehran RJ, Swisher SG, Roth JA, Morris JS, Etzel CJ, El-Zein R: Genetically abnormal circulating cells in lung cancer patients: an antigen-independent fluorescence in situ hybridization-based case-control study. *Clin Can Res* 2010;16:3976–3987.
- 30 Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, Vénissac N, Mouroux J, Vielh P, Hofman P: Detection of circulating tumour 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 tumour cell method. *Int J Cancer* 2010;129:1651–1660.
- 31 Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA: Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:587–595.
- 32 Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Utkus L: Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450:1235–1239.
- 33 Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497–1500.
- 34 Pao W, Miller V, Zakowski M: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from 'never smokers' and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13306–13311.
- 35 Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352:786–792.
- 36 Kwak EL, Sordella R, Bell DW: Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:7665–7670.
- 37 Pao W, Miller VA, Politi KA: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73.
- 38 Flores LM, Kindelberger DW, Ligon AH, Cappelletti M, Fiorentino M, Loda M, Cibas ES, Jänne PA, Krop IE: Improving the yield of circulating tumour cells facilitates molecular characterisation and recognition of discordant HER2 amplification in breast cancer. *Br J Cancer* 2010;102:1495–1502.
- 39 Nadel EM: Symposium on tumor cells in the circulating blood: part I and part II. *Acta Cytologica* 1965;9:1–184.

© Free Author Copy – for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact [permission@karger.ch](mailto:permission@karger.ch)

## Cellules tumorales circulantes : isolement, caractérisation et intérêt en clinique

*Circulating tumor cells: isolation, characterization and clinical application*

Emma Pailler\*, Rachel Young\*, Françoise Farace\*

RÉSUMÉ

» Les cellules tumorales circulantes (CTC) offrent des perspectives très prometteuses en oncologie. Du fait de leur très grande rareté dans le sang périphérique, ces cellules requièrent des technologies d'analyse complexes présentant un niveau de sensibilité élevé. Leur détection ou caractérisation nécessite 2 étapes : une première étape d'enrichissement suivie d'une seconde de détection, ou caractérisation proprement dite, grâce à des approches immunologiques, moléculaires ou fonctionnelles. Cet article présente une synthèse des principales technologies d'enrichissement et de détection des CTC disponibles à ce jour. Grâce à ces technologies, leur intérêt pronostique a été démontré dans plusieurs cancers métastatiques. Ces technologies permettent aussi maintenant d'accéder à la caractérisation de divers types d'anomalies génétiques et de biomarqueurs moléculaires présents dans les CTC. Ainsi, les CTC pourraient être exploitées comme une "biopsie liquide" pour diagnostiquer des biomarqueurs moléculaires, sélectionner un traitement ciblé et suivre son efficacité ou l'émergence de résistances.

**Mots-clés :** Cellules tumorales circulantes – Événements rares – CellSearch® – Thérapies ciblées – Anomalies moléculaires.

SUMMARY

*Circulating tumor cells (CTCs) offer great promise in oncology. Due to their extreme rarity in the peripheral blood, these cells require complex analytical technology with a high level of sensitivity. Their detection or characterization requires 2 steps: an enrichment step followed by detection, or rather characterization, made possible by immunological, molecular or functional approaches. This review presents an overview of the principal CTC enrichment and detection technologies available today. Thanks to these technologies, the interest of CTCs as potential biomarkers has been described in several metastatic cancers. These technologies allow for the characterization of various types of genetic anomalies and molecular biomarkers present in CTCs. CTCs can also be exploited as a "liquid biopsy" in diagnosis of molecular biomarkers and selection of targeted treatment, providing information on patient prognosis and treatment efficacy or emerging resistance.*

**Keywords:** Circulating tumor cells – Rare events – CellSearch® – Targeted therapies – Molecular abnormalities.

\* Université Paris-Sud XI, Inserm U981 "Biomarqueurs prédictifs et nouvelles stratégies moléculaires en thérapeutique anticancéreuse", institut de cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif; laboratoire de recherche translationnelle, unité de biologie des cellules circulantes, institut de cancérologie Gustave-Roussy.

Les cancers métastatiques sont responsables d'environ 90 % de la mortalité par cancer. Au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, le pathologiste australien Thomas Ashworth proposa l'hypothèse que les cellules tumorales circulantes (CTC) pourraient jouer un rôle essentiel dans le développement de métastases et représenteraient une population hétérogène de cellules provenant à la fois de la tumeur primitive et des métastases. Pendant de nombreuses années, la recherche sur les CTC dans le sang n'a pas suscité l'intérêt de la communauté scientifique, plus particulièrement focalisée sur la caractérisation de la tumeur solide en elle-même. Les progrès dans le domaine des CTC ont été entravés par le défi technologique que représentent l'enrichissement et la détection d'événements aussi

rare dans le sang périphérique. En effet, ces cellules représentent quelques éléments seulement parmi des millions de cellules hématopoïétiques dans 10 ml de sang chez un patient atteint de cancer métastatique (1). Depuis leur première description, les CTC se sont montrées très prometteuses en raison tant de leur intérêt clinique que de leur rôle dans le processus métastatique. À l'heure actuelle, la biologie de ces cellules est encore très mal connue, et nous disposons de peu de données sur les processus qui régulent leur devenir pendant leur transit dans le sang. Il est maintenant établi que le nombre de CTC est un biomarqueur pronostique dans plusieurs cancers métastatiques (sein, prostate, poumon). La caractérisation des CTC, tant du point de vue de l'énumération que de la caractérisation phéno-

typique et moléculaire, est susceptible de fournir un plus grand nombre d'informations cliniques concernant le pronostic, le choix, l'efficacité, la résistance aux thérapies ciblées ainsi que la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de nouveaux agents anticancéreux. Sans avoir la prétention d'être exhaustif, cet article a pour objectif de présenter les différentes technologies d'enrichissement et de détection des CTC disponibles à ce jour ainsi que les principales applications cliniques qui en découlent.

### Enrichissement, détection et caractérisation des CTC

La dernière décennie a vu l'avènement de nouvelles approches cytométriques de détection des CTC. Ces technologies sont plus sensibles et plus spécifiques que les méthodes précédentes de PCR, principalement de PCR quantitative en temps réel (RT-PCR), basées sur l'amplification d'anomalies génétiques ou de transcrits de gènes spécifiques de tumeurs ou de tissu dans le sang total (2). Les CTC étant extrêmement rares, de l'ordre de 1 à 10 par millilitre de sang, les méthodes de détection nécessitent un niveau de sensibilité élevé et requièrent la combinaison de 2 étapes : une étape d'enrichissement et une méthode de détection et de caractérisation de ces cellules.

### Stratégies d'enrichissement des CTC

À l'heure actuelle, 2 grands types de technologies d'enrichissement sont utilisables afin d'obtenir un échantillon enrichi en cellules tumorales : l'isolement des CTC par sélection positive et l'enrichissement par sélection négative (figure). Cette étape est indispensable, car elle permet de limiter la contamination en cellules non tumorales de la fraction enrichie. Parmi les techniques de sélection positive, plusieurs approches ont été développées. La technologie d'enrichissement la plus largement utilisée repose sur une immunoséparation au moyen de billes magnétiques ou ferrofluides recouvertes par un anticorps dirigé contre un ou des antigènes d'intérêt spécifiques aux cellules tumorales de la tumeur. Ce type de technologies regroupe l'approche CellSearch®, l'AdnaTest, l'anti-EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule)/anti-cytokeratin antibody CTC enrichment, le MACS® (Magnetic-Activated Cell Sorting), le MagSweeper, le Dynabeads® Epithelial Enrich (3). La méthode CellSearch®, basée sur l'enrichissement de cellules exprimant l'antigène EpCAM, est l'unique

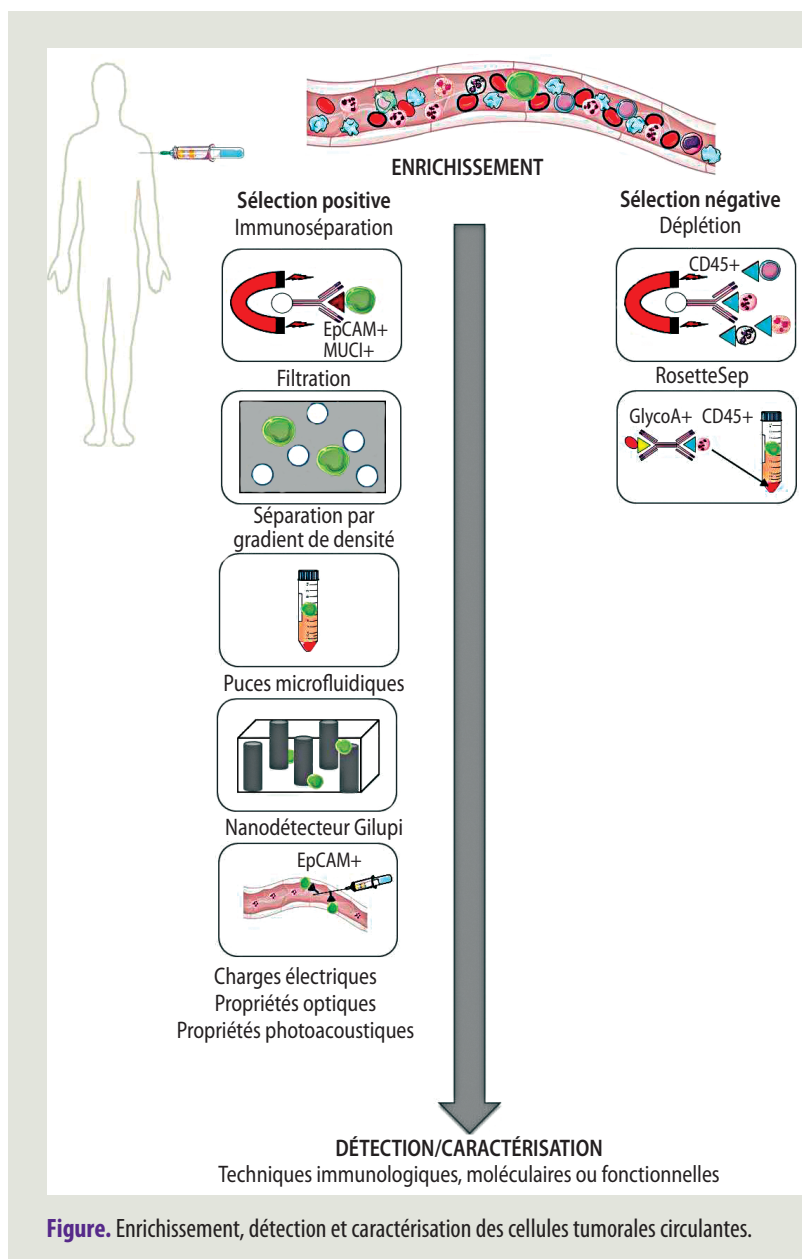


Figure. Enrichissement, détection et caractérisation des cellules tumorales circulantes.

technologie approuvée par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux. La technologie AdnaTest, quant à elle, combine 2 antigènes épithéliaux associés à la tumeur : un anticorps anti-EpCAM et 2 anticorps anti-MUC1 (4). Un autre type de technologie basé sur la sélection positive a également été développé ; il s'agit de la sélection sur des caractéristiques physiques des CTC. Une des premières techniques repose sur la morphologie de ces cellules via un système de filtration discriminant les cellules par le critère de taille et regroupant notamment les méthodes ISET® (Isolation by Size of Epithelial

*Tumor trophoblastic cells*) [5], ScreenCell® (6), Nucleopore Assay (7), Aquamarijn (8) ou encore la méthode développée par l'équipe de R.J. Cote (9). Ce type de méthode permet aux cellules de traverser la membrane microporeuse que représente le filtre grâce à un système de pression ou de courant électrique. Une nouvelle génération de microfiltres en parylène permet également de capturer des CTC non fixées afin de mesurer l'activité des télomérases (10). Un autre type de filtration a aussi été développé sur un microfiltre en 3 dimensions constitué de 2 couches d'une membrane en parylène poreuse (11). Cette méthode permet d'enrichir en CTC sans a priori du phénotype. Cependant, du fait de la forte variabilité de la taille des CTC, la taille fixe des pores entraîne une importante contamination en leucocytes. Une variante de cette approche a été développée par Clearbridge BioMedics avec une biopuce ClearCell® qui utilise les propriétés physiques de taille et de déformabilité des cellules cancéreuses, qui sont plus grandes et plus rigides que les cellules sanguines (12). Une autre stratégie combine l'isolement des CTC grâce à des billes de 3 µm recouvertes par des anticorps dirigés contre le marqueur épithélial EpCAM et la filtration par un système microfluidique (13).

La seconde technique basée sur les propriétés physiques est le Ficoll-Isopaque avec le système Lymphoprep™. Elle est basée sur la séparation par gradient de densité suite à une centrifugation qui permet de séparer les cellules mononucléaires, caractérisées par leur faible densité, des autres cellules sanguines (seuil de 1,077 ng/ml). La méthode OncoQuick® est similaire mais présente l'avantage de combiner une barrière poreuse qui évite la contamination par le sang total des cellules isolées (14). Diverses techniques basées sur les propriétés électriques des CTC ont également été développées, notamment le dispositif microfluidique combinant la séparation cellulaire par MOFF (*Multi-Orifice Flow Fractionation*) et par diélectrophorèse (DEP) des cellules (3). La méthode ApoStream® DEP-FFF (*Dielectrophoresis Field Flow Fractionation*) permet quant à elle d'isoler les CTC viables selon leur DEP, qui varie avec les différences de taille et de propriétés de la membrane (15).

Ces dernières années ont vu l'émergence des puces microfluidiques, très innovantes d'un point de vue technologique. Le premier système *CTC-chip* rapporté initialement par l'équipe de M. Toner en 2007 était composée de *microposts* recouverts par l'anticorps dirigé contre la protéine EpCAM (16). Le sang est pompé à travers la puce, et les CTC sont capturées par les *microposts* puis marquées avec les anticorps anticytokeratines, anti-CD45 et par le marqueur nucléaire DAPI puis détectées dans la puce à l'aide d'un microscope à fluorescence. Le marqueur CD45

est un marqueur leucocytaire permettant l'exclusion des cellules sanguines. Cependant, les résultats extrêmement prometteurs en termes de sensibilité publiés par cette équipe n'ont pas été confirmés. Cette équipe a par la suite développé une puce microfluidique à haut débit, le *herringbone chip*, qui permet de détecter des CTC dans le sang total sans prétraitement des échantillons (17). Globalement, les systèmes microfluidiques basés sur l'expression d'EpCAM ne permettent pas une capture plus efficace que le CellSearch® mais offrent une plus grande souplesse au niveau de la détection et de la caractérisation. En effet, ces systèmes sont compatibles avec une haute résolution d'image, et il est possible de contrôler les forces et interactions entre les cellules. L'équipe française de J.Y. Viovy a développé un "laboratoire sur puce", baptisé Ephesia, qui regroupe, sur un support extrêmement réduit, un tamis à cellules constitué d'un réseau de colonnes formées de microbilles magnétiques portant des anticorps dirigés contre une protéine de surface spécifique aux cellules tumorales (18). Ce système original combine les avantages du tri microfluidique (contrôle du flux et des interactions entre billes et cellules) et ceux du tri immunomagnétique. Un autre système microfluidique permettant la sélection à haut débit, l'énumération et la manipulation électrocinétique des CTC a été développé par l'équipe américaine de S.A. Soper (19). Plus récemment, une nouvelle génération de puces est apparue, basée sur un capteur à effet Hall (20). Les cellules sont, dans un premier temps, marquées avec des nanoparticules (anticorps dirigés contre une protéine de surface spécifique de type HER2, EGFR ou EpCAM et conjugués à des billes magnétiques). Les cellules marquées dans le sang total peuvent alors être acheminées dans le canal microfluidique, où les sondes de Hall les capturent. Une équipe américaine a également développé une technologie reposant sur l'utilisation d'un cocktail d'anticorps dirigés contre divers antigènes de surface tels que HER2, MUC1 ou encore EGFR, des antigènes mésenchymateux, telle la N-cadhérine, et des antigènes caractéristiques des cellules souches (21). Les CTC peuvent ensuite être analysées individuellement. Du fait du large panel de puces microfluidiques actuellement développées, cette revue n'a pas la prétention d'être exhaustive pour l'ensemble de cette technologie.

La seule approche *in vivo* actuellement développée est le système CellCollector™ Gilupi (22). Le nanodétecteur, fil d'acier inoxydable recouvert d'une fine couche d'or et d'hydrogel présentant l'anticorps anti-EpCAM, est présent sur une aiguille qui est directement placée dans la veine du patient. Pendant les 30 minutes où le dispositif est présent sur le patient, les CTC EpCAM positives sont retenues et environ 1,5 l de sang passe dans le système.



D'autres techniques très innovantes sont en cours de développement, qui reposent sur la signature optique des CTC avec la technologie OFIS (*OptoFluidic Intracavity Spectroscopy*) ou encore sur leurs caractéristiques photoacoustiques (3).

L'approche par sélection négative a été moins explorée. Elle repose essentiellement sur le système de déplétion négative qui consiste à éliminer les cellules porteuses d'un antigène non tumoral spécifique, comme, par exemple, le marqueur CD45 spécifique aux leucocytes. Cette méthode est notamment développée par Invitrogen avec la technologie Dynabeads® CD45. Ce marqueur pan-leucocytes peut également être combiné avec le marqueur CD61 spécifique aux mégacaryocytes et aux plaquettes (23). Le système RARE (*RosetteSep-Applied imaging Rare Event*) est une technique qui combine, d'une part, la sélection négative permettant d'éliminer les leucocytes CD45+ pontés spécifiquement aux érythrocytes grâce à la glycopherine A et, d'autre part, la séparation par gradient de densité (24). Une sélection peut également être réalisée en combinant d'autres marqueurs tels que CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66. L'équipe de J.J. Chalmers a notamment développé une approche permettant la lyse des globules rouges puis une déplétion immunomagnétique des cellules CD45+, ce qui permet ensuite la caractérisation des cellules retenues par immunocytochimie ou RT-PCR (25).

## Détection et caractérisation des CTC

Après enrichissement, la détection peut être réalisée par des techniques immunologiques (immunocytochimie et immunofluorescence), moléculaires ou encore fonctionnelles.

La technologie CellSearch® décrite ci-dessus combine l'enrichissement et la détection. Ainsi, les CTC capturées à l'aide de billes magnétiques recouvertes avec un anticorps spécifique du marqueur épithélial EpCAM sont marquées avec des anticorps dirigés contre les cytokératines 8, 18 et 19 et contre le CD45 et avec le DAPI, marqueur nucléaire. Les cellules cytokératines+/DAPI+/CD45- sont comptées grâce à un scanner à fluorescence (26). Selon cette méthode, une CTC est définie selon plusieurs critères :

- ✓ cellule intacte avec une morphologie ronde ou ovale et de taille supérieure à 4 µm ;
- ✓ cellule avec un noyau à l'intérieur du cytoplasme et une aire nucléaire inférieure à l'aire cytoplasmique ;
- ✓ cellule marquée positivement par les cytokératines et négativement par le CD45.

Cette méthode ne s'adapte donc qu'à la détection de CTC de phénotype épithélial exprimant l'EpCAM de façon forte ou modérée, et ne permet aucune flexibilité pour la caractérisation des CTC, mis à part les marqueurs commercialisés tels qu'EGFR ou HER2. Sa conception actuelle ne permet pas d'aller au-delà de la numération des CTC. Cependant, la technologie CellSearch® reste, à l'heure actuelle, la méthode de référence, et toutes les autres méthodes développées sont "expérimentateur-dépendantes" et, en général, comparées à cette dernière. Les technologies de *CTC-chip* permettent également de combiner l'enrichissement et la détection des CTC. Par exemple, la technologie Ephesia permet de caractériser les cellules enrichies par des analyses par FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), RT-PCR ou encore PLA (*Proximity Ligation Assays*).

D'autres méthodes de détection basées sur l'immunofluorescence ont été développées, notamment avec l'utilisation de microscopes automatisés à grande vitesse tels que les systèmes FAST (*Fiber-optic Array Scanning Technology*) et LSC (*Laser Scanning Cytometry*), qui permettent de détecter les CTC marquées par des anticorps couplés à des fluorochromes sans préalablement réaliser un enrichissement (7, 27). L'équipe de P. Kuhn a développé la technologie HD-CTC afin d'identifier les CTC par une imagerie de haute résolution (28).

L'intérêt des méthodes cytométriques est qu'elles permettent de caractériser les cellules sans une lyse totale. Cela permet de combiner une analyse morphologique, phénotypique et moléculaire. Cependant, l'inconvénient majeur repose sur le fait qu'il n'existe pas de marqueurs spécifiques à toutes les cellules tumorales. L'utilisation des cytokératines peut engendrer un accrochage non spécifique des macrophages, des cellules plasmiques ou encore des précurseurs des cellules hématopoïétiques (29). Le marqueur MUC1, également utilisé, peut quant à lui marquer de façon non spécifique les précurseurs des érythrocytes (30). Cette non-spécificité est diminuée lors des multimarquages combinant un ou plusieurs marqueurs tumoraux et un marqueur leucocytaire, comme le CD45.

La détection des CTC peut également être réalisée par une analyse purement cytomorphologique de ces cellules grâce à diverses colorations commerciales telles que le MGG (May-Grünwald Giemsa) ou la coloration éosine-hémalun de Mayer. Une CTC est alors définie selon les critères suivants :

- ✓ la taille du noyau est supérieure ou égale à 16 µm ;
- ✓ le contour nucléaire présente des irrégularités ;
- ✓ le cytoplasme est visible autour du noyau ;
- ✓ le ratio noyau-cytoplasme est élevé ( $\geq 0,8$ ).

Notre équipe a notamment rapporté l'intérêt de cette approche après enrichissement par filtration, ainsi que l'équipe de P. Hofman et de C. Dive (31-33).

Les CTC peuvent également être détectées via l'identification d'altérations génétiques ou épigénétiques spécifiques des cellules cancéreuses. Ces altérations peuvent être des mutations dans les proto-oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur, des instabilités au niveau des microsatellites ou encore des séquences de virus oncogéniques. Les méthodes de RT-PCR sans étape préalable d'enrichissement sont les plus utilisées pour détecter les ARNm codant pour les cytokératines (18-20), MUC1 ou encore le CEA. Néanmoins, une étape d'enrichissement permet de travailler uniquement dans une fraction enrichie en CTC, ce qui diminue la contamination en cellules hématopoïétiques et permet donc un signal plus spécifique. Le système CTC AdnaTest d'Alere permet d'enrichir, isoler et caractériser les CTC grâce à l'analyse des ARNm spécifiques aux marqueurs tumoraux (34). Une seule équipe a rapporté le génotypage des mutations d'*EGFR* dans le cancer du poumon grâce à l'utilisation d'une puce microfluidique; ces résultats n'ont pas été confirmés (35). La détection d'anomalies moléculaires telles que les amplifications ou les translocations peut être réalisée par FISH. Un module du CellSearch® en cours de développement et non commercialisé permet la détection de HER2 dans le sein ou encore de PTEN et de la translocation *TMPRSS2-ERG* dans la prostate (36). La détection du remaniement d'*ALK* caractéristique d'un sous-type de cancer bronchique non à petites cellules a été rapportée par notre équipe ainsi que par celle de P. Hofman (37, 38).

La seule méthode fonctionnelle décrite est la technologie EPISPOT (*EPithelial ImmunoSPOT*), dérivée de l'ELISPOT (*Enzyme-Linked immunospot*) [39]. Elle est décrite dans l'article de C. Alix-Panabières (p. 199) et permet, après enrichissement par diverses méthodes, la détection de protéines d'intérêt sécrétées par les potentielles CTC au cours d'une culture à court terme (24 à 48 h). Les enjeux actuels, du point de vue de la caractérisation des CTC, reposent sur les approches sur cellule unique, qui permettront de mettre en évidence l'hétérogénéité tumorale dans le sang. La technologie du DEPArray™ développée par Silicon Biosystems est basée sur le principe de diélectrophorèse et combine la microélectronique avec la microfluidique. Dans un champ électrique non uniforme, les cellules présentes dans la suspension liquide subissent des forces qui permettent de les déplacer et de les séparer. Cette méthode est le seul instrument automatisé qui permet d'identifier, quantifier et récupérer des sous-populations de cellules rares afin de les analyser moléculairement. Silicon Biosystems

commercialise également des kits permettant d'amplifier la totalité du génome d'une cellule unique puis de réaliser des analyses de séquençage de Sanger pour différents gènes, dont *EGFR*. L'approche sur cellule unique peut également être explorée par les technologies de microdissection laser ou par l'approche CellCelector™, qui permet de collecter par aspiration une cellule unique.

### Applications cliniques

La majorité des études cliniques sur les CTC ont été réalisées avec l'approche standardisée CellSearch®; il existe des données limitées avec les autres technologies. En utilisant l'approche CellSearch®, plusieurs équipes ont récemment montré que les taux de CTC étaient corrélés à l'évolution clinique des patients et étaient un facteur pronostique indépendant dans plusieurs cancers métastatiques, notamment les cancers du sein, de la prostate, du côlon, les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) [40-42]. De plus, le suivi des taux de CTC permet de prédire précocement, avant même les examens radiologiques, la réponse à un traitement conventionnel (hormonothérapie ou chimiothérapie) chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, ce qui suggère que la détection des CTC pourrait être utilisée pour identifier très tôt des patients susceptibles de retirer un bénéfice d'une thérapie anticancéreuse (43). En situation néo-adjuvante, l'équipe de J.Y. Pierga a montré qu'un taux de CTC supérieur ou égal à 1 cellule pour 7,5 ml est un facteur pronostique indépendant de la survie (44). Dans le cancer métastatique de la prostate, compte tenu des difficultés inhérentes à cette maladie pour la prise en charge thérapeutique des patients et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, suivre les taux de CTC comme biomarqueurs de l'efficacité, de la réponse et de la survie est d'une grande utilité clinique. L'équipe de C. Dive a montré, dans les CBNPC, que les CTC ont une valeur pronostique et prédictive de la réponse à la chimiothérapie (42). Malgré les limites de la technologie CellSearch® que nous avons soulignées, notamment du point de vue de sa sensibilité, la robustesse et la standardisation de cette méthode permettent de considérer le taux de CTC mesurées comme un puissant biomarqueur pronostique et prédictif dans plusieurs cancers métastatiques.

L'équipe de P. Hofman a publié en 2011 une étude montrant par la technique de filtration ISET® que les CTC constituent un marqueur pronostique en situation périopératoire dans les CBNPC (32).

Cependant, actuellement, l'intérêt majeur des CTC réside

dans l'hypothèse que ces cellules pourraient constituer une source alternative de cellules tumorales pour des diagnostics moléculaires et représenter une véritable "biopsie liquide". À l'heure actuelle, nous sommes à l'avènement de la caractérisation de l'hétérogénéité moléculaire de ces cellules grâce aux technologies permettant d'analyser des cellules isolées et non des fractions enrichies. Les approches sur cellules uniques vont permettre d'identifier les patients éligibles à une thérapie ciblée, de suivre les CTC sous traitement et, ainsi,

d'identifier les clones circulants. Cela permettra d'identifier en temps réel la résistance aux thérapies ciblées. Des approches automatisées sont néanmoins nécessaires à la standardisation des méthodes d'enrichissement et de caractérisation des CTC. L'évolution des technologies d'enrichissement et de détection des CTC, leur culture ainsi que le développement de modèles in vivo pourront contribuer dans un avenir proche à une meilleure compréhension de la biologie de ces cellules pendant le transit dans le sang. ■

E. Pailler déclare avoir un lien d'intérêts avec LabEx LERMIT (allocation doctorale). R. Young n'a pas déclaré ses éventuels liens d'intérêts. F. Farace déclare avoir des liens d'intérêts avec Roche, Novartis et Boehringer.

## RÉFÉRENCES

1. Van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, den Toonder JM. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res* 2011;71(18):5955-60.
2. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006;12(3):130-9.
3. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* 2012;10:138.
4. Tewes M, Aktas B, Welt A et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(3):581-90.
5. Vona G, Sabile A, Louha M et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000;156(1):57-63.
6. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 2011;31(2):427-41.
7. Ntouroupi TG, Ashraf SQ, McGregor SB et al. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope. *Br J Cancer* 2008;99(5):789-95.
8. Coumans FA, Van Dalum G, Beck M, Terstappen LW. Filter characteristics influencing circulating tumor cell enrichment from whole blood. *PLoS One* 2013;8(4):e61770.
9. Lin HK, Zheng S, Williams AJ et al. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 2010;16(20):5011-8.
10. Xu T, Lu B, Tai YC, Goldkorn A. A cancer detection platform which measures telomerase activity from live circulating tumor cells captured on a microfilter. *Cancer Res* 2010;70(16):6420-6.
11. Zheng X, Cheung LS, Schroeder JA, Jiang L, Zohar Y. A high-performance microsystem for isolating circulating tumor cells. *Lab Chip* 2011;11(19):3269-76.
12. Tan SJ, Lakshmi RL, Chen P, Lim WT, Yobas L, Lim CT. Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients. *Biosens Bioelectron* 2010;26(4):1701-5.
13. Lin MX, Hyun KA, Moon HS et al. Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation. *Biosens Bioelectron* 2013;40(1):63-7.
14. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 2002;49(4):150-8.
15. Gupta V, Jafferji I, Garza M et al. ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics* 2012;6(2):24133.
16. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450(7173):1235-9.
17. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(43):18392-7.
18. Saliba AE, Saia L, Psychari E et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(33):14524-9.
19. Adams AA, Okagbare PI, Feng J et al. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J Am Chem Soc* 2008;130(27):8633-41.
20. Issadore D, Chung J, Shao H et al. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector. *Sci Transl Med* 2012;4(141):141ra92.
21. Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA et al. A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discov* 2011;1(7):580-6.
22. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol* 2012;41(4):1241-50.
23. Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics*. 2007;4(6):741-56.
24. Naume B, Borgen E, Tossvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy* 2004;6(3):244-52.
25. Wu Y, Deighan CJ, Miller BL et al. Isolation and analysis of rare cells in the blood of cancer patients using a negative depletion methodology. *Methods* 2013;64(2):169-82.
26. Allard WJ, Matera J, Miller MC 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* 2004;10(20):6897-904.
27. Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(29):10501-4.
28. Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol* 2012;9(1):016003.
29. Borgen E, Pantel K, Schlimok G et al. A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70(6):400-9.
30. Brugger W, Buhning HJ, Grunebach F et al. Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J Clin Oncol* 1999;17(5):1535-44.
31. Farace F, Massard C, Vimond N et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 2011;105(6):847-53.
32. Hofman V, Ilie MI, Long E 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* 2011;129(7):1651-60.
33. Krebs MG, Hou JM, Sloane R et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2012;7(2):306-15.
34. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 2012;14(1):R15.
35. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359(4):366-77.
36. Attard G, Swennenhuus JF, Olmos D et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69(7):2912-8.
37. Pailler E, Adam J, Barthelemy A et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(18):2273-81.
38. Ilie M, Long E, Butori C et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2012;23(11):2907-13.
39. Alix-Panabières C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012;195:69-76.
40. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(8):781-91.
41. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(19):6302-9.
42. Krebs MG, Sloane R, Priest L et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(12):1556-63.
43. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006;12(14 Pt 1):4218-24.
44. Pierga JY, Hajage D, Bachelot T et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 2012;23(3):618-24.





# Clinical utility of circulating tumor cells in *ALK*-positive non-small-cell lung cancer

Vincent Faugeroux<sup>1,2</sup>, Emma Paillet<sup>1,2</sup>, Nathalie Auger<sup>3</sup>, Melissa Taylor<sup>1,2</sup> and Françoise Farace<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U981 “Identification of Molecular Predictors and New Targets for Cancer Treatment,” Institut Gustave Roussy, University of Paris-Sud, Paris, France

<sup>2</sup> Translational Research Laboratory, Institut Gustave Roussy, Paris, France

<sup>3</sup> Department of Biopathology, Institut Gustave Roussy, Paris, France

## Edited by:

Stephen V. Liu, Georgetown University, USA

## Reviewed by:

Zhongxing Liao, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, USA

Sunitha Nagrath, University of Michigan, USA

## \*Correspondence:

Françoise Farace, Institut Gustave Roussy, 114 rue EdouardVaillant, Villejuif, Paris 94805, France  
e-mail: francoise.farace@gustaveroussy.fr

The advent of rationally targeted therapies such as small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has considerably transformed the therapeutic management of a subset of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring defined molecular abnormalities. When such genetic molecular alterations are detected the use of specific TKI has demonstrated better results (overall response rate, progression free survival) compared to systemic therapy. However, the detection of such molecular abnormalities is complicated by the difficulty in obtaining sufficient tumor material, in terms of quantity and quality, from a biopsy. Here, we described how circulating tumor cells (CTCs) can have a clinical utility in anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) positive NSCLC patients to diagnose *ALK-EML4* gene rearrangement and to guide therapeutic management of these patients. The ability to detect genetic abnormalities such *ALK* rearrangement in CTCs shows that these cells could offer new perspectives both for the diagnosis and the monitoring of *ALK*-positive patients eligible for treatment with *ALK* inhibitors.

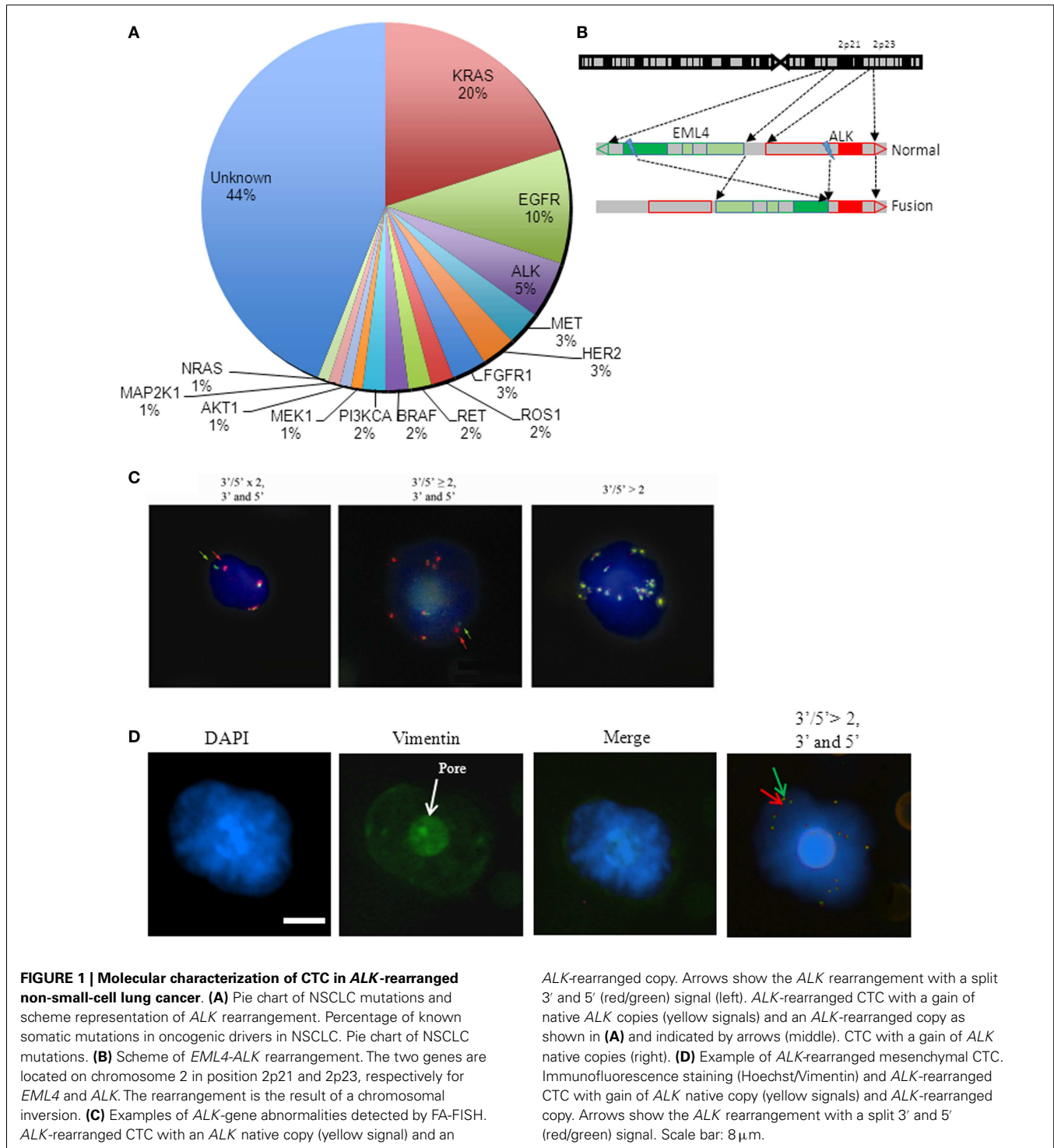
**Keywords:** *ALK* rearrangement, circulating tumor cells, targeted therapy, non-small-cell lung cancer, predictive biomarker

In the past decade, the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC) has considerably shifted with the emergence of rationally targeted therapies for a subset of molecularly defined lung cancers. NSCLCs and in particular adenocarcinoma, the most frequent histologic subtype, have been segmented into clinically relevant molecular subsets according to a classification based on multiple so-called oncogenic “driver” alterations (Figure 1A) (1). These somatic aberrations occur in genes that encode signaling proteins crucial for tumor proliferation and survival. Tumors harboring these mutant oncogenes may be systematically identified and targeted specifically using tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapies that ensure dramatic and durable clinical benefit. The first example of a clinically relevant NSCLC driver oncogene was the identification of somatic mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene (2–4). Common *EGFR* alterations (the L858R point mutation and exon 19 deletions) are present in 10–30% of patients with NSCLC and confer sensitivity to gefitinib, erlotinib, and afatinib. As first-line treatment, *EGFR* inhibitors can produce overall response rates (ORR) of 75% in selected NSCLC patients (5).

Similarly to *EGFR* mutations, the *ALK*-gene rearrangement defines a unique molecular subset in 3–7% of NSCLC patients (6). *ALK*-gene rearrangement involves the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene and, most often, the echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (*EML4*) loci which both map to the short arm of the human chromosome 2 in opposite directions (7, 8) (Figure 1B). Several different in-frame fusion variants of *EML4-ALK* have been described with different *EML4* breakpoints. However, all fusion variants contain the same C-terminal domain, which confers a gain of function resulting in constitutively active

fusion proteins with potent transforming activity. The clinical characteristics of NSCLC patients that are positive for *EML4-ALK* variants are similar to those of who harbor activating mutations in the *EGFR* gene: both groups of patients tend to manifest an adenocarcinoma histological subtype and to be non or light smokers (9). The discovery that the *EML4-ALK* fusion protein was a potent oncogenic driver in NSCLC rapidly fueled the development of the multi-targeted TKI crizotinib, and accelerated its FDA approval for the treatment of patients with advanced *ALK*-positive NSCLC. Two studies have since shown an ORR of 60% and a median progression free survival (PFS) of 8–9 months in *ALK*-positive NSCLC patients receiving crizotinib (10). Another study compared treatment with crizotinib to chemotherapy in *ALK*-positive NSCLC patients and showed that the PFS was longer for patients receiving crizotinib (7.7 months) than for those treated with chemotherapy (3 months) (11). Despite this high response rate in *ALK*-rearranged NSCLC, most patients develop resistance to crizotinib, typically within 1 year. Next generation *ALK* inhibitors with potentially improved efficacy and selectivity compared to crizotinib are currently being developed to overcome this resistance to crizotinib. In a recent phase I study, ceritinib demonstrated marked anti-tumor activity in both crizotinib-relapsed and crizotinib-naïve patients (12).

Prospective molecular profiling of NSCLC is now performed in routine clinical practice to identify oncogenic “driver” abnormalities and to screen eligible patients for targeted TKI therapies. Tumor tissue may be difficult to obtain in advanced/metastatic NSCLC patients for whom surgery is rarely a component of the treatment strategy. The molecular characteristics or biomarkers



are most commonly identified on tumor biopsy samples although tissue adequacy, both in terms of quantity and quality, is often insufficient for patients with advanced/metastatic NSCLC. The detection of an ALK rearrangement is currently performed on small biopsies or fine-needle aspirates of the tumor but is hindered by the very limited tissue quantities available. The diagnosis of ALK rearrangement can be performed by fluorescence

*in situ* hybridization (FISH, which is considered as the gold standard), immunohistochemistry (IHC), or reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) on these tumor samples. Wang et al. recently reported that FISH and IHC results were concordant in 98% of cases while RT-PCR results were less concordant with FISH (89%). FISH is highly specific but is costly and requires technical expertise. The IHC assay developed by Ventana (Ventana

ALK assay) enables to detect *ALK* rearrangement with a high sensitivity and concordance when compared to FISH results, and has the advantage to be automated, faster, and less expensive than

FISH (13). Treatment with crizotinib was FDA approved with a companion diagnostic test, the Vysis *ALK* break apart FISH probe kit (Abott molecular). Finding alternatives to a tumor biopsy and

**Table 1 | Numbers and percentages of ALK-rearranged cells in tumor and in CTCs of ALK-positive and ALK-negative patients.**

ALK positive (P) or negative (PN) patients <sup>a</sup>	Sex	Age	Smoking status <sup>b</sup>	Tumor % of rearranged cells <sup>c</sup>	CTCs characterized by ISET		
					Total CTCs (/mL) <sup>d</sup>	Rearranged CTCs (/1 mL)	% of rearranged CTCs <sup>e</sup>
P1	M	32	3	97%	16	9	56%
P2	M	35	0	47%	17	9	53%
P3	F	40	0	30%	10	5	50%
P4	M	54	0	30%	9	4	44%
P5	F	79	0	60%	25	10	40%
P6	F	69	0	43%	28 <sup>g</sup>	34	100%
P7	M	69	20	27%	25	7	28%
P8	M	48	3.5	RT-PCR <sup>+</sup> <sup>f</sup>	25	24	96%
P9	F	70	40	61%	15	6	40%
P10	M	53	0	30%	17	7	41%
P11	F	25	0	68%	16	7	44%
P12	F	44	12.5	29%	10	9	90%
P13	F	36	0	77%	7	4	57%
P14	M	48	5	62%	17	11	65%
P15	F	42	0	25%	10	7	70%
P16	F	52	0	26%	14	9	64%
P17	F	42	10	25%	10 <sup>g</sup>	11	100%
P18	F	57	0	28%	18 <sup>g</sup>	25	100%
PN1	F	42	0	0%	45	0	0%
PN2	M	60	60	0%	26	0	0%
PN3	M	67	35	0%	4	1	0%
PN4	F	57	35	NA	42	1	2%
PN5	M	76	52	NA	13	0	0%
PN6	F	53	20	IHC	20	1	5%
PN7	F	53	45	NA	33	1	3%
PN8	M	44	40	NA	37	0	0%
PN9	M	54	30	0%	20	1	5%
PN10	M	59	40	0%	19	1	5%
PN11	F	59	20	0%	10	1	10%
PN12	M	66	100	0%	23	1	4%
PN13	M	66	75	0%	12	1	8%
PN14	M	75	60	0%	16	1	6%

ALK, anaplastic lymphoma kinase; CTC, circulating tumor cell; FISH, fluorescence in situ hybridization; NA, not available; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

<sup>a</sup>All patients have metastatic disease.

<sup>b</sup>Number of pack-years. All patients are former or never smokers (0: never smokers).

<sup>c</sup>Percentage of rearranged tumor cells determined by FISH in tumor samples.

<sup>d</sup>Total numbers of CTCs per milliliter were calculated as the mean of CTCs identified by combining a four-color immunofluorescent staining with cytomorphological examination in 3 × 1 mL of blood.

<sup>e</sup>Percentage of ALK-rearranged CTCs is the proportion of ALK-rearranged CTCs determined by FA-FISH among total numbers of CTCs determined in independent experiments by combining a four-color immunofluorescent staining with cytomorphological examination.

<sup>f</sup>The biopsy was negative by FISH but positive by RT-PCR.

<sup>g</sup>In this three patients, numbers of ALK-rearranged CTCs were slightly greater to the number of total CTCs identified by phenotypic analysis. This difference is due to the fact that numbers of CTCs may differ between each spot of the filter.

more effective means to diagnose an *ALK* rearrangement is a critical issue in order to identify NSCLC patients who may benefit from an ALK inhibitor treatment.

Molecular characterization of circulating tumor cells (CTCs) may inform on the status of predictive biomarkers for drug sensitivity and therapy selection. CTCs are, however, very rare events occurring at rates, as low as one cell per  $10^6$  or  $10^7$  leukocytes. Most methods of CTC detection rely on the combination of two successive steps, an initial enrichment process followed by CTC detection so as to increase the sensitivity of the assay (14). Numerous technical efforts have been made to reliably detect and quantify CTCs, although the development of a universal assay has proven quite difficult. The major technical challenges for CTC detection are due to the rarity of CTCs and their high degree of phenotypical and molecular heterogeneity. Using the CellSearch platform, which is based on the detection of epithelial cells expressing EpCAM, CTCs levels have been observed to be prognostic in various metastatic solid tumors including NSCLC and SCLC. Using an enrichment technique based on blood filtration (ISET, isolation by size epithelial tumor cells), the prognostic value of CTCs was also reported in patients with resected NSCLC. We and others groups have reported that CTCs are identified in higher numbers using the ISET technique compared to the CellSearch method in NSCLC most likely due to the fact that CTCs expressing markers of epithelial–mesenchymal transition (EMT) and that have lost epithelial features are missed by CellSearch (15). In spite of technical difficulties, a few studies have demonstrated the feasibility of CTC assays for predictive biomarker detection. Two groups including our own have reported the feasibility of detecting *ALK* rearrangement from CTCs enriched by filtration in patients with *ALK*-positive NSCLC (16, 17). Ilie et al. reported the detection of *ALK* rearrangement and strong ALK protein expression by IHC in CTCs from five patients with *ALK*-rearranged NSCLC. FISH and IHC were negative in CTCs from 82 NSCLC patients whose tumors did not harbor *ALK* rearrangement. In order to exploit CTCs as predictive biomarkers of personalized treatments, our group developed a FISH method on filters (filter adapted-FISH, FA-FISH) that was optimized for high cell recovery. By combining blood filtration and FA-FISH, we demonstrated that *ALK*-rearranged CTCs could be detected in a cohort of 18 *ALK*-positive NSCLC patients (17). All 18 *ALK*-positive patients had four or more *ALK*-rearranged CTCs per milliliter of blood while no or only one *ALK*-rearranged CTC was detected in 14 *ALK*-negative patients (Table 1). Furthermore, all CTCs harbored a unique *ALK*-rearrangement pattern consisting in the 3'5' break apart of *ALK* probes whereas heterogeneous rearrangement patterns were present within the tumor. This unique 3'5' pattern was present in CTCs harboring either a single copy of *ALK* or a gain of native *ALK* copies (Figure 1C). CTCs harboring an isolated red signal pattern were never detected in *ALK*-positive patients, even when isolated red signals were exclusively present in the tumor biopsies. The split rearrangement pattern was therefore detected in CTCs regardless of the frequency of tumor cells harboring this rearrangement in the tumor tissue. *ALK*-rearranged CTCs harboring this unique rearrangement expressed a mesenchymal phenotype, suggesting that these cells may have derived from the clonal selection of tumor cells harboring greater invasive and

migratory properties (Figure 1D). In this study, we also demonstrated that monitoring quantitative and qualitative changes of CTCs with distinct *ALK* abnormalities pattern was feasible in patients undergoing ALK inhibitor therapy.

By demonstrating that *ALK* rearrangement can be reliably detected in the CTCs of *ALK*-positive NSCLC patients, these two studies provide new perspectives for the diagnosis of *ALK*-positive patients eligible for treatment with ALK inhibitors. These non-invasive molecular analyses performed on CTCs could be easily repeated at different time-points during treatment and could help to guide therapeutic decisions in a patient's treatment course. Single cell analyses of CTCs captured on filters at the time of disease progression are also anticipated to help characterize resistant subclones and mechanisms of resistance to ALK inhibitors.

## REFERENCES

- Shames DS, Wistuba II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol* (2014) **232**(2):121–33. doi:10.1002/path.4275
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**(36):13306–11. doi:10.1073/pnas.0405220101
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* (2004) **304**(5676):1497–500. doi:10.1126/science.1099314
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* (2004) **350**(21):2129–39. doi:10.1056/NEJMoa040938
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2012) **13**(3):239–46. doi:10.1016/S1470-2045(11)70393-X
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* (2010) **363**(18):1693–703. doi:10.1056/NEJMoa1006448
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* (2007) **448**(7153):561–6. doi:10.1038/nature05945
- Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* (2009) **27**(26):4232–5. doi:10.1200/JCO.2009.23.6661
- Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* (2010) **16**(22):5581–90. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0851
- Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* (2012) **13**(10):1011–9. doi:10.1016/S1470-2045(12)70344-3
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* (2013) **368**(25):2385–94. doi:10.1056/NEJMoa1214886
- Shaw AT, Engelman JA. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* (2014) **370**(26):2537–9. doi:10.1056/NEJMc1404894
- Wang J, Cai Y, Dong Y, Nong J, Zhou L, Liu G, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with primary lung adenocarcinoma harboring ALK rearrangements detected by FISH, IHC, and RT-PCR. *PLoS One* (2014) **9**(7):e101551. doi:10.1371/journal.pone.0101551
- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* (2009) **35**(5):463–74. doi:10.1016/j.ctrv.2009.03.004
- Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* (2011) **105**(9):1338–41. doi:10.1038/bjc.2011.405

16. Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V, Coelle C, Mauro V, et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* (2012) **23**(11):2907–13. doi:10.1093/annonc/mds137
17. Pailler E, Adam J, Barthelemy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* (2013) **31**(18):2273–81. doi:10.1200/JCO.2012.44.5932

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

*Received: 04 August 2014; accepted: 29 September 2014; published online: 05 November 2014.*

*Citation: Faugeroux V, Pailler E, Auger N, Taylor M and Farace F (2014) Clinical utility of circulating tumor cells in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Front. Oncol.* **4**:281. doi: 10.3389/fonc.2014.00281*

*This article was submitted to Thoracic Oncology, a section of the journal *Frontiers in Oncology*.*

*Copyright © 2014 Faugeroux, Pailler, Auger, Taylor and Farace. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*





EXPERT  
REVIEWS

## The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer

Expert Rev. Mol. Diagn. Early online, 1–25 (2015)

Kirsty Ross<sup>1,2</sup>,  
 Emma Paillet<sup>1,2</sup>,  
 Vincent Faugeroux<sup>1,2</sup>,  
 Melissa Taylor<sup>1</sup>,  
 Marianne Oulhen<sup>1,2</sup>,  
 Nathalie Auger<sup>3</sup>,  
 David Planchard<sup>4</sup>,  
 Jean-Charles Soria<sup>1,4</sup>,  
 Colin R. Lindsay<sup>1,2</sup>,  
 Benjamin Besse<sup>4</sup>,  
 Philippe Vielh<sup>1,2,3,†</sup> and  
 Françoise Farace<sup>\*1,2,‡</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U981 “Identification of Molecular Predictors and new Targets for Cancer Treatment”, F-94805, VILLEJUIF, France

<sup>2</sup>Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, “Circulating Tumor Cells” Translational Platform, CNRS UMS3655 – INSERM US23 AMMICA, F-94805, VILLEJUIF, France

<sup>3</sup>Department of Biopathology, Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>4</sup>Department of Medicine, Gustave Roussy, F-94805, Villejuif, France

<sup>†</sup>Authors contributed equally.

<sup>\*</sup>Author for correspondence:

Tel.: (33)142115198

francoise.farace@gustaveroussy.fr

In non-small-cell lung cancer (NSCLC), genotyping tumor biopsies for targetable somatic alterations has become routine practice. However, serial biopsies have limitations: they may be technically difficult or impossible and could incur serious risks to patients. Circulating tumor cells (CTCs) offer an alternative source for tumor analysis that is easily accessible and presents the potential to identify predictive biomarkers to tailor therapies on a personalized basis. Examined here is our current knowledge of CTC detection and characterization in NSCLC and their potential role in *EGFR*-mutant, *ALK*-rearranged and *ROS1*-rearranged patients. This is followed by discussion of the ongoing issues such as the question of CTC partnership as diagnostic tools in NSCLC.

**KEYWORDS:** Circulating tumor cells • non-small-cell lung carcinoma • diagnostic biomarkers • *ALK* rearrangement • *EGFR* mutation

Metastatic disease is responsible for the vast majority of cancer-related deaths.[1] The concept of “disseminating” tumor cells dates back to the “seed and soil” hypothesis first described by Paget in the 19th century.[2] Whilst the metastatic process is still not understood in its entirety, the advent of the “liquid biopsy” consisting of circulating tumor cells (CTCs) collected from peripheral blood has opened an enlightening window into the underlying biology of metastasis.[3–5] The ever-prominent role of molecular targeted therapies in oncology necessitates tumor molecular analysis.[6] Tumor biopsies are often problematic; CTCs offer an easily accessible and alternative tumor source for analysis with potential to offer “real-time” monitoring.[3–5,7]

In this review, we will focus on the potential role of CTCs as diagnostic biomarkers in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). Changes in CTC number with standard therapy and correlation with treatment response have previously highlighted the potential of CTCs as predictive biomarkers.[8–11] Our evolving insight into the molecular basis of NSCLC underpins a large proportion of recent advances

in treatment options. The success of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in *EGFR* mutants and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in *ALK*-rearranged NSCLC patients heralded a new paradigm of molecular targeted therapies in the management of lung cancer.[12–22] Patient genotyping and eligibility for targeted treatment is currently identified using tumor biopsies.[23] Even in the event of a successful biopsy, tumor heterogeneity, between the primary site and metastases or potentially within one site, can obscure the tumor’s true genetic profile.[24–26] CTCs are proposed to offer a more accurate representation of a tumor’s evolution, providing insight into tumor heterogeneity, genomic diversity of metastatic disease and underlying oncogenic alterations resulting in resistance—thereby serving as a “liquid biopsy.” Identification of predictive biomarkers in CTCs to aid treatment decisions within the targetable genotype specific subgroups (*EGFR/ALK/c-ros* oncogene 1 (*ROS1*)) would clearly be beneficial.

CTCs analysis is multifaceted—with the option to study CTCs' DNA, RNA, proteins and functionally *in vitro/in vivo* including the xenotransplantation of CTCs into immunodeficient mice.[3,27,28] With a variety of analytes and such high prospects, what are the factors holding CTCs back from utilization in the clinical setting? The rarity of CTCs makes detection and analysis difficult, and procedures complex, time-consuming and expensive—overall making reproducibility of techniques challenging. The presence of such low numbers detectable in blood ultimately also limits validation of techniques and analysis. Another aspect to “liquid biopsies” is the field of circulating tumor DNA (ctDNA) which has been reinvigorated with the development of next generation sequencing. Debate surrounds whether it will be ctDNA or CTCs that will prevail as the best method of “liquid biopsy” or whether a complimentary approach is best. In this review, we will discuss the methods available for CTC detection and characterization, and salient points on the biology of CTCs, and will describe the detection of predictive biomarkers in CTCs in NSCLC (*EGFR/ALK/ROS1*). We will then cover the potential comparative and collaborative role of CTCs and ctDNA and conclude with our opinion on the next most important steps to develop the diagnostic role of CTCs to clinical utility. We will focus on NSCLC, and yet also describe important findings reported from other cancer types which have contributed to the field.

### CTC detection and characterization

CTCs were first detected in 1869 from an autopsy of a patient who had died from metastatic cancer.[29] Despite knowledge of their existence for well over a century, research continues to address the question of the best methods of detection and analysis. Numerous CTC enrichment and identification methods have been published during the past 10 years generating a huge diversity of data, which can be confusing for the scientific and medical community. CTC detection remains technically challenging principally due to the extreme rarity with which CTCs occur in the bloodstream: one CTC per  $\sim 10^7$  white blood cells per milliliter of blood.[3–5] The identification and characterization of CTCs therefore requires extremely sensitive and specific analytical methods that are usually a combination of enrichment and detection procedures [30–33] (Table 1).

### CTC enrichment

CTC enrichment can be achieved either by capturing CTCs among normal blood cells (positive selection) or by depleting normal leukocytes (negative selection). Enrichment procedures through positive selection can be achieved through use of biological features such as the expression of tumor-specific cell surface markers or through means of the physical properties of the cells such as size, density or charge. Depletion of normal leukocytes usually relies on the expression of CD45 by the cells. In theory, the negative selection approach offers the advantage to have no *a priori* on the physical or biological properties of the CTCs—therefore widening the scope of CTC detection to cover the heterogeneity of CTCs. The number of remaining

normal blood cells is, however, much higher using negative selection and this approach is less developed than the positive selection approach. Immunocapture of CTCs is the most widely used approach. After enrichment, CTCs need to be identified by a well-defined method that can distinguish tumor cells from normal blood cells at the single-cell level—this is usually achieved by virtue of immunofluorescence (IF) or immunocytochemistry (ICC), cytomorphological analysis, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) or polymerase chain reaction (PCR)-based methods.[27,28,30–33]

CTC capture using antibodies against cell surface antigens

The CellSearch<sup>®</sup> platform (Janssen Diagnostics Company, Rarita, USA) is the most commonly used method of detecting CTCs—a semiautomated immunomagnetic system, which quantifies CTCs in whole blood samples. Notably this is the only CTC enumeration system to have been fully validated with respect to reproducibility and performance characteristics and the only technology to have been deployed in large-scale multicenter trials, leading to its approval by the Food and Drug Administration (FDA) as an aid to prognosis assessment in patients with metastatic breast, prostate and colorectal cancer.[10,36,56] The CellSearch platform enriches CTCs using ferromagnetic beads coated in epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). CTCs are defined according to positivity for DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole; indicating a nucleated cell), positivity for cytokeratins (CK) in the cytoplasm, and negativity for the leukocyte common antigen CD45. CTC identification by CellSearch relies exclusively on the detection of fluorescent signals and not on true morphological criteria such as size, presence of nucleus irregularity or high nucleus-to-cytoplasmic ratio.[34]

The Adnatest<sup>®</sup> (Qiagen Hannover GmbH, Langenhagen, Germany) is another epithelial-marker based approach allowing positive enrichment of CTCs. [40] Other novel and promising EpCAM-based enrichment technologies include microfluidic devices, including the CTC-chip, Herringbone-chip, Ephesia CTC-Chip and Isoflux<sup>™</sup> (Fluxion Biosciences Inc., South San Francisco, CA, USA).[37–44] Recently another chip platform was published which combines size filtration and immunocapture.[39] The Magsweeper enriches CTCs using a magnetic rod prelabeled with anti-EpCAM antibody-coated magnetic beads, which is stirred through the blood sample. [42] Finally, GILUPI Nanomedizin (GILUPI GmbH, Potsdam, Germany) has developed a strategy based on the use of nanodetectors bound with an anti-EpCAM antibody-coated functionalized medical wire which is placed directly into a vein, thus increasing the volume of blood that is in contact with the detector and therefore allowing the capture of greater numbers of CTCs.[43]

A major caveat to EpCAM-based enrichment technologies is that if a subset of CTCs undergoes epithelial–mesenchymal transition (EMT)—whereby epithelial markers are downregulated—these technologies most likely fail to enrich an important subpopulation of cells and might miss an aggressive and

**Table 1. Principal methods of CTC enrichment and detection strategies.**

Technology	CTC enrichment	CTC detection	Additional information
<i>Antibody-based CTC capture</i>			
CellSearch® [34,35]	Anti-EpCAM-coated ferromagnetic beads	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF for CK, CD45 and DAPI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FDA approval in advanced breast, colorectal and prostate cancer [36]</li> <li>• No morphological analysis</li> </ul>
CTC chip [37]	Anti-EpCAM antibody-coated microposts	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF for DAPI, CK, CD45 ± RT-PCR for selected genes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microfluidic microchip: laminar blood flow through microposts</li> <li>• CTCs are immobilized in the microfluidic chamber making standard cytopathological analysis or single-cell molecular characterization difficult</li> </ul>
Herringbone chip (HB-Chip) [38]	Anti-EpCAM antibody-coated microposts and chip surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF for CK, CD45 and DAPI ± tumor specific markers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microfluidic microchip: generation of microvortices to increase interactions between target CTCs and the EpCAM antibody-coated chip surface</li> <li>• CTCs are immobilized in the microfluidic chamber making standard cytopathological analysis or single-cell molecular characterization difficult.</li> </ul>
CTC iCHIP [39]	Magnetic bead capture combined with microfluidic processing	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF or RT-PCR</li> <li>• EpCAM- &amp; EpCAM+ CTC detection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microfluidic processing: inertial focusing strategy allows positioning of cells in a near-single file line which are then deflected using minimal magnetic force into microchannels.</li> <li>• Magnetically labeled target cells sorted either through positive selection, by selection of EpCAM+ cells for CTCs or negative selection, through selection of CD45+ cells for leukocytes.</li> </ul>
AdnaTest® [40]	Immunomagnetic: EpCAM and MUC1-coated magnetic beads	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunocaptured cells are lysed to allow mRNA extraction then multiplex RT-PCR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allows analysis on the gene expression profile of CTCs.</li> <li>• RT-PCR for MUC1, HER2 or EpCAM</li> </ul>
IsoFlux™ [41]	Immunomagnetic: EpCAM-coated magnetic beads plus microfluidic processing	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF for CK, CD45 and Hoechst</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enables detection of intact viable CTCs</li> </ul>
MagSweeper [42]	Immunomagnetic: EpCAM-coated magnetic beads on a magnetic rod	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microscopic visualization</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Magnetic rod rotates in sample to isolate CTCs, rod then placed in buffer to release CTCs.</li> </ul>
GILUPI cell collector™ [43]	Functionalized EpCAM-coated medical wire placed directly into vein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF for EpCAM, CK and DAPI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Collection <i>in vivo</i> to the functionalized 2-cm long tip of the CellCollector™</li> <li>• Allows screening of a larger blood volume.</li> </ul>
Ephesia CTC-chip [44]	Functionalized magnetic beads combined with microfluidic processing	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF for cell surface and nuclear markers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allows analysis by IF and morphological criteria and gene profiling.</li> </ul>
Folate-receptor-based CTC detection [45]	Lysis of erythrocytes then use of anti-CD45 and anti-CD14 magnetic beads for immunomagnetic depletion of leukocytes and macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Labeling with conjugates of a tumor-specific ligand folic acid and synthesized oligonucleotide</li> <li>• Subsequent quantification with RT-PCR</li> <li>• IF for folate, CK and DAPI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Folate receptors are highly expressed in a variety of cancers, especially in ovarian and lung cancers. In contrast, normal tissues express low to negligible levels.</li> <li>• Has demonstrated detection of CTCs in Stage I NSCLC</li> </ul>

(continued)

**Table 1. (continued).**

Technology	CTC enrichment	CTC detection	Additional information
<i>Physical Characteristic-based capture</i>			
ISET® [46]	Cell size-based filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF &amp; FISH, or single-cell analysis following laser microdissection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Can detect nonepithelial cells and CTC microemboli</li> <li>• Allows true morphological identification of CTCs</li> </ul>
ScreenCell® [47]	Cell size-based filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF &amp; FISH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Can detect nonepithelial cells</li> <li>• Allows morphological analysis</li> <li>• Potential to isolate living cells</li> </ul>
Microdevice—Cote's Group [48]	Cell size-based filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF: CK, CD45, DAPI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Can detect nonepithelial cells</li> <li>• Allows morphological analysis</li> <li>• Portable microdevice</li> </ul>
Accucyte® System [Cytefinder™ & Cytepicker™] [49]	Density-based separation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF; CK, CD45, EpCAM, DAPI/Hoechst</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Automatic preparation for slide-based analysis &amp; single-cell retrieval for genomic analysis</li> </ul>
Parsortix [50]	Size-based selection of CTCs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF; CK, CD45, DAPI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detection of nonepithelial cells</li> <li>• IF of cells within cassette for identification and enumeration</li> <li>• Alternatively cells can be removed from the cassette for staining +/- or downstream gene expression analysis; FISH, qPCR, NGS</li> </ul>
<i>Live cell detection</i>			
EPISPOT [51]	Protein assay—CD45 depletion and short-term culture in plates coated in antibody against MUC-1, Protein Specific Antigen (PSA) or cytokeratin-19	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IF secondary antibodies to MUC-1, PSA or cytokeratin-19</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detection of live CTCs</li> </ul>
CAM [52]	Density gradient centrifugation then cells are added to CAM for short-term culture	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICC for cell-surface markers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detection of live CTCs</li> </ul>
Telomerase-based assay [53]	Centrifugation through a density gradient	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter element, probe</li> <li>• Cell size and IF intensity analysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detection of live CTCs</li> </ul>
<i>Other</i>			
DEPArray™ [54]	Pre-enrichment step necessary	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Movement of cells within chip by electric field changes</li> <li>• IF imaging</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microfluidic system with individually controllable electrodes with embedded sensors which can create dielectrophoretic (DEP) cages around cells</li> <li>• After imaging cells of interest can be moved to specific locations within the chamber, for example, for isolation &amp; recovery</li> </ul>
Epic CTC Platform [55]	No enrichment—nucleated cells dispensed as a monolayer on slides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICC CK, CD45, DAPI &amp; a characterization antibody &amp; FISH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No microfluidic manipulation</li> <li>• Integrated downstream capabilities for IF, FISH, NGS</li> </ul>

CAM: Chick Embryo Chorioallantoic Membrane; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; IF: Immunofluorescence; ISET: Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells; MUC-1: Mucin-1; RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.

clinically relevant subset of cancer cells.[58] For these reasons, increasing attention has been dedicated to technologies that use label-independent enrichment methods.[59,60]

CTC capture using physical properties

CTC enrichment by blood filtration using microporous filters (with filter pore diameters usually of 8  $\mu\text{M}$  size) is a non-immunological CTC isolation technique based on CTCs' larger size and less deformability compared to leukocytes. The filtration approach therefore does not rely on anti-epithelial antigen expression to capture CTCs and may therefore, as discussed above, detect CTCs that would not be detected by immunological approaches. In addition, it has been postulated that circulating tumor microemboli (CTM) may be a particularly aggressive form of CTCs, which could be retained on filters due to their larger size. Several filtration devices have been reported including isolation of tumor cells by size (ISET<sup>®</sup>) (RareCells Diagnostics, Paris, France), the ScreenCell<sup>®</sup> (ScreenCell, Sarcelles, France) approach, the microdevice system developed by Cote's group, Creatv MicroTech (CellSieve<sup>™</sup> microfilters, Rockville, USA) and VyCAP Microsieve<sup>™</sup> membranes (Deventer, The Netherlands).[46–62] These devices differ by several parameters including the nature of the membrane filtration, pore spacing, the necessity or not to perform lysis of erythrocytes prior to filtration and the possibility to control the filtration pressure. CTC enrichment could be achieved at a high recovery rate using some of these filtration devices.[3–5,59,60] CTCs however, in particular those with EMT properties, may not always be larger or stiffer than leukocytes and may not be retained on the filters. Recent size-based separation methods such as the Parsortix (ANGLE plc, Guildford, United Kingdom) have been reported which offer the advantage to collect CTCs independently of membrane filters.[50] Other physical characteristic-based enrichment technologies include the ApoStream<sup>®</sup> (ApoCell Inc., Houston, USA) and Dielectrophoretic Field Flow Fractionation (DEP-FFF) technologies, which exploit the electric properties of CTCs such as the DEParray<sup>™</sup> (Silicon Biosystems S.p.A., Bologna, Italy) system.[54,63,64] The filtration-based systems are usually highly flexible in regard to the detection techniques employed downstream—the enrichment allows true morphological and phenotypical (ICC, IF) analysis and FISH or molecular profiling of single CTCs microdissected from the filters. The AccuCyte<sup>™</sup>-CyteFinder<sup>™</sup> system with the CytePicker<sup>™</sup> (Rarecyte Inc., Seattle, USA) is a novel platform utilizing density-based cell separation and subsequent automatic slide preparation for analysis.[49] Single CTCs can be removed from slides using the Cytepicker<sup>™</sup> for whole genome amplification (WGA), PCR, Sanger sequencing, whole exome sequencing (WES) or array-based comparative genomic hybridization (aCGH). The AccuCyte is differentiated from existing density-based methods as it allows virtually complete harvesting of the buffy coat into a small volume for application to a microscopic slide without cell

lysis or wash steps, which are potential sources of CTC loss.[49] A semiautomated platform combining filtration and immunofluorescence staining is also currently in development by Siemens Healthcare Diagnostics (Elkhart, USA).[65]

#### **Nucleic acid-based approach for detection of CTCs**

A number of studies have tried to detect the presence of CTCs through multiplex PCR targeting various tumor-associated mRNA. Accurate quantification of CTCs is, however, difficult with such an approach as CTCs may express different levels of the genes selected for identification, and precise cutoff values between mRNA levels in normal blood cells and tumor cells needs to be determined.[66–68] These techniques also require considerable investments in time, laboratory infrastructure, computational analysis and bioinformatics support. Analysis of proteins specifically secreted by CTCs might also be used for their identification. The EPISPOT strategy enriches CTCs by negative selection and then cultures them on a membrane coated in antibodies that capture secreted proteins.[51]

#### **Comparative analysis between enrichment based on biological properties vs. physical properties**

Comparative analysis between ISET filtration and the CellSearch<sup>®</sup> in NSCLC patients has revealed an overall higher number of CTCs are captured by ISET.[69–71] Hofman *et al.* performed CellSearch and ISET<sup>®</sup> using double immunofluorescence staining with anti-cytokeratin and anti-vimentin antibodies on 210 patients undergoing radical surgery for NSCLC. CTCs were detected in 69% patients using CellSearch and/or ISET: in 50% using ISET and 39% using CellSearch; 11% of patients had vimentin-positive cells with cytological criteria of malignancy on ISET [69] (the difference in capture between the two techniques is hypothesized to be due to CellSearch underestimating CTCs holding an EMT phenotype). In 2011, our group published a direct comparison of the CellSearch with ISET filtration. CTCs were enumerated in 60 patients with metastatic breast, prostate and lung carcinomas. Concordant results were obtained in 55% (11 out of 20) of breast cancer patients, in 60% (12 out of 20) of prostate cancer patients and in only 20% (4 out of 20) of lung cancer patients. The low concordance of the results suggested that the two techniques might identify different subpopulations of CTCs. Some of the discordance observed may be attributable to the fact that different CTC identification criteria were used (CK positivity and DAPI location *vs.* cytomorphological criteria assessed by a cytopathologist). Overall, the results highlighted the discrepancies between the numbers of CTC enumerated by ISET and CellSearch. These differences were thought to depend largely upon the tumor type.[70] Finally Krebs *et al.* published results in 2012 also reporting greater CTC detection rate *via* ISET. Samples were collected from 40-stage IIIA–IV chemo-naive NSCLC patients—80% (32 of 40) patients were found to be positive for CTCs by ISET compared with 23% (9 of 40) by CellSearch; 43% of patients with stage III/IV NSCLC had CTM detected on ISET but never isolated from CellSearch in



paired samples.[71] Overall, the difference in capture of the two techniques, observed within these three studies, is thought to be a consequence of CellSearch's reliance on EpCAM positivity for CTC detection.

### Genomic profiling of CTCs

The development of novel single-cell sequencing technologies should significantly further the field of CTC-based "liquid biopsy." Single-nucleus sequencing has been shown to be capable of characterizing tumor evolution in breast cancer.[72] aCGH and WGA were utilized by Heitzer *et al.* (in patients with stage IV colorectal cancer (CRC)) and suggested that complex tumor genomes could be distinguished from CTCs. Their results illustrated that most mutations initially found only in single CTCs could retrospectively be detected through ultra-deep sequencing of patients' primary tumors. This suggested that most mutations identified in single CTCs are present at a subclonal level at diagnosis in the primary site. They did however also detect new changes of clinical relevance in CTCs not present in the primary tumor, such as a cyclin-dependant kinase (CDK) 8 amplification, which could represent a potential target for CDK inhibitors.[27]

Ni *et al.* reported results in 2013 on the WGA of single CTCs in lung cancer patients using a recently developed method of multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC).[73] MALBAC was developed to enhance the amplification uniformity across the entire genome.[74] They observed characteristic cancer-associated single-nucleotide variations and insertions/deletions in exomes of CTCs. Every CTC from an individual patient exhibited reproducible copy number variation (CNV) patterns which were similar to the metastatic tumor but not the primary tumor. They also noted that different patients with adenocarcinoma shared similar CNV patterns whereas patients with small-cell lung cancer (SCLC) had distinctly different CNV patterns. Based on their findings, they hypothesized that CNVs are the key events of metastasis; with CNVs at a certain combination of gene loci potentially altering the gene expression of different pathways and conferring a selective advantage for metastasis.[73] Hodgkinson *et al.* successfully developed CTC-derived explant (CDX) mouse models from SCLC patients and performed genomic analysis on both the CDXs and corresponding CTCs. Next-generation sequencing (NGS) of the CDXs demonstrated genomic profiles with characteristics of SCLC but with some alterations from the primary biopsy, suggesting tumor evolution. Matched somatic *TP53* mutations were detected in all CTCs analyzed in the study and there was a prominent similarity in copy number aberration (CNA) patterns between CDXs and CTCs, suggesting that CTCs from a patient with extensive-SCLC are homogeneous.[75]

### Biology of circulating tumor cells

CTCs migrate from primitive tumors or metastases offering a route of metastatic dissemination.[76] Recent works in breast models has illustrated that CTCs can also colonize the primary tumor site and participate in tumor progression.[77] CTCs

harbor complex biology with three key properties expected to contribute to their metastatic capacity. First, EMT which allows migration into vasculature and second, the presence of stem-cell properties which contribute to the re-establishment of tumor tissue at the primary or metastatic site upon tumor recurrence or distant progression [5,78] and lastly, intratumor heterogeneity with the emergence of subclones which support cell survival advantage and promote tumor progression.

### Epithelial–mesenchymal transition

EMT and the reverse process, termed mesenchymal–epithelial transition (MET), are important in embryogenesis.[78,79] Epithelial tumors invade and metastasize through the phenotypic changes of EMT. During EMT, epithelial cells lose cell–cell contacts and cell polarity, downregulate epithelial-associated genes, acquire mesenchymal expression and undergo major changes in their cytoskeleton.[80–82] Overall, the process results in a cell with a mesenchymal appearance with increased motility and invasiveness. Cells undergo this process on a continuum and have been found to harbor varying levels of EMT/MET plasticity; carcinoma cells may present a decrease in the expression of typical epithelial specific markers, such as cytokeratin and EpCAM, and an increase in the expression of mesenchymal markers such as vimentin.[3,81] The concept of EMT does remain a topic of debate; however, recent correlative studies have highlighted its potential significance, with EMT demonstrated in CTCs and a mesenchymal phenotype in tumor tissue associated with a poor prognosis in several cancers including NSCLC.[5,60,81,82] Hou *et al.* studied EMT markers in both SCLC and NSCLC and reported heterogeneous expression within their patient cohort.[82] In 2011, our group showed for the first time the existence of hybrid CTCs with an epithelial/mesenchymal phenotype in patients with NSCLC.[60] When comparing the detection rates of CellSearch and ISET in NSCLC, Hofman *et al.* reported proportions of CTCs, which only expressed vimentin, supporting a mesenchymal phenotype, and their presence was associated with shorter disease-free survival.[59] Studies also suggest that EMT might particularly affect tumor cells with stem-cell properties.[83,84]

It is important to appreciate the evolving process of EMT in CTC analysis.[78,85] This insight has a critical impact since CTCs undergoing EMT may be missed by techniques based on the immunocapture of EpCAM-positive CTCs. Mesenchymal-like CTC subpopulations may be difficult to identify in the hematopoietic cell environment as the latter is also of mesenchymal origin. Experimental studies have also suggested that CTCs "frozen" in a mesenchymal state might not be able to form solid metastases and that these cells need to revert back to an epithelial phenotype.[82] If this is also true in cancer patients, CTCs with the highest EMT/MET plasticity might be the most aggressive ones, supporting both tumor cell dissemination and initiation of metastatic outgrowth.

### Cancer stem cells

Stem cells are vital for the generation and regeneration of all tissues and are defined by their undifferentiated phenotype. The

metastatic process requires disseminated cancer cells to hold the self-renewal capacity of stem cells to ultimately enable formation of macroscopic metastases at distant sites. Among the heterogeneous population of cells that comprise a tumor are cells which harbor the stem cell-like properties of self-renewal and ability to generate differentiated progeny and thus have been called cancer stem cells (CSCs).[83,84,86] Mani *et al.* reported a link between EMT and CSCs when the induction of EMT in human mammary epithelial cells resulted in *de novo* expression of stem cell markers and acquisition of functional stem cell properties.[83]

CTCs believed to hold a CSC phenotype have been detected and in some cases used to establish CDX models and cell lines, thus providing the opportunity for functional testing as well as *in vitro* and *in vivo* drug testing with detection of possible resistance mechanisms. In 2013, Bacelli *et al.* developed a xenograft assay and used it to show that primary human luminal breast cancer CTCs contain metastasis-initiating cells that give rise to bone, lung and liver metastases in mice.[28] Zhang *et al.* provided evidence of the isolation, characterization and long-term culture of human breast cancer CTCs, leading to the description of a brain metastatic selected markers (BMSM) protein signature that is suggestive of CTC metastatic competency to the brain.[87] Yu *et al.* established CTC cultures from patients with estrogen receptor-positive breast cancer. Genome sequencing of the CTC lines revealed pre-existing PIK3CA mutations and newly acquired mutations in the estrogen receptor 1 gene, PIK3CA gene and fibroblast growth factor receptor 2 gene. Subsequent drug sensitivity testing of CTC lines revealed potential new therapeutic targets.[88] In 2015, Cayrefourcq *et al.* reported the establishment of a cell line from CTCs from a patient with colorectal cancer. When analyzed at the genome, transcriptome, proteome and secretome level, the cell line harbored characteristics of the original tumor cells.[89] As described earlier, Hodgkinson *et al.* demonstrated the capacity of CTCs from SCLC patients to form CTC-derived explant (CDX) models in immunocompromised mice. Blood samples from patients with chemotherapy-naïve, extensive-stage SCLC were enriched for CTCs and then injected into the flanks of mice. In four of the six patients, CDXs developed palpable tumors within 4 months of CTC implantation. CTC number was calculated pre-transplantation, using the CellSearch, with higher numbers correlating with shorter time taken to development of a palpable tumor and chemorefractory disease. CDXs were treated with the standard chemotherapy regime of cisplatin/etoposide for SCLC—with the response of CDXs to treatment reflecting the overall survival of the corresponding patients.[75]

#### Circulating tumor cell clusters

CTC clusters consisting of 2–50 tumor cells are present in the blood of patients with cancer but our understanding of their contribution to metastasis is not definitive. Aceto *et al.* used mouse models with tagged mammary tumors and reported that whilst their presence is rare in the circulation compared with single CTCs, CTC clusters have 23–50-fold increased metastatic potential.[90,91] CTC clusters are derived from multicellular groupings of primary tumor cells held together through

plakoglobin-dependent intercellular adhesion. Clustered cells lack the presence of proliferating or apoptotic cells supporting the hypothesis that they hold survival advantage.[91,92] Studies have reported that when CTM were injected into the circulation of mice, they resulted in higher metastatic potential than solitary tumor cells.[93] The lack of proliferation also implies that these CTM would be less responsive to chemotherapy when compared with proliferating single CTCs. Hou *et al.* detected CTM from a subset of SCLC patients using the CellSearch and ISET and reported that their presence correlated with worse prognosis and unfavorable clinical parameters such as extensive stage, elevated lactate dehydrogenase, presence of liver metastasis and higher number of metastatic sites.[94]

#### Intratumor heterogeneity

The potential of personalized medicine is restricted by the complex and evolving genomic landscape of tumors. Recent studies demonstrate the extensive genetic and phenotypic variation, which occurs not only between tumors (intertumor heterogeneity) but also within individual tumors (intratumor heterogeneity). Within tumors, populations of genetically distinct subclones can interact or be spatially separated, and this subclonal architecture varies dynamically through the disease course.[26,95,96] The development of massively parallel sequencing technologies has offered the characterization of cancer genomes at an unprecedented level. This novel insight supported the Darwinian evolutionary process of cancer and uncovered the extent of intratumor heterogeneity throughout solid tumors.[97,98] In NSCLC, De Bruin *et al.* sequenced 25 spatially distinct regions from operable NSCLCs and found evidence of branched evolution, with driver mutations arising before and after subclonal diversification. They noted pronounced intratumor heterogeneity in copy number alterations, translocations and mutations.[97] Our group recently reported considerable heterogeneity noted in CTCs from *ROS1*-rearranged patients, with heterogeneous *ROS1*-gene abnormalities and elevated numerical chromosomal instability (CIN)—hypothesized to be a potential mechanism to escape *ROS1*-inhibitor therapy in *ROS1*-rearranged NSCLC tumors.[99]

Intratumor heterogeneity is a critical limiting factor to the field of personalized medicine. First single-site biopsies could lead to underestimation of a tumor's genomic profile and second it could present major challenges to targeted therapies and biomarker development.[26,100] CTCs are hypothesized to offer a greater representation of a tumor's genetic profile with the opportunity for longitudinal monitoring from a simple blood sample.

#### Detection of predictive biomarkers in CTCs in NSCLC

Enumeration performed sequentially at baseline and through treatment has demonstrated a potential role in assessing treatment response. Hou *et al.* reported in a cohort of SCLC patients that change in CTC number after one cycle of chemotherapy was an independent prognostic factor for SCLC.[94] For those patients receiving treatment with curative intent, persistently elevated levels of CTCs could suggest patients who may benefit



from prolonged or more intensive treatment regimes. Similarly, other roles for CTCs may lie in adapting patient management post-tumor resection. High CTC numbers could potentially identify patients that may benefit from adjuvant therapy. Sequential CTC monitoring may have a role in early suspicion of minimal residual disease and/or recurrence before symptomatic or radiologically detectable disease develops. We have summarized some completed clinical studies and ongoing clinical trials whose aim was to investigate CTCs in NSCLC. (Tables 2 & 3)

The majority of patients with NSCLC are diagnosed with inoperable advanced disease—holding 5-year survival rates of 2%.<sup>[113]</sup> The option of “personalized” therapies tailored according to mutational analysis is highly advantageous and improves overall survival in their genotype-selected patients.<sup>[13,20]</sup> In advanced NSCLC, 10–12% of non-Asian patients and 30–40% of Asian patients harbor *EGFR* mutations; 2–7% have *ALK* rearrangements; and ~1% have *ROS1* rearrangements.<sup>[19,114–117]</sup> With several novel and effective targeted therapies now available, it is of great importance to identify patients who harbor the specific mutations or rearrangements warranting their use. Tumor biopsies are, as described earlier, unfortunately limiting for multiple reasons and liquid biopsies offer the potential to identify predictive biomarkers. The detection of *EGFR* mutations, *ALK* rearrangements and *ROS1* rearrangements has been performed in CTCs.<sup>[99,103–120]</sup> Studies, which we present below, have demonstrated the feasibility and thus the potential to offer important clinical perspectives on molecular driver alterations detected in CTCs and emergence of resistant clones under treatment. The progression from “bench-to-bedside” of these techniques will require further development to standardize the most simple and suitable techniques for large prospective studies, which hold high sensitivity and specificity, for validation in the future.

#### **Epidermal growth factor receptor mutation detection in CTCs**

Maheswaran *et al.* reported the detection of *EGFR* mutations in CTCs in 2008—CTCs were isolated from 27 NSCLC patients using the CTC-chip, microfluidic device containing microposts coated with anti-EpCAM antibodies <sup>[118]</sup> *EGFR* mutational analysis was performed using allele-specific PCR amplification and was compared to the results from the concurrent isolated free plasma DNA and original tumor biopsy. They identified the expected *EGFR*-activating mutation in CTCs from 11 of 12 patients (92%) and in matched free plasma DNA from 4 of 12 patients ( $p = 0.009$ ). They also identified the *T790M* resistance mutation in CTCs from patients who had already received TKI therapy. Serial analysis also demonstrated that reduction in CTC number under treatment was associated with an improved radiological response and vice versa. Interestingly, in patients who developed progression different *EGFR*-activating mutations were identified in CTCs suggesting the emergence of different tumor subclones.<sup>[118]</sup>

Punnose *et al.* reported on the clinical correlation between change in CTC number detected during therapy and treatment response. The study cohort consisted of 41 patients with relapsed or refractory NSCLC who were enrolled in a single arm Phase II clinical trial of erlotinib and pertuzumab. Peripheral blood was analyzed for CTC enumeration using the CellSearch platform at baseline and changes in CTC levels were assessed for correlation with PDG-PET and CT imaging and survival end points. The analysis reported a statistically significant correlation between high baseline CTC counts and patient response to treatment according to RECIST ( $p = 0.009$ ).<sup>[103]</sup>

#### ***ALK*-rearrangement detection in circulating tumor cells**

The detection of *ALK*-positive CTCs was recently reported by two groups.<sup>[119,120]</sup> On the basis that ISET filtration offers higher CTC recovery and a broader coverage of the phenotypic heterogeneity of CTCs in NSCLC, when compared to CellSearch, these two groups utilized ISET for examining *ALK* rearrangement in CTCs.<sup>[69,70]</sup>

In 2012, Ilie *et al.* demonstrated that *ALK* status could be determined in CTCs isolated from patients with NSCLC by immunocytochemistry (ICC) and FISH analysis. CTCs from 87 patients with NSCLC were isolated using ISET filtration and screened for their *ALK* status both in tumor samples and in CTCs. *ALK* break-apart FISH was carried out using the Vysis *ALK* Break Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) on two spots of one ISET filter (each spot corresponding to the filtration of one milliliter of blood). ICC analyses were performed using the anti-*ALK* antibody (5A4 clone) on two other ISET spots. Five patients had *ALK* rearrangement and strong *ALK* protein expression in CTCs and in the corresponding tumor samples. FISH confirmed *ALK* rearrangement with the break apart of the 5' and 3' probes and multiple signals per cell. Both *ALK*-FISH and *ALK* immunoreactivity analyses showed negative results in CTCs and corresponding tumor samples for 82 patients negative in the tumor tissue. For the five patients with *ALK*-rearranged tumors, *ALK*-rearranged CTCs were detected by ICC and FISH in three different CTC samples collected per each patient.<sup>[119]</sup>

Our group published in 2013 a novel approach in detecting *ALK* rearrangement in CTCs with high sensitivity and specificity in patients with NSCLC: combining ISET filtration and a FISH assay optimized for CTC characterization on filters called FA-FISH.<sup>[120]</sup> Levels of four or more *ALK*-rearranged CTCs per milliliter of blood were detected in all 18 *ALK*-positive patients tested, but no or only one *ALK*-rearranged CTC was detected in 14 *ALK*-negative patients. Using the threshold of four *ALK*-rearranged CTCs per 1 ml of blood, sensitivity and a specificity of 100% was met for predicting the *ALK*-rearrangement status present within the tumors. Diagnosis of *ALK* rearrangement by FISH on paraffin-embedded tumor samples uses a threshold of 15% of *ALK*-rearranged cells, which represents two standard deviations above the mean cell count in negative tumor samples. Due to the rarity of CTCs in blood, we proposed using the number of *ALK*-rearranged CTCs per volume of blood

**Table 2. Summary of clinical studies of circulating tumor cells in non-small-cell lung carcinoma.**

Authors	Study title	Purpose	Methods	Results	Authors' summary	Ref.
Sawabata <i>et al.</i>	<b>Circulating tumor cells in peripheral blood caused by surgical manipulation of non-small-cell lung cancer: pilot study using an immunocytology method</b>	To determine whether cancer cells can be detected during and after surgery using an immunocytology method.	Nine patients undergoing a lobectomy for NSCLC were studied. The presence of CTCs was determined by using the CellSearch system.	<ul style="list-style-type: none"> <li>one patient showed evidence of CTCs at thoracotomy, and three patients did so after surgery. Ten days after the operation, the CTCs had disappeared in all these cases.</li> <li>The median follow-up period was 14 months, and there was no cancer recurrence in any of the patients.</li> </ul>	Using this technique, tumor cells were detected in the peripheral blood of patients before and after lobectomy procedures. It could be argued that this method can provide useful information about patients undergoing lung cancer treatment.	[101]
Krebs <i>et al.</i>	<b>Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer</b>	To investigate whether CTCs are detectable in patients with NSCLC and what their ability might be to provide prognostic information and/or early indication of patient response to conventional therapy.	101 patients with previously untreated, Stage III or IV NSCLC had blood samples collected for CTC analysis before and after administration of one cycle of standard chemotherapy. CTCs were measured using the CellSearch system.	<ul style="list-style-type: none"> <li>The no. of CTCs in 7.5 ml of blood was higher in patients with Stage IV NSCLC (n = 60; range, 0–146) compared with patients with Stage IIIB (n = 27; range, 0–3) or IIIA disease (n = 14; no CTCs detected).</li> <li>In univariate analysis, PFS was 6.8 vs. 2.4 months with (p &lt; .001), and OS 8.1 vs. 4.3 months (p &lt; .001) for patients with &lt;5 CTCs compared with ≥5 CTCs before chemotherapy, respectively.</li> <li>In multivariate analysis, CTC no. was the strongest predictor of OS (HR 7.92; p &lt; .001), and the point estimate of the HR was increased with incorporation of a second CTC sample that was taken after one cycle of chemotherapy (HR, 15.65; p &lt; .001).</li> </ul>	CTCs are detectable in patients with Stage IV NSCLC and are a novel prognostic factor for this disease. Further validation is warranted before routine clinical application.	[102]

(continued)

Table 2. (continued).

Authors	Study title	Purpose	Methods	Results	Authors' summary	Ref.
Hofman <i>et al.</i>	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	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparison of the efficacy of the CellSearch and the ISET enrichment methods for detection of CTCs before radical surgery in NSCLC patients.</li> <li>• To evaluate for correlation between the presence of CTCs and the prognostic value.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detection and enumeration of CTCs in 210 consecutive patients undergoing radical surgery for NSCLC were evaluated with the CellSearch Assay™ (CS), using the CellSearch Epithelial Cell Kit, and by the ISET method, using double immunolabeling with anti-cytokeratin and anti-vimentin antibodies.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CTCs were detected in 144 of 210 (69%) patients using CS and/or ISET and in 104 of 210 (50%) and 82 of 210 (39%) patients using ISET and CS, respectively. Using ISET, 23 of 210 (11%) patients had vimentin-positive cells with cytological criteria of malignancy.</li> <li>• Disease-free survival (DFS) was worse for patients with CTCs compared to patients without CTCs detected by CS alone (<math>p &lt; 0.0001</math>) or by ISET alone (<math>p &lt; 0.0001</math>).</li> <li>• The presence of CTCs detected by both CS and ISET correlated even better with shorter DFS at a univariate (<math>p &lt; 0.0001</math>) and multivariate level (<math>p &lt; 0.001</math>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CS and ISET are complementary methods for detection of CTCs in preoperative radical surgery for NSCLC.</li> <li>• CTC detection in resectable NSCLC patients using CS and/or ISET could be a prognostic biomarker of great interest and may open up new avenues into improved therapeutic strategies for lung carcinoma patients.</li> </ul>	[59]
Punnoose <i>et al.</i>	Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical end points in a Phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib	<ul style="list-style-type: none"> <li>• To investigate the utility of CTC enumeration and characterization using the CellSearch platform, as well as mutation detection in ctDNA, in patients with advanced NSCLC.</li> <li>• To assess for CTCs' role as surrogate end points or their use for predictive biomarker evaluation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 41 patients were enrolled in a single-arm Phase II clinical trial of erlotinib and pertuzumab. Peripheral blood was analyzed for CTC enumeration, EGFR expression in CTCs and detection of oncogenic mutations in CTCs and ctDNA.</li> <li>• Changes in CTC levels were correlated with FDG-PET and CT imaging and survival end points.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CTCs were detected (<math>\geq 1</math>CTC) at baseline in 78% of patients.</li> <li>• Greater sensitivity for mutation detection was observed in ctDNA than in CTCs and detected mutations were strongly concordant with mutation status in matched tumor.</li> <li>• Higher baseline CTC counts were associated with response to treatment by RECIST (<math>p = 0.009</math>) and decreased CTC counts upon treatment were associated with FDG-PET and RECIST response (<math>p = 0.014</math> and <math>p = 0.019</math>) and longer PFS (<math>p = 0.050</math>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Data provides evidence of a correlation between decreases in CTC counts and radiographic response by either FDG-PET or RECIST in patients with advanced NSCLC.</li> <li>• These findings require prospective validation but suggest a potential role for using CTC decreases as an early indication of response to therapy and ctDNA for real-time assessment of mutation status from blood.</li> </ul>	[103]

(continued)

**Table 2. (continued).**

Authors	Study title	Purpose	Methods	Results	Authors' summary	Ref.
Hirose <i>et al.</i>	<b>Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer</b>	The aim of this study was to investigate the relationship of the number of CTCs with the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic NSCLC.	Prospective evaluation of CTCs in the peripheral blood of 33 patients with previously untreated metastatic NSCLC. All patients received combination chemotherapy with gemcitabine and carboplatin. The CTCs were captured using the CellSearch system. Blood samples with one or more CTC per 7.5 ml were defined as positive.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Of the 33 patients, 12 (36.4%) had positive CTCs and 5 (15.2%) had five or more CTCs before chemotherapy.</li> <li>There were no differences in response rates to cytotoxic chemotherapy between CTC-positive patients and CTC-negative patients.</li> <li>The rate of progressive disease in cytotoxic chemotherapy was significantly higher in CTC-positive patients (66.7%) than in CTC-negative patients (23.8%, <math>p = 0.02</math>). CTCs positive in 36.4 and 15.2% had five or more CTCs before CT.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>The number of CTCs could be a useful predictive factor for the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic NSCLC.</li> </ul>	[104]
Muinelo-Romay <i>et al.</i>	<b>Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced NSCLC patients receiving first-line systemic treatment</b>	To investigate the prognostic value of CTC and their utility for therapy monitoring in NSCLC	43 patients with newly diagnosed NSCLC were prospectively enrolled. Blood samples were obtained before the 1st, 2nd and 5th cycles of chemotherapy and analyzed using CellSearch technology. Both CTC and CTC-related objects (not morphological standard or broken epithelial cells) were counted.	<ul style="list-style-type: none"> <li>At baseline 18 (41.9%) patients were positive for intact CTC count and 10 (23.2%) of them had <math>\geq 5</math> CTCs, while CK positive events were found in 79.1% of patients.</li> <li>The group of patients with CTCs <math>&gt;5</math> at baseline presented worse PFS and OS than those with <math>&lt;5</math> CTCs (<math>p = 0.034</math> and <math>p = 0.008</math>, respectively).</li> <li>High levels of total CK-positive events were associated with poor prognosis in the group of patients with <math>&lt;5</math> CTCs.</li> <li>Patients presenting with increased levels of CTC during the treatment demonstrated lower OS and PFS rates</li> </ul>	All these data supported the value of CTC as a prognostic biomarker and as a surrogate indicator of chemotherapy effectiveness in advanced NSCLC patients, with the additional value of analyzing other "objects" such as apoptotic CTC or CK fragments to guide the clinical management of these patients.	[105]

ALK: Anaplastic lymphoma kinase; CS: CellSearch; CTCs: Circulating tumor cells; DFS: Disease-free survival; EGFR: Epidermal growth factor receptor; FDG-PET: Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography; ISET: Isolation by size of epithelial tumor cells; NSCLC: Non-small-cell lung carcinoma; ORR: Overall response rate; PFS: Progression-free survival; RECIST: Response evaluation in solid tumors.

**Table 3. Summary of clinical trials studying circulating tumor cells in non-small-cell lung carcinoma.**

Sponsor center	Official study title, status & study type	Purpose	Primary outcome measures	Secondary outcome measures	Study completion date & clinical trial identifier	Ref
<b>Epic Sciences</b>	<b>Phase 2 Study of circulating tumor cell in non-small cell lung carcinoma</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recruiting</li> <li>• Observational</li> <li>• Prospective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• To establish the CTC assay as a surrogate for tissue diagnosis of suspected primary lung cancer.</li> <li>• Evaluating clinical and molecular markers to stratify the outcome/survival in patients with thoracic malignancies.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CTC Enumeration (time frame: 3 months from baseline, an average of 2 weeks post patient tissue biopsy)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lung cancer subtyping</li> <li>• Nodal staging</li> <li>• Establish the prognostic value by measuring CTC count over time</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dec 2015</li> <li>• NCT01830426</li> </ul>	[106]
<b>Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania</b>	<b>The detection of circulating tumor cells (CTC) in patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) undergoing definitive radiotherapy or chemoradiotherapy</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recruiting</li> <li>• Observational</li> <li>• Prospective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients with NSCLC who undergo radiation as part of a definitive course of treatment will be enrolled. Blood collections will be obtained before, during and after radiotherapy. We will collect demographic and treatment data and explore &amp; describe the pattern of CTC detection in all patients</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CTCs will be detected by imaging for GFP which measures cells which high levels of telomerase activity after adenovirus transduction. CTCs are measured in units of number of GFP-positive cells /ml.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CTCs will be detected by imaging for GFP which measures cells which high levels of telomerase activity after adenovirus transduction. CTCs are measured in units of number of GFP-positive cells /ml.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dec 2015</li> <li>• NCT02135679</li> </ul>	[107]
<b>Massachusetts General Hospital</b>	<b>Detecting EGFR T790M mutations from circulating tumor cells</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Active—not recruiting</li> <li>• Observational</li> <li>• Prospective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• To determine if the EGFR mutation can be detected in CTCs; Using the CTC-chip.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No. of patients with detectable EGFR mutations in their CTCs</li> <li>• Determine the concordance of EGFR genotyping from CTCs compared to tumor tissue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Number of patients with EGFR genotype results detectable from plasma cfDNA</li> <li>• Explore the feasibility of EGFR genotyping from plasma circulating free DNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jan 2016</li> <li>• NCT01734915</li> </ul>	[108]

(continued)

Table 3. (continued).

Sponsor center	Official study title, status & study type	Purpose	Primary outcome measures	Secondary outcome measures	Study completion date & clinical trial identifier	Ref
Centre Hospitalier Universitaire de Nice	<b>Multicenter validation of the sensitivity of theanostic ALK rearrangement detection by FISH analysis and prevalence of escaping mutations in circulating tumor cells for the noninvasive management of lung cancer patients (STALKLUNG01)</b>	In Stage IIb/Stage IV NSCLC: <ul style="list-style-type: none"> <li>a definitive prospective clinical validation of the use of CTCs as an alternative to tumor tissue for ALK analysis-based patients stratification</li> <li>ALK rearrangement will be prospectively investigated in CTCs isolated by ISET at diagnosis and during follow up and <i>de novo</i> mutations will be searched in patients with resistance to crizotinib.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sensitivity and specificity of the FISH technique for the detection of the ALK rearrangement in CTCs (change from baseline to 6 and 12 months)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sensitivity and specificity of the ICC analysis on CTCs</li> <li>Association between the ALK-rearranged CTC levels evolution and tumor progression at 6 and 12 months</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>July 2016</li> <li>NCT02372448</li> </ul>	[109]
Sun Yat-sen University	<b>A multicenter, prospective, observational trial on the prognostic and dynamic change of CTC enumeration in advanced NSCLC with 1st or 2nd line chemotherapy and targeted therapy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>To study the relationship between CTC count and clinical outcome of treatment (ORR and PFS).</li> <li>To study the relationship between CTC and overall survival.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Baseline CTC count</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CTC count change. Time Frame: 2 years</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dec 2016</li> <li>NCT02155426</li> </ul>	[110]
Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania	<b>The utility of circulating tumor cells as confirmation of pathologic diagnosis in early stage non-small-cell lung cancer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>To determine whether CTCs can be used to confirm pathologic diagnosis in early-stage (Stage I) NSCLC Patients scheduled to undergo surgical intervention. Presence of CTCs will be compared to final pathologic diagnosis based on surgical specimens to assess the sensitivity of using CTCs alone to make a definitive diagnosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Number of adverse events / (time frame: 2.5 years)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Number of adverse events / (time frame: 2.5 years)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sep 2017</li> <li>NCT02380196</li> </ul>	[111]

(continued)

**Table 3. (continued).**

Sponsor center	Official study title, status & study type	Purpose	Primary outcome measures	Secondary outcome measures	Study completion date & clinical trial identifier	Ref
<b>Istituto Oncologico Veneto IRCCS</b>	<b>Individualized treatment of patients with advanced NSCLC: potential application for circulating tumor cells (CTC) molecular and phenotypical profiling (2012/52)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>To evaluate CTC count modifications as an early predictor of response to treatment.</li> <li>To determine the percentage of CTC-positive patients and total CTC numbers in patients with advanced NSCLC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Change of CTC count during treatment and comparison with CT and PET [time frame: 36 months]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Purified CTC obtained by automated platform and DNA sequencing performed to assess sensitizing mutations in advanced NSCLC patients. <i>EGFR</i> mutations or <i>EML4-ALK</i> fusion genes detected in CTC will be compared with tumor specimens.</li> <li>CTC count assay will be integrated with mAb targeting <i>EGFR</i> or <i>EML4-ALK</i> fusion gene, to test whether assaying the quote of <i>EGFR</i>-positive and <i>ALK</i>-positive CTC provides a more sensitive marker for rating pharmacodynamic effects in patients compared with total CTC counts.</li> <li>To evaluate whether live vs. apoptotic CTC changes under treatment may be used as predictor of tumor response, M30-positive CTC will be quantified as previously.</li> <li>Data obtained with the CTC assay will be correlated with common prognostic factors.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dec 2017</li> <li>NCT02407327</li> </ul>	[112]

ALK: Anaplastic lymphoma kinase; CS: CellSearch; CTCs: Circulating tumor cells; DFS: Disease-free survival; EGFR: Epidermal growth factor receptor; FDG-PET: Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography; GFP: Green fluorescent protein; ISET: Isolation by size of epithelial tumor cells; NSCLC: Non-small-cell lung carcinoma; ORR: Overall response rate; PFS: Progression-free survival; RECIST: Response evaluation in solid tumors.

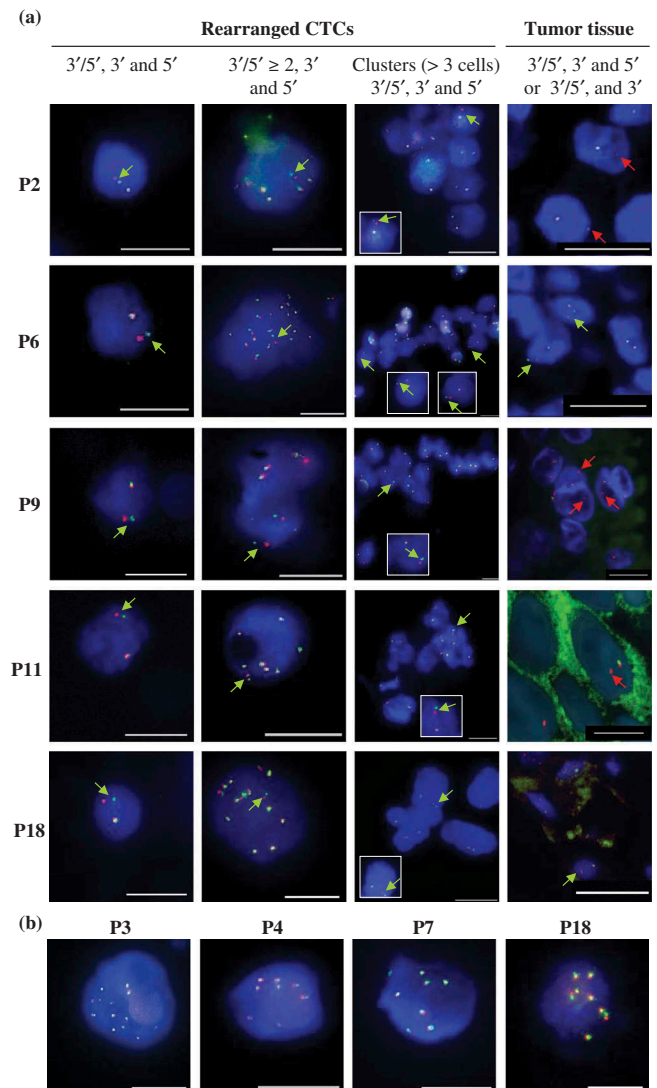


rather than the overall percentage as a cutoff value for establishing the diagnosis of *ALK* rearrangement. By combining four-color IF and FISH, *ALK*-rearranged CTCs were found to display a remarkably homogeneous mesenchymal phenotype contrasting with the heterogeneity observed between and within tumor specimens in terms of epithelial and mesenchymal marker expression. *ALK* protein levels correlated with heterogeneity in EMT marker expression within the tumor specimens of two patients. This evidence suggested that *ALK* expression holds a role in EMT induction in NSCLC. A unique FISH pattern of *ALK* rearrangement (the break-apart signal) was consistently identified in CTCs despite the inter-tumoral heterogeneity of *ALK* rearrangements and the frequency of tumor cells harboring this rearrangement within tumors. In addition, this unique *ALK*-rearrangement pattern was detected in CTCs of patients for whom it was not identified within the tumor biopsy. Although a single tumor biopsy sample might not be representative of the entire tumor, these results suggested that CTCs may originate from various metastatic sites. In this study, we observed the presence of various CTC subsets including small CTCs (size ~10  $\mu\text{m}$ ) harboring one *ALK* native copy and the rearranged copy, large CTCs with several *ALK* native copies and one or two rearranged copies, and CTCs harboring only *ALK* native copies (corresponding to *ALK* gain of copies or amplification) (Figure 1). Based on total CTC numbers, the number of *ALK*-rearranged CTCs and the number of CTCs with gains of *ALK* copies, it was also estimated that CTCs harboring a normal *ALK* status were also present and represented a non-negligible subset.

For patients with *ALK*-positive NSCLC, our findings suggested that CTCs that harbor this unique *ALK* rearrangement and express a mesenchymal phenotype may result from the clonal selection of tumor cells that display migratory properties and higher invasive potential and may possibly contain highly metastatic cells, such as CSCs. We monitored *ALK*-rearranged CTC subsets in five patients at baseline and at an early time-point (1–3 months) under crizotinib treatment. The evolution of the different *ALK*-rearranged CTC subsets was found to be highly variable highlighting the heterogeneity of responses to crizotinib in CTC subsets (Figure 2). Monitoring for changes in CTCs bearing *ALK* abnormalities was possible in patients undergoing *ALK* inhibitor therapy, suggesting the serial evaluation of CTC subsets could be used to identify subpopulations harboring different sensitivities to crizotinib.[120]

#### CTC detection in *ROS1*-rearranged NSCLC patients

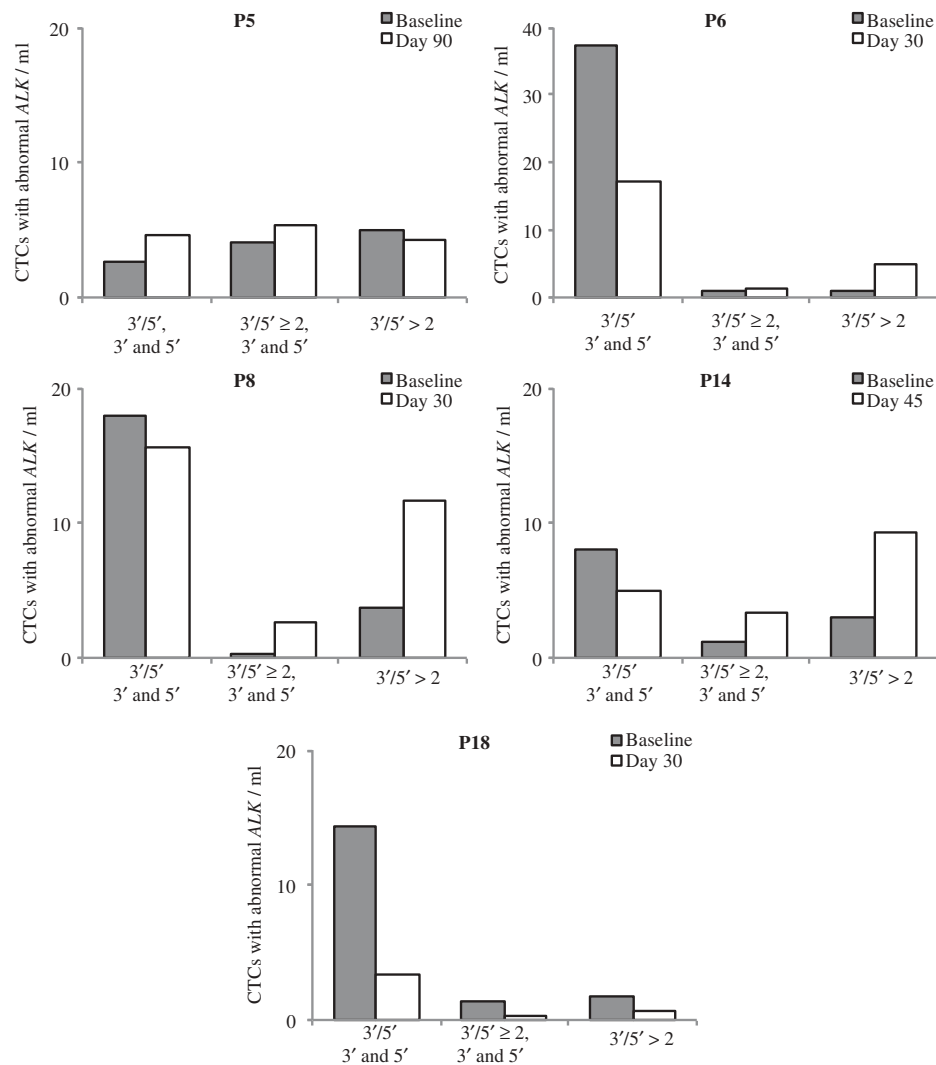
Our group recently published the detection of *ROS1* rearrangements in the CTCs of four patients with *ROS1* rearrangement previously detected by FISH on tumor biopsy. Detection was performed using ISET<sup>®</sup> filtration and FA-FISH. In *ROS1*-rearranged patients, the median number of *ROS1*-rearranged CTCs at baseline was 34.5 per 3 ml of blood (range 24–55). We evaluated the effect of crizotinib on *ROS1*-gene copy number; in the two patients who had



**Figure 1. Heterogeneity of circulating tumor cells detected in *ALK*-rearranged patients.** Detection of *ALK* gene abnormalities in circulating tumor cells (CTCs) and tumor specimens of *ALK*-positive patients; selected patients from a cohort of 18 *ALK*-positive patients (a) Examples of isolated or clusters of *ALK*-rearranged CTCs detected by filter-adapted FISH (FA-FISH) and of *ALK*-rearranged tumor cells in tumor specimens detected by FISH. Green arrows show an *ALK* rearrangement with a split 3' and 5' (red/green) signal. Red arrows show an *ALK* rearrangement with only the 3' signal (b) Examples of isolated CTCs with a gain of native *ALK* copies. Scale: white bars correspond to 10  $\mu\text{m}$ . Reprinted with permission from [120] © 2013 American Society of Clinical Oncology. All rights reserved.

tumor progression the number of *ROS1*-gene copies present in *ROS1*-rearranged cells increased significantly during treatment. *ROS1*-rearranged CTCs showed considerable heterogeneity of *ROS1*-gene abnormalities and elevated numerical chromosomal instability (CIN), which was hypothesized to





**Figure 2. Evolution of ALK-rearranged circulating tumor cell subsets under crizotinib therapy.** Levels of circulating tumor cells (CTCs) harboring different patterns of ALK abnormalities detected before and during crizotinib treatment in five ALK-positive patients. Data are presented as the mean of values obtained from three spots (3 × 1 ml). Reprinted with permission from [120] © 2013 American Society of Clinical Oncology. All rights reserved.

promote the emergence of drug resistant CTC subclones with increased metastatic capacity, offering potential mechanisms of *ROS1*-inhibitor-therapy resistance in *ROS1*-rearranged NSCLC tumors. Given the rarity of *ROS1*-rearranged NSCLC, these results only involve a small number of patients. Further validation of this method in larger cohorts of *ROS1*-rearranged and negative patients is necessary to establish clear numerical thresholds for their prognostic and/or predictive potential.[99]

Overall, there is great clinical potential for CTCs to be utilized in the diagnosis of predictive biomarkers in NSCLC; the fundamental prerequisite is validation studies with larger patient cohorts.

### Circulating tumor DNA (ctDNA): comparative and collaborative role of CTCs and ctDNA

In 1948, Mandel and Metais discovered fragmented DNA in the circulation in the cell-free component of blood—termed circulating cell-free DNA (cfDNA).[121] In oncology, necrotic and apoptotic tumor cells of a primary tumor and/or metastases and/or CTCs discharge their DNA into the cell-free component of blood. The fragmented genomes released constitute circulating tumor DNA (ctDNA). Two hypotheses exist about the mechanisms of release of cfDNA or ctDNA into the bloodstream: termed “passive secretion” and “active secretion”.[122,123] The passive mechanism involves the release of nucleic acids, through phagocytosis, from apoptotic and necrotic cells. The “active” hypothesis, in

contrast, reports that fragments of cellular nucleic acid can be actively released. The active mechanism is not fully understood; however, one explanation states that tumor cells release nucleic acids to transform the targeted recipient cells at distant locations. [122] An additional proposition to these two mechanisms is that cfDNA may be released by CTCs. This hypothesis is however controversial owing to the large discrepancy in amount of cfDNA in the bloodstream and the significant rarity of CTCs. CfDNA is known to exist at steady-state levels and rise or fall according to cellular injury and necrosis. [122] Elevated concentrations of ctDNA fragments are found in the blood plasma and serum of patients with cancer with various tumor types and have been associated with unfavorable outcomes in clinical studies including in NSCLC [124–128]. CfDNA is also present in elevated levels in patients with benign conditions such as cardiovascular disease, infections, diabetes and hepatic disorders. [123] This background of cfDNA necessitates the discrimination of ctDNA from cfDNA: ctDNA features somatic mutations present only in the genomes of cancerous or precancerous cells. To quantify the proportion, ctDNA represents <1.0% of total cfDNA; therefore standard sequencing techniques such as Sanger sequencing are only able to detect ctDNA in patients with high tumor burden and high levels of ctDNA. [122–130] Recent advances in digital genomic technologies allow detection of rarer mutant variants and have raised research attention in this field.

In lung cancer, the level of cfDNA has been associated with worse prognosis, tumor stage, size and metastases. Van der Drift *et al.* studied 46 patients with newly diagnosed NSCLC (29/46 were stage I to III). They reported a significantly reduced survival in patients with DNA concentrations in the highest tertile (median survival 11.8 months) compared to the lowest tertile (median survival 21.5 months). [124] Another study investigating the role of low dose CT screening collected ctDNA at various time points. They observed that the median ctDNA concentration was significantly higher within the 12 months immediately prior to diagnosis and surgery compared with samples taken over a year prior to diagnosis. Higher levels of plasma DNA at surgery were also hypothesized to represent a risk factor for aggressive disease—as they were significantly associated with a poorer 5-year survival ( $p = 0.0066$ ). [130] Bettgowda *et al.* evaluated ctDNA in 223 patients with localized cancers of various origin—they found ctDNA present in 49–78% of patients and in 86–100% of patients with metastatic disease. The differences in the fraction of patients with detectable levels also correlated with stage; 47% of Stage I, 55, 69 and 82% for those with Stages II, III and IV, respectively. [131] Activating and resistant *EGFR* mutations, which confer response and resistance to *EGFR*-directed therapies, respectively, have been identified in ctDNA using single-molecular PCR (BEAMing; Inostics GmbH, Germany). [132] *T790M* resistance mutations have also been identified in ctDNA following treatment with gefitinib. [133]

The Spanish Lung Cancer Group (SLCG) published findings in February 2015 reporting that the *EGFR L858R* mutation in cfDNA is a negative prognostic biomarker in *EGFR*-mutated patients. This study was a secondary objective of the pivotal European Tarceva vs. Chemotherapy (EURTAC) trial; which had demonstrated greater

efficacy of erlotinib compared with chemotherapy for the first-line treatment of European patients with advanced *EGFR*-mutated NSCLC; with either *L858R* mutations in exon 21 or deletions in exon 19. Using the peptide nucleic acid-mediated 5' nuclease real-time polymerase chain reaction (TaqMan) assay, they studied *EGFR* mutations in cfDNA isolated from 97 patients' baseline blood samples. *EGFR* mutations in cfDNA were detected in 76 of 97 (78%) patients with usable blood samples. Median OS was less in patients with the *L858R* mutation in cfDNA at 13.7 months (95% CI: 7.1–17.7) vs. 27.7 months (95% CI: 16.1–46.2) in those with the exon 19 deletion ( $p < .001$ ). Given the apparent negative influence on OS of *L858R* mutation detection in cfDNA, the authors stated that a prospective study was warranted to examine the use of *EGFR* mutations in cfDNA as a viable surrogate biomarker. The SLCG is participating in two ongoing clinical trials in patients with advanced-stage *EGFR*-mutant NSCLC: with plasma and serum collection for *EGFR* mutation testing in cfDNA at baseline, at response and at disease progression: the European Phase II BELIEF trial (NCT01562028) of erlotinib plus bevacizumab (Avastin) and the SLCG Phase II GOAL trial (NCT01513174) comparing gefitinib plus olaparib (Lynparza) vs. gefitinib alone. It is hoped that these trials will provide further insight into *EGFR* mutation testing in cfDNA. [134]

Recently Newman *et al.* introduced Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing (CAPP-Seq) an economical and ultrasensitive method for quantifying ctDNA for NSCLC. Their method combined optimized library preparation methods for low DNA input masses with a multiphase bioinformatics approach to design a “selector” consisting of biotinylated DNA oligonucleotides that target recurrently mutated regions in lung cancer. They reported the lowest background error rate and lowest detection limit of any NGS-based method used for ctDNA analysis at the time of publication. They detected ctDNA in 100% of Stage II–IV and 50% of Stage I NSCLC patients, with 96% specificity for mutant allele fractions down to  $-0.02\%$ . Levels of ctDNA were also noted to significantly correlate with tumor volume, distinguished between residual disease and treatment-related imaging changes, and provided earlier response assessment than radiographic approaches. [135]

Utilizing ctDNA holds an advantage over CTCs in that analysis is more convenient and in some cases more sensitive. However within lung cancer management, despite multiple translational research studies and clinical trials, the detection of ctDNA is not yet used in routine clinical practice. There are several challenges, which can be highlighted when considering how to optimize the role of ctDNA. First, differentiating ctDNA from normal cfDNA can be difficult and second ctDNA may be present at extremely low levels, which can result in some artifactual mutations (false positives) or to false negative results. Third performing an accurate quantification of the number of fragments in a sample is challenging. Lastly, rigorous control of pre-analytical conditions including immediate plasma separation, storage and transport on dry ice is critical, yet is very hard to upkeep and makes multicenter prospective trials more problematic. [123] With the development of NGS technologies, the field of ctDNA analysis, which originally started

20 years ago has been reinvigorated—yet clinical utilization is still to be achieved.

As a majority, studies are performed to detect either CTCs or ctDNA in isolation. One can question whether it is appropriate to analyze for both in parallel. One study performed by Maheswaran *et al.* did compare the two for efficacy of detection—CTCs and ctDNA were analyzed for *EGFR* mutations in the same patients and they concluded that genotyping of CTCs seemed more sensitive ( $p = 0.009$ ).<sup>[118]</sup> On the other hand, Dawson *et al.* assessed CTCs and ctDNA in parallel in patients with metastatic breast cancer and claimed that ctDNA levels were more sensitive, and showed more dynamic range and more correlation with changes in tumor burden than CTCs.<sup>[127]</sup> Bettgowda *et al.* also found that in many cases where CTCs were not identifiable, ctDNA was detected (13 of 16 patients with various cancers, 81%).<sup>[131]</sup>

There are a few specific settings in which we can foresee the complementary use of ctDNA and CTCs. CTCs can endure through chemotherapy and other treatments, suggesting that their persistence might indicate failure of therapy.<sup>[75,136]</sup> In the event of persisting elevated ctDNA levels, one could then collect CTCs from patients for genomic analysis to identify underlying resistance mechanisms and potential targetable mutations. This collaborative approach may be of use in the setting of occult minimal residual disease whether post-operative or post-chemo/radiotherapy.

Thus far proof-of-principle data have been published with small cohorts of metastatic patients with relatively high CTC counts and ctDNA amounts. It is necessary for larger prospective studies to valid their clinical utility, independently and in collaboration, prior to stepping over to the clinic. Further analysis need also be performed in patients with lower tumor burdens. A fundamental benefit to using ctDNA over CTCs is obviously in the quantity and quality of DNA—allowing for somatic mutational analysis. In large prospective studies of ctDNA, it would be difficult to eliminate the problem of dilution with normal DNA—released in benign diseases, old patients and in infection or injury. CTCs do offer a greater number of analytes—DNA, RNA (mRNA, microRNA) and protein functional studies (*in vitro/in vivo*) along with morphological analysis plus FISH and ICC and analysis of tumor heterogeneity through single-cell analysis (Table 4).<sup>[3–5]</sup>

### Expert commentary

The “liquid biopsy” is highly topical in cancer research; however, with so much research interest why is the progression to clinical use still elusive? Ideally in the future, the “liquid biopsy” will identify predictive biomarkers and subsequently tailor therapy appropriately. The essential prerequisite to clinical utility is clinical validation in large multicenter prospective trials including analysis in patients with lower tumor burden. CTCs offer multiple facets of analysis including identification of *EGFR* mutations, *ALK* rearrangements and *ROS1* rearrangements to select patients for targeted therapies. Single-cell analysis including WGA

and the potential of CTC-derived xenografts provide knowledge into possible resistance mechanisms and thus drivers of tumor progression. Unfortunately, these techniques are complex, time-consuming, expensive and limited by the presence of such low numbers of CTCs. A key point which needs to be remembered is the importance of EMT in the evolution of CTCs and therefore that certain techniques, such as the CellSearch, reliant on EpCAM-positivity will potentially miss CTCs under EMT. Validation of non-marker-based CTC detection technologies will broaden our catchment and reduce the risk of false negatives. We can anticipate that identification of CTCs harboring stem-cell like properties and molecular analysis of such cells will consolidate our understanding of resistance and aid steps to try combat tumor progression. Development of further semiautomated systems in steps such as the detection of CTCs bearing predictive biomarkers, such as *ALK* rearrangements, *EGFR* mutations and *ROS1* rearrangements, would standardize methods and reduce inter-individual technical variability. The therapeutic options for NSCLC patients with targetable mutations are increasing—with 2nd and 3rd generation TKIs already revealing impressive results. The hope is that sequential monitoring of CTCs will identify patients who will benefit from specific therapies—therefore in some cases, the management of Stage IV NSCLC could become in essence treatment of a chronic disease.

Initially, further clarification of the potential for each in isolation, ctDNA and CTCs, need occur prior to us understanding the true role of a collaborative partnership.<sup>[66]</sup> However, one can strongly hypothesize that in the future, a complementary approach would be most beneficial once the techniques are standardized and each utilized to their utmost advantage. Our understanding of CTCs in only in its infancy yet holds great promise in the future to aid the personalized treatment of patients with NSCLC.

### Five-year review

When considering the path that research in this field will follow over the next 5 years, there are three key elements which come to mind: first the need to investigate further the issue of inter- and intratumor heterogeneity between primitive tumor sites, metastatic sites and CTCs, and the impact this may have on treatment decision-making. The development of single-cell sequencing technologies offers the opportunity to distinguish complex tumor genomes from single CTCs and along with CTC-derived xenograft models; to study the tumorigenic potential and resistance mechanisms, we will greatly advance our understanding of CTCs’ role in tumoral evolution. Second, the validation of CTC detection and characterization techniques on large patient cohorts is necessary and third the development of automated platforms to simplify and standardize techniques to aid their passage to widespread clinical utility. Currently several research teams are focusing on the use of highly sophisticated automated platforms and we would hope that over the

**Table 4. Advantages and limitations of the detection of CTCs vs. ctDNA.**

	Circulating tumor cells	Circulating tumor DNA
Origins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primary tumor and/or metastases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necrotic and apoptotic tumor cells</li> </ul>
Analytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA</li> <li>• RNA (mRNA/microRNA)</li> <li>• Functional studies (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>) such as xenotransplantation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA</li> </ul>
Analytical technologies	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICC, IF, FISH, cell culture</li> <li>• Molecular assays, NGS</li> <li>• CTC-derived xenografts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA assays, for example, NGS</li> </ul>
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morphological analysis for a malignant phenotype is possible as CTCs are detected as intact cells</li> <li>• Molecular characterization at cellular and subcellular levels</li> <li>• Use of immunolabeling techniques</li> <li>• Opportunity to perform functional assays (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>); for example, CTC xenotransplantation into immunocompromised mice</li> <li>• Offer insight into the metastatic process and tumor progression</li> <li>• Could alter treatment decision-making</li> <li>• Persistence of CTCs through treatment may suggest drug resistance</li> <li>• Complementary with ctDNA in assessing for occult minimal residual disease</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparatively simpler methods of detection and analysis</li> <li>• Could potentially alter treatment decision-making</li> <li>• Higher sensitivity for assessing tumor burden</li> <li>• Could identify tumor progression and drug resistance</li> <li>• May be useful in assessing for occult minimal residual disease following surgery or treatment; in parallel with CTC analysis</li> </ul>
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Very rare and fragile cells</li> <li>• Necessity of highly sensitive and specific analytical techniques</li> <li>• Multiple technologies have been developed for CTC isolation—with a vast but sometimes overwhelming amount of data</li> <li>• Only one technology, the CellSearch<sup>®</sup>, has received FDA approval for use in advanced breast, prostate and colorectal cancer</li> <li>• False-negative results: CTCs which have undergone EMT are missed by techniques reliant on epithelial-marker-based capture</li> <li>• Heterogeneous CTC population; requiring different techniques to detect different populations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pre-analytical conditions are not standardized</li> <li>• No possible functional assays</li> <li>• False positives—detection of tumor-associated genes within normal tissue of elderly patients or those with benign conditions</li> <li>• False negatives—no specific isolation of ctDNA unless detection of tumor-specific mutations</li> </ul>

CTCs: Circulating tumor cells; ctDNA: Circulating tumor DNA; EMT: Epithelial–mesenchymal transition; FDA: U.S. Food and Drug Administration; FISH: Fluorescence in situ hybridization; ICC: Immunocytochemistry; IF: Immunofluorescence; NGS: Next-generation sequencing.

next 5 years clinical validation of their diagnostic role in NSCLC will be achieved. Ultimately, the overall objective is to optimize the tailoring of personalized therapies to NSCLC patients, with CTCs potentially utilized in a diagnostic role and in prognostic and predictive assessments.

#### Financial & competing interests disclosure

*K Ross is recipient of a grant from DUERTECC/EURONCO (Diplôme Universitaire Européen de Recherche Translationnelle et Clinique en Cancérologie). E Pailler is supported by the LabEx LERMIT (grant no ANR-10-LABX-0033-LERMIT) and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no*

*FDT20150532072). CR Lindsay is supported by ESMO (translational research fellowship) with the aid of a grant from Hoffmann-La Roche and recipient of a grant from DUERTECC/EURONCO (Diplôme Universitaire Européen de Recherche Translationnelle et Clinique en Cancérologie). The authors are grateful for the research support of INCA (PRT-K14-032), IMI 11th call (IMI-JU-11-2013, no. 115749), CANCER ID (grant no. 115749), Fondation de France (grant no 201300038317) and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant no 20131200417). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.*

## Key issues

- Eligibility for targeted therapies in non-small-cell lung cancer (NSCLC) requires mutational analysis of tumor biopsies. Tumor biopsies are limiting for multiple reasons including the technical challenge, the risk incurred to the patient and the possible misrepresentation of a tumor's true genetic profile owing to tumor heterogeneity. Circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA (ctDNA) offer an alternative source for tumor analysis to identify predictive biomarkers.
- There are a multitude of CTC detection techniques with the CellSearch<sup>®</sup>, the only technique fully validated by the FDA. The CellSearch<sup>®</sup> is an immunomagnetic platform which enriches CTCs using ferromagnetic beads coated in epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). The CellSearch<sup>®</sup> is therefore hypothesized to miss CTCs, which have undergone Epithelial–mesenchymal transition—missing an important subpopulation of CTCs thought to have higher metastatic potential.
- Nonimmunological detection techniques have demonstrated higher CTC recovery in NSCLC patients.
- Detection of *EGFR* mutations, *ALK* rearrangements and *ROS1* rearrangements in CTCs has been demonstrated with high sensitivity and specificity. Single-cell genomic analysis can be performed on CTCs to identify possible resistance mechanisms.
- Validation of CTC techniques for predictive biomarker detection is difficult given the rarity of CTCs, the complexity of the methods and relatively small patient cohorts in NSCLC subgroups.
- Development of semiautomated machines to perform CTC detection and characterization, based on nonimmunological techniques, will improve detection rates in NSCLC, reproducibility and therefore suitability for large multicenter studies.
- CTCs and ctDNA both require future large prospective studies to aid validation of detection techniques prior to progression to clinical utility and determination of their potential collaborative partnership.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
  - of considerable interest
- Weiss L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Canc Met Rev.* 2000;19(3–4):I–XI, 193–383.
  - Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.* 1889;1:571–573.
  - Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11:129–144.
  - **A review describing the underlying biology of circulating tumor cells (CTCs) and their potential to inform us on intratumor heterogeneity and tumor evolution. It also describes the technologies for CTC detection and isolation and includes recent advances in single-cell molecular analysis.**
  - Maheswaran S, Haber DI. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev.* 2010;20(1):96–99.
  - Joose SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2014;7(1):1–11.
  - **A review discussing the biology of tumor cell dissemination, technical advances, as well as the challenges, and potential clinical implications of CTC detection and characterization. It includes discussion on the use of xenograft models to gain further insights into the biology of tumor cell dissemination and assessment of tumoral response to therapies.**
  - Shames DS, Wistuba II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol.* 2014;232(2):121–133.
  - Wu C, Maher M, Shepard J. Complications of CT-guided percutaneous needle biopsy of the chest: prevention and management. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;196:W678–W682.
  - Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, et al. Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Am J Pathol.* 2009;175:808–816.
  - Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4218–4224.
  - De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6302–6309.
  - Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2009;20:1223–1229.
  - Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:13306–13311.
  - Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129–2139.
  - Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised Phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:121–128.
  - Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised Phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:239–246.
  - Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line

- treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, Phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2011;12:735–742.
17. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, et al. United States Food and Drug Administration drug approval summary: gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1212–1218.
  18. Johnson JR, Cohen M, Sridhara R, et al. Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6414–6421.
  19. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693–1703.
  20. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(25):2385–2394.
  21. Crinò L, Kim D-W, Riely G, et al. Initial Phase 2 results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. *J Clin Oncol.* 2011;29(suppl):7514.
  22. Camidge DR, Bang Y, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib (PF-02341066) in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from the molecularly defined cohort of this first-in-man Phase I study. *Lancet Oncol.* 2012;13(10):1011–1019.
  23. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2013;8:823–859.
  24. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples: practical approach of a working group. *Lung Cancer.* 2012;76:1–18.
  25. Moreira AL, Thornton RH. Personalised medicine for non-small-cell lung cancer: implications of recent advances in tissue acquisition for molecular and histologic testing. *Clin Lung Cancer.* 2012;13:334–339.
  26. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883–892.
  27. Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next generation sequencing. *Cancer Res.* 2013;73:2965–2975.
  - **A study involving comprehensive genomic profiling of CTCs using array-comparative genomic hybridization (CGH) and next-generation sequencing in patients with stage IV colorectal cancer with comparison made to the primary tumor and metastases. The study found that most mutations initially found only in CTCs were also present at subclonal level in the primary tumors and metastases from the same patient.**
  28. Bacelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.* 2013;31:539–544.
  - **The development of a xenograft assay from primary human luminal breast cancer CTCs and demonstration that these CTCs contained metastasis-initiating cells (MICs) which gave rise to bone, lung and liver metastases in mice. They describe functional circulating MICs and associated markers, which are proposed to aid the design of better tools to diagnose and treat metastatic breast cancer.**
  29. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J.* 1869;14:146.
  30. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumor cells. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:329–340.
  31. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* 2013;59:110–118.
  32. Pantel K, Alix-Panabieres C. Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis.* 2012;4(5):446–447.
  33. Yu M, Stott S, Toner M, et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol.* 2011;192(3):373–382.
  34. Allard WJ, Matera J, Miller CM, 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.* 2004;10:6897–6904.
  35. Riethdorf S, Fritsche H, Müller 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.* 2004;10:6897–6904.
  36. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with breast colorectal and prostate cancer. *J Oncol.* 2010;210:617421.
  37. Nagrath S, Sequist LC, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007;450:1235–1239.
  38. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:18392–18397.
  39. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med.* 2013;5(179):179ra147.
  40. Zieglschmid V, Hollmann C, Gutierrez B, et al. Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. *Anticancer Res.* 2005;25:1803–1810.
  41. Harb W, Fan A, Tran T, et al. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR assay. *Transl Oncol.* 2013;6:528–538.
  42. Talasz AH, Powell AA, Huber DE, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:3970–3975.
  43. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, et al. A novel method for the *in vivo* isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol.* 2012;41:1241–1250.
  44. Saliba AE, Saias L, Psychari E, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled



- magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:14524–14529.
45. Chen X, Zhou F, Li X, et al. Folate receptor-positive circulating tumor cell detected by LT-PCR-based method as a diagnostic biomarker for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(8):1163–1171.
  46. Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*. 2000;156:57–63.
  47. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res*. 2011;31(2):427–441.
  48. Lin HK, Zheng S, Williams AJ, et al. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2010;16(20):5011–5018.
  49. Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, et al. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining. *BMC Cancer*. 2015;15:360.
  50. Obermayr E, Maritschnegg E, Speiser P, et al. Circulating rare cells enable highly efficient cancer detection. *AACR 106th Annual Meeting*; April 18–22, 2015; Philadelphia, PA. *Cancer Res*. 2015;75:LBI97.
  51. Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, et al. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem*. 2013;60:214–221.
  52. Lu J, Fan T, Zhao Q, et al. Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2010;126:669–683.
  53. Dorsey JF, Kao GD, MacArthur KM, et al. Tracking viable circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing definitive radiation therapy: pilot study results. *Cancer*. 2014;15(6):683–687.
  54. Peeters DJ, De Laere B, Van den Eynden GG, et al. Semiautomated isolation and molecular characterization of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer*. 2013;108(6):1358–1367.
  55. Werner SL, Ryon PG, Landers M, et al. Analytical validation and capabilities of the epic CTC platform: enrichment-free circulating tumour cell detection and characterization. *J Circ Biomark*. 2015;4:3. DOI:10.5772/60725.
  56. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:781–791.
  57. 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*. 2008;26:3213–3221.
  58. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, et al. Circulating tumor cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012;12:178.
  59. Hofman V, Ilie MI, Long E, 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*. 2011;129:1651–1660.
  60. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, et al. Detection of circulating tumor cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2011;105:1338–1341.
  61. Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch (®) CTC test. *Cytometry A*. 2015;87(2):137–144.
  62. De Wit S, van Dalum G, Lenferink ATM, et al. The detection of EpCAM<sup>+</sup> and EpCAM<sup>-</sup> circulating tumor cells. *Sci Rep*. 2015;5:12270.
  63. Gupta V, Jafferji I, Garza M, et al. Apostream, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*. 2012;6(2):024133.
  64. Gascoyne PR, Noshari J, Anderson TJ, et al. Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis. *Electrophoresis*. 2009;30:1388–1398.
  65. Magbanua MJ, Pugia M, Lee JS, et al. A novel strategy for detection and enumeration of circulating rare cell populations in metastatic cancer patients using automated microfluidic filtration and multiplex immunoassay. *PLoS ONE*; 2015;10(10):e0141166.
  66. Gold B, Cankovic M, Furtado LV, et al. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2015;17(3):209–224.
  67. Polzer B, Medoro G, Pasch S, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med*. 2014;6(11):1371–1386.
  68. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the light-cycler system. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5145–5151.
  69. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*. 2011;17:827–835.
  70. Farace F, Massard C, Vimond N, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumor-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer*. 2011;105(6):847–853.
  71. Krebs M, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol*. 2012;7:306–315.
  72. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472:90–94.
  73. Ni X, Zhuo M, Su Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. *PNAS*. 2013;110(52):21083–21088.
  74. Zong C, Lu S, Chapman AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*. 2012;338(6114):1622–1626.
  75. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of

- circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2014;20:897–903.
- **CTCs from patients with either chemosensitive or chemorefractory SCLC were found to be tumorigenic in immune-compromised mice, and resultant CTC-derived explants (CDXs) mirrored the donor patient's response to platinum and etoposide chemotherapy. Genomic analysis of isolated CTCs revealed considerable similarity to the corresponding CDX.**
76. Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*. 2013;23:573–581.
  77. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009;139(7):1315–1326.
  78. Hay ED. An overview of epithelial–mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154:8–20.
  79. Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R. Epithelial–mesenchymal transitions: a mesodermal cell strategy for evolutive innovation in metazoans. *Anat Rec*. 2002;268:343–351.
  80. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:131–142.
  81. Joosse SA, Hannemann J, Spotter J, et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2012;18:993–1003.
  82. Hou JM, Krebs M, Ward T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol*. 2011;178:989–996.
  83. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133:704–715.
  84. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, et al. Expression of stem cell and epithelial–mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R15.
  85. Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumor cell research. *Nat Canc Rev*. 2014;14:623–631.
  86. Lundin A, Driscoll B. Lung cancer stem cells: progress and prospects. *Cancer Lett*. 2013;338(1):89–93.
  87. Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med*. 2013;5(180):180ra48.
  88. Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014;345(6193):216–220.
  89. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res*. 2015;75:892–901.
  90. Liotta LA, Sidel MG, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res*. 1976;36:889–894.
  91. Aceto N, Bardia N, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014;158(5):1110–1122.
  92. Kim Y, Koo KH, Sung JY, et al. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:306879.
  93. Knisely WH, Mahaley MS Jr. Relationship between size and distribution of spontaneous metastases and three sizes of intravenously injected particles of VX2 carcinoma. *Cancer Res*. 1958;18:900–905.
  94. Hou JM, Krebs M, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30:525–532.
  95. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet*. 2012;13:795–806.
  96. Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA, et al. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med*. 2012;4:27ps10.
  97. De Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*. 2014;346(6206):251–256.
  98. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:924–935.
  99. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1408–1415.
  - **The first proof-of-concept that CTCs can be used for noninvasive and sensitive detection of ROS1 rearrangement in NSCLC patients. CTCs from ROS1-rearranged patients were found to show considerable heterogeneity of ROS1-gene abnormalities and elevated numerical chromosomal instability (CIN), a potential mechanism to escape ROS1-inhibitor therapy in ROS1-rearranged NSCLC tumors.**
  100. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501:338–245.
  101. Sawabata N, Okumura M, Utsumi T, 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*. 2007;55(5):189–192.
  102. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1556–1563.
  103. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a Phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res*. 2012;18(8):2391–2401.
  104. Hirose T, Murata Y, Oki Y, et al. Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res*. 2012;20(2–3):131–137.
  105. Muinelo-Romay L, Vieito M, Abalo A, et al. Evaluation of circulating tumor cells and related events as prognostic factors and surrogate biomarkers in advanced NSCLC patients receiving first-line systemic treatment. *Cancers*. 2014;6(1):153–165.
  106. Epic Sciences. Circulating tumor cells in non-small cell lung carcinoma (LDx) In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2000- [cited 2015 Sep 21]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01830426>. NLM Identifier: NCT01830426
  107. Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania. The Detection Of circulating tumor cells (CTC) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) undergoing



- definitive radiotherapy or chemoradiotherapy. In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2000- [cited 2015 Sep 21]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02135679>. NLM Identifier: NCT02135679
108. Massachusetts General Hospital. Detecting EGFR T790M mutations from circulating tumor cells. In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [cited 2015 Sep 21]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01734915>. NLM Identifier: NCT01734915
109. Centre Hospitalier Universitaire de Nice. Multicenter validation of the sensitivity of theranostic ALK rearrangement detection by FISH analysis and prevalence of escaping mutations in circulating tumor cells for the non-invasive management of lung cancer patients (STALKLUNG01) In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [cited 2015 Sep 21]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02372448>. NLM Identifier: NCT02372448
110. Sun Yat-sen University. A multicenter, prospective, observational trial on the prognostic and dynamic change of CTC enumeration in advanced NSCLC With 1st or 2nd line chemotherapy and targeted therapy. In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [cited 2015 Sep 21]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02155426>. NLM Identifier: NCT02155426
111. Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania. The utility of circulating tumor cells as confirmation of pathologic diagnosis in patients with suspected early stage non-small cell lung cancer. In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [cited 2015 Sep 21]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02380196>. NLM Identifier: NCT02380196
112. Istituto Oncologico Veneto IRCCS. Individualized treatment of patients with advanced NSCLC: potential application for circulating tumor cells (CTC) molecular and phenotypical profiling (2012/52) In: ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [cited 2015 Sep 21]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02407327>. NLM Identifier: NCT02407327
113. Jemal A, Thun MJ, Ries LAG, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use and tobacco control. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(23):1672-1694.
114. Cortes-Funes H, Gomez C, Rosell R, et al. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2005;16:1081-1086.
115. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1167-1173.
116. Yoshida K, Yatabe Y, Park JY, et al. Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2:22-28.
117. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012;30:863-870.
118. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med.* 2008;359:366-77.
- **A study of EGFR mutational analysis performed on DNA recovered from CTCs using allele-specific PCR amplification with concurrent analysis of isolated free plasma DNA and the original tumor-biopsy specimens. T790M mutation, which confers drug resistance to EGFR inhibitors, was detected in CTCs collected from patients with EGFR mutations who had received tyrosine kinase inhibitors.**
119. Ilie M, Long E, Butori C, et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumor cells and tumor tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2012;23(11):2907-2913.
- **Demonstration that ALK status can be determined in CTCs isolated from patients with lung cancer by immunocytochemistry and FISH analyses. Five patients were demonstrated to have ALK gene rearrangement and strong ALK protein expression in CTCs and in corresponding tumor samples.**
120. Pailler E, Adam J, Barthelemy A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK-rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(18):2273-2281.
- **Proof that ALK rearrangements can be detected in CTCs of patients with ALK-positive NSCLC by using a filtration technique and FA-FISH. Results also suggested that CTCs harboring a unique ALK rearrangement and mesenchymal phenotype may arise from clonal selection of tumor cells that have acquired the potential to drive metastatic progression of ALK-positive NSCLC.**
121. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [in French]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142:241-243.
122. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14:985-990.
123. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32:579-586.
- **A review of ctDNA utility including in the setting of minimal residual disease, monitoring of tumor burden, molecular resistance and heterogeneity, discussions on chromosomal alterations and some novel adaptations.**
124. Van der drift MA, Hol BE, Klaassen CH, et al. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010;69(2):283-287.
125. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:426-437.
126. Leary RJ, Kinde I, Diehl F, et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med.* 2010;2:20ra14.
127. Dawson SJ, Tsui DQ, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368:1199-1209.
128. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, et al. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:1284-1285.
129. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:16368-16373.

130. Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(1):69–74.
131. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6:224ra24.
132. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7808–7815.
133. Kuang Y, Rogers B, Yeap Y, et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2630–2636.
134. Karachaliou N, Mayo-de las Casa C, Queralt C, et al. Association of *EGFR* L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EURTAC trial. *JAMA Oncol.* 2015;1(2):149–157.
135. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014;20(5):548–554.
136. Huang X, Gao P, Song Y, et al. Relationship between circulating tumor cells and tumor response in colorectal cancer patients treated with chemotherapy: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014;14:976.



## C. LE CANCER DU POU MON NON À PETITES CELLULES : LES REMANIEMENTS DES GÈNES *ALK* ET *ROS1*

Le cancer du poumon est considéré comme la première cause de décès par cancer dans le monde. Il est classiquement divisé en deux catégories clinico-histologiques, les CBNPC et les CBPC, qui sont différentes d'un point de vue histologique mais aussi en termes de pronostic et de réponse au traitement. Les CBNPC représentent environ 85 % des cas et incluent les adénocarcinomes, les lésions pré-néoplasiques, les carcinomes épidermoïdes, les carcinomes à grandes cellules, les carcinomes adénoquameux et les carcinomes sarcomatoïdes. Les adénocarcinomes sont la forme histologique la plus fréquente (~ 50 %). Ils sont également caractérisés d'un point de vue moléculaire. De nombreuses anomalies moléculaires ont été décrites et agissent comme des acteurs clés de la croissance tumorale (*drivers* oncogéniques). Nous nous focaliserons dans ce manuscrit sur les remaniements de gène *ALK* qui représente 3 à 7 % des cas et plus rapidement sur les remaniements du gène *ROS1* qui représente 1 à 2 % des cas.

Pour plus de simplicité, nous utiliserons le terme « patients *ALK* remanié » à la place de « patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement du gène *ALK* » et « patients *ROS1* remanié » à la place de « patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement du gène *ROS1* ».

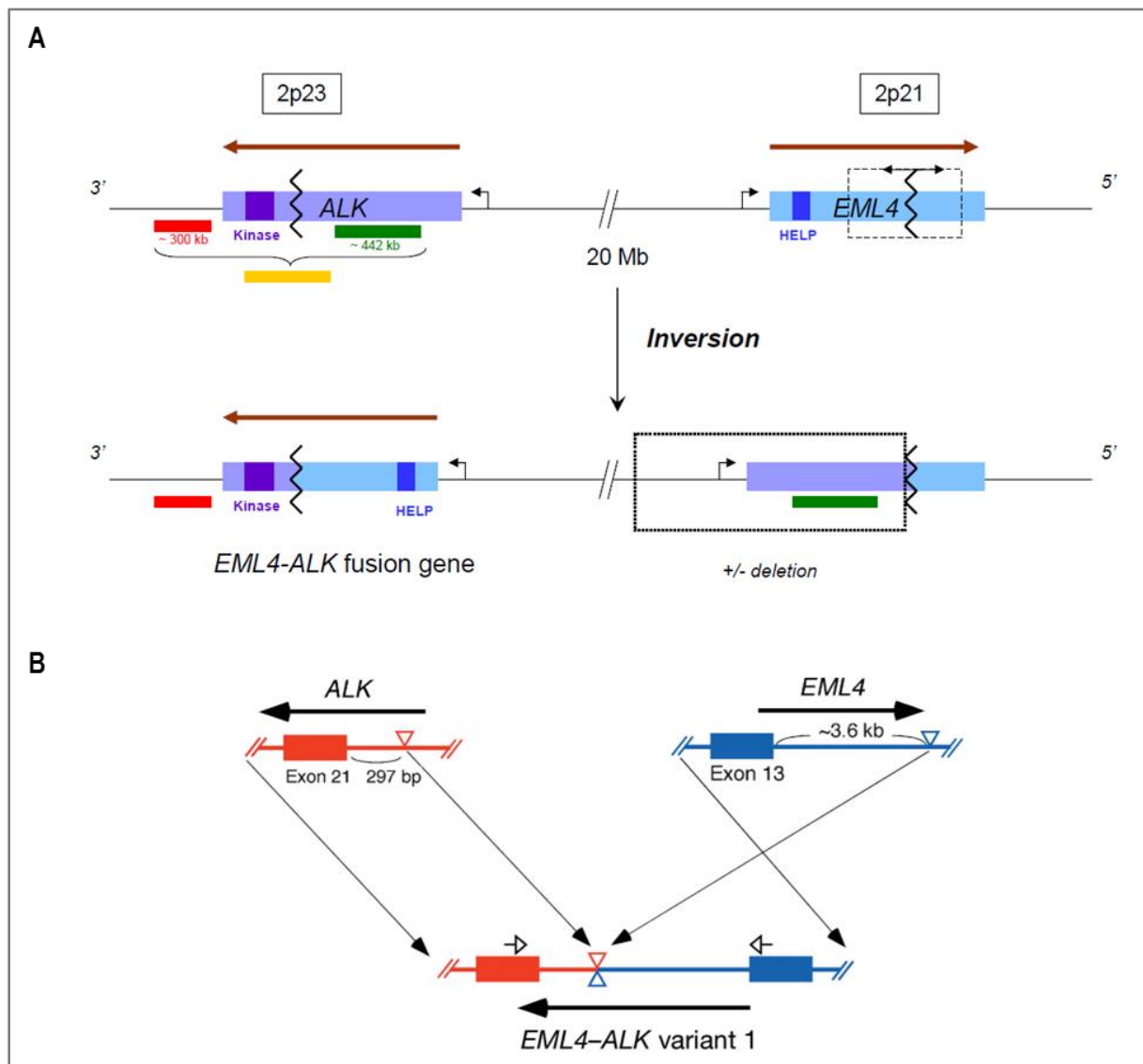
### 1. La fonction biologie du gène *ALK*

Le gène *ALK* a été identifié en 1989 et est localisé sur le bras court du chromosome 2 en position p23 [Le Beau *et al.*, 1989]. Il code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase qui fait partie de la superfamille des récepteurs à l'insuline [Iwahara *et al.*, 1997]. Des études récentes ont identifié la pleiotrophine, la midkine ou encore l'héparine comme de potentiels ligands [Stoica *et al.*, 2001 ; Murray *et al.*, 2015]. Néanmoins, une meilleure compréhension de l'activation de ce récepteur et de ses fonctions reste à approfondir. Chez les souris, la production de la protéine est retrouvée pendant le développement au niveau du thalamus, de l'hypothalamus, du mésencéphale et des ganglions rachidiens mais est à peine détectable à l'âge adulte ce qui suggère un rôle dans le développement neurologique [Vernersson *et al.*, 2006]. Chez l'Homme, l'expression du gène semble limitée dans les tissus adultes, à l'intestin grêle, aux testicules et au système nerveux [Morris *et al.*, 1994].

### 2. Les gènes de fusion *ALK*

En 1994, l'équipe d'A Thomas Look a caractérisé *ALK* comme gène de fusion *NPM-ALK* (*nucleophosmin*) dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules non hodgkinien [Morris *et al.*,

1994]. Plus de dix ans après, Soda *et al.* rapportent la découverte du gène de fusion *EML4-ALK* (*echinoderm microtubule associated protein like 4*) dans les CBNPC [Soda *et al.*, 2007] (**Figure 6**).



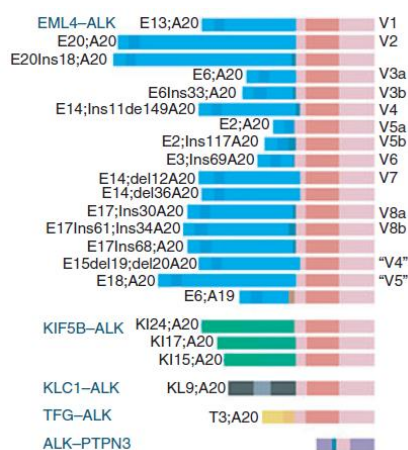
**Figure 6. Représentation schématique du gène de fusion *EML4-ALK*.**

L'inversion paracentrique *EML4-ALK* est présente sur le chromosome 2p et résulte d'une fusion entre la partie N-terminale d'*EML4* et la partie intracellulaire d'*ALK* comprenant le domaine tyrosine kinase.

Figure adaptée avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature [Soda *et al.*, 2007], copyright 2007.

Le potentiel oncogénique du gène de fusion *EML4-ALK* a ensuite été confirmé par des expériences de transformation de fibroblastes murins NIH/3T3 ainsi que par le développement d'un cancer du poumon dans un modèle de souris transgénique [Soda *et al.*, 2007 ; Soda *et al.*, 2008]. Récemment, un modèle murin de cancer du poumon *ALK* remanié a été établi en générant le gène de fusion *EML4-ALK* grâce à l'utilisation de la technologie Crispr-Cas9 [Choi *et al.*, 2014 ; Maddalo *et al.*, 2014].

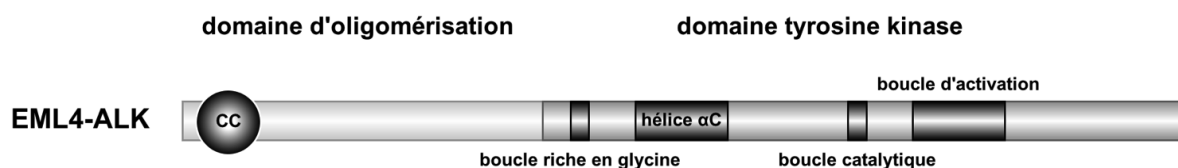
Dans la plupart des cancers et particulièrement dans les CBNPC, les gènes de fusion induisent la production constitutive de la protéine ALK [Hallberg *et al.*, 2016]. Le principal partenaire de fusion est le gène *EML4* dont la partie 5' est fusionnée à la partie 3' de *ALK* [Shaw *et al.*, 2009]. Plusieurs variants du gène de fusion ont été décrits dont *EML4-ALK* E13;A20 et E20;A20 sont les plus courants. De nombreux autres gènes de fusion différant par le type de gène partenaire en position N-terminale (*KIF5B* (*kinesin family member 5B*) et *TFG* (*TRK-fused gene*) ont été décrits [Rikova *et al.*, 2007 ; Takeuchi *et al.*, 2009] (**Figure 7**).



**Figure 7 : Liste des variants de fusion ALK.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press, *Annals of Oncology* [Kerr *et al.*, 2016], copyright 2016.

Ils ont les caractéristiques structurales communes suivantes : une région promotrice qui est fonctionnelle dans le tissu d'intérêt et une région codée qui peut permettre l'oligomérisation du récepteur afin que le domaine kinase de ALK soit activé de façon comparable à son activation native. La protéine de fusion doit être stable ce qui suppose que le point de cassure inclut l'ensemble du domaine tyrosine kinase de ALK (**Figure 8**). Les partenaires de fusion influent sur le niveau d'expression ainsi que sur la localisation subcellulaire de la protéine. La protéine de fusion activée entraîne ainsi une cascade d'activation impliquée dans la prolifération cellulaire et la cancérogénèse.



**Figure 8. Représentation schématique de la protéine de fusion EML4-ALK.**

Le domaine d'oligomérisation est responsable de l'activation constitutive de la protéine de fusion.

Figure adaptée avec les autorisations de AACR, *Cancer Discovery* [Katayama *et al.*, 2015], copyright 2015 et de Oxford University Press, *Annals of Oncology* [Solomon *et al.*, 2016], copyright 2016.

### 3. Caractéristiques clinico-biologiques des patients

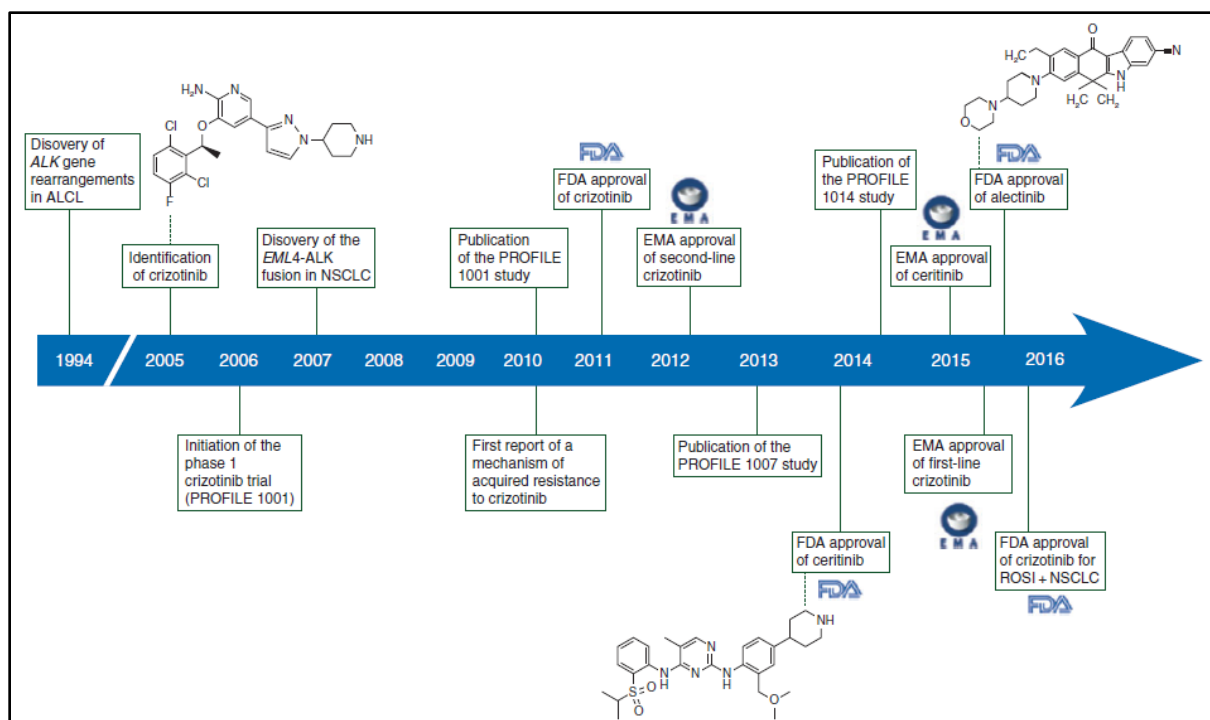
D'un point de vue clinico-biologique, les patients *ALK* remanié présentent majoritairement un type histologique adénocarcinome sans autres anomalies génétiques *driver* décrites (notamment *EGFR* et *KRAS*). Ils sont généralement jeunes lors du diagnostic et non-fumeurs (< 15 paquets années) [Shaw *et al.*, 2009 ; Gainor *et al.*, 2013]. Néanmoins, certains patients peuvent ne pas présenter ces caractéristiques clinico-biologiques.

### 4. Les méthodes de diagnostic permettant l'identification de *ALK* oncogénique

La détection de cette anomalie moléculaire peut être réalisée par différentes méthodes [Rogers *et al.*, 2015 ; Kerr *et al.*, 2016]. Classiquement la technique de FISH est utilisée avec un seuil de positivité établi à 15 % [Camidge *et al.*, 2010 ; Lindeman *et al.*, 2013]. La FDA a approuvé cette technique avec la sonde FISH de Vysis (ALK Break Apart FISH Probe Kit, Abbot Molecular). D'autres méthodes de détection ont été développées notamment l'immunohistochimie (IHC) et la RT-PCR [Takeuchi *et al.*, 2008 ; Shen *et al.*, 2015].

### 5. La prise en charge thérapeutique des cancers bronchiques non à petites cellules *ALK* remanié

La prise en charge des cancers du poumon peut être la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux qui incluent les chimiothérapies et les thérapies ciblées. La majorité des CBNPC sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie et sont par conséquent non opérables [D'Addario *et al.*, 2010 ; Doebele *et al.*, 2012]. Les traitements ciblant *ALK* ont théoriquement succédé à la chimiothérapie qui correspond à des traitements systémiques cytotoxiques. En effet, plusieurs TKI ciblant spécifiquement *ALK* ont été ou sont en cours de développement (**Figure 9**). Le crizotinib, TKI de première génération, a reçu son AMM (autorisation de mise sur le marché) en 2013. Cependant, compte tenu des délais de diagnostic, il est fréquent que la chimiothérapie soit administrée en amont du crizotinib.



**Figure 9 : Chronologie des avancées thérapeutiques très rapides dans les cancers bronchiques non à petites cellules ALK remanié.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press, *Annals of Oncology* [Solomon *et al.*, 2016], copyright 2016.

#### a. Le crizotinib : un inhibiteur de première génération

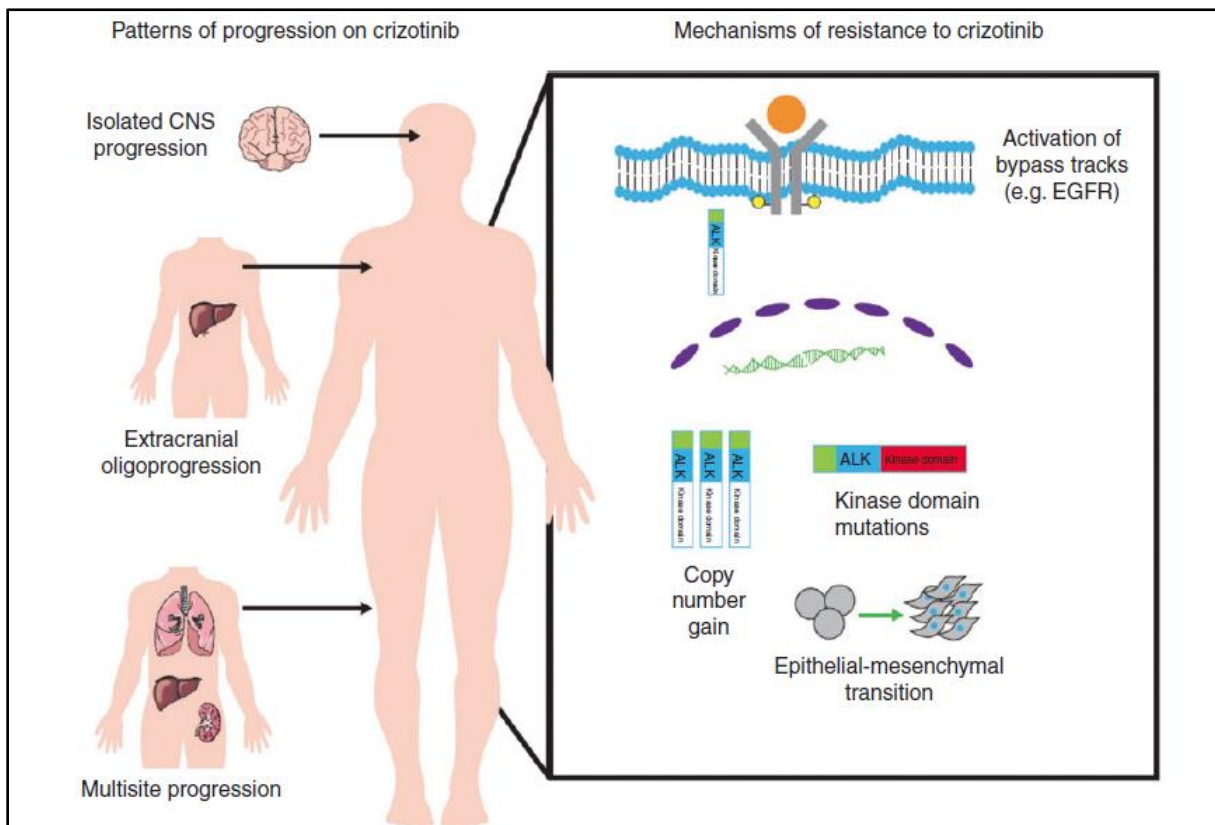
Le premier TKI développé est le crizotinib qui est une petite molécule orale ciblant les protéines oncogéniques ALK, ROS1 et MET [Kwak *et al.*, 2010]. Dans la dernière mise à jour de l'étude de phase I (PROFILE 1001), l'ORR est de 60,8 % et la PFS de 9,7 mois [Camidge *et al.*, 2012]. Au vu des résultats très intéressants des phases I et II (PROFILE 1001 et PROFILE 1005), le crizotinib a été approuvé en 2011 par la FDA dans le traitement de référence des CBNPC ALK remanié [Gerber *et al.*, 2010]. Dans une étude de phase III randomisée (PROFILE 1007), Shaw *et al.* ont comparé le crizotinib à une chimiothérapie standard (pémetrexed ou docétaxel) en deuxième ligne chez des patients ALK remanié localement avancé ou métastatique [Shaw *et al.*, 2013]. La PFS est significativement plus élevée dans le groupe crizotinib que dans celui traité par chimiothérapie avec une médiane de survie de 7,7 mois *versus* 3 mois. L'ORR est de 65 % dans le groupe crizotinib *versus* 20 %. Cependant, il n'y a pas de différence significative en termes d'OS ; ceci est probablement dû au fait que lorsque les patients du groupe chimiothérapie ont progressé, ils ont été traités par crizotinib. Suite à cette étude, le crizotinib a obtenu son AMM en France en 2013 en deuxième ligne après échec d'une ligne de chimiothérapie standard dans le traitement des CBNPC ALK remanié. Dans une récente étude (PROFILE 1014), Solomon *et al.* ont comparé le crizotinib à une combinaison de chimiothérapies



(pémetrexed et sels de platine) en première ligne de traitement des CBNPC *ALK* remanié [Solomon *et al.*, 2014]. Cette étude montre une PFS significativement plus longue dans le groupe crizotinib avec une médiane de 10,9 mois *versus* 7,0 mois et une ORR de 74 % *versus* 45 %. Le *cross-over* à la progression n'a pas permis d'évaluer le bénéfice sur la survie globale. L'ORR ainsi que la PFS avec le crizotinib semblent nettement supérieure en première ligne par rapport à son utilisation en deuxième ligne. Néanmoins, l'apparition de métastases cérébrales est fréquente chez les patients traités par crizotinib alors que par ailleurs la maladie est contrôlée [Maillet *et al.*, 2013 ; Costa *et al.*, 2015]. Un *case report* a montré de très faibles niveaux de crizotinib dans le liquide cérébro-spinal d'un patient qui rechutait à cause de métastases cérébrales [Costa *et al.*, 2011]. Le crizotinib a une pénétration cérébrale très faible qui est probablement due à son efflux par les glycoprotéines P [Johnson *et al.*, 2014]. Bien que l'ORR soit élevée, l'efficacité à long terme est invariablement limitée par le développement de résistance [Camidge *et al.*, 2012 ; Dagogo-Jack *et al.*, 2016].

#### **b. Les mécanismes de résistance au crizotinib**

Les patients développent une résistance au crizotinib généralement un an après le début du traitement [Shaw *et al.*, 2013 ; Solomon *et al.*, 2014 ; Dagogo-Jack *et al.*, 2016]. La résistance aux TKI est généralement classée en deux catégories, la résistance primaire ou intrinsèque et la résistance secondaire ou acquise. Peu de données sur la résistance intrinsèque, définie comme une absence *de novo* de réponse au traitement, sont disponibles [Gainor *et al.*, 2013]. La résistance acquise se développe pendant le traitement de tumeurs initialement sensibles et peut être causée par des mutations dans la cible de la drogue elle-même ou par diverses autres réponses adaptatives induites par le traitement [Doebele *et al.*, 2012 ; Katayama *et al.*, 2012 ; Dagogo-Jack *et al.*, 2016]. Les mécanismes de résistance acquise aux TKI peuvent être classés en quatre catégories [Gainor *et al.*, 2013 ; Toyokawa *et al.*, 2015 ; Dagogo-Jack *et al.*, 2016] (**Figure 10**) : (i) l'acquisition de mutations secondaires dans le domaine kinase comme la mutation *gatekeeper* L1196M ou les mutations G1269A, C1156Y, 1151Tins, L1152R, G1202R, S1206Y, D1203N, I1171T, F1174 (~ 30 % des cas) [Choi *et al.*, 2010 ; Sasaki *et al.*, 2011 ; Doebele *et al.*, 2012 ; Katayama *et al.*, 2012 ; Toyokawa *et al.*, 2014] (**Figure 11**) ; (ii) l'amplification du gène *ALK* [Katayama *et al.*, 2011 ; Doebele *et al.*, 2012 ; Katayama *et al.*, 2012 ; Gainor *et al.*, 2016] ; (iii) l'activation de voies alternatives impliquant entre autres *EGFR* ou *cKIT* (*KIT proto-oncogene*) (~ 30 % des cas) [Sasaki *et al.*, 2011 ; Katayama *et al.*, 2012 ; Crystal *et al.*, 2014 ; Lovly *et al.*, 2014 ; Hrustanovic *et al.*, 2015 ; Wilson *et al.*, 2015]. Cette activation peut provenir de nouvelles anomalies génétiques comme des mutations activatrices, une amplification ou la simple surexpression d'un gène ; (iv) une transition histologique *via* l'EMT [Kim *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2013 ; Kobayashi *et al.*, 2013 ; Kogita *et al.*, 2014].



**Figure 10 : Mode de progression et mécanismes de résistance décrits chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules porteurs du remaniement *ALK* et traités par l'inhibiteur de première génération crizotinib.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press, *Annals of Oncology* [Dagogo-Jack *et al.*, 2016], copyright 2016.

### ***c. Le ceritinib, l'alectinib et le lorlatinib : exemples d'inhibiteurs de deuxième et troisième générations***

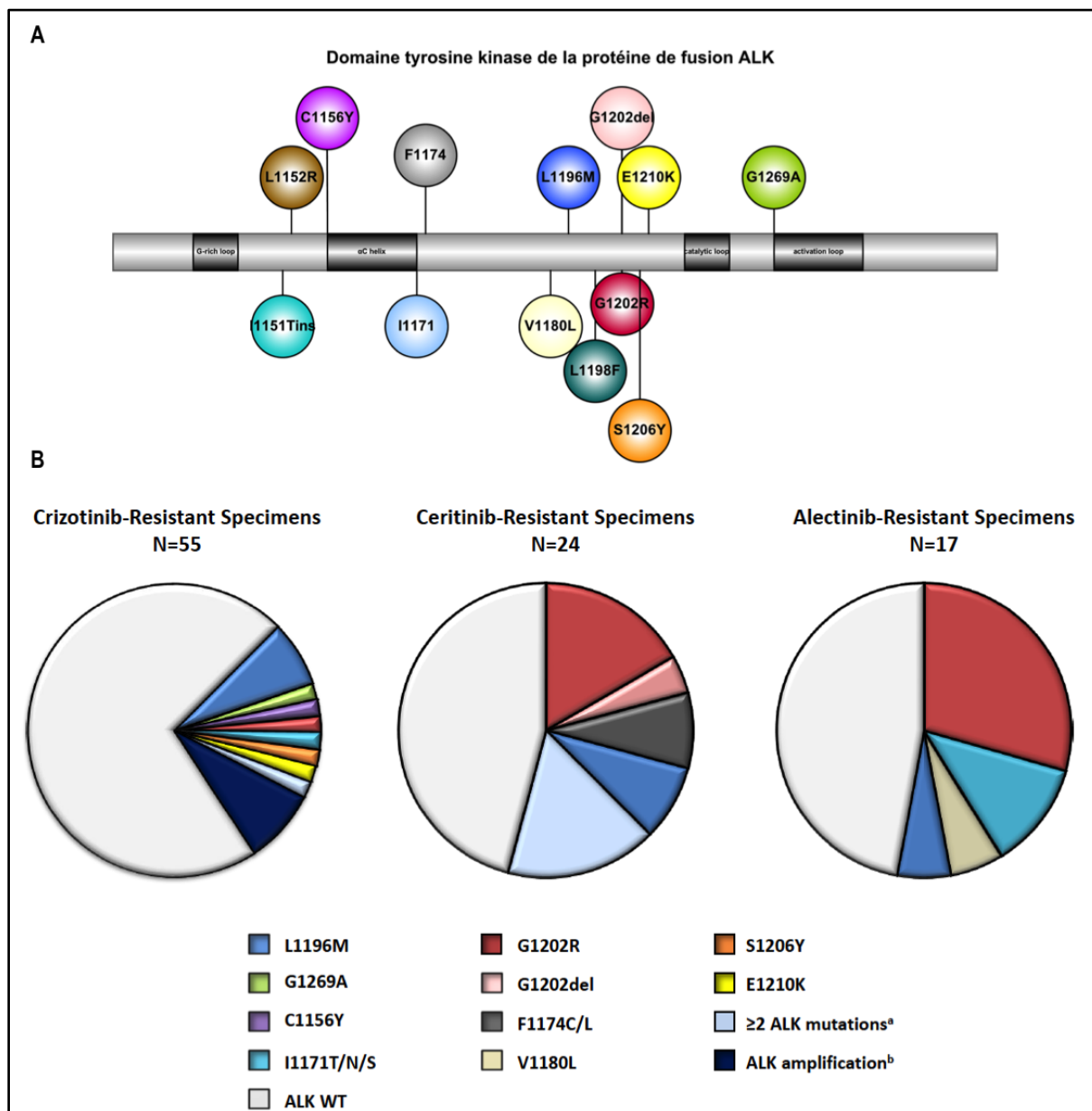
Afin de contourner les mécanismes de résistance au crizotinib décrits dans la section ci-dessus, des inhibiteurs de deuxième et troisième générations ont été développés. Parmi les inhibiteurs de deuxième génération, le ceritinib est le TKI le plus avancé en clinique. Il s'agit d'un puissant TKI administré par voie orale. Son IC50 (concentration inhibitrice médiane) est 20 fois supérieure à celle du crizotinib [Friboulet *et al.*, 2014]. Il a été montré comme efficace chez les patients présentant dans la tumeur biopsiée les mutations de résistance L1196M, G1269A, I1171T et S1206Y [Friboulet *et al.*, 2014]. Dans l'étude de phase I, l'ORR est de 58 % et la médiane de PFS de 7,0 mois [Shaw *et al.*, 2014]. Le sous-groupe de patients prétraités avec du crizotinib présente une ORR de 56 % et une médiane de PFS de 6,9 mois ce qui démontre qu'une réponse au ceritinib est possible chez la plupart des patients ayant développé une résistance au crizotinib. De plus, ces réponses sont également visibles chez des

patients sans mutation détectable [Shaw *et al.*, 2014]. Les résultats de cette étude ont permis son approbation par la FDA en 2014 en deuxième ligne après échec ou intolérance au crizotinib. Les résultats récents des études de phases I et II (ASCEND-1 et ASCEND-2) confirment l'efficacité du ceritinib [Crino *et al.*, 2016 ; Kim *et al.*, 2016]. Néanmoins, les patients développent une résistance au ceritinib compte tenu principalement de l'émergence des mutations secondaires G1202R et F1174C/V (**Figure 11**). Ces mutations ont été confirmées comme conférant une résistance au ceritinib dans des cellules Ba/F3 [Friboulet *et al.*, 2014].

L'alectinib est un autre inhibiteur de deuxième génération, fortement sélectif de ALK qui est 10 fois plus puissant que le crizotinib [Kodama *et al.*, 2014]. Son efficacité a été montrée chez les patients présentant dans la tumeur biopsiée les mutations de résistance L1196M, G1269A, C1156Y et F1174L [Sakamoto *et al.*, 2011 ; Iwama *et al.*, 2014]. Récemment, une étude clinique de phase I/II a été réalisée au Japon chez des patients *ALK* remanié prétraités par chimiothérapie mais naïfs de traitement par crizotinib. Cette étude présente une ORR de 93,5 % avec une médiane de PFS supérieure à 27 mois [Seto *et al.*, 2013]. Dans l'étude de phase I/II réalisée aux États-Unis chez des patients prétraités par le crizotinib, l'ORR est de 54,5 % [Gadgeel *et al.*, 2014]. Les études de phase II (NP28763 et NP28761) de Shaw *et al.* ainsi que de Ou *et al.* rapportent une nette efficacité de l'alectinib chez les patients résistants au crizotinib [Ou *et al.*, 2016 ; Shaw *et al.*, 2016]. De plus, l'alectinib a une activité au niveau du système nerveux central [Gainor *et al.*, 2015]. Des études cliniques de phase III sont en cours comparant l'alectinib au crizotinib en première ligne de traitement. Hiroshi Nokihara a rapporté lors du congrès ASCO 2016 une efficacité plus élevée de l'alectinib dans l'étude J-ALEX menée dans la population japonaise [Nokihara *et al.*, 2016]. Les résultats dans la population caucasienne sont attendus. Ils permettront de confirmer ou non la supériorité de l'alectinib. Néanmoins, comme pour le crizotinib ou le ceritinib, les patients développent une résistance à l'alectinib avec notamment les mutations secondaires V1180L et I1171T/N/S [Katayama *et al.*, 2014 ; Ou *et al.*, 2014 ; Toyokawa *et al.*, 2015] (**Figure 11**). Ces deux mutations confèrent une résistance au crizotinib et à l'alectinib mais pas au ceritinib [Katayama *et al.*, 2014]. L'amplification du gène *MET* a été décrite comme un mécanisme de résistance à l'alectinib [Gouji *et al.*, 2014] ; le patient a ensuite répondu au crizotinib inhibant ALK et MET. La mutation G1202R confère quant à elle une résistance aux trois molécules [Shaw *et al.*, 2013 ; Ou *et al.*, 2014 ; Fontana *et al.*, 2015] (**Figure 11**).

Très récemment, Gainor *et al.* ont rapporté la plus large analyse de biopsies de tumeur de patients résistants aux TKI de première ou deuxième génération [Gainor *et al.*, 2016]. Comme cela avait déjà été rapporté, les mutations de résistance au niveau du domaine tyrosine kinase de ALK sont minoritaires chez les patients résistants au crizotinib (**Figure 9**). Cependant, les mutations de résistance sont beaucoup plus présentes (50 %) chez les patients résistants aux TKI de deuxième génération. De plus,

le spectre de mutations mis en évidence est différent. La mutation de résistance G1202R présente dans seulement 2 % des cas de résistance au crizotinib, émerge comme la mutation principale de résistance aux TKI de deuxième génération la plus fréquente (**Figure 11**).



**Figure 11. Altérations génétiques de résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase présentes dans la protéine de fusion ALK chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules ALK remanié.**

(A) Mutations connues de résistance dans le domaine tyrosine kinase de ALK. (B) Distribution et fréquence des altérations génétique (mutations / amplification) de résistance au crizotinib, au ceritinib et à l'alectinib d'après Gainor *et al.*<sup>a</sup> Certaines biopsies présentent deux ou trois mutations de résistance. <sup>b</sup> La recherche d'amplification du gène ALK n'a été réalisée que dans les biopsies à résistance pour le crizotinib.

Figure adaptée avec l'autorisation de AACR, Cancer Discovery [Gainor *et al.*, 2016], copyright 2016.

Le lorlatinib est un TKI de troisième génération qui a une activité *in vitro* 10 fois supérieure au crizotinib contre le gène de fusion *EML4-ALK* sauvage et 40 fois supérieure lorsque ce dernier présente la mutation de résistance L1196M. Cette molécule a été conçue et optimisée afin d'améliorer la pénétration de la barrière hémato-encéphalique [Johnson *et al.*, 2014]. Son efficacité a été démontrée sur de nombreuses mutations de résistance incluant la mutation G1202R connue pour être réfractaire [Zou *et al.*, 2015]. Zou *et al.* ont rapporté dans une étude préclinique la nette efficacité du lorlatinib notamment dans des modèles de résistance aux TKI de première et deuxième générations. Dans des modèles précliniques, Gainor *et al.* ont montré une meilleure efficacité du lorlatinib sur des lignées présentant des mutations de résistance comparées aux lignées non mutées [Gainor *et al.*, 2016]. Les essais cliniques de phases I/II sont actuellement en cours et les résultats sont attendus.

D'autre part, des combinaisons de drogues sont également développées avec notamment la combinaison des TKI et des inhibiteurs de HSP90 (*heat shock protein 90*) ou encore des TKI et l'immunothérapie [Katayama *et al.*, 2015].

## 6. Les remaniements du gène *ROS1*

Le gène *ROS1* humain a été découvert grâce à son homologie avec le gène *c-ROS* chez le poulet qui a été décrit comme un proto-oncogène [Matsushime *et al.*, 1986]. Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 6 en position q22. Le gène *ROS1* code pour un récepteur orphelin à activité tyrosine kinase de la sous-famille du récepteur de l'insuline [Acquaviva *et al.*, 2009]. *ALK* et *ROS1* ont une origine phylogénétique commune et partagent 77 % d'acides aminés en commun dans le site de liaison à l'ATP dans le domaine tyrosine kinase [Ou *et al.*, 2012]. Peu de données sont disponibles concernant la fonction de *ROS1* sauvage [Davies *et al.*, 2013]. À l'âge adulte, l'expression de *ROS1* est la plus forte dans les reins mais également dans le cervelet, le tissu nerveux périphérique, l'estomac, l'intestin grêle et le colon mais peut être également retrouvée en plus faible quantité dans d'autres tissus [Davies *et al.*, 2013]. À noter qu'il n'y a pas de production de la protéine *ROS1* dans les cellules normales du poumon [Rimkunas *et al.*, 2012].

La découverte d'un remaniement de gène *ROS1* a été mise en évidence dans la lignée cellulaire de glioblastome humain U118MG ; une délétion sur le chromosome 6 a abouti à la fusion de la partie 3' de *ROS1* et de la partie 5' de *FIG* [Birchmeier *et al.*, 1987 ; Charest *et al.*, 2003]. D'autres partenaires ont également été décrits incluant les gènes *SLC34A2* (*solute carrier family 34 member 2*), *CD74*, *TPM3* (*tropomyosin 3*) et *EZR* (*ezrin*) [Takeuchi *et al.*, 2012]. Les gènes de fusion ont été décrits dans les cholangiocarcinomes, les cancers ovariens, les cancers colorectaux ou encore les CBNPC [Rikova *et al.*, 2007 ; Gu *et al.*, 2011]. Dans les CBNPC, les remaniements du gène *ROS1* définissent une sous-

population moléculaire qui représente environ 1 à 2 % des cas [Bergethon *et al.*, 2012 ; Gainor *et al.*, 2013]. Les caractéristiques clinico-biologiques des patients *ROS1* remanié sont similaires à celles des patients *ALK* remanié tout comme les méthodes de diagnostic [Davies *et al.*, 2013].

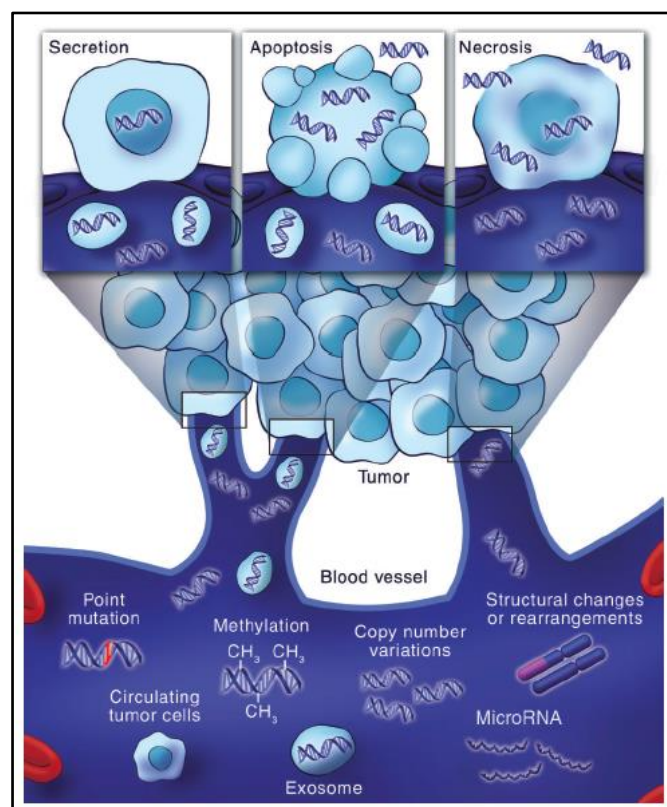
Les patients *ROS1* remanié sont traités par les mêmes TKI que les patients *ALK* remanié c'est-à-dire par l'inhibiteur de première génération crizotinib ou les inhibiteurs de deuxième et troisième générations que sont le ceritinib et le lorlatinib [Ye *et al.*, 2016]. Ces molécules sont approuvées ou en cours d'évaluation dans des essais cliniques. L'extension de la phase I évaluant le crizotinib présente une ORR de 72 %, une durée moyenne de réponse de 17,7 mois et une PFS de 19,2 mois ce qui a permis son approbation par la FDA en 2016 [Shaw *et al.*, 2014]. Cependant, comme pour les patients *ALK* remanié, l'efficacité à long terme est invariablement limitée par le développement de résistance [Engelman *et al.*, 2008]. Seulement quatre mutations de résistance acquises ont été décrites : G2032R, L2155S, D2033N, S1986Y/F [Awad *et al.*, 2013 ; Song *et al.*, 2015 ; Drilon *et al.*, 2016 ; Facchinetti *et al.*, 2016].

## **7. Identification de biomarqueurs circulants dans l'ADN tumoral circulant versus les cellules tumorales circulantes dans les cancers bronchiques non à petites cellules**

Face au répertoire croissant des thérapies ciblées et aux besoins pressants de diagnostic et de suivi de l'évolution de la tumeur, il paraît essentiel de déterminer au mieux le statut moléculaire de cette dernière mais également de mettre en évidence et idéalement anticiper les mécanismes de résistance aux TKI afin de guider le choix thérapeutique. Pratiquer des biopsies pour le diagnostic ou en situation de résistance est cliniquement délicat, invasif et associé à des risques importants. D'un point de vue technique, les sites tumoraux sont souvent difficiles d'accès et les biopsies peuvent être non contributives ; d'un point de vue biologique, une simple biopsie ne reflète pas l'hétérogénéité intratumorale et la diversité génomique de la tumeur [Gerlinger *et al.*, 2012]. Le développement d'approches non invasives permettant d'identifier des anomalies moléculaires éligibles pour une thérapie ciblée, de suivre l'évolution de la tumeur tout au long du traitement et d'informer sur l'émergence et la nature des mécanismes à l'origine de la résistance est devenu une question importante [Pantel *et al.*, 2013 ; Alix-Panabieres *et al.*, 2016]. Deux approches de « biopsie liquide » sont principalement évaluées dans les CBNPC.

La première est l'ADN tumoral circulant. La mise en évidence de l'ADN libre circulant chez les patients atteints de cancer date de 1977 [Pietrasz *et al.*, 2016]. Son origine est controversée et plusieurs hypothèses ont été proposées ; il proviendrait de cellules tumorales apoptotiques ou nécrotiques de la

tumeur primitive ou de la lyse des cellules tumorales circulantes ou de micro-métastases. L'ADN tumoral circulant est présent en quantité variable selon les types de tumeur et leurs stades : il peut représenter jusqu'à 90 % de l'ADN libre circulant chez un patient métastatique tandis qu'il ne représente que 0,01 % dans les stades précoces [Diehl *et al.*, 2008]. Des techniques très sensibles comme les techniques ciblées de digital PCR, de BEAMing (*beads, emulsion, amplification and magnetics*) ou de NGS ou les techniques non ciblées de WES sont donc nécessaires pour détecter les anomalies génomiques incluant les mutations ponctuelles, les insertions/délétions, les translocations ou encore les amplifications de gènes [Dressman *et al.*, 2003 ; Bidard *et al.*, 2013 ; Didelot *et al.*, 2013 ; Newman *et al.*, 2014] (**Figure 12**). Pour une possible utilisation en routine, il est nécessaire d'évaluer si l'ADN tumoral circulant permet d'identifier des biomarqueurs de sensibilité. Cela implique des études de concordance entre les mutations retrouvées dans l'ADN tumoral circulant et dans les échantillons tumoraux (**Tableau 1**).



**Figure 12. Altérations génomiques détectées dans l'ADN tumoral circulant.**

Les cellules tumorales relarguent des fragments d'ADN libre dans la circulation par différents mécanismes. Diverses altérations génomiques incluant les mutations ponctuelles, les insertions/délétions, les translocations, les amplifications ou encore les variations du nombre de copies peuvent être détectées dans l'ADN tumoral circulant.

Figure reproduite avec l'autorisation de AACR, Journal of Clinical Oncology [Diaz *et al.*, 2014], copyright 2014.

	Méthode de détection	Stades	Mutant tumeur	Mutant plasma	Sensibilité	Spécificité
[Douillard <i>et al.</i> , 2014]	ARMS (PCR en temps réel)	Stade IIB-IV	105/652 (16 %)	70/652 (11 %)	66 %	99,8 %
[Qiu <i>et al.</i> , 2015] (méta-analyse)	variées	Stade I-IV	1113/3112 (36 %)	757/3112 (24 %)	62 %	96 %
[Karachaliou <i>et al.</i> , 2015]	PNA PCR clamp	Stade IIIB-IV	97/97 (100 %)	76/97 (78 %)	78 %	NE
[Mok <i>et al.</i> , 2015]	Cobas EGFR blood test	Stade IIIB-IV	96/238 (40 %)	77/238 (32 %)	75 %	96 %
[Uchida <i>et al.</i> , 2015]	NGS	Stade I1-IIIA	36/110 (33 %)	17/110 (15 %)	22 %	NE
[Uchida <i>et al.</i> , 2015]	NGS	Stade IIIB-IV	66/172 (38 %)	61/172 (35 %)	73 %	NE

**Tableau 1. Concordance au diagnostic entre les mutations identifiées à partir d'un prélèvement tissulaire et d'ADN tumoral circulant dans les cancers bronchiques non à petites cellules.**

ARMS : *amplification refractory mutation system* ; BEAMing : *beads, emulsion, amplification, and magnetics* ; PNA-LNA : *peptide nucleic acid-locked nucleic acid* ; NE : non évaluable.

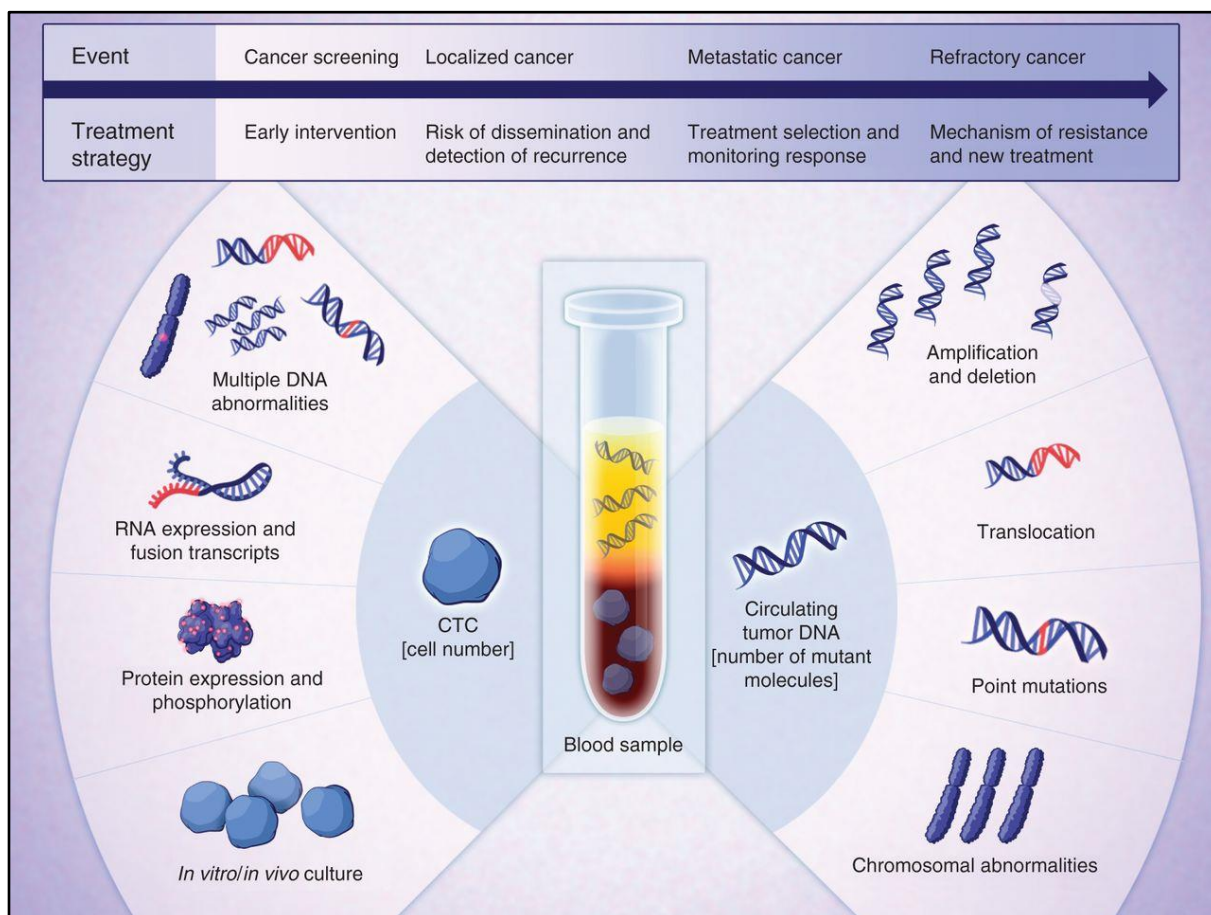
Tableau reproduit et adapté, Bulletin du Cancer [Pietrasz *et al.*, 2016].

Ces différentes études ont permis de montrer que la détection des mutations dans le plasma est très spécifique mais que la sensibilité n'est à l'heure actuelle pas suffisante pour substituer ce type d'analyse aux tests moléculaires sur biopsie tumorale. L'ADN tumoral circulant est à l'heure actuelle plutôt une alternative en cas d'échec de la biopsie ou d'analyses moléculaires non contributives. Sa principale application serait d'être utilisé comme « biopsie liquide » afin de mettre en évidence de possibles altérations moléculaires et de les suivre sous traitement [Bidard *et al.*, 2013 ; Diaz *et al.*, 2014].

Les CTC ont été plus largement détaillées dans la section Introduction B. Tout comme l'ADN tumoral circulant, elles sont accessibles par une simple prise de sang et leur analyse de manière répétée pourrait permettre d'étudier l'évolution tumorale sous traitement. Cependant l'ADN tumoral circulant est une approche plus simple que l'analyse des CTC pour identifier des anomalies moléculaires éligibles pour une thérapie ciblée. Néanmoins, les CTC sont de réelles entités cellulaires contrairement à l'ADN tumoral circulant qui est uniquement du matériel génétique libre ; il est ainsi possible de détecter dans une même CTC plusieurs altérations génomiques ce qui peut permettre de mettre en évidence l'hétérogénéité tumorale mais également cartographier l'évolution clonale. Également, l'analyse des CTC, et en particulier leur analyse à l'échelle de cellule unique, permet d'apporter des informations complémentaires comme la morphologie, le phénotype mais également le profil transcriptomique. Ainsi, il est possible d'avoir un lien entre le profil mutationnel d'une cellule et l'activation des voies de signalisation. Le développement de modèles tumoraux ou de lignées cellulaires dérivées de CTC sont des moyens qui peuvent permettre de comprendre les caractéristiques biologiques de ces cellules, leur fonctionnalité en tant que « cellules souches cancéreuses » et ainsi améliorer nos connaissances sur la



biologie des métastases (**Figure 13** et **Tableau 2**).



**Figure 13. Applications cliniques de l'analyse des cellules tumorales circulantes et de l'ADN tumoral circulant.**

Figure reproduite avec l'autorisation de AACR, Cancer Discovery [Haber *et al.*, 2014], copyright 2014.

Table 1 Advantages and limitations of the detection of circulating tumor cells vs. ctDNA		
Subject	Advantages	Limitations
CTCs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Visualization of intact cells for morphological identification of a malignant phenotype</li> <li>• Relevance for the metastatic process and disease progression;</li> <li>• Allow functional <i>in vitro/in vivo</i> assays (e.g., xenotransplantation of CTCs into immunodeficient mice)</li> <li>• Opportunity for molecular characterization at both cellular and sub-cellular level (e.g., genomic analysis of single CTCs)</li> <li>• Allows immuno-labeling based approaches</li> <li>• Complementary with ctDNA: CTCs can survive current chemotherapy and might indicate failure of therapeutic interventions</li> <li>• Potentially influence changes in treatment modalities</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low abundance and fragility</li> <li>• Require extremely sensitive and specific analytic methods</li> <li>• False-negative (due to epithelial-to-mesenchymal transition) and false-positive results</li> <li>• Heterogeneity of the CTC populations (e.g., detection of CTCs with tumor-initiating capacity)</li> <li>• Multiplicity of technologies used for CTC isolation</li> </ul>
Cell-free ctDNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• More sensitive for detection of disease burden</li> <li>• Complementary with CTCs for detection of minimal residual disease after surgery or therapy with curative intent</li> <li>• Might predict acquired drug resistance</li> <li>• Potentially influence changes in treatment modalities</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• False-negative and false-positive results (e.g., no specific isolation of tumor DNA unless the detection of tumor-specific mutations; or mutations of tumor-associated genes in normal tissue of aging patients and in frequent benign diseases)</li> <li>• No functional assays</li> <li>• Lack of standardization of preanalytical conditions (e.g., dilution and contamination of ctDNA with normal DNA from dying blood cells after blood collection)</li> </ul>
CTCs, circulating tumor cells; ctDNA, circulating tumor DNA.		

**Tableau 2. Avantages et limites des approches de « biopsie liquide » : cellules tumorales circulantes et ADN tumoral circulant.**

Tableau reproduit de la publication en *open-access*, Annals of Translational Medicine [Ilie *et al.*, 2014], copyright 2014.

En conclusion, l'ADN tumoral circulant et les CTC sont des approches complémentaires. L'ADN tumoral circulant pourrait être préféré pour l'identification des anomalies moléculaires lors du diagnostic ou du suivi sous traitement bien que les CTC représentent un outil sans précédent pour étudier la biologie du processus métastatique.

# **Matériels & Méthodes**

## A. PRÉLÈVEMENTS SANGUINS POUR L'ÉTUDE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES CHEZ L'HOMME

L'ensemble des patients atteints de CBNPC ont été recrutés à Gustave Roussy et ont été inclus dans l'étude CEC/CTC (2008-A00585-50 ; investigateur principal : Professeur Jean-Charles Soria). Cette étude autorise à prélever des patients consentants à des fins de recherche dans le domaine des CTC. Les patients ont signé un consentement éclairé pour un maximum de dix prélèvements sanguins sur une période de trois ans. Depuis 2011, 77 patients *ALK* remanié ainsi que neuf patients *ROS1* remanié ont été inclus. Pendant toute la durée de mon Master 2 et de mon Doctorat, j'ai suivi ces deux cohortes de patients, ce qui consiste à consulter de façon hebdomadaire les dossiers médicaux électroniques présents sur la base données eSimbad de Gustave Roussy afin de suivre l'évolution de la maladie et à programmer si nécessaire un prélèvement auprès de l'attaché de recherche clinique référent. Les données clinico-biologiques de ces patients ont été recueillies à partir de la base de données eSimbad ainsi qu'à partir des dossiers médicaux papiers.

Cohorte de patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement <i>ALK</i>		n =
Nombre de patients <i>ALK</i> remanié inclus dans l'étude CEC/CTC		77
•	Ayant reçu comme première ligné de TKI le crizotinib	75
•	Ayant reçu comme première ligne de TKI un TKI de deuxième ou troisième génération	2
Patient suivi à Gustave Roussy depuis la première ligne de TKI par crizotinib		64
•	Nombre de patients ayant un prélèvement à résistance au crizotinib	13
•	Nombre de patients suivis sous un autre TKI après résistance au crizotinib	11
Patient suivi à Gustave Roussy uniquement sous un TKI de deuxième ou troisième génération		13

Cohorte de patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement <i>ROS1</i>		n =
Nombre de patients <i>ROS1</i> remanié inclus dans l'étude CEC/CTC		9
•	Ayant reçu comme première ligné de TKI le crizotinib	8
•	Ayant reçu comme première ligne de TKI un TKI de deuxième ou troisième génération	1
Patient suivi à Gustave Roussy depuis la première ligne de TKI par crizotinib		8
•	Nombre de patients ayant un prélèvement à résistance au crizotinib	1
•	Nombre de patients suivis sous un autre TKI après résistance au crizotinib	1
Patient suivi à Gustave Roussy uniquement sous un TKI de deuxième ou troisième génération		1

## **B. LIGNÉES CELLULAIRES**

Les lignées cellulaires NCI-H2228, HCC78, A549, NCI-H1975, HCT116 ont été utilisées pour les différentes mises au point. Pour cela, elles ont été mélangées en quantité connue avant enrichissement dans du sang de donneur sain provenant de l'établissement de sang français afin de mimer les CTC de patients. Ces lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu DMEM (*dulbecco's modified eagle medium*) ou RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) en fonction des recommandations (ThermoFisher, Waltham, MA, États-Unis). Les milieux de culture sont enrichis avec 10 % de sérum de veau foetal (ThermoFisher) et 1 % de solutions d'antibiotiques pénicilline-streptavidine (ThermoFisher). Les lignées cellulaires sont maintenues dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> et décollées à l'aide de trypsine (ThermoFisher).

## C. MÉTHODES D'ENRICHISSEMENT EN CELLULES TUMORALES CIRCULANTES

### 1. La technique de filtration ISET

Le prélèvement est réalisé sur des tubes EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) afin de pouvoir enrichir en CTC par filtration ISET (RareCells). Le volume prélevé peut être variable (en général de 10 mL) et il est donc possible de réaliser un ou deux filtres par prélèvement. Immédiatement après le prélèvement, l'échantillon sanguin est dilué au 1:10 dans un tampon de lyse des érythrocytes contenant le fixateur formaldéhyde. Le sang dilué est incubé 10 minutes à température ambiante puis est soumis à une aspiration douce créée par une pompe à aspiration. Le filtre est composé d'une membrane en polycarbonate proposant 10 spots eux même constitués de pores cylindriques aléatoires et calibrés de 8 µm. Chaque spot correspond à la filtration de 1 mL de sang. Les cellules sont filtrées à une pression de -7 kPa bien que les recommandations de RareCells indiquent qu'une pression plus élevée peut être appliquée. Les filtres sont ensuite séchés et enveloppés dans un papier aluminium avant d'être stockés à -20°C dans un sachet plastique contenant un dessiccateur afin de contrôler l'humidité.

### 2. La méthode de sélection positive CellSearch

Afin de pouvoir énumérer les CTC avec la technologie CellSearch (Janssen Diagnostics), 10 mL de sang sont prélevés sur un tube CellSave. Ces tubes contiennent un anticoagulant et un réactif de préservation qui permettent de conserver le prélèvement pendant 96 heures à température ambiante. L'enrichissement et le marquage sont réalisés selon le protocole du fabricant à partir de 7,5 mL de sang. Un anticorps anti-vimentine couplé au fluorochrome FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (clone V9, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, États-Unis) est ajouté dans le canal libre afin d'avoir une information sur le statut EMT des CTC DAPI+/CD45-/EPCAM+/CK+ capturées.

### 3. La technique de sélection négative RosetteSep

Le prélèvement sanguin destiné à l'enrichissement par RosetteSep (Human CD45 Depletion Cocktail kit, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) est collecté sur des tubes CellSave. Pour cette approche, une comparaison entre des prélèvements sanguins collectés sur tubes EDTA ou sur tubes CellSave a été réalisée par une technicienne de l'équipe, Fanny Billiot. Cette comparaison a montré un meilleur taux de récupération cellulaire pour les échantillons collectés sur des tubes CellSave (données non présentées dans ce manuscrit). Le RosetteSep est réalisée le même jour que le prélèvement. La méthode de RosetteSep permet, grâce à un mélange préétabli d'anticorps (CD45, CD66b, glycophorine A), de former des rosettes en liant les cellules non désirées et les érythrocytes. Les rosettes ainsi formées vont précipiter sur un gradient de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Little

Chalfont, Royaume-Uni) au cours d'une centrifugation de 20 min à 1200 rpm (rotations par minute). Les CTC sont recherchées dans la fraction de cellules mononuclées restante suite à cette déplétion.

## **D. DÉTECTION ET CARACTÉRISATION DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES ENRICHIES PAR FILTRATION ISET**

Les mises au point des protocoles détaillés dans cette section ont été réalisées avec Marianne Oulhen, ingénieure d'étude dans l'équipe.

### **1. Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET**

Ce point est détaillé dans la section Résultats A.2. Brièvement, le filtre ISET est décongelé et un spot est découpé et immobilisé sur une lame de verre SuperFrost plus (Thermo Fisher Scientific). Nous avons généralement réalisé des marquages par immunofluorescence quatre couleurs (DAPI/CD45 APC (*allophycocyanin*)/marqueurs épithéliaux AF488 (alexa fluor)/marqueurs mésenchymateux AF546).

### **2. Caractérisation cytomorphologique des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET**

Ce point est détaillé dans la section Résultats A.2. La coloration cytologique des cellules retenues sur le filtre préalablement marqué par immunofluorescence est réalisée avec le colorant hémalun de Mayer (RAL Diagnostics, Martillac, France) ou avec le kit Diff-Quik (Siemens Healthcare diagn., Munich, Germany).

### **3. Scan et analyse d'image après marquage par immunofluorescence et coloration cytologique**

Ce point est détaillé dans la section Résultats A.2. Une représentation schématique du processus globale est présentée **Figure 14**. La calibration microscopique, le scan des spots, la relocalisation des cellules ainsi que l'analyse d'images sont réalisés avec le scanner de lames Ariol (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL, USA) qui comprend un microscope Leica DM6000 B et une platine multi-lame motorisée.



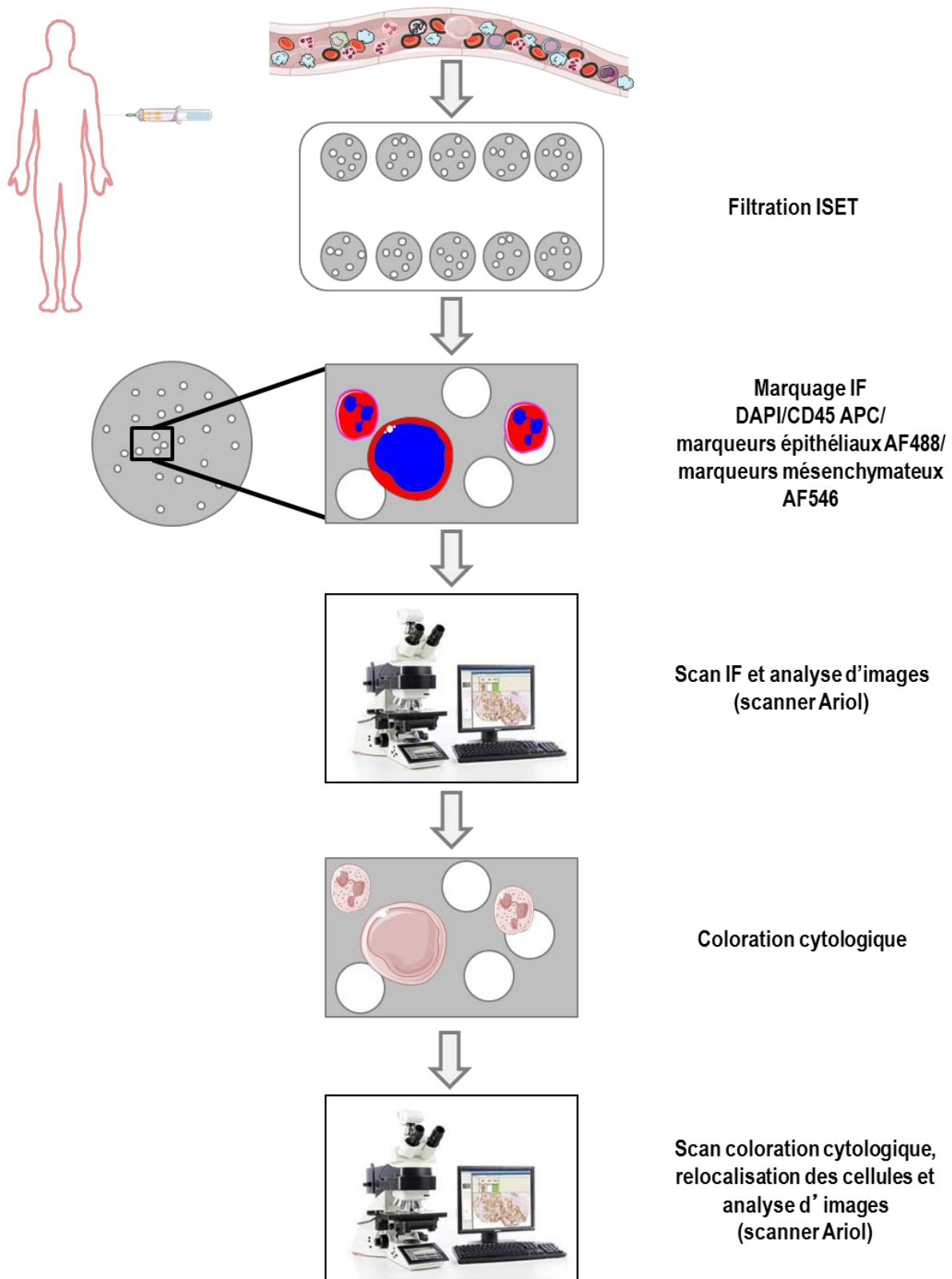


Figure 14 : Méthode établie pour la détection et la caractérisation phénotypique et cytomorphologique des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET.

## 5. Caractérisation par immunofluorescence et FA-FISH des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET

Ce point est détaillé dans la section Résultats A.2. La méthode originale de FISH adaptée aux filtres (FA-FISH) a fait l'objet d'une demande de brevet (PCT/FR2011/052688). Cette technique peut être réalisée directement ou à la suite d'un marquage par immunofluorescence. La FA-FISH est réalisée sur un spot avec différentes sondes qui dépendent de l'étude. La sonde Vysis LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) est utilisée pour analyser les prélèvements de patients *ALK* remanié. Le design de la sonde *ALK* permet la détection du point de cassure du gène *ALK* avec un fragment d'ADN de ~300 kilobases (kb) du côté télomérique (3') marqué en Spectrum-Orange et d'un fragment d'ADN de ~442 kb du côté centromérique (5') marqué en Spectrum-Green. Le statut normal du gène *ALK* apparaît comme une fusion des signaux rouge/vert (3'/5' x 2, jaune) ; un réarrangement avec un point de cassure dans la région 2p23 donne deux signaux distincts rouge et vert (3' et 5') appelé « *break-apart* » ou un unique signal rouge (3') appelé « rouge isolé ». La sonde XCyting Centromere Enumeration Probe XCE 2 (MetaSystems GmbH, Altlußheim, Germany) ciblant le chromosome 2 peut être ajoutée afin de déterminer le statut de ploïdie des CTC. Une amplification est définie comme un cluster de signaux « rouge isolé » [Katayama *et al.*, 2012] ou un ratio  $\frac{ALK}{centromère\ 2}$  supérieur à 2,5 tandis qu'un ratio inférieur à 2,0 correspond à un gain de copie du gène. La sonde Vysis 6q22 ROS1 Break Apart FISH probe RUO Kit (Abbott Molecular Inc.) est utilisée pour analyser les prélèvements de patients *ROS1* remanié. Le design de la sonde *ROS1* permet la détection du point de cassure du gène *ROS1* avec un fragment d'ADN de ~317 kb du coté télomérique (5') marqué en Spectrum-Orange et d'un fragment d'ADN de ~557 kb du coté centromérique (3') marqué en Spectrum-Green. Le statut normal du gène *ROS1* apparaît comme une fusion des signaux rouge/vert (3'/5' x 2, jaune) ; un réarrangement avec un point de cassure dans la région 6q22 donne deux signaux distincts rouge et vert (3' et 5') *break-apart* ou un unique signal vert (3') appelé « vert isolé ». Afin de mettre en évidence la ploïdie des CTC, une approche de multi-FA-FISH a été développée avec le kit AneuVysion Multicolor DNA Probe. Les sondes présentes dans ce kit ciblent les chromosomes 13, 18, 21, X et Y.

La ploïdie est déterminée par l'équation  $\frac{\text{nombre de copies des chromosomes (13+18+21+X+Y)}}{4}$ .

## 7. Scan et analyse d'images après marquage par immunofluorescence et FA-FISH

Ce point est détaillé dans la section Résultats A.2. Une représentation schématique du processus global est présentée **Figure 15** (exemple des sondes FISH *ALK* ou *ROS1*).

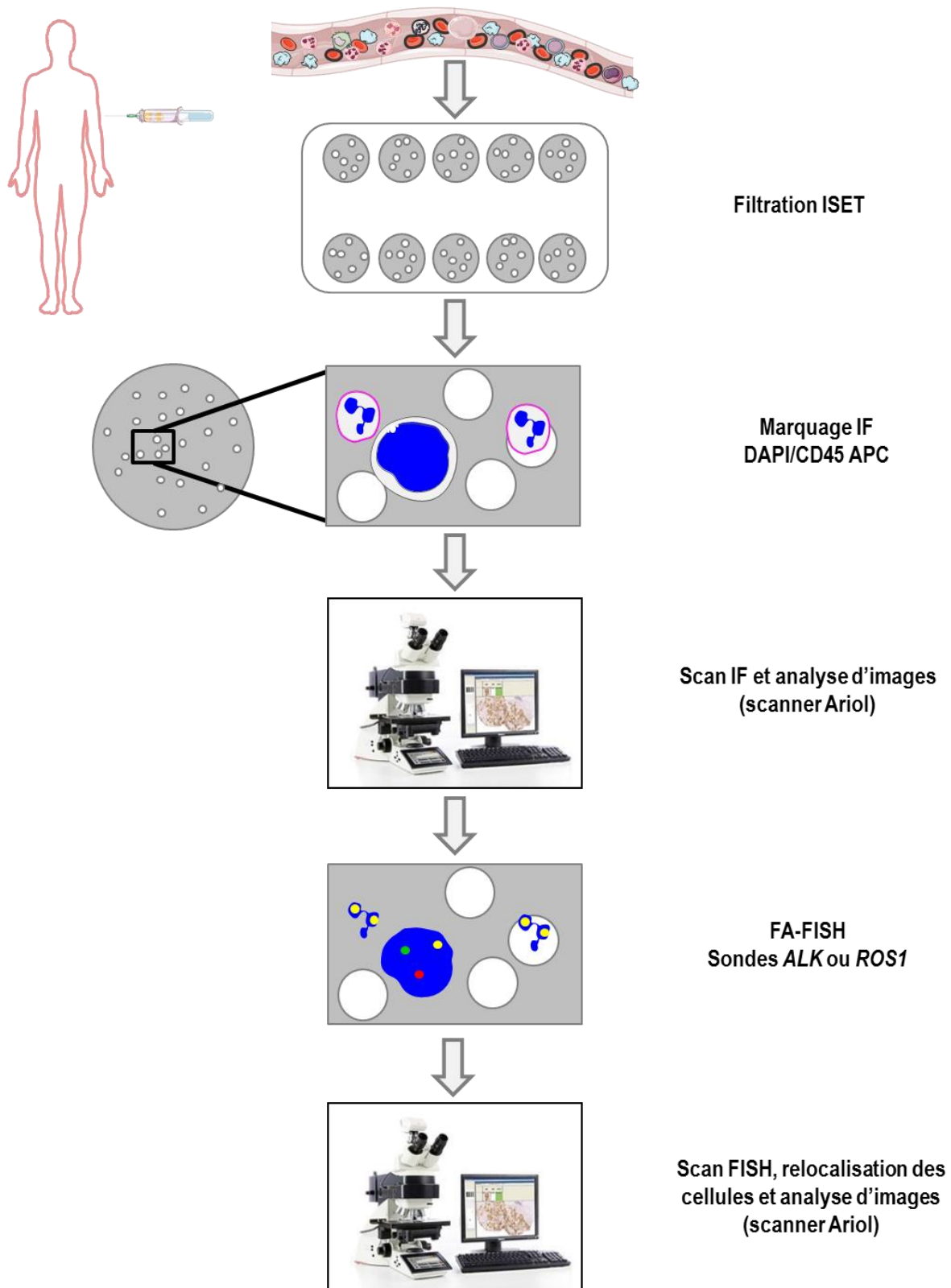


Figure 15 : Méthode établie pour la détection et la caractérisation phénotypique et moléculaire des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET.

## F. DÉTECTION, ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE CELLULES TUMORALES CIRCULANTES UNIQUES

Les mises au point des protocoles détaillés dans cette section ont été réalisées avec Vincent Faugeroux, doctorant dans l'équipe. Les détails des mises au point et optimisations ne seront pas retracés en globalité dans ce manuscrit.

### 1. Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET et isolement de cellules uniques par microdissection laser

#### a. *Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes*

Le protocole de marquage par immunofluorescence des cellules retenues sur le filtre a été adapté et optimisé afin d'être compatible avec les analyses moléculaires sur cellule unique en aval. Le filtre ISET est décongelé et un spot est découpé et immobilisé sur une lame de verre SuperFrost plus. Une encoche nette réalisée au scalpel est faite sur le spot du filtre afin de permettre la relocalisation des cellules lors de l'isolement des cellules par microdissection laser. Les cellules retenues sur le filtre sont perméabilisées avec une solution TBS 1X (*tris-buffered saline*) (Agilent Technologies, Dako, Glostrup, Danemark)-Triton 0,2 % (Roche, Sigma-Aldrich Co. LLC., Saint-Louis, MO, États-Unis) pendant 7 minutes à température ambiante. Suite au lavage avec une solution de TBS 1X, le mélange d'anticorps est déposé et incubé pendant 25 minutes à température ambiante. Les anticorps utilisés sont l'anti-CD45 APC (clone HI30, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, États-Unis), le cocktail de marqueurs épithéliaux comprenant l'anti-EPCAM (clone VU1D9, Novus Biological, Littleton, CO, États-Unis), l'anti-CK 8, 18, 19 (clone A45-B/B3, AS Diagnostik, Hueckeswagen, Germany) et l'anti-CK 7 (Dako) couplés en AF488 et le marqueur mésenchymateux N-Cadhérine (clone 32/NCadherin, BD Biosciences) couplé en AF546. Après des lavages avec une solution de TBS 1X-Tween 20 (Dako) 0,05 % et une solution de TBS 1X, le marquage nucléaire est réalisé avec une solution de Hoeschst 33342 (Sigma-Aldrich) à 0,3 µg/mL. Suite aux mêmes lavages, le spot du filtre est déposé sur une nouvelle lame de verre SuperFrost plus puis monté entre lame et lamelle avec le milieu de montage ibidi (Biovalley, Nanterre, France) pour le scan. Après avoir réalisé le scan, la lamelle et le milieu de montage sont délicatement retirés grâce à deux lavages successifs dans une solution de TBS 1X-Tween 20 (Dako) 0,05 % et une solution de TBS 1X.

**b. Scan et analyse d'image après marquage par immunofluorescence**

Comme détaillé dans la section Résultats A.2, la calibration microscopique, le scan du spot, la relocalisation des cellules ainsi que l'analyse d'images sont réalisés avec le scanner Ariol system. Les cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> sont ainsi sélectionnées et classées selon les catégories suivantes : épithéliales (E<sup>+</sup>/M<sup>-</sup>), hybrides (E<sup>+</sup>/M<sup>+</sup>), mésenchymateuses (E<sup>-</sup>/M<sup>+</sup>), sans marqueur mais avec un diamètre du noyau supérieur à 16  $\mu\text{m}$  (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> >2 pores), sans marqueur et avec un diamètre du noyau inférieur à 16  $\mu\text{m}$  (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> <2 pores), cluster (CTC  $\geq 4$ ), cluster mixte (nombre de cellules 4) et microcluster (nombre de cellules  $\geq 3$ ).

**c. Relocalisation des cellules tumorales circulantes et microdissection laser**

Les coordonnées cartésiennes x et y des CTC sélectionnées sont transférées sur le microdissecteur laser LMD 6500 (Leica Biosystems Richmond Inc.) via le logiciel Alter que nous avons développé pendant la seconde année de mon Doctorat en collaboration avec l'équipe recherche & développement (R&D) de Leica Biosystems. Le LMD se caractérise par un microscope droit Leica DM6000B couplé à un faisceau laser dans l'ultraviolet commandé par un logiciel propre au système. Les cellules sélectionnées peuvent être visualisées en lumière visible mais également en fluorescence à des grossissements allant de 5X à 63X. La microdissection est réalisée avec l'objectif 20X grâce au laser ultraviolet qui, en se déplaçant, permet la découpe avec précision de la zone définie. La zone découpée est récupérée par gravité dans le capuchon d'un tube Opticaps 0,2  $\mu\text{L}$  (Leica Biosystems Richmond Inc.). La présence du microdissécat dans le capuchon est vérifiée grâce à l'objectif 5X. Les tubes contenant les CTC uniques dans le capuchon sont conservés à -80°C. Une représentation schématique du processus globale est présentée **Figure 16**.

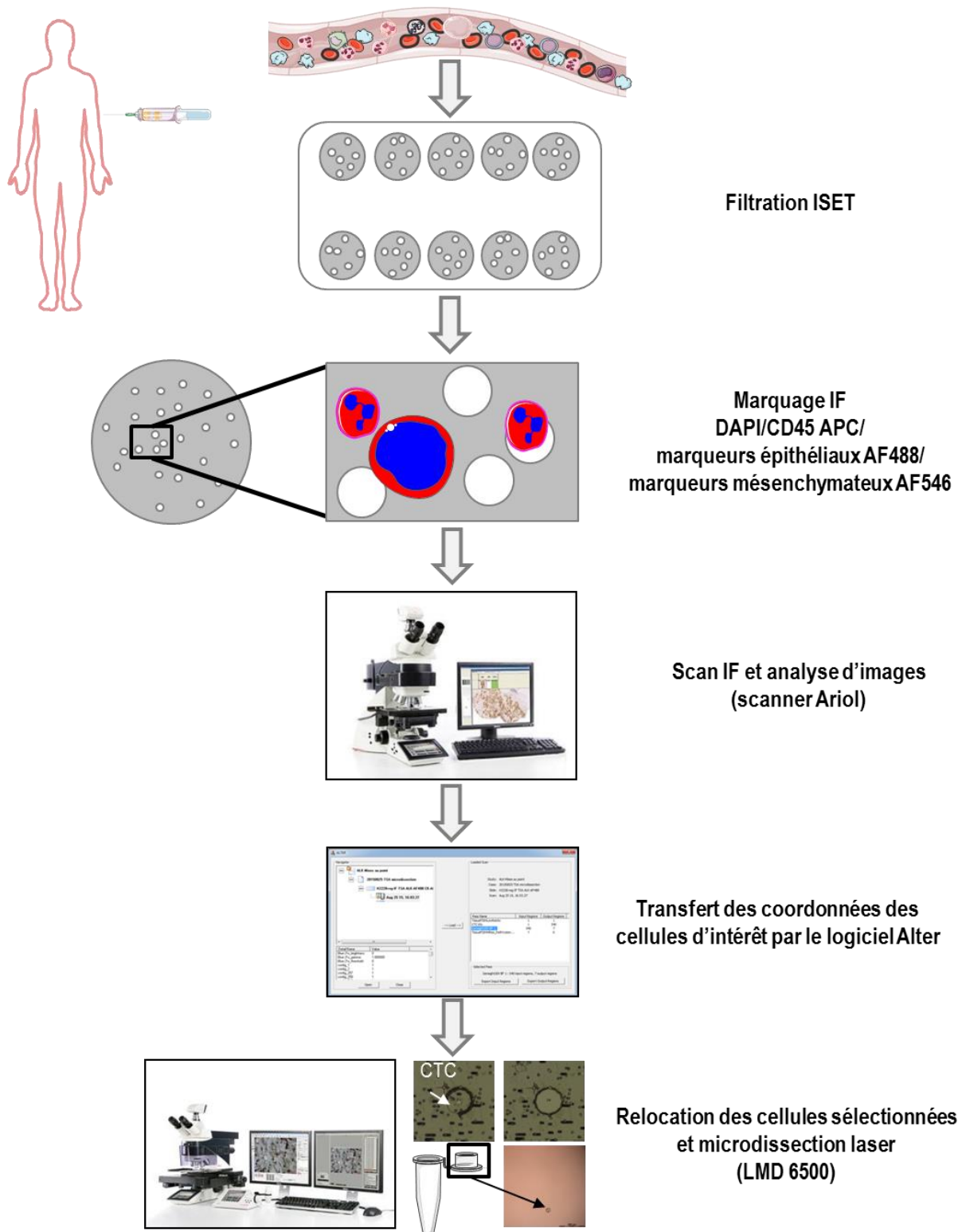


Figure 16 : Méthode établie pour la détection, la caractérisation phénotypique et l'isolement par microdissection laser des CTC enrichies par filtration ISET.

## 2. Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par RosetteSep et isolement de cellules uniques par tri cellulaire

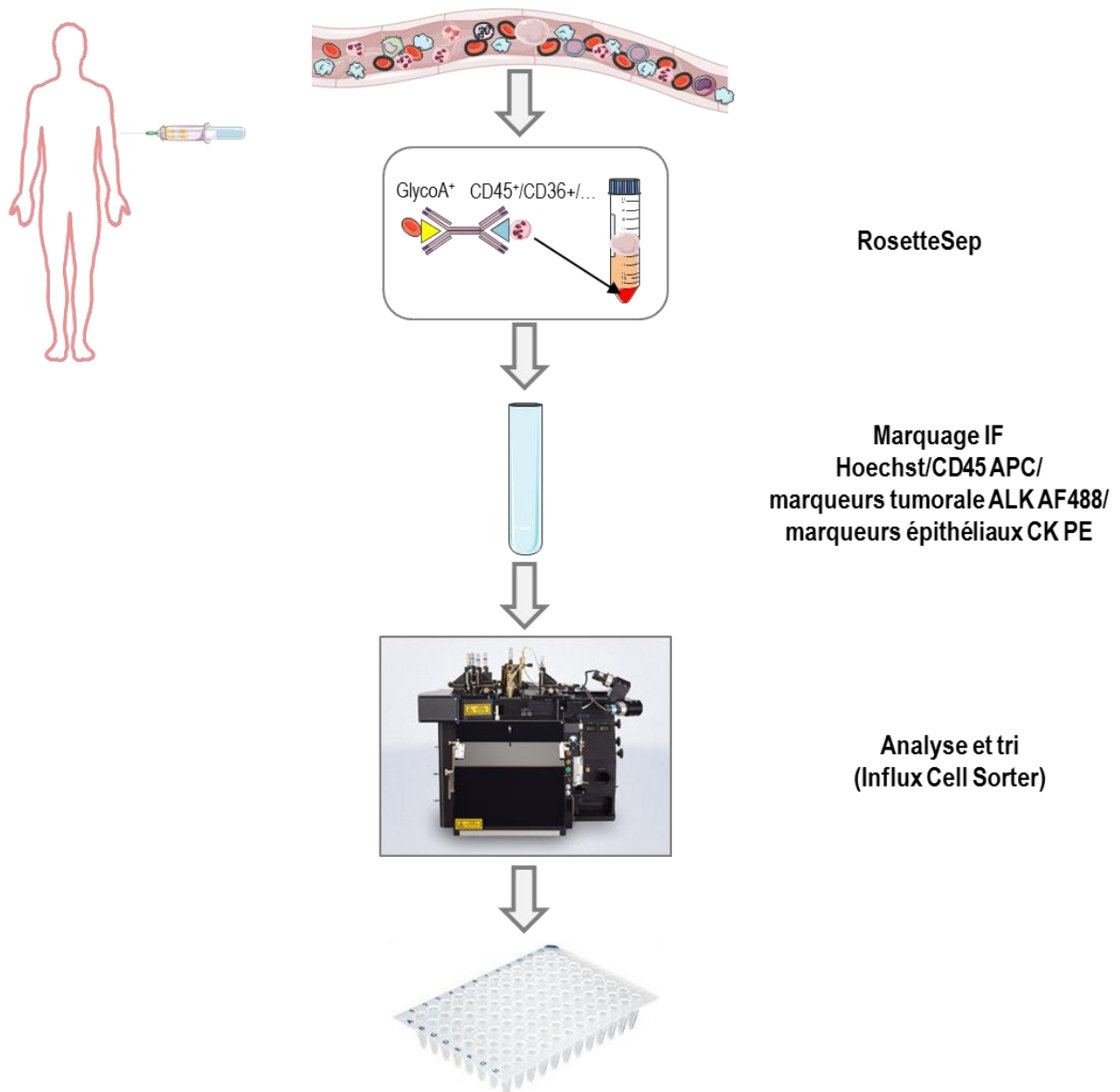
### a. *Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes*

Après l'enrichissement par RosetteSep et un lavage avec du PBS 1X (*phosphate buffered saline*) suivis d'une centrifugation de 5 minutes à 1600 rpm, le culot de cellules correspondant à la fraction enrichie est transféré dans un tube FACS (BD Biosciences). Le kit Fix&Perm (ThermoFisher) est utilisé afin de faciliter l'accès des anticorps aux structures intracellulaires et de fixer les cellules. Le fixateur est ajouté et immédiatement retiré grâce à un lavage avec du PBS 1X suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 1300 rpm. Pour le marquage, les anticorps utilisés sont l'anti-ALK (clone D5F3, Cell Signaling, Danvers, MA, États-Unis) et le cocktail anti-CD45 APC et anti-CK 8, 18, 19 PE du CellSearch. L'anticorps primaire anti-ALK est incubé 20 minutes à température ambiante avec le perméabilisant. Après un lavage avec du PBS 1X suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 1300 rpm, l'anticorps secondaire AF488 chèvre anti-lapin (ThermoFisher) ainsi que les anticorps anti-CD45 et anti-CK déjà couplés sont incubés 20 minutes à température ambiante. Après un dernier lavage avec du PBS 1X suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 1300 rpm, les échantillons décantés à ~300 µL sont conservés à +4°C pour une analyse le jour même ou le lendemain matin.

### b. *Isolement des cellules tumorales circulantes par tri cellulaire*

Le tri cellulaire est réalisé avec l'ingénieur Philippe Rameau sur la plateforme d'imagerie et cytométrie (PFIC) de Gustave Roussy dirigée par le Docteur Corinne Laplace-Builhé. La stratégie de marquage permet d'identifier les CTC avec un immunophénotype Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/ALK<sup>+</sup>/CK<sup>-</sup>, Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/ALK<sup>+</sup>/CK<sup>+</sup> et Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/ALK<sup>-</sup>/CK<sup>+</sup>. Le tri cellulaire est réalisé sur un système Influx (BD Biosciences) équipé de lasers 405, 488, 561 et 640. Une buse de 100 µm est utilisée et le système fonctionne avec une pression de 20 psi (*pound-force per square inch*). Les cellules sont triées en mode « enrichissement » avec une enveloppe de tri de deux gouttelettes. Les cellules triées sont récupérées dans une plaque PCR 96 puits (Starlab, Orsay, France), chaque puits contenant 5 µL de PBS 1X. Une représentation schématique du processus est présentée **Figure 17**. La stratégie de sélection des cellules est présentée en **Figure 18**.





**Figure 17 : Méthode établie pour la détection, la caractérisation phénotypique et l'isolement par tri cellulaire des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET.**

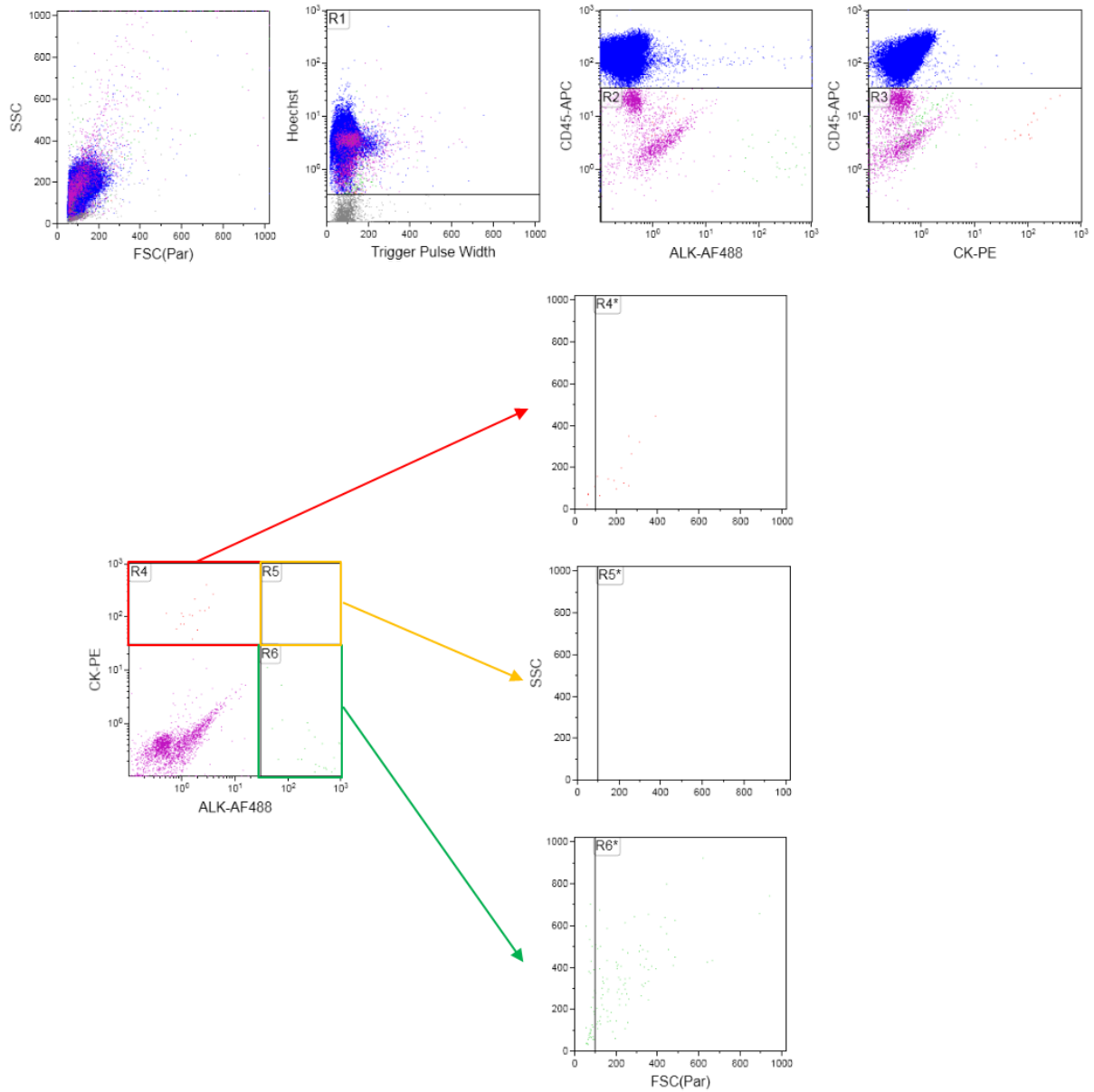


Figure 18 : Stratégie de détection des cellules tumorales circulantes (Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>/CK<sup>+</sup>) lors du tri cellulaire.

### 3. Détection de cellules tumorales circulantes épithéliales par CellSearch et isolement en cellules uniques par le *puncher*

Lors de l'enrichissement des CTC avec la technologie CellSearch, les CTC sont capturées par des billes magnétiques et l'échantillon final (375  $\mu$ L) est transféré au sein de l'autoprep dans une cartouche appelé *magnet* afin de permettre l'énumération des cellules. Suite à l'analyse des CTC au sein de l'analyseur, le *magnet* est immédiatement retiré de l'aimant. Le liquide contenant les cellules est délicatement retiré et deux lavages successifs sont réalisés avec du PBS 1X. Une méthode alternative consiste à retirer le liquide du *magnet* et à le remplacer par une solution PBS 1X-glycérol 50 % EDTA 20 mM ; le *magnet* est ensuite conservé à -20°C afin de retirer les cellules ultérieurement. Par chélation des cations bivalents, l'EDTA peut ainsi permettre une meilleure récupération des cellules « collées » aux parois du *magnet*. La suspension cellulaire est ensuite filtrée grâce au système de filtre contenant des micro-puits (*microwells*) développé par VyCAP. Les filtres permettent de retenir une seule cellule par micro-puits. Ils sont en silicium et chaque micro-puits a un diamètre 5 à 10 fois supérieur au diamètre d'une cellule. Suite à la filtration, le filtre contenant les cellules est scanné à l'aide d'un microscope inversé Nikon TE 2000. Les CTC DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CK<sup>+</sup>/Vim<sup>+/-</sup> sont sélectionnées grâce au logiciel VyCAP punch program 2.4 développé par VyCAP. Grâce à la platine motorisée, les CTC sont ensuite *punchées* c'est-à-dire qu'une aiguille perfore précisément le micro-puits dans lequel est retenue la CTC sélectionnée. La cellule est récupérée dans le capuchon d'un tube PCR 0,2  $\mu$ L contenant 30  $\mu$ L d'éthanol. Le tube est ensuite vortexé et centrifugé 10 secondes à 14000 rpm. Afin d'évaporer l'éthanol, le tube est centrifugé 1 heure à 2200 rpm, capuchon ouvert. Les tubes contenant les CTC uniques sont conservés à -20°C. Une représentation schématique du processus est présentée **Figure 19**.

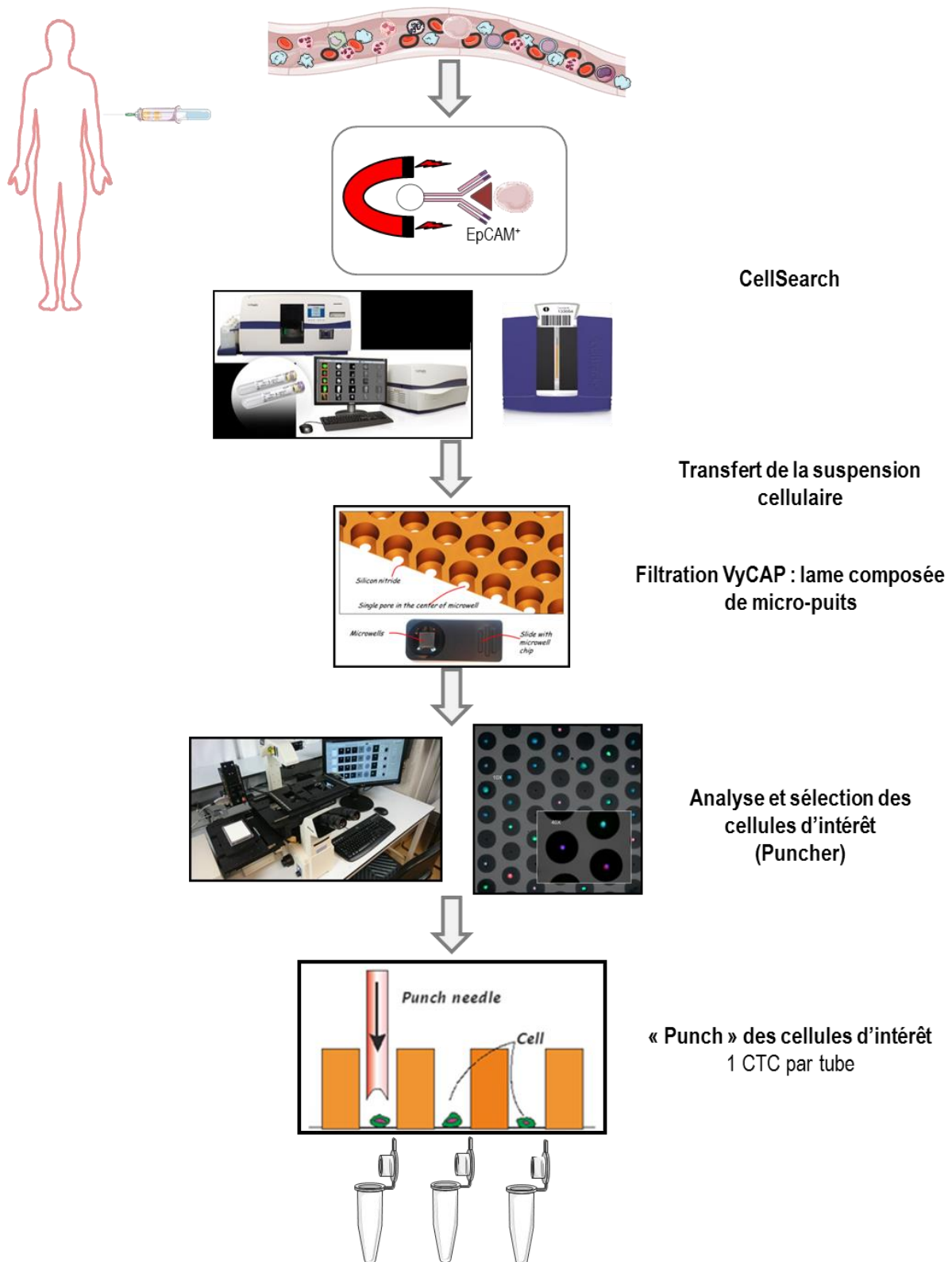
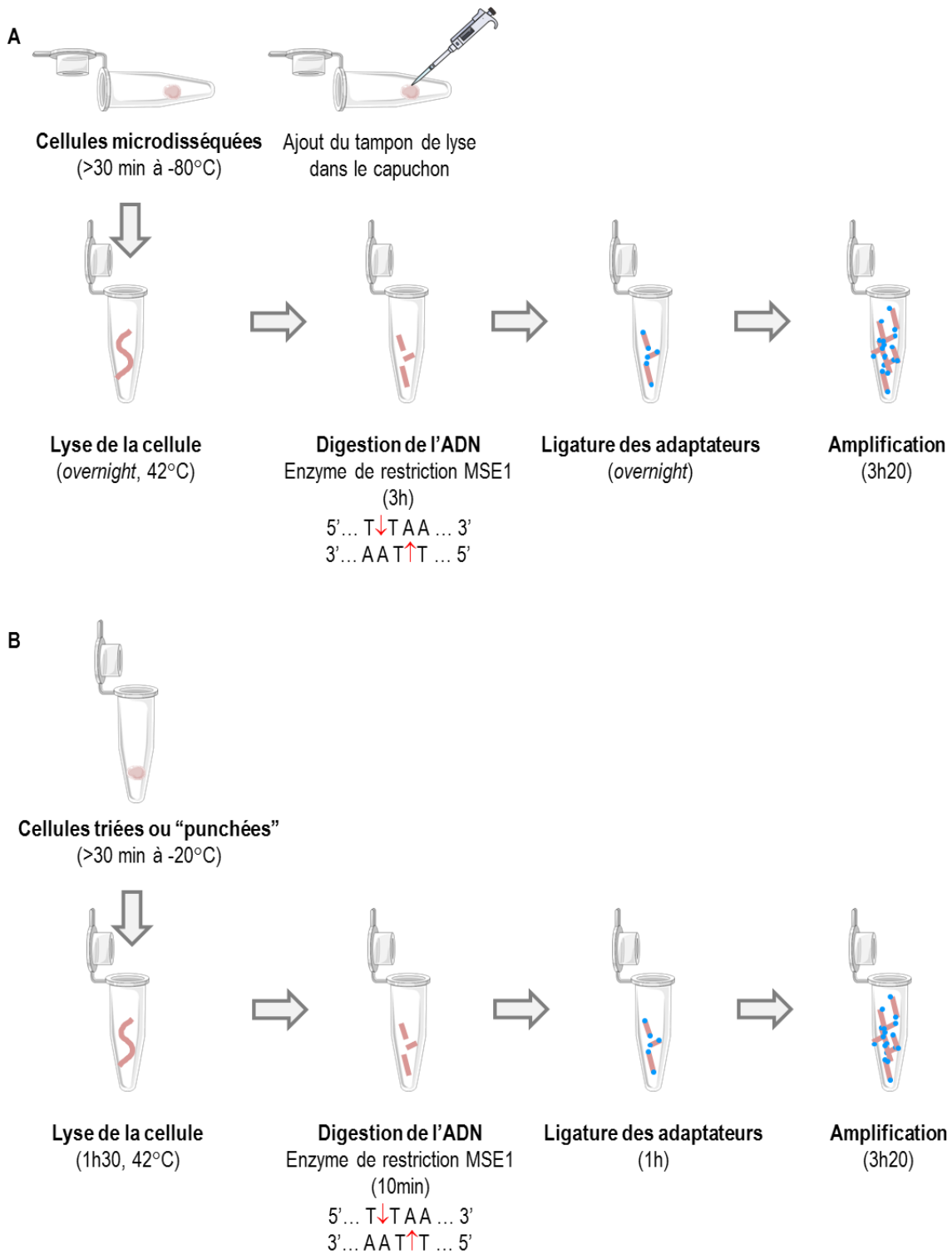


Figure 19 : Méthode établie pour la détection, la caractérisation phénotypique et l'isolement par le *puncher* des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET.

## G. ANALYSE MOLÉCULAIRE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES ISOLÉES

### 1. Amplification totale du génome

Plusieurs systèmes d'amplification totale du génome WGA ont été évalués au sein du groupe, notamment par Vincent Faugeroux (doctorant) et Rachel Young (post-doctorante) en collaboration avec Charles Marcaillou, biologiste moléculaire chez Integragen. La méthode choisie a été le kit Ampli1 WGA (Silicon Biosystems) dont le protocole a été décrit en 1999 par Klein *et al.* sous le terme de SCOMP (*single cell comparative genomic hybridization*) [Klein *et al.*, 1999]. La méthode est basée sur une approche de LM-PCR (*ligation mediated-PCR*). Le design des amorces ainsi que la fragmentation du génome ne sont pas réalisés au hasard contrairement aux autres approches de WGA. La Taq polymérase est hautement fidèle avec un taux d'erreur estimé inférieur à  $4,8 \times 10^{-6}$ . Le protocole est détaillé dans les méthodes publiées par Czyz and Klein [Czyz *et al.*, 2015]. Brièvement, le tampon de lyse contenant la protéinase K est ajouté sur la CTC unique (ou le *pool* de CTC uniques) présente dans un tube PCR 0,2  $\mu$ L. Dans le cas des cellules microdisséquées, le tampon de lyse est ajouté sous l'objectif 5X du microscope, précisément sur les microdissécats présents dans le capuchon du tube. La lyse est réalisée à 42°C pendant un temps défini selon la technique d'isolement des CTC ; pour les cellules triées, la lyse est de 45 minutes tandis que pour des cellules microdisséquées elle a une durée de 15 heures compte tenu de la barrière du filtre. La protéinase K est inactivée pendant 30 minutes à 65°C puis 15 minutes à 80°C. La digestion avec l'endonucléase MSE1 qui coupe spécifiquement au niveau des sites de restriction T↓TAA est réalisée à 37°C puis l'enzyme est inactivée 5 minutes à 65°C. Cette étape permet d'obtenir des fragments d'ADN compris entre 100 et 1500 paires de bases (pb). Les adaptateurs préparés sont ensuite ligaturés au niveau des sites de restriction des fragments d'ADN lors d'une incubation à 15°C. La dernière étape correspond à l'amplification des fragments d'ADN. Une représentation schématique du processus est présentée **Figure 20**. À noter qu'une réamplification du produit de WGA est possible à partir de 1  $\mu$ L de WGA initial. Cette étape facultative est réalisée avec le kit Ampli1 ReAmp/ds (Silicon Biosystems) en suivant les instructions du fournisseur.



**Figure 20 : Étapes pour l'amplification totale du génome de type LM-PCR.**

## 2. Contrôles de qualité

Afin de contrôler la qualité des WGA, deux contrôles qualité (QC) ont été validés et utilisés. Ils correspondent à des PCR multiplexes ciblant différentes régions du génome. Le premier correspond au contrôle qualité (QC1) utilisé par le groupe de Nicolas Stoecklein [Mohlendick *et al.*, 2013]. Les caractéristiques des amplicons sont présentées dans le **Tableau 3**. Un WGA de qualité correcte correspond à un QC1  $\geq 3/5$  (l'amplicon correspondant au gène CADPS n'est pas pris en compte).

Gène	Localisation génomique	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille du produit de PCR (pb)
<i>DNAH9</i>	17p	gggtctcatcaccagcattt	gccatctccacatggtctt	401
<i>PICK1</i>	22q	tcgtatgctggagtcctgtg	gggatggctttgtgaggta	358
<i>NEK9</i>	14q	gcaggagggaacctgtatga	caggaaagaaagcccacaga	288
<i>GRIK5</i>	19q	ctagctcccaccaacctcag	ctcgatgatcccggtgatct	222
<i>CADPS</i>	3p	cccacccttcttactaca	ttctaacagggtgggggatg	175*
<i>LAMC1</i>	1q	tctgcttgggcattctct	ttctaacagggtgggggatg	111

**Tableau 3. Liste des gènes de la PCR multiplexe pour les contrôles de qualité (QC1).**

\*Cet amplicon comprend un site MSE1 ; une bande correspondant à cet amplicon n'est visible que dans les cas de digestion partielle de l'ADN.

Le deuxième contrôle qualité (QC2) a été testé plus récemment. Il correspond au contrôle qualité développé par le groupe de Christopher Klein et actuellement commercialisé par Silicon Biosystems dans le kit Ampli1 QC [Polzer *et al.*, 2014]. Les caractéristiques des amplicons sont présentées dans le **Tableau 4**. Ce contrôle qualité permet de définir un index d'intégrité du génome (GII, *genome integrity index*) : GII = 0, aucune amplification, GII = 1, une bande correspondant à l'amplicon *KRAS*, GII = 2, une bande correspondant aux amplicons CK19, TP53 ou D5S2117, GII=3, deux bandes correspondant aux amplicons CK19, TP53 ou D5S2117 et GII=4, trois bandes correspondant aux amplicons CK19, TP53 et D5S2117. L'amplicon ciblant *KRAS* a été spécifiquement sélectionné dans une région cible du génome correspondant à un petit fragment d'ADN obtenu après digestion enzymatique par MSE1 ; cet amplicon permet de mettre en évidence un ADN endommagé ou dégradé. *A contrario*, les amplicons ciblant les gènes CK19, TP53 et D5S2117 ont été spécifiquement sélectionnés dans les régions cibles du génome correspondant à des grands fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique par MSE1. Ces régions sont plus complexes à amplifier. Un WGA avec un QC2  $\geq 3/4$  est considéré comme de bonne qualité.

Gène	Localisation génomique	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille du produit de PCR (pb)
CK19	6p	gaagatccgcgactggtac	ttcatgtctagccgtgactg	614
TP53	17q	gaagtgtctcatgtctggatc	cagcccaacccttgcctta	301
D5S2117	5q	ccaggtgagaacctagtcag	actgtgtcctccaacctatgg	147
KRAS	12p	ataaggcctctgaaaatgac	ctgaattagctgtatcgcaagg	91

**Tableau 4. Liste des gènes de la PCR multiplexe pour les contrôles de qualité (QC2).**

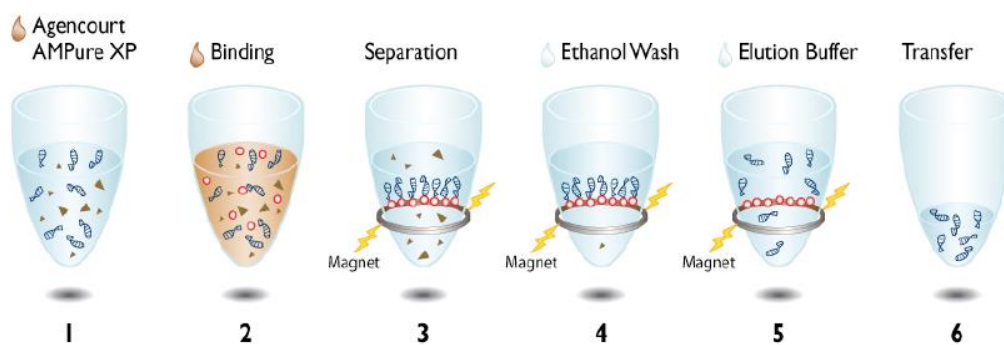
Les deux PCR multiplexes sont réalisées avec le Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher). Les échantillons sont migrés sur un gel d'agarose 2 %.

### 3. Conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin

Cette étape permet de convertir l'ADN simple brin encore présent à la fin du WGA en ADN double brin afin d'augmenter la quantité d'ADN double brin disponible. Cette conversion est réalisée avec le kit Ampli1 ReAmp/ds (Silicon Biosystems) en suivant les instructions du fournisseur. Cette étape a été réalisée pour les échantillons engagés pour l'analyse ciblée de type Ion AmpliSeq.

### 4. Purification des échantillons de WGA

Les échantillons de WGA sont purifiés avec les billes Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter France S.A.S, Roissy CDG, France) qui permettent la purification de fragments d'ADN supérieurs à 100 pb. Cette technique repose sur le principe d'immobilisation réversible de l'ADN sur phase solide (SPRI, *solid-phase reversible immobilization*) et permet l'élimination des dNTP (désoxyribonucléotides), des amorces, des dimères d'amorces, des sels et autres réactifs contaminants (**Figure 21**). La purification est réalisée en plaque 96 puits en suivant les instructions du fournisseur. L'éluion est réalisée dans 27,5 µL d'H<sub>2</sub>O sans nucléase.



**Figure 21 : Purification des échantillons de WGA par la technique d'immobilisation réversible de l'ADN sur phase solide.**



## 5. Dosage des échantillons de WGA

Le dosage des échantillons de WGA purifiés est réalisé avec le kit Qubit dsDNA HS Assay et l'appareil Qubit Fluorometer 2.0 (ThermoFisher). Cette technologie permet de mesurer la concentration d'un échantillon grâce à des sondes fluorophores contenant des *dyes* qui ne fluorescent que liées à l'ADN. Cette spécificité permet une quantification précise des acides nucléiques et non des contaminants. Le protocole utilisé est celui proposé par le fournisseur. Une solution contenant 199  $\mu\text{L}$  de tampon et 1  $\mu\text{L}$  de WGA est préparée puis, après 2 minutes d'incubation, le tube est placé dans la cavité prévue de l'appareil. La mesure est réalisée instantanément.

## 6. Approches de PCR multiplexes ciblées et séquençage à haut débit de nouvelle génération

### a. *Technologie Access Array*

Cette approche a été menée avec Integrigen. Les PCR à séquencer sont réalisées avec le dispositif Access Array (Fluidigm, San Francisco, CA, États-Unis). Ce système permet de combiner 48 PCR pour 48 échantillons soient une réalisation de 2304 PCR indépendantes au total sur le même dispositif. En final, les produits de PCR de chaque échantillon constituant les différentes librairies sont séquencés sur un séquenceur Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, États-Unis). Dans le cadre de mon projet de Doctorat, les mutations de résistance aux TKI ALK et les mutations cancer les plus décrites dans les CBNPC sont ciblées (**Tableau 5**) ; un total de 42 couples d'amorces de PCR couvrant 48 mutations a été dessiné avec le pipeline interne d'Integrigen basé sur l'outil Primer3. Du fait du WGA LM-PCR Ampli1 utilisé, les amorces ainsi que les amplicons ne contiennent aucun site de restriction MSE1.

Gène	Mutation	Gène	Mutation
<i>AKT1</i>	E17K	<i>KRAS</i>	G12X
<i>ALK</i>	T1151X		G13X
	L1152X		Q61X
	C1156Y	<i>MEK1 (MAP2K1)</i>	Q56P
	I1171X		K57N
	F1174X		D67N
	L1196M		P124
	G1202R	<i>NRAS</i>	G12X
	D1203N		Q61X
	S1206Y	<i>PIK3CA</i>	E542K
	G1269A		E545X
<i>BRAF</i>	G466V		H1047X
	G469A	<i>PTEN</i>	R233*
	Y472C	<i>ROS1</i>	G2032R
	D594G	<i>TP53</i>	V157X
	L597V		R175X
	V600E		R213*
<i>EGFR</i>	G719		Y220X
	S768I		G245X
	T790M		R248X
	L858R		R249X
	L861Q		R273X
	del exon 19		R282X
	ins exon 19		
<i>HER2</i>	ins exon 20		

**Tableau 5. Liste des mutations ciblées avec l'approche Access Array.**

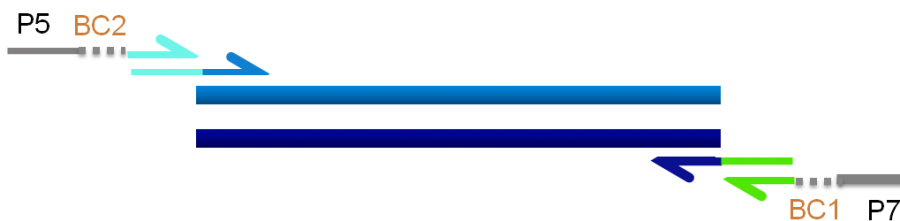
Les WGA purifiés et quantifiés sont normalisés à 25 ng/μL de manière à engager précisément 100 ng. Brièvement, le protocole de préparation des bibliothèques suit la description du guide utilisateur avec quelques adaptations réalisées par Integragen. Lors de la première PCR, un tag universel présent en 5' de chaque couple d'amorce (Tag Rd1 sur l'amorce sens et Rd2 sur l'amorce anti-sens) est ajouté à l'extrémité de chaque amplicon (**Figure 22**). Suite au thermocyclage PCR de l'Access Array réalisé sur le système BioMark, l'Access Array est transféré sur le post-PCR IFC Controller AX permettant de récupérer les 42 PCR pour chaque échantillon. Les *pools* sont ensuite purifiés (Matériel & Méthode F.4) puis vont subir une deuxième PCR en microplaque. Ce sont les séquences universelles ajoutées lors de la PCR 1 qui vont permettre, lors de la PCR 2 avec les paires adéquates d'amorces universelles, l'ajout des index permettant de différencier chaque échantillon, et les adaptateurs complets P5 et P7 pour le séquençage sur la plateforme MiSeq (**Figure 22**). Toutes les PCR sont contrôlées sur le Fragment Analyzer (AATI) qui permet une électrophorèse capillaire utilisant une détection par fluorescence des acides nucléiques. Les PCR sont quantifiées pour effectuer un *pool* équimolaire des échantillons à

séquencer. Le *pool* est ensuite purifié (Matériel & Méthode F.4) et est de nouveau déposé sur le Fragment Analyzer de manière à vérifier le profil en comparant à la répartition théorique ainsi que l'élimination d'éventuelles constructions vides à environ 150 pb. Le *pool* validé est finalement quantifié précisément par qPCR en utilisant les amorces P5 et P7 afin d'engager la quantité adéquate pour le séquençage sur MiSeq. Le séquençage MiSeq des deux extrémités de chaque fragment PCR et des deux index est réalisé en lecture 2x150 b avec un kit V1 de 300 cycles selon les recommandations d'Illumina.

■ **PCR1 sur Access Array : locus spécifique et tags universels Rd1 et Rd2**



■ **PCR2 en tubes: ajout des adaptateurs Illumina P5 & P7 + 2 barcodes échantillon**



**Figure 22. Principe des PCR réalisées pour la technologie Access Array.**

**b. Technologie Ion AmpliSeq**

Cette approche est réalisée en collaboration avec la plateforme de recherche transitionnelle BMO (Biopathologie Moléculaire) de Gustave Roussy dirigée par le Docteur Ludovic Lacroix. L'approche choisie correspond à des PCR multiplexes ciblant un panel de mutations cancer suivies d'un séquençage à haut débit avec le PGM (*personal genome machine*) Ion Torrent (ThermoFisher). Les mises au point ne sont pas détaillées.

Trois grandes étapes sont nécessaires et sont réalisées suivant les instructions du fabricant. La première correspond à la préparation des bibliothèques qui comprend notamment les PCR AmpliSeq (**Figure 23**). Les PCR multiplexes sont réalisées à l'aide de deux panels. Le premier correspond au panel Ampli1 CHPCustom Beta développé par Silicon Biosystems ciblant 48 gènes et 1267 mutations (**Tableau 6**). Le second correspond à un panel NSCLC-ALK/EGFR développé au sein du laboratoire ciblant spécifiquement les mutations de résistance aux TKI ALK et EGFR (**Tableau 7**). Suite aux PCR, les échantillons sont fragmentés enzymatiquement puis une digestion partielle des amorces est réalisée

avec la FuPa. Les adaptateurs liés à des codes-barres sont ligaturés. La deuxième étape correspond à la préparation de la matrice de séquençage qui permet l'amplification clonale grâce à la PCR en émulsion avec le OneTouch 2 suivie par l'enrichissement en *Ion sphere particles* à la surface desquelles un fragment de librairie est amplifié grâce à un système de capture sur billes liées à la streptavidine. La matrice de séquençage couplée aux amorces de séquençage et à la polymérase est chargée sur une puce Ion Torrent (puce 314, 316 ou 318 selon le nombre d'échantillons). Ce type de séquenceur combine la micro-fluidique et une technologie semi-conductrice qui permet de transformer directement l'information génétique en information numérique. À chaque polymérisation de nucléotides non modifiés, la libération d'ions  $H^+$  entraîne une variation de pH, elle-même détectée au niveau de la couche mince (technologie des semi-conducteurs) située au fond de chaque puits. L'ensemble des données brutes générées est transcrit sous forme d'ionogrammes.

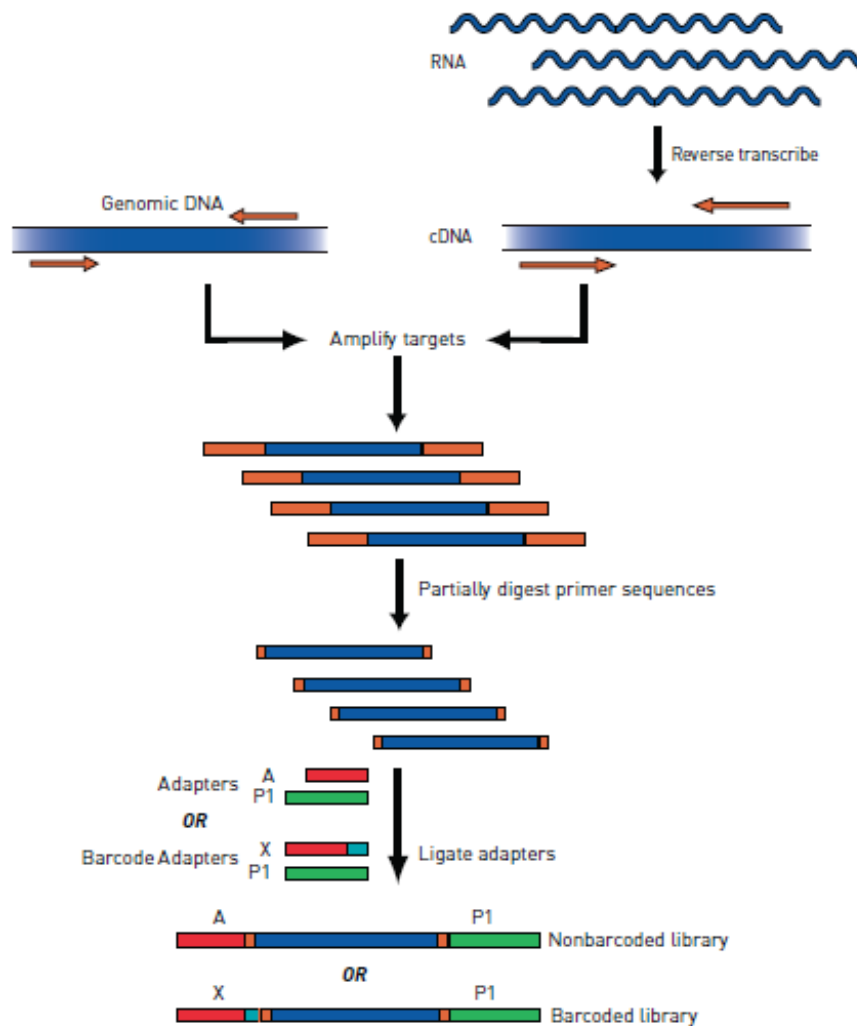


Figure 23. Préparation des librairies pour le séquençage à haut débit de nouvelle génération avec le PGM Ion Torrent.

Gènes			
<i>ABL1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>IDH2</i>	<i>PIK3CA</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB4</i>	<i>JAK3</i>	<i>PTEN</i>
<i>ALK</i>	<i>EZH2</i>	<i>KDR</i>	<i>PTPN11</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>KIT</i>	<i>RB1</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR1</i>	<i>KRAS</i>	<i>RET</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>SMAD4</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>MET</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>MLH1</i>	<i>SMO</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNA11</i>	<i>MPL</i>	<i>SRC</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>GNAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>STK11</i>
<i>DDR2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>NRAS</i>	<i>TP53</i>
<i>EGFR</i>	<i>IDH1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>VHL</i>

**Tableau 6. Listes des gènes ciblés par le panel Ampli1 CHPCustom Beta développé par Silicon Biosystems.**

Chromosome	Gène	Exon	Mutations	Chromosome	Gène	Exon	Mutations
chr2	<i>ALK</i>	22	1151Tins	chr7	<i>EGFR</i>	18	V689M
		22	L1152R/P			18	E709X/Q
		22	C1156Y			18	G719C/S/A
		22	I1171T			18	S720P
		23	F1174C/L/V			19	D761Y
		23	L1196M			20	V765A
		23	L1198F			20	S768I
		23	G1202R			20	V769L
		23	D1203N			20	N771T
		23	S1206Y			20	T783A
		25	G1269A			20	T790M
						20	C797S
						21	N826S
						21	A839T
						21	K846R
						21	L858R
						21	L861Q
						21	G863D

**Tableau 7. Listes des gènes et des mutations ciblés par le panel NSCLC-ALK/EGFR développé au sein du laboratoire.**

## 7. Approche de séquençage de l'exome

Le projet de séquençage de l'exome de CTC chez des patients *ALK* remanié résistants au crizotinib a été sélectionné pour être financé par la taxe d'apprentissage 2015. Cette approche est réalisée en collaboration avec la plateforme de génomique de Gustave Roussy dirigée par le

Docteur Nathalie Droin. Suite aux WGA, les fragments d'ADN obtenus présentent à leurs extrémités les adaptateurs nécessaires à la LM-PCR. Pour une meilleure préparation des bibliothèques des WES et faciliter l'analyse bioinformatique, nous avons choisi de digérer avec l'enzyme MSE1 ces adaptateurs. 100 à 200 ng de WGA digérés, de biopsie tumorale ou d'ADN constitutionnel extrait à partir du sang total sont fragmentés avec le système Covaris S2 (LGC, Teddington, Angleterre) pendant 5 minutes 30 afin d'obtenir des fragments de 150 pb (**Figure 24**). Les extrémités des fragments sont réparées, prolongées avec un A en 3' et des adaptateurs sont liés avec le robot Bravo (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, États-Unis) puis amplifiées par PCR pendant six cycles. Les bibliothèques contenant les adaptateurs sont hybridées pendant 24 heures avec des ARN biotinylés complémentaires de tous les exons humains puis enrichies avec des billes magnétiques streptavidine (kit SureSelect Human All Exon V5, Agilent). Les bibliothèques finales sont indexées puis séquencées sur le séquenceur HiSeq-2000 de chez Illumina.

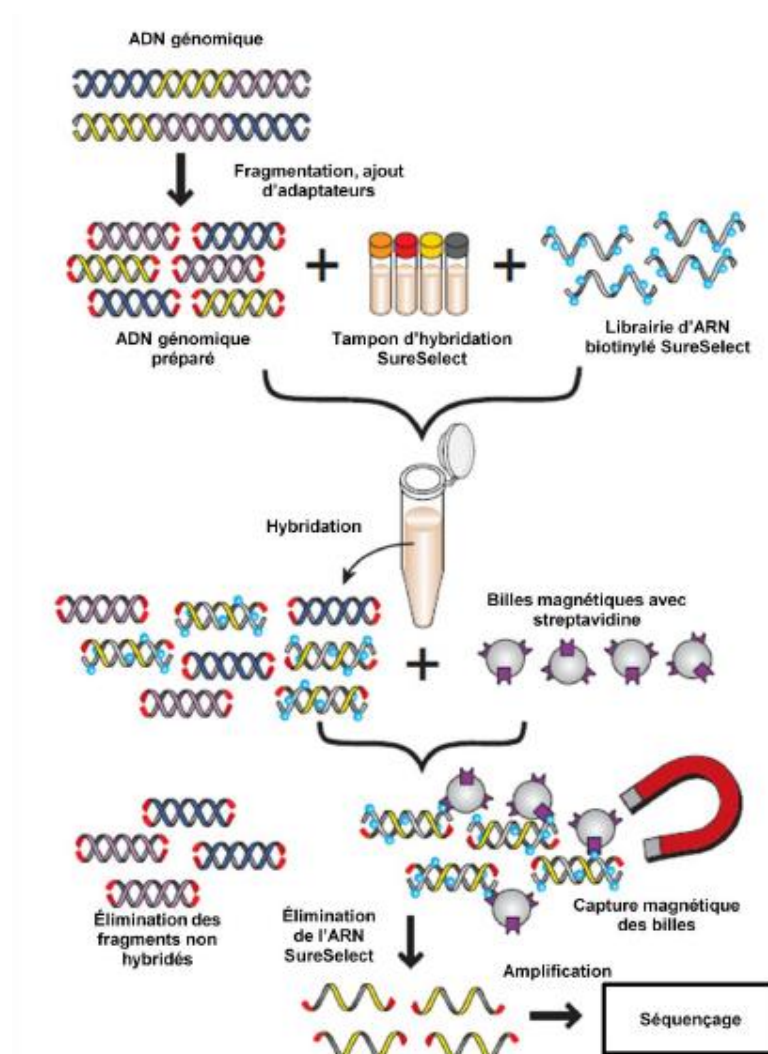


Figure 24. Technique d'enrichissement pour le séquençage d'exomes avec l'approche Agilent SureSelect.

## 8. Analyses bio-informatiques

### a. *Approches de PCR multiplexes ciblées et séquençage haut débit de nouvelle génération*

Les analyses bio-informatiques des échantillons ont été réalisées par Céline Lefebvre, bio-informaticienne au sein de l'unité INSERM 981. Suite aux séquençages, les fichiers de données brutes au format Fastq sont générés pour chaque échantillon engagé. En utilisant le logiciel BWA mem, les séquences brutes sont alignées sur le génome de référence humain GRCh37/hg19. Un fichier BAM est généré par échantillon. La qualité des séquences alignées est évaluée avec l'outil Picard du *Broad Institute*. Le logiciel GATK HaplotypeCaller est ensuite utilisé pour mettre en évidence respectivement les substitutions et les petites insertions/délétions. Les filtres d'analyse (fréquence allélique > 0.1 et couverture minimale = 50) sont appliqués pour l'analyse des variants dans la tumeur et les CTC. Les variants sont annotés avec les algorithmes snpEff et snpSift et ne sont considérés que dans les régions exoniques. Les variants annotés comme polymorphismes (*minor allele frequency*, MAF >0.001) sont retirés sauf s'ils sont rapportés dans la base de données COSMIC (*catalogue for somatic mutations in cancer*).

### b. *Approche de séquençage de l'exome*

Les analyses bio-informatiques des échantillons ont été réalisées par Marc Deloger, bio-informaticien sur la plateforme de bio-informatique de Gustave Roussy dirigée par le Professeur Daniel Gautheret. La méthode d'analyse des données de WES de CTC uniques a été établie par Céline Lefebvre dans le cadre d'un projet de WES de CTC de patients atteints de cancer métastatique de la prostate mené par Vincent Faugeroux au sein du laboratoire.

Suite aux séquençages, les fichiers de données brutes au format Fastq sont générés pour chaque échantillon engagé. À l'aide du logiciel cutadapt 1.7.1, les adaptateurs universels du WGA restent malgré la digestion enzymatique sont retirés (étape de *trimming*). En utilisant le logiciel BWA mem, les séquences brutes sont alignées sur le génome de référence humain GRCh37/hg19. Un fichier BAM est généré par échantillon. Les réalignements autour des insertions/délétions sont réalisés avec le logiciel GATK. Les qualités des séquences brutes et alignées sont évaluées respectivement avec les outils FastQC et Picard. L'identification des variants est réalisée avec le logiciel GATK HaplotypeCaller en comparaison avec le génome de référence humain GRCh37/hg19. La distorsion allélique après WGA est mise en évidence grâce à la comparaison des échantillons CTC (qui ont subi le WGA) avec les variants hétérozygotes de référence détectés dans l'échantillon contrôle (ADN constitutionnel du patient extrait à partir de sang total). La distorsion allélique correspond au pourcentage de variants hétérozygotes identifiés dans l'échantillon contrôle qui sont retrouvés homozygotes dans l'échantillon

CTC. Afin d'identifier les mutations somatiques, les logiciels Mutect et IndelGenotyper sont utilisés pour mettre respectivement en évidence les substitutions et les petites insertions/délétions. La méthode établie utilise plusieurs filtres d'analyse qui sont : une fréquence allélique du variant dans la tumeur ou les CTC  $> 0.05$  ; une couverture minimale du variant dans la tumeur ou les CTC = 3 ; une fréquence allélique dans le contrôle  $< 0.04$  ; une couverture maximale du variant dans le contrôle = 3 ; couverture minimale de cette position = 8. Les mutations somatiques sont annotées avec les algorithmes snpEff et snpSift et ne sont considérées que dans les régions exoniques. Les variants annotés comme polymorphismes (MAF  $> 0.001$ ) sont retirés sauf s'ils sont rapportés dans la base de données COSMIC. Les mutations CTC spécifiques sont définies comme des mutations somatiques partagées par au moins trois échantillons CTC d'un même patient.

## **H. ANALYSES STATISTIQUES**

Les stratégies d'expression des résultats et les tests statistiques utilisés sont présentés pour chaque article dans la section Matériel & Méthodes.



# Résultats

## A. LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES : BIOMARQUEURS DE SENSIBILITÉ ?

Dans le cadre d'un projet de recherche en collaboration avec la plateforme translationnelle BMO dirigée par le Docteur Ludovic Lacroix, le laboratoire avait évalué la faisabilité de détecter, dans des fractions enrichies en CTC par le CellSearch ou par la filtration ISET, des mutations *hotspots* dans les gènes *EGFR* et *KRAS*. Ces résultats non publiés de l'équipe ont montré que cette approche sur fractions enrichies est peu efficace pour détecter des mutations dans des CTC probablement en raison de la faible proportion d'ADN tumoral parmi l'ADN « normal », ce qui nécessite des méthodes très sensibles de détection. Dans le contexte de ces résultats mais également des données publiées par d'autres équipes, il nous a semblé nécessaire de développer une approche plus sensible et plus spécifique pour rechercher des anomalies génomiques pouvant être de potentiels biomarqueurs de sensibilité. Sur la base des résultats publiés par notre groupe [Farace *et al.*, 2011] et confirmés par d'autres équipes [Hofman *et al.*, 2011 ; Krebs *et al.*, 2012] montrant la nette supériorité de la technologie de filtration ISET comparée au CellSearch dans les cancers de la prostate et du poumon, Marianne Oulhen (ingénieure d'étude) et moi avons développé dès 2011 des méthodes permettant de caractériser les CTC enrichies par cette méthode de filtration au niveau phénotypique, morphologique et moléculaire. La question de la détection d'anomalies génomiques a été abordée par le développement de la technologie d'hybridation *in situ* de l'ADN, FISH, qui permet la détection de remaniements, d'amplifications ou de délétions de gènes. Nous avons adapté la méthode de FISH aux CTC enrichies par filtration (FA-FISH), en nous appuyant notamment sur les compétences développées au sein de la plateforme translationnelle HistoCytoPathologie (HCP) dirigée par le Docteur Philippe Vielh. Pour établir cette méthode, nous avons réalisé l'ensemble des mises au point avec des lignées cellulaires présentant des anomalies moléculaires connues (par exemple, la lignée de CBNPC *ALK* remanié, NCI-H2228) mélangées dans du sang de donneur sain afin de « mimer » les CTC, puis nous avons appliqué les protocoles « stabilisés » aux filtres réalisés à partir des prélèvements de patients.

## 1. Développement de la méthode de FISH sur filtres ISET (FA-FISH)

### **Brevet PCT/FR2011/052688. Méthode de caractérisation de cellules tumorales circulantes et application au diagnostic**

Amélie Barthélémy, Benjamin Besse, Françoise Farace, Marianne Oulhen, Emma Pailler, Jean-Charles Soria, Alexander Valent, Philippe Vielh

Cette méthode établie fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet PCT/FR2011/052688.

En choisissant de développer l'approche de FISH sur filtres, plusieurs questions se sont posées : est-ce que la technique de FISH peut être appliquée aux CTC enrichies par filtration ? Si oui, sera-t-il possible d'obtenir une information sur un nombre suffisant de CTC afin d'aboutir à un résultat fiable ?

Le développement de la FA-FISH a nécessité de nombreuses optimisations techniques par rapport à la méthode de FISH établie sur tissu ou sur étalement de cellules sur lames. La première étape a consisté à évaluer le temps nécessaire pour la digestion enzymatique de la membrane cytoplasmique grâce à une solution de HCL 0,01N 10 % contenant de la pepsine, afin que les sondes puissent correctement accéder au noyau et s'hybrider ; cette étape est optimale lorsque les filtres sont incubés dans cette solution à 37°C pendant 6 minutes. La deuxième étape a consisté à diminuer le bruit de fond dû à l'accrochage des sondes fluorescentes de FISH sur le support filtre. Pour cela, les températures optimales de co-dénaturation et d'hybridation ont été évaluées pour chacune des sondes utilisées et des lavages plus stringents ont été réalisés afin de diminuer l'accrochage aspécifique de ces dernières. D'autre part, nous avons observé que des cellules peuvent être perdues pendant la technique ; deux étapes de fixation ont été ajoutées afin de préserver au mieux l'intégrité des cellules. De plus, les filtres doivent être manipulés très délicatement lors de chacune des étapes de la technique. Un spot de filtre ISET correspond à la filtration de 1 mL de sang. Cette filtration retient environ 6000 à 20000 cellules hématopoïétiques, majoritairement des polynucléaires, et environ 50 cellules non hématopoïétiques. L'analyse manuelle en microscopie de l'ensemble de ces cellules est très fastidieuse. Les scanners de lames sont développés pour analyser une centaine de cellules par FISH, comme nécessaire lors des analyses des biopsies tumorales. De plus, nous avons conscience que la nature même des filtres, contrairement aux lames de verre sur lesquelles sont disposées les coupes de biopsie, engendrerait des difficultés lors de l'analyse microscopique. En effet, les filtres ne sont microscopiquement pas plats ce qui par conséquent implique que l'acquisition microscopique nécessite de nombreux *z-stacks* afin d'avoir l'ensemble des signaux FISH pour une cellule. Nous avons également observé des signaux non spécifiques présents dans les pores, dus probablement à la présence de débris cellulaires retenus. De ce fait, nous avons établi une stratégie d'analyse afin de diminuer les biais d'interprétation. Si une CTC est sur un pore, l'interprétation peut être compliquée ; les

signaux présents dans le pore ne sont pas interprétés. Si une CTC est entièrement coincée dans un pore, l'interprétation de la FISH n'est pas possible ; l'information est perdue pour cette cellule.

## **2. Mise au point de protocoles combinés pour la caractérisation des cellules tumorales circulantes et développement de méthodes de microscopie semi-automatisée**

### **Article 1. Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells (BMC Cancer, 2016 Jul 14;16(1):477)**

Emma Pailler\*, Marianne Oulhen\*, Fanny Billiot, Alexandre Galland, Nathalie Auger, Vincent Faugeron, Corinne Laplace-Builhé, Benjamin Besse, Yohann Loriot, Maud Ngo-Camus, Merouan Hemanda, Colin R Lindsay, Jean-Charles Soria, Philippe Vielh, Françoise Farace

Publication en *open-access*.

En parallèle du développement de la FA-FISH pour caractériser moléculairement les CTC, nous avons établi une méthode de caractérisation phénotypique de ces cellules par immunofluorescence et une méthode de caractérisation cytomorphologique par coloration cytologique. Chacune de ces trois méthodes a été établie individuellement. Concernant la caractérisation phénotypique, les cellules retenues lors de l'enrichissement sur le spot du filtre sont marquées par immunofluorescence (DAPI/CD45/marqueurs épithéliaux/marqueurs mésenchymateux). La mise au point de l'immunofluorescence sur filtre a nécessité des ajustements au niveau de la concentration des anticorps et de leur combinaison afin de pouvoir réaliser des multi-marquages, des temps d'incubation et des lavages. De plus, comme nous l'avons précédemment décrit pour la FA-FISH, nous avons observé que le support filtre n'est microscopiquement pas plat et que les pores, contenant pour la plupart des débris cellulaires, sont source de fluorescence non spécifique. Tout en offrant de réels avantages, notamment en termes de sensibilité et de flexibilité pour la caractérisation des CTC, le système de filtration ISET rend difficile l'automatisation de la digitalisation et de l'analyse d'images par microscopie. Après évaluation de plusieurs scanners de lames, nous avons choisi le système Ariol développé par Leica Biosystems notamment pour ses capacités de relocalisation des cellules. En collaboration avec leur équipe R&D, nous avons validé une approche de numérisation des spots. Pour cette première étape, nous avons établi des paramètres précis (temps d'exposition, gain et *offset*) pour la calibration de chacun des fluorochromes. Ces paramètres permettent de moduler l'intensité de fluorescence de chacun des marqueurs ainsi que le bruit de fond inhérent au support. L'exposition du CD45 est de façon systématique la plus élevée possible afin de discriminer au mieux les cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> des cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>. Les expositions des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux sont ajustées afin de

pouvoir détecter des expressions faibles. La calibration de l'*offset* dans le canal DAPI permet d'individualiser correctement les noyaux des cellules. La seconde étape a consisté à développer une sélection automatisée des cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> sur le logiciel Ariol Review 4.0.1.5. Cette sélection est basée sur l'aire du noyau supérieur à 55  $\mu\text{m}^2$  (un pore du filtre mesure 50  $\mu\text{m}^2$ ) et sur l'intensité de fluorescence du CD45. Suite à cette sélection automatique des cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, une catégorisation de ces cellules est réalisée manuellement en fonction des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux classiquement utilisés. Nous avons classé les cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> selon les catégories suivantes : épithéliales (E<sup>+</sup>/M<sup>-</sup>), hybrides (E<sup>+</sup>/M<sup>+</sup>), mésenchymateuses (E<sup>-</sup>/M<sup>+</sup>), sans marqueur mais avec un diamètre du noyau supérieur à 16  $\mu\text{m}$  (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> >2 pores), sans marqueur et avec un diamètre du noyau inférieur à 16  $\mu\text{m}$  (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> <2 pores), cluster (CTC  $\geq 4$ ), cluster mixte (nombre de cellules  $\geq 4$ ) et microcluster (nombre de cellules  $\geq 3$ ).

Concernant la caractérisation morphologique, les mises au point ont consisté à évaluer plusieurs colorants cellulaires et à établir des critères stricts pour identifier des CTC. Sur les conseils du Docteur Philippe Vielh (cytopathologiste), nous avons établi les conditions de coloration avec le colorant cellulaire Hémalun de Mayer ainsi qu'avec le kit Diff-Quik. Une CTC est définie par la taille de son noyau (évaluée par rapport aux pores présents sur le filtre), l'irrégularité de sa membrane nucléaire, la présence d'un cytoplasme visible et un ratio nucléo-cytoplasmique élevé. L'ensemble des CTC sont validées par Philippe Vielh. Les cellules colorées sont ensuite numérisées grâce au scan en lumière visible de l'Ariol. Cependant, une analyse automatisée des cellules colorées en fonction des critères définis n'est pas possible.

Puis nous avons combiné l'immunofluorescence et la coloration morphologique afin d'obtenir plusieurs informations pour une même cellule ce qui implique une relocalisation parfaite. Nous avons ajusté les protocoles pour chacune des techniques afin de pouvoir les réaliser de façon séquentielle. Les cellules retenues sur le spot du filtre sont marquées par immunofluorescence (DAPI/CD45/marqueurs épithéliaux/marqueurs mésenchymateux) puis le spot est numérisé. Les cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> sont sélectionnées automatiquement comme précédemment détaillé. Les cellules sont ensuite colorées avec un colorant cellulaire puis le spot est de nouveau numérisé. Les CTC sont identifiées en suivant les critères de sélection établis.

La seconde méthode développée nous a permis d'apporter une information sur le phénotype des CTC présentant une anomalie génomique (remaniement, amplification ou gain de gène) et limité l'analyse de la FISH aux cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>. Les cellules retenues sur le spot du filtre sont marquées par immunofluorescence (DAPI/CD45) puis le spot est numérisé. Les cellules DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> sont sélectionnées automatiquement comme précédemment détaillé. L'ADN des cellules est ensuite hybridé avec des sondes FISH spécifiques puis seules les cellules d'intérêt DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> sont numérisées. Du

fait que nous travaillons sur des cellules entières mais également à cause de la non-planéité du support filtre, nous avons dû développer une méthode de scan particulière afin de pouvoir numériser la FISH. Pour cela, nous avons déterminé le nombre de *z-stacks* ainsi que le pas entre ces *z-stacks* nécessaires pour une capture optimale de l'ensemble des signaux d'une cellule. Pour déterminer le nombre de *z-stacks*, nous avons scanné des CTC enrichies par filtration chez trois patients distincts (patients *ALK* remanié, *ROS1* remanié, *ERG* remanié) en faisant varier le nombre de *z-stacks* de 5 à 30 avec une incrémentation à chaque scan de 5 (le pas a été arbitrairement déterminé à 0,6  $\mu\text{m}$ ). Nous avons compté le nombre de signaux interprétables pour chacune des cellules dans les six scans indépendants. Le paramètre à 30 *z-stacks* est celui qui nous permet d'obtenir le maximum de signaux interprétables pour plus de 80 % des cellules analysées. Nous avons ensuite modulé le pas entre les *z-stacks* de 0,5  $\mu\text{m}$  à 0,8  $\mu\text{m}$ . De la même façon, nous avons évalué le nombre de signaux interprétables pour chacune des conditions et nous avons ainsi déterminé qu'un pas de 0,6  $\mu\text{m}$  est optimal. D'autre part, nous avons observé que l'intensité des signaux de FISH peut varier fortement d'une région à l'autre du filtre. Un protocole de multi-exposition a été optimisé afin de paramétrer trois temps d'exposition pour chacun des fluorochromes. Pour chaque cellule, 27 combinaisons sont possibles, ce qui permet d'analyser au mieux l'intensité, la taille et l'épaisseur des signaux FISH. Les cellules présentant des anomalies génomiques sont validées par le Docteur Nathalie Auger (cytogénéticienne). Ces deux approches permettent d'améliorer la reproductibilité des analyses tout en diminuant le temps d'analyse ainsi que les différences inter-opérateurs. Ainsi, ces méthodes permettent d'envisager la standardisation et la validation de ces analyses sur des cohortes élargies de patients.

TECHNICAL ADVANCE

Open Access



# Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells

Emma Pailler<sup>1,2,3†</sup>, Marianne Oulhen<sup>1,2†</sup>, Fanny Billiot<sup>1,2</sup>, Alexandre Galland<sup>4</sup>, Nathalie Auger<sup>5</sup>, Vincent Faugeroux<sup>1,2,3</sup>, Corinne Laplace-Builhé<sup>6</sup>, Benjamin Besse<sup>7</sup>, Yohann Lorient<sup>7</sup>, Maud Ngo-Camus<sup>7</sup>, Merouan Hemanda<sup>4</sup>, Colin R. Lindsay<sup>1,2</sup>, Jean-Charles Soria<sup>2,7</sup>, Philippe Vielh<sup>1,2,5</sup> and Françoise Farace<sup>1,2,3\*</sup>

## Abstract

**Background:** Circulating tumor cell (CTC)-filtration methods capture high numbers of CTCs in non-small-cell lung cancer (NSCLC) and metastatic prostate cancer (mPCa) patients, and hold promise as a non-invasive technique for treatment selection and disease monitoring. However filters have drawbacks that make the automation of microscopy challenging. We report the semi-automated microscopy method we developed to analyze filtration-enriched CTCs from NSCLC and mPCa patients.

**Methods:** Spiked cell lines in normal blood and CTCs were enriched by ISET (isolation by size of epithelial tumor cells). Fluorescent staining was carried out using epithelial (pan-cytokeratins, EpCAM), mesenchymal (vimentin, N-cadherin), leukocyte (CD45) markers and DAPI. Cytomorphological staining was carried out with Mayer-Hemalun or Diff-Quik. *ALK*-, *ROS1*-, *ERG*-rearrangement were detected by filter-adapted-FISH (FA-FISH). Microscopy was carried out using an Ariol scanner.

**Results:** Two combined assays were developed. The first assay sequentially combined four-color fluorescent staining, scanning, automated selection of CD45<sup>-</sup> cells, cytomorphological staining, then scanning and analysis of CD45<sup>-</sup> cell phenotypical and cytomorphological characteristics. CD45<sup>-</sup> cell selection was based on DAPI and CD45 intensity, and a nuclear area >55 μm<sup>2</sup>. The second assay sequentially combined fluorescent staining, automated selection of CD45<sup>-</sup> cells, FISH scanning on CD45<sup>-</sup> cells, then analysis of CD45<sup>-</sup> cell FISH signals. Specific scanning parameters were developed to deal with the uneven surface of filters and CTC characteristics. Thirty z-stacks spaced 0.6 μm apart were defined as the optimal setting, scanning 82 %, 91 %, and 95 % of CTCs in *ALK*-, *ROS1*-, and *ERG*-rearranged patients respectively. A multi-exposure protocol consisting of three separate exposure times for green and red fluorochromes was optimized to analyze the intensity, size and thickness of FISH signals.

**Conclusions:** The semi-automated microscopy method reported here increases the feasibility and reliability of filtration-enriched CTC assays and can help progress towards their validation and translation to the clinic.

**Keywords:** Circulating tumor cells, Filtration enrichment, Fluorescent staining, FA-FISH, Predictive biomarkers

## Background

Circulating tumor cells (CTCs) captured from blood as a liquid biopsy are currently a very active and promising area in translational cancer research [1]. CTCs are very rare cells – occurring at rates as low as one cell per 10<sup>6</sup>

or 10<sup>7</sup> leukocytes – which detach from a primary tumor or metastatic site, circulate in the peripheral blood and may colonize secondary sites to form metastasis [2, 3]. To date, identification and characterization of CTCs has been hampered by their rarity, their phenotypical and genetic heterogeneity and the technical limitation of current assays [4]. As a consequence, CTC detection methods commonly rely on two steps, a first enrichment step based on either CTC phenotypical or physical properties, and a secondary step of detection to increase the sensitivity of the assay. The semi-automated CellSearch

\* Correspondence: francoise.farace@gustaveroussy.fr

†Equal contributors

<sup>1</sup>“Circulating Tumor Cells” Translational Platform AMMICA CNRS UMS3655–INSERM US23, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

<sup>2</sup>INSERM U981 “Identification of Molecular Predictors and new Targets for Cancer Treatment”, F-94805 Villejuif, France

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



platform (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, USA) enriches CTC candidates through ferromagnetic beads coated with epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) specific antibody and defines CTCs according to the presence of cytokeratins (CK8, CK18 and CK19) and the absence of the common leukocyte antigen CD45 [5]. In prospective multicenter studies in metastatic breast, prostate (mPCa) and colon cancers [6–8], CTC levels using this platform were shown to have prognostic significance, and extensive analytical validation and clinical qualification led the U.S. Food and Drug Administration (FDA) to approve CellSearch as an aid to prognosis in these tumors. In non-small-cell lung cancer (NSCLC), CTC levels were also reported to have a prognostic value, but the number of CTCs caught by the CellSearch remains low in this tumor type even in patients with metastatic advanced disease [9]. The potential reason for this is that CTCs have lost epithelial features, expressing markers of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) which can be missed by the CellSearch [10–12]. In addition to prognostic utility, CTCs are currently extensively studied to detect predictive biomarkers and screen eligible patients for targeted therapies [13–20]. Moreover analyses performed on CTCs could be repeated at different time-points during treatment to monitor response and guide therapeutic decisions. Performing molecular analysis in CTCs analyzed by the CellSearch is relatively challenging in cancers such as NSCLC due to the low numbers of CTCs captured and the processing conditions of the system.

The limitations of the CellSearch and other antibody-based capture methods have stimulated the development of other technologies for CTC enrichment and detection [4]. An alternative approach consisting of distinguishing CTCs from normal hematopoietic cells according to size is being actively explored. Several filter devices have been described including ISET (ISET, isolation by size of epithelial tumor cells, Rarecells, Paris, France) [21–23], ScreenCell [24], the Accucyte system [25], CellSieve [26], the Portable Filter-based Microdevice [27], VyCAP [28], the Siemens prototype [29] and the Parsortix system [30]; allowing identification of CTCs according to cytomorphological, phenotypical or molecular characteristics. Ours and other groups have reported that higher numbers of CTCs are captured in cancers such as NSCLC and mPCa using a filtration system compared to CellSearch [10, 26, 31, 32]. CTCs expressing mesenchymal and epithelial markers were reported in NSCLC, mPCa and breast cancer patients using filtration enrichment [11, 12, 26, 33, 34] and CTCs enriched by ISET were reported to have a prognostic value in resected NSCLC patients [31]. By capturing CTCs independent of surface-marker expression, filtration methods may offer a significant advantage for covering the phenotypic and genetic

heterogeneity of CTCs, and identification of predictive markers. We and another group reported the detection of *ALK*-rearrangement in CTCs ISET-enriched by filtration in NSCLC patients with an *ALK*-rearranged tumor [17, 18, 35] as well *ROS1*-rearrangement in CTCs from NSCLC patients with an *ROS1*-rearranged tumor [20].

While offering important advantages such as sensitivity of CTC capture and flexibility for CTC characterization following filtration, filtration systems have drawbacks. One problem is that it is difficult to design a filter membrane which sits entirely flat, regardless of the material used: virtually all filter membranes developed today are not microscopically flat. Another is that pores inevitably retain white blood cell debris and fluorescence signals which disturb microscopy analysis, thus cells placed on pores are frequently difficult to analyze. These two problems make the automation of microscopy challenging to implement. Given these difficulties the microscopy analysis of CTCs enriched on filters remains manual, time-consuming due to the high numbers of white blood cells present on filters, and highly operator-dependent. Although automation is an essential step for filtration-enriched CTC assays to progress to the clinic, there is today no published method reporting the semi-automation of microscopy and image analysis of filtration-enriched CTCs.

Here we report the semi-automated method established to analyze filtration-enriched CTCs from NSCLC and mPCa according to two combined assays i.e (i) fluorescent staining and high-resolution cytomorphology; (ii) fluorescent staining and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The first method aims to identify CTCs according to both phenotypical and cytomorphological parameters and includes the establishment of scanning parameters for selecting and creating an image gallery of CD45<sup>-</sup> cells, and characterizing CTCs. The second relies on the detection of molecular biomarkers by establishing FISH scanning parameters (z-stacking, step i.e. distance between two z-stacks, exposure time) for optimal FISH signal identification in filtration-enriched CTCs.

## Methods

### Patients

NSCLC and mPCa patients were recruited at the Gustave Roussy, Paris, France. Informed written consent for blood sample collection was obtained from all patients (IDRCB2008-A00585-50). The study was approved by local institutional board and ethics committees. Blood was collected into EDTA tubes.

**Blood sample collection and enrichment of CTCs by ISET**  
CTC enrichment by the ISET filtration system (RareCells, Paris, France) was carried out according to the



manufacturer's protocol, as previously reported [10, 11]. To preserve cell integrity, the filtration pressure was optimized to -7 kPa. After processing, filters were dried, wrapped in an aluminum sheet and stored frozen in plastic bag containing a silica gel desiccant at -20 °C until use.

#### Fluorescent staining of filtration-enriched CTCs

ISET filters are composed of 10 spots. Each spot (corresponding to filtration of 1 mL blood) was cut out for independent analysis. Filters were thawed and individual spots were immobilized on glass slides using adhesive ribbon. A 'snick' was made on each spot to allow the precise relocation of cells between fluorescent staining and cytomorphological staining. After rehydration in TBS 1X (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), cell permeabilization was carried out by incubating filters for 7 min at room temperature in TBS 1X-Triton X-100 0.2 % (Roche, Sigma-Aldrich Co. LLC., Saint-Louis, MO, USA). After a wash with TBS 1X, saturation was carried out by incubating filters for 25 min at room temperature in TBS 1X-normal goat serum 5 % (Thermo Fisher Scientific Inc.). Epithelial markers were employed in the "green" channel including mouse anti-pancytokeratin monoclonal antibodies (clone A45-B/B3, AS Diagnostik, Hueckeswagen, Germany; clone C11, Novus Biological, Littleton, CO, USA; clone KL1, Beckman Coulter, Brea, CA, USA; clone OV-TL 12/30, Dako, Les Ulis, France) directly conjugated to Alexa Fluor (AF) 488 using the Zenon Mouse IgG Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) and EpCAM/CD326 AF488 (clone VU1D9, Novus Biological). An anti-vimentin (clone V9, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or an anti-N-cadherin (clone 32/N-Cadherin, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) conjugated in AF546 and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD45 (clone HI30, BD Biosciences) were used. Antibodies incubation was carried out 25 min in a humidity dark chamber. After two washes with TBS 1X-Tween20 0.05 % (Dako) and TBS 1X, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) was added for 10 min. ISET spots were mounted between slide and coverslip using Ibi mounting medium (Biovalley, Nanterre, France). Slides were stored at +4 °C until scanning.

#### Cytomorphological staining of filtration-enriched CTCs

After fluorescence scanning, the coverslip and the mounting medium were removed using a wash of PBS 1X, filters were stained with Mayer Hemalun (RAL Diagnostics, Martillac, France) at room temperature for 30 min or with Diff-Quik (Siemens Healthcare diagn., Munich, Germany) according to the manufacturer's protocol. ISET spots were mounted using Ibi mounting medium and stored at +4 °C until scanning.

#### Scanning and image analysis of combined fluorescent and cytomorphological staining in filtration-enriched CTCs

Scanning and image analysis were carried out using an Ariol scanning system (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL, USA) including a Leica DM6000 B microscope with multibay stages (MB 8). Single interference filter sets for blue (DAPI), green (FITC), red (Texas Red) and dark red (Cy5) filters were used. Calibrations were performed using the Ariol Scan application 4.0.1.5 (Leica Biosystems Richmond Inc.). After delineation of the scanning area (i.e. one entire ISET spot) at  $\times 5$  magnification, gain was set at maximum (255) to eliminate risk of fluorochrome bleaching. Exposure time was calibrated for each channel at  $\times 20$  magnification. Using only one parameter (i.e. exposure time for adjusting fluorochrome exposure) allowed to compare settings between scans done at different times or by different users. Exposure time for epithelial markers was adjusted to have a very low signal on CD45<sup>+</sup> cells (at limit of the background noise) while the exposure time of the mesenchymal marker was set to have a saturated signal on CD45<sup>+</sup> cells which are known to be strongly positive. Offset was calibrated as high as possible in the DAPI channel to individualize at best nucleus. Selection of CD45<sup>-</sup> from CD45<sup>+</sup> elements was carried out in real time by the Ariol scanning system. The fluorescence scan takes  $\sim 1$  h30 for one ISET spot. For cytomorphological staining scanning a pre-scan of the whole spot was performed at  $\times 5$  in the brightfield channel, the snick being used to precisely relocate cells. The cytomorphological staining scan takes  $\sim 45$  min at  $\times 20$  magnification. All images were analyzed with the Ariol Review application 4.0.1.5 (Leica Biosystems Richmond Inc.).

#### Combination of fluorescent staining and FA-FISH of filtration-enriched CTCs

Filters were thawed and individual spots were immobilized on glass slides using adhesive ribbon. A snick was made on each spot for precise CD45<sup>-</sup> cell relocation for filter-adapted-FISH (FA-FISH) scanning. After rehydration in TBS 1X (Dako), filters were incubated for 5 min at 98 °C in TBS 1X-EDTA (Dako) and then 30 min in TBS 1X-normal mouse serum 5 % (Thermo Fisher Scientific Inc.). Fluorescent staining was performed overnight with anti-CD45 in a dark humidity chamber. After three washes with TBS 1X-Tween20 0.05 % followed by TBS 1X, nuclear staining was performed using DAPI for 15 min. For FA-FISH, filters were then washed with TBS 1X-Tween 20 0.05 %, incubated for 30 min at room temperature in methanol:acetic acid (9:1) solution and then digested at 37 °C with a pepsin (Sigma-Aldrich) solution at 10 % in 0.01 N HCL. After washing with PBS 1X, filters were fixed at room temperature in formaldehyde solution (Sigma-Aldrich)

and dehydrated in successive baths containing increasing concentrations of ethanol (VWR International, Radnor, PA, USA). FA-FISH experiments were performed using several probes according to the manufacturer's protocol: the Vysis LSI *ALK* Break Apart Rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA); the Vysis 6q22 *ROS1* Break Apart FISH probe RUO Kit (Abbott Molecular Inc.); the ZytoLight SPEC *RET* Dual Color Break (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany); the Vysis *EGFR/CEP7* FISH Probe Kit (Abbott Molecular Inc.); the CytoCell *c-met* amplification Probe Kit (CytoCell Ltd., Cambridge, UK); the ZytoLight SPEC *FGFR1/CEN8* Dual Color Probe (ZytoVision GmbH); the *FIP1L1-PDGFR*A FISH DNA Probe (Dako) with the TelVysion 4q (Abbott Molecular Inc.); the Vysis *AR* amplification Probe Kit (Abbott Molecular Inc.); the Kreatech *ERG* Break Apart Rearrangement Probe Kit (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Netherlands). After hybridization, filters were washed in stringent wash buffer 1X (Dako) and wash buffer 1X (Dako), then dehydrated again in successive ethanol solutions. Filters were finally mounted using DAPI mounting medium (Dako). All FISH probes were optimized for FA-FISH using cancer cell lines spiked in normal blood and filtered by ISET (Additional file 1: Figure S1).

#### Scanning and image analysis of combined fluorescent staining and FA-FISH in filtration-enriched CTCs

Scanning and image analysis of fluorescent staining were carried out as described above. For scanning FA-FISH, a pre-scan of the whole ISET spot was first performed at  $\times 5$  magnification in the DAPI channel to precisely relocate cells. Thanks to the snick made on the spot, the fluorescence and the FA-FISH scans were linked. A scan pass in the DAPI channel at  $\times 10$  magnification was developed for adjustment of focus and FISH capture was performed at  $\times 63$  magnification in the small regions containing CD45<sup>-</sup> cells. The z-stack number, step, gain, offset and exposure time (ranging from 5 to 100 ms) were calibrated at  $\times 63$  magnification. The Ariol scanning system adjusted the focus on DAPI every frame. All images were analyzed with the Ariol Review application 4.0.1.5. To determine the best number of z-stacks, filter enriched-CTCs from patients with *ALK*-, *ROS1*- and *ERG*-rearranged tumors were scanned six times from 5 z-stacks to 30 z-stacks. For the best step determination, filter enriched-CTC were scanned four times with steps ranging from 0.5 to 0.8  $\mu\text{m}$ . No bleaching was observed.

#### Cell lines

The NCI-H2228, HCC78, NCI-H661, A549, H1975 and LNCaP cell lines were cultured in RPMI medium 1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) and TPC1, A-431, MB-MDA-134, Res259, VCaP in DMEM medium (Thermo Fisher Scientific Inc.) supplemented with 10 % fetal

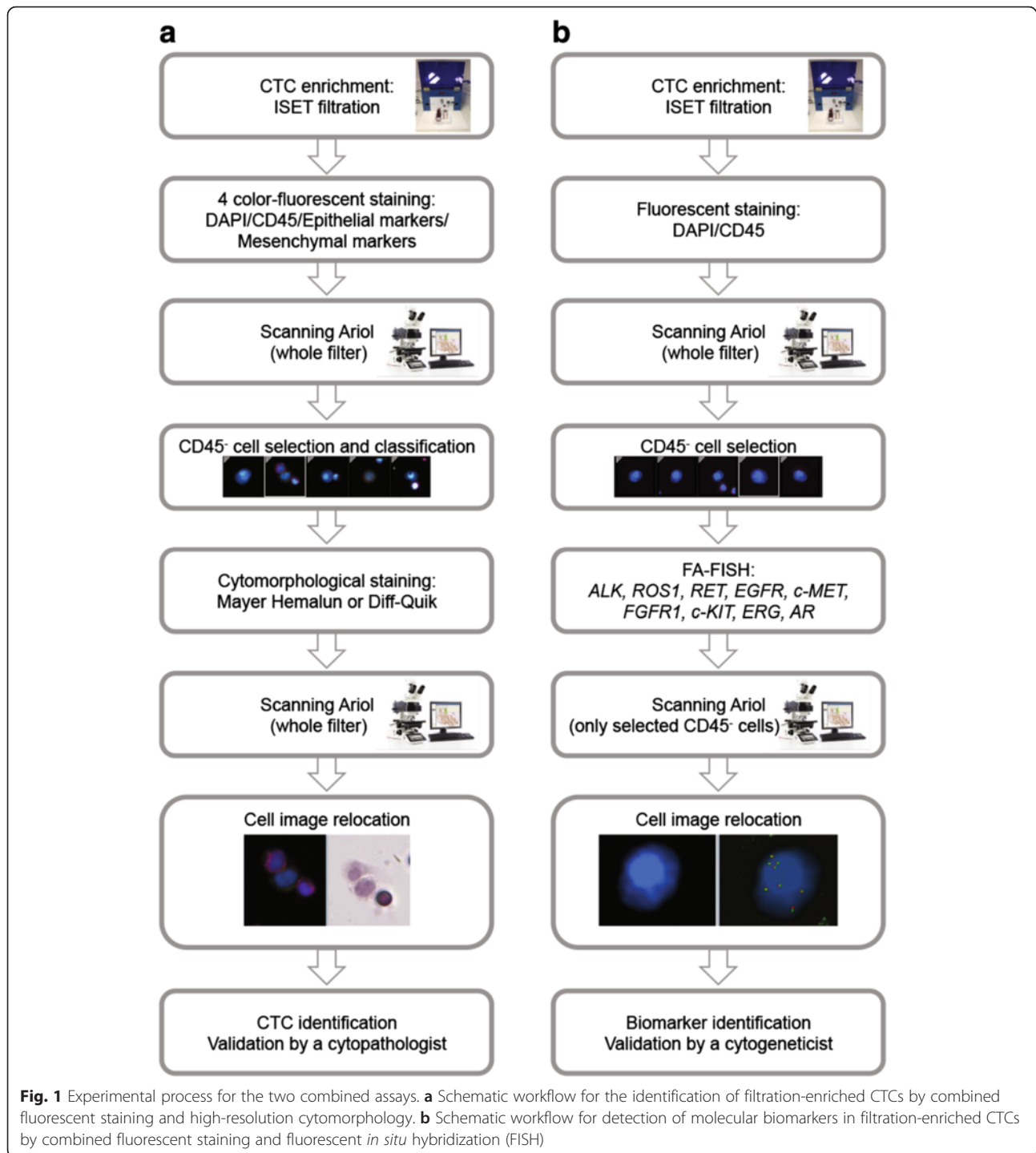
bovine serum and maintained in a humidified incubator in 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cell lines were spiked at various dilutions into blood from healthy donors filtered on ISET, as done for patient samples.

## Results

### Semi-automated microscopy method to identify filtration-enriched CTCs by combined phenotypical and cytomorphological analysis

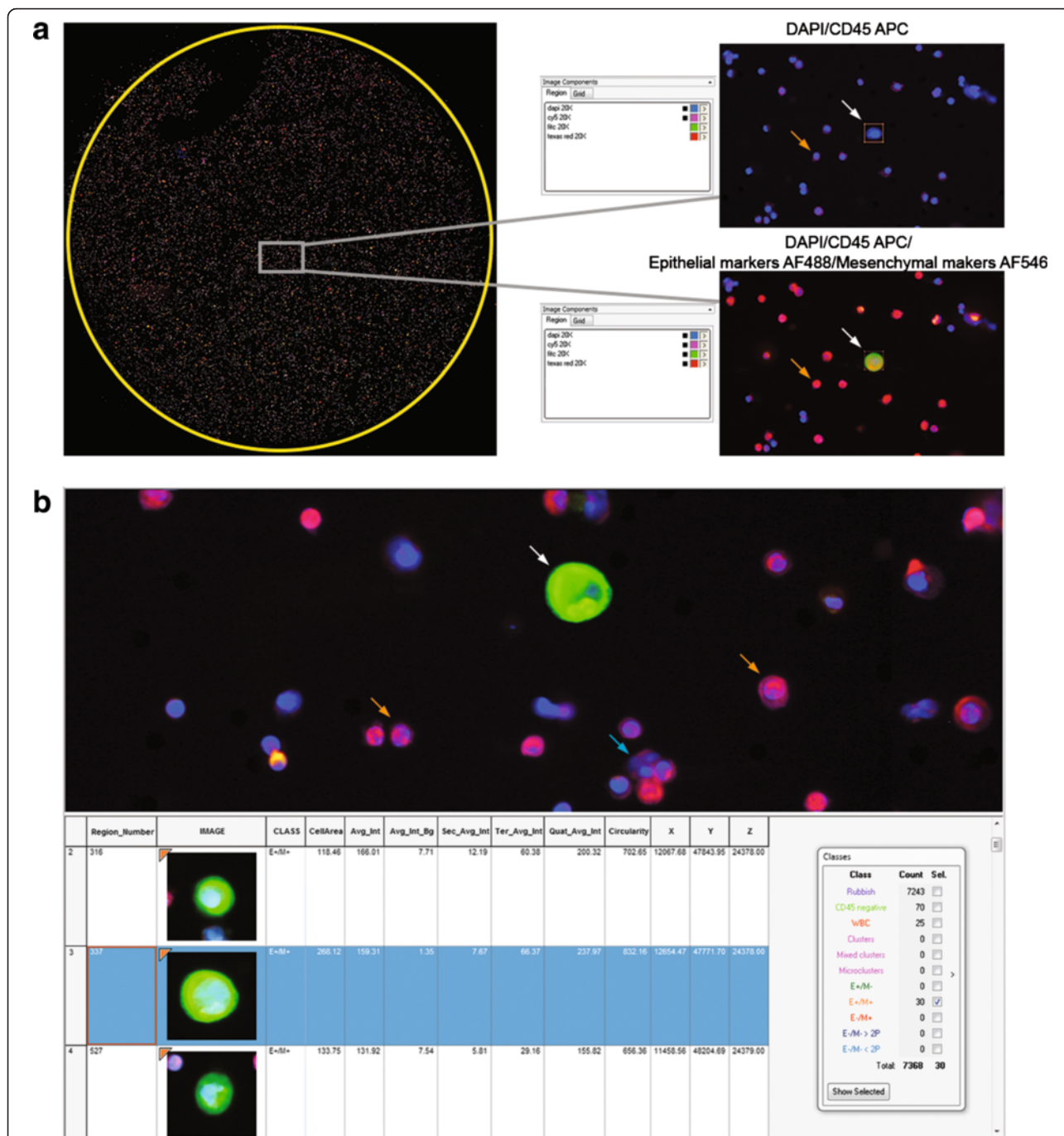
CTCs are most often identified phenotypically through the detection of epithelial markers by immunofluorescent staining. Filtration-enriched CTCs may also be identified according to true cytomorphological criteria such as nucleus size (compared with the size of the filter pores (8  $\mu\text{m}$ ) corresponding to the internal control) and irregularity of the nuclear membrane, the presence of a visible cytoplasm and a high nuclear-to-cytoplasmic ratio [10, 31, 36]. To further characterize filtration-enriched CTCs, we established a method where CTCs were identified by combining phenotypical (immunofluorescent staining) and cytomorphological characterization, and report here the semi-automated scanning and image analysis method developed to analyze filters. Using cancer cell lines spiked in normal blood and filtered by ISET, we developed a multi-step process where filters were (i) treated by four-color fluorescent staining, (ii) scanned using an Ariol scanning system and automatically analyzed to select CD45<sup>-</sup> from CD45<sup>+</sup> cells, (iii) treated by a cytomorphological dye, (iv) scanned and analyzed again using the Ariol scanning system to gather for cells of interest phenotypical and cytomorphological images, and cell characteristics (Fig. 1a). To identify CTCs potentially undergoing EMT, four-color fluorescent staining was carried out using epithelial (pancytokeratins, EpCAM), mesenchymal (vimentin or N-cadherin) markers, CD45 and nuclear staining (DAPI or Hoechst 33342).

Three scanning parameters including gain and exposure time – which operate on fluorochrome intensity – and offset – which operates on the fluorescent background of the membrane – were critical for the automated selection of CD45<sup>-</sup> cells. CD45 exposure time was systematically adjusted as high as possible to optimally discriminate CD45<sup>-</sup> and CD45<sup>+</sup> cells (Fig. 2a). The exposure time of epithelial and mesenchymal markers was adjusted to detect low marker expression as expected in CTCs undergoing EMT (Fig. 2a). Offset calibration in the DAPI channel was critical to fully demarcate nuclei and automatically select individual CD45<sup>-</sup> from CD45<sup>+</sup> cells. To adjust for the uneven surface of the membrane, the focus was determined before scanning using nine focus points across the filter, then readjusted every frame during scanning (~350 times). Using this scanning method, the total number of cells (mostly CD45<sup>+</sup>) counted per 1 mL ISET spot was highly variable, ranging from 6000 to 20000. The



automated selection of CD45<sup>-</sup> cells was based on three criteria: (i) intensity of DAPI, (ii) intensity of CD45, (iii) a nuclear area superior to 55  $\mu\text{m}^2$  (an area of 50  $\mu\text{m}^2$  corresponds to a pore of 8  $\mu\text{m}$  diameter). In order to select clusters, and especially mixed clusters which contain both CTCs and CD45<sup>+</sup> cells, a nuclear area superior to 150  $\mu\text{m}^2$  (equivalent of three pores) was added as a fourth criteria, and the CD45 intensity was

not considered in this situation. All selected DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> elements (usually ranging from 10 to 150 elements per 1 mL ISET spot) were reviewed manually and classified according to their phenotype and nucleus size. Eight categories were established including exclusively epithelial cells (E<sup>+</sup>/M<sup>-</sup>), cells in EMT (E<sup>+</sup>/M<sup>+</sup>), mesenchymal cells (E<sup>-</sup>/M<sup>+</sup>), cells with no markers and a nucleus diameter superior to 16  $\mu\text{m}$  (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> > 2 pores),

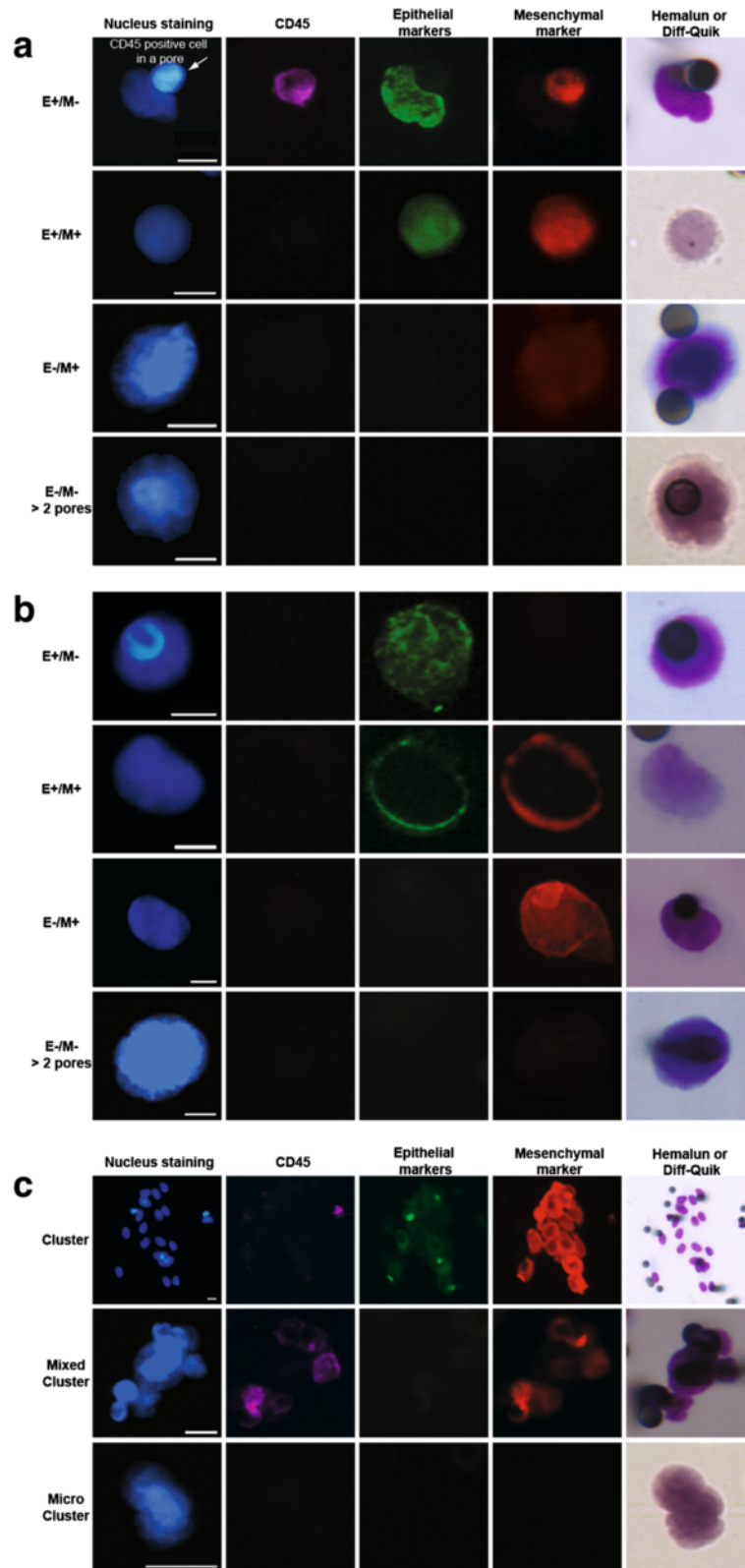


**Fig. 2** Scanning and image gallery of A459 cells spiked in normal blood and filtered by ISET. **a** Images of the whole ISET filter (left panel). Grey windows and right panels show DAPI/CD45 APC and DAPI/CD45 APC/Epithelial markers AF488/Mesenchymal markers AF546 channels. **b** Zoom in images for DAPI/CD45 APC/Epithelial markers AF488/Mesenchymal markers AF546 channels. The image gallery of A459 cells and cell characteristics are shown. Cell categories after automated selection of CD45<sup>-</sup> cells and manual review of images are shown. The white arrow indicates an A549 cell, orange arrows indicate CD45<sup>-</sup> cell into pores, the blue arrow a CD45<sup>+</sup> cell outside a pore. Abbreviations: Avg\_Int, DAPI average intensity; Avg\_Int\_Bg, background average intensity; Sec\_Avg\_Int, CD45 average intensity; Ter\_Avg\_Int, AF488 average intensity; Quat\_Avg\_Int, AF546 average intensity

cells with no markers and a nucleus diameter inferior to 16 μm (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> < 2 pores), CTC clusters (number of CTCs ≥ 4), mixed clusters (number of CD45<sup>+</sup> cells

and CTCs ≥ 4), and microclusters (number of CD45<sup>-</sup> and/or CTC = 3). The characteristics of each selected element such as cell area and fluorescence intensities





**Fig. 3** Examples of isolated CTCs (E<sup>+</sup>/M<sup>-</sup>, E<sup>+</sup>/M<sup>+</sup>, E<sup>-</sup>/M<sup>+</sup>, E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> > 2 pores respectively) identified by combined fluorescent staining and high-resolution cytomorphology in representative **a** NSCLC and **b** mPCa patients. **c** Examples of CTC clusters, mixed clusters and microclusters respectively in NSCLC and/or mPCa patients. Scale: white bars = 10 μm

were detailed in an image gallery. An example of A549 cancer cells spiked in normal blood and treated as mentioned above is shown in Fig. 2.

High-resolution cytomorphology was carried out by staining filters with either Mayer Hemalun or Diff-Quik, and scanning in brightfield. Cytomorphological images were precisely relocated within CD45<sup>-</sup> cell subpopulations using the Ariol scanning system and validated by an experienced cytopathologist (PV). Five criteria were used to define an epithelial CTC including i) presence of a well-defined and non-damaged nucleus inside the cytoplasm, ii) absence of CD45 expression, iii) expression of epithelial markers, iv) nuclear size superior to 1.5 pore diameter (i.e. 12 μm), v) presence of a well-defined cytoplasm. Examples of isolated CTCs from NSCLC and mPCa patients identified using these five criteria and harboring only epithelial markers or both epithelial and mesenchymal markers are shown in Fig. 3 (a and b). In the absence of epithelial marker expression, CTCs were defined as cells presenting all the following cytomorphological criteria: i) nucleus size

superior to two pores (i.e. ≥ 16 μm), ii) nucleus irregularity, iii) high nuclear-to-cytoplasmic ratio. CTCs with no detectable epithelial marker expression but cytomorphological characteristics of CTCs were consistently detected in both NSCLC and mPCa patients as shown in Fig. 3 (a and b). Examples of clusters from NSCLC and/or mPCa patients are shown in Fig. 3c.

#### Semi-automated microscopy method to identify filtration-enriched CTCs by combined phenotypical and FA-FISH analysis

We previously reported a method for FA-FISH on ISET filters, optimized to decrease non-specific fluorescent probe binding to the filter membrane and confer high cell recovery [18, 20]. Scanning software is commonly able to analyze around 100 cells per tumor sample by FISH, and it was therefore not possible to scan all cells (6000 to 20,000, as mentioned above) present on a 1 mL ISET spot. To decrease the numbers of cells to scan, we limited the FISH analysis to CD45<sup>-</sup> cells: this option provided the

**Table 1** FISH spots detected per CTC in a patient with an *ALK*-rearranged tumor depending on the number of z-stacks

CTC ID	Number of FISH spots					
	5 z-stacks	10 z-stacks	15 z-stacks	20 z-stacks	25 z-stacks	30 z-stacks
1	n.i. <sup>a</sup>	9	9	13	10	<b>18</b>
2	3	8	6	<b>16</b>	15	<b>16</b>
3	n.i. <sup>a</sup>	3	2	8	7	<b>12</b>
4	4	11	2	4	13	<b>13</b>
5	n.i. <sup>a</sup>	5	6	8	8	<b>17</b>
6	n.i. <sup>a</sup>	12	4	4	2	<b>16</b>
7	8	6	8	19	1	<b>27</b>
8	2	4	4	8	10	<b>15</b>
9	2	2	3	13	7	<b>16</b>
10	n.i. <sup>a</sup>	22	6	14	17	<b>27</b>
11	n.i. <sup>a</sup>	4	8	8	10	<b>16</b>
12	1	10	6	<b>16</b>	12	<b>16</b>
13	1	4	2	<b>16</b>	2	3
14	n.i. <sup>a</sup>	6	9	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>
15	2	4	n.i. <sup>a</sup>	4	4	<b>16</b>
16	1	10	8	2	7	<b>16</b>
17	n.i. <sup>a</sup>	6	9	8	<b>20</b>	9
18	6	7	7	<b>16</b>	14	<b>16</b>
19	6	7	n.i. <sup>a</sup>	10	12	<b>18</b>
20	3	8	6	6	8	<b>18</b>
21	1	3	<b>9</b>	6	8	8
22	2	5	6	n.i. <sup>a</sup>	<b>14</b>	8
% <sup>b</sup>	0 %	0 %	4 %	23 %	18 %	82 %

Abbreviations: *ALK* anaplastic lymphoma kinase gene; CTC circulating tumor cell; FISH fluorescence *in situ* hybridization; n.i. non-interprettable

<sup>a</sup>Number of FISH spots is uncountable due to non-optimal focus in the DAPI channel

<sup>b</sup>Percentage of cases where a higher number of FISH spots were observed

The numbers in bold correspond to the highest number of spots for this CTC

additional advantage of excluding CD45<sup>+</sup> subpopulations which could occasionally harbor unspecific FISH rearrangement signals when damaged (data not shown). We established a second multi-step process where filters were (i) treated by fluorescent staining, (ii) scanned on the Ariol scanning system and analyzed automatically to locate CD45<sup>-</sup> cells as described above, (iii) treated by FA-FISH, (iv) scanned in the small regions containing the CD45<sup>-</sup> cells, (v) and analyzed for detection, interpretation and validation of FISH signals within CD45<sup>-</sup> cells (Fig. 1b).

FISH scanning in tumor specimens depends on three parameters: z-stacking (usually ranging from 7 to 11 stacks), the step i.e. the distance between z-stacks (usually 0.6  $\mu\text{m}$  or 0.7  $\mu\text{m}$ ), and the exposure time of red and green fluorochromes. FISH scanning of filter enriched-CTCs must take into consideration two particular characteristics of CTCs and filters: first, CTCs are not cut as tissue sections and may have a large nucleus (superior to 30  $\mu\text{m}$  in diameter). These characteristics add to the uneven surface of the filter and strongly influence the above three parameters. Second, CTCs are frequently located in pores which contain DAPI positive debris and fluorescent signals, rendering their analysis challenging.

We first determined the best number of z-stacks to scan filter enriched-CTCs from patients with an *ALK*-rearranged tumor. Six independent scans of the same filters were performed with an increasing number of z-stacks ranging from 5 to 30, at an arbitrary step of 0.6  $\mu\text{m}$ . Thirty was the maximum z-stack number tolerated by the scanner. As shown in Table 1, 30 z-stacks was the optimal setting to scan CTC FISH spots (82 % detection rate) in an patient with *ALK*-rearranged tumor, while fewer spots were detected at lower numbers of z-stacks. Thirty z-stacks were also optimal to scan CTC FISH spots in patients with a *ROS1*-rearranged tumor (91 % detection rate) (Table 2). In a patient with *ERG*-rearranged tumor, 30 stacks also allowed a 95 % detection rate of CTC FISH spots (Table 3). Thirty z-stacks were therefore established as the optimal setting for scanning filter-enriched CTCs.

We next examined the influence of the step on the number of FISH spots. Scanning of the same filters was performed with an increasing step, ranging from 0.5  $\mu\text{m}$  to 0.8  $\mu\text{m}$ . As shown in a patient with *ALK*-rearranged tumor (Table 4), a maximal number of FISH spots was detected at a step of 0.6  $\mu\text{m}$  (92 % detection rate). This was confirmed in filters from patients with *ROS1*- and *ERG*-rearranged tumors (Additional file 2: Table S1 and Additional file 3: Table S2).

The exposure time of red and green signals was observed to strongly influence the intensity, size and thickness of FISH spots. Because FISH signal intensities were highly variable from one ISET filter region to another one, we developed a multi-exposure protocol to analyze FISH signals

**Table 2** FISH spots detected per CTC in a patient with a *ROS1*-rearranged tumor depending on the number of z-stacks

CTC ID	Number of FA-FISH spots					
	5 stacks	10 stacks	15 stacks	20 stacks	25 stacks	30 stacks
1	9	n.i. <sup>a</sup>	6	14	14	<b>30</b>
2	4	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
3	12	22	18	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>
4	3	2	n.i. <sup>a</sup>	13	<b>14</b>	<b>14</b>
5	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
6	26	28	26	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>
7	6	15	11	20	<b>28</b>	<b>28</b>
8	36	42	48	52	<b>62</b>	<b>62</b>
9	10	14	18	20	<b>30</b>	<b>30</b>
10	13	20	22	26	<b>30</b>	<b>30</b>
11	2	12	12	13	<b>14</b>	<b>14</b>
12	6	6	8	10	<b>14</b>	<b>14</b>
13	4	6	6	8	<b>14</b>	<b>14</b>
14	8	13	20	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
15	10	14	14	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
16	10	12	13	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
17	2	6	4	15	<b>16</b>	<b>16</b>
18	4	11	16	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>
19	20	33	26	46	55	64
20	12	14	12	14	15	14
21	11	n.i. <sup>a</sup>	20	24	<b>28</b>	<b>28</b>
22	10	12	12	<b>20</b>	19	12
% <sup>b</sup>	4 %	9 %	9 %	41 %	86 %	91 %

Abbreviations: CTC circulating tumor cell; FISH fluorescence *in situ* hybridization; n.i. non-interpretable; *ROS1 c-cros oncogene 1*

<sup>a</sup>Number of FISH spots is uncountable due to non-optimal focus in the DAPI channel

<sup>b</sup>Percentage of cases where a higher number of FISH spots were observed

The numbers in bold correspond to the highest number of spots for this CTC

consisting of three exposure times for both the green and red fluorochromes (Fig. 4). Twenty-seven settings of exposure time were in theory possible allowing for each candidate CTC the selection of the best setting. As shown in Fig. 4a, the highest exposure was not systematically the best setting, as thick signals can give a false idea of the distance between two spots. To identify CTCs harboring abnormal FISH patterns, signals present in DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells were systematically validated by an experienced cytogeneticist (NA). Examples of filtration-enriched CTCs harboring *ALK*-, *ROS1*-, *RET*-, or *ERG*-gene alterations from NSCLC and mPCa are illustrated in Fig. 5.

## Discussion

Here we reported the development of a semi-automated microscopy method for analyzing filtration-enriched CTCs using two combined assays. The first assay allowed

**Table 3** FISH spots detected per CTC in a patient with an *ERG*-rearranged tumor depending on the number of z-stacks

CTC ID	Number of FA-FISH spots					
	5 z-stacks	10 z-stacks	15 z-stacks	20 z-stacks	25 z-stacks	30 z-stacks
1	5	9	2	10	16	<b>22</b>
2	23	32	22	32	33	<b>36</b>
3	4	12	6	15	<b>16</b>	<b>16</b>
4	11	20	10	24	30	<b>32</b>
5	10	6	12	<b>16</b>	14	<b>16</b>
6	26	14	2	30	31	<b>45</b>
7	34	4	2	39	<b>59</b>	<b>59</b>
8	15	4	4	27	<b>31</b>	<b>31</b>
9	14	8	2	31	33	<b>34</b>
10	6	2	16	26	26	<b>31</b>
11	2	2	4	15	16	<b>22</b>
12	14	32	2	60	58	<b>61</b>
13	13	0	20	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>
14	10	10	12	<b>35</b>	32	<b>35</b>
15	17	10	10	56	53	<b>65</b>
16	16	6	8	28	30	<b>32</b>
17	6	6	10	14	15	<b>16</b>
18	5	14	2	14	14	<b>20</b>
19	8	4	6	16	26	<b>31</b>
20	30	20	26	<b>52</b>	<b>52</b>	44
21	4	16	6	12	18	<b>27</b>
22	7	n.i. <sup>a</sup>	6	<b>30</b>	29	<b>30</b>
% <sup>b</sup>	0 %	0 %	0 %	23 %	23 %	95 %

Abbreviations: CTC circulating tumor cell; *ERG* v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog; FISH fluorescence *in situ* hybridization; n.i. non-interpretable

<sup>a</sup>Number of FISH spots is uncountable due to non-optimal focus in the DAPI channel

<sup>b</sup>Percentage of cases where a higher number of FISH spots were observed  
The numbers in bold correspond to the highest number of spots for this CTC

identification of CTCs by combining four-color fluorescence to high-resolution cytomorphological analysis. The microscopy method of this first assay included establishment of scanning parameters, definition of criteria for creating an image gallery of CD45<sup>-</sup> cells, and definition of criteria to identify CTCs among CD45<sup>-</sup> cells based on both phenotypical and true cytomorphological characteristics. The second process was developed to identify molecular biomarkers in CTCs by combining fluorescent staining and FISH. After identification and location of CD45<sup>-</sup> cells on filters as established in the first assay, the method included the establishment of parameters for scanning FA-FISH into filter regions containing CTC candidates, and the analysis of FISH using a multi-exposure protocol for optimal definition of signals. These two assays were possible due to the capacity of the Ariol scanning system to perfectly relocate images i.e. images of fluorescence and cytomorphology, and images of fluorescence and FA-FISH signals in CD45<sup>-</sup> cells.

In contrast to antibody-based immunomagnetic enrichment, high numbers of CD45<sup>+</sup> cells are retained by most filtration systems [10, 26, 32, 37]. The automated selection of CD45<sup>-</sup> cells greatly reduces the number of cells to analyze (here approximately 100 cells instead of 6000 to 20000) thereby improving the feasibility of the assay and the reliability of the results. CTCs were identified among selected CD45<sup>-</sup> cell candidates by examining high-resolution images from both four-color fluorescence and cytomorphology. High-resolution cytomorphology is only possible when cells collected on filters are intact and their morphology well preserved during the filtration process. Although very time-consuming given the number of spots to analyze and the high number of CD45<sup>+</sup> cells retained per spot, ISET offers the advantage of preserving cellular integrity. In both NSCLC and mPCa patients, we observed CTCs that were negative for epithelial and mesenchymal markers but were validated as true CTCs by a cytopathologist (PV). One



**Table 4** FISH spots detected per CTC in a patient with an *ALK*-rearranged tumor depending on the step

CTC ID	Number of FA-FISH spots			
	0.5 $\mu\text{m}$	0.6 $\mu\text{m}$	0.7 $\mu\text{m}$	0.8 $\mu\text{m}$
1	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
2	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
3	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	28
4	<b>32</b>	<b>32</b>	28	27
5	<b>16</b>	<b>16</b>	14	13
6	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
7	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>
8	13	<b>16</b>	12	16
9	29	28	<b>32</b>	<b>32</b>
10	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
11	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
12	28	26	<b>31</b>	<b>30</b>
13	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	30
14	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
15	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>
16	27	<b>28</b>	18	27
17	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
18	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	12
19	30	<b>32</b>	30	27
20	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	14
21	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
22	<b>32</b>	<b>32</b>	31	22
23	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	27
24	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
% <sup>a</sup>	79 %	92 %	75 %	58 %

Abbreviations: *ALK* anaplastic lymphoma kinase gene; CTC, circulating tumor cell; FISH, fluorescence *in situ* hybridization

<sup>a</sup>Percentage of cases where a higher number of FISH spots were observed  
The numbers in bold correspond to the highest number of spots for this CTC

cannot completely exclude that CTCs undergoing EMT and expressing a low level of epithelial and mesenchymal markers may be missed by our immunofluorescent assay. Furthermore as shown here, the level of both epithelial and/or mesenchymal marker expression detected in actual filtration-enriched CTCs can be substantially lower than that of spiked cell lines, a difference we also observed using manual microscopy. Although we have no evident explanation for this, the combination of four-color fluorescence to high-resolution cytomorphology contributes to a better characterization of such CTCs and reliability of the results. Therefore by combining phenotypic and cytomorphological data and high-resolution images, the approach described here enables us to better characterize CTCs as well as detect more CTCs than with phenotypic analyses alone, further

highlighting the considerable phenotypic and cytomorphological heterogeneity of CTCs.

FISH analysis of tumor specimens for diagnostic testing of biomarkers such as *ALK*- or *ROSI*-rearrangement is in most cases still done manually by cytogeneticists. Tumor cells are identifiable by their morphology and the manual analysis offers the possibility to perform as many stacks as necessary for capturing all FISH spots. Manual FISH analysis of filters is laborious given the number of CD45<sup>+</sup> cells retained per filter. It may also be a source of errors since it is well known by cytogeneticist that apoptotic CD45<sup>+</sup> cells may harbor non-specific break apart FISH signals. Given the size of CTCs and the absence of an even filter surface, 30 z-stacks spaced 0.6  $\mu\text{m}$  apart were required to capture a maximum of FISH spots and identify *ALK*-, *ROSI*- and *ERG*-rearrangement in CTCs from NSCLC and mPca patients. Pre-analytical steps during ISET filtration were found critical for the quality of FA-FISH and optimal scanning, especially the possibility to filter at a very low pressure enabling preservation of cell integrity. Unlike tissue sections, standard scanning settings were unable to capture all FISH spots present in filtration-enriched CTCs. The multi-exposure protocol offering twenty-seven exposure settings was therefore essential for optimal capture and definition of FISH signals that were systematically validated by an experienced cytogeneticist (NA).

Multiple studies have highlighted the important phenotypic and genetic heterogeneity of CTCs which cannot be covered by a single CTC isolation technique. Some of these studies have also shown the capacity of filtration to enrich CTCs harboring distinct epithelial-to-mesenchymal phenotypes, capturing higher numbers of CTCs compared to antibody-based methods, mostly in NSCLC and mPca. As a consequence of these advantages and in particular because the number of CTCs is critical for assessing molecular biomarkers, filtration based enrichment methods may be a preferred technique to progress CTCs as a non-invasive approach for selecting specific therapies. Given this clinical perspective, automation of microscopy analysis is a necessary step to improve reproducibility of analyses, reduce risks of errors, inter-operator differences, and progress towards a standardization of filtration-enriched CTC analysis. Furthermore, a second advantage of the automated analysis of filtration-enriched CTC is the possibility to combine successive assays on the same filter. Automation allows precise location of cells on filters, thus relocating cell data and images from successive experiments performed on the same filter. The combination of assays increases the amount of available information, contributing to a better characterization of CTCs and reliability of the results.

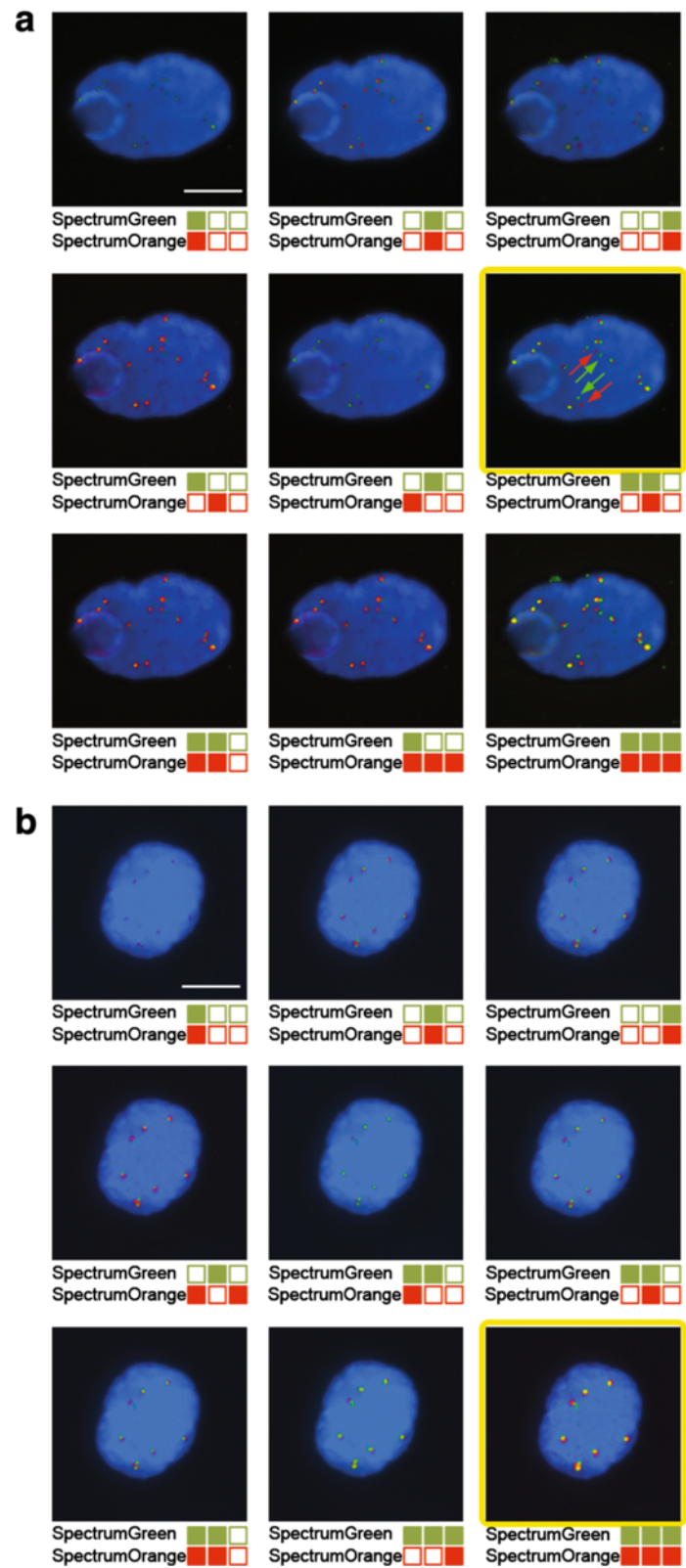
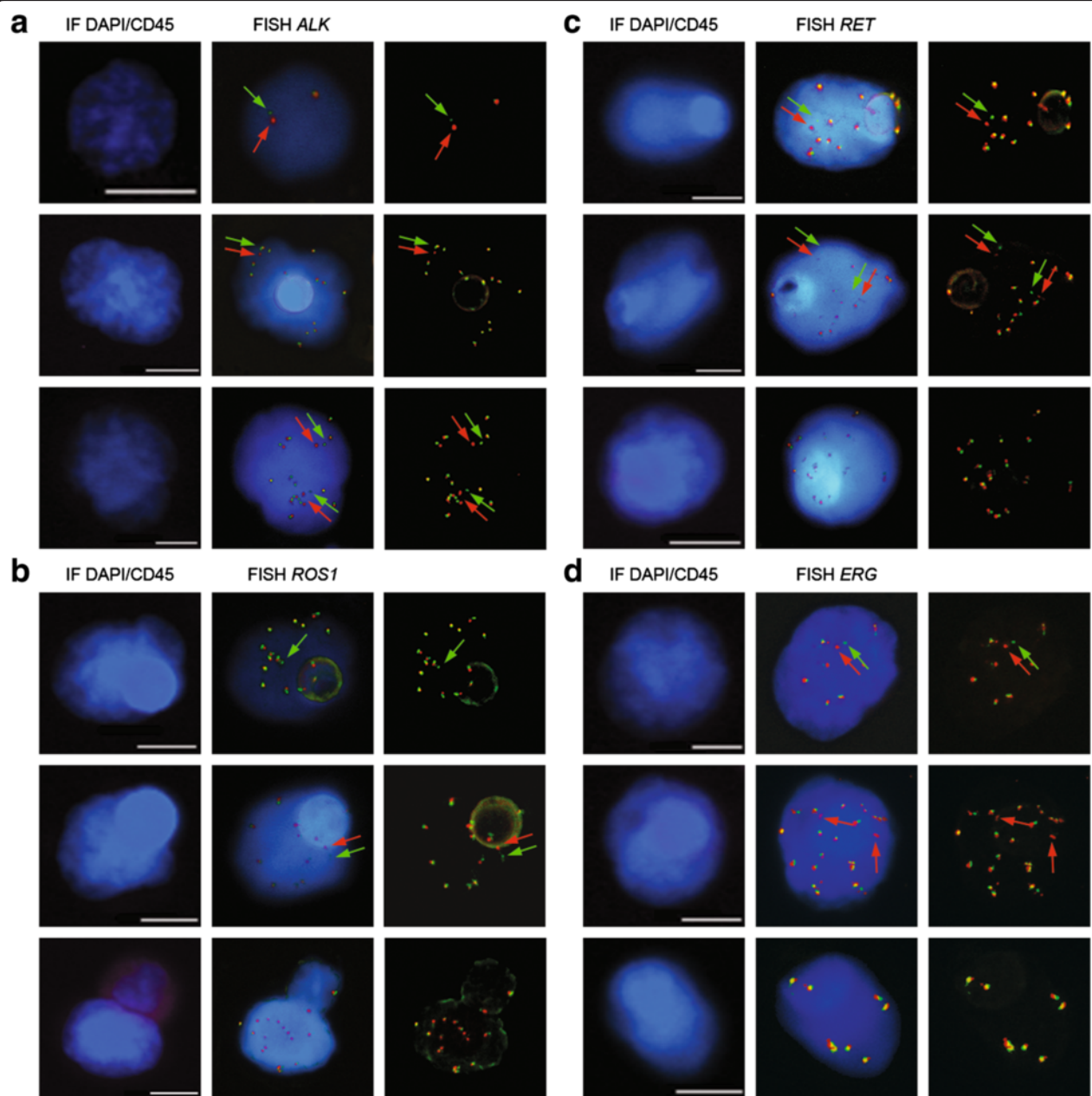


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Fig. 4** Detection of *ALK*-rearrangement and gain of *ALK*-native copies in CTCs from a patient with an *ALK*-rearranged tumor using the multi-exposure protocol. *ALK*-gene status was tested in filtration enriched-CTCs by combined fluorescent staining and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). FISH signals were captured with the multi-exposure protocol and 9 out of the 27 possibilities are shown. Images of best exposure level for red and green signals are framed in yellow. **a** Detection *ALK*-rearrangement. Green and red arrows indicate the break apart signal. **b** Detection of gain of *ALK*-native copies. Scale: white bars = 10  $\mu$ m



**Fig. 5** Examples of gene-rearrangement detection in filtration enriched-CTCs from NSCLC and mPCa patients by combined fluorescent staining and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). **a** Example of *ALK*-rearrangement detection in NSCLC patients with an *ALK*-rearranged tumor. **b** Example of *ROS1*-rearrangement detection in NSCLC patients with a *ROS1*-rearranged tumor. **c** Example of *RET*-rearrangement detection in NSCLC patients with a *RET*-rearranged tumor. **d** Example of *ERG*-rearrangement detection in mPCa patients with an *ERG*-rearranged tumor. Gene rearrangements are shown by green and red. Scale: white bars = 10  $\mu$ m

## Conclusions

While offering important advantages such as sensitivity of CTC capture and flexibility for CTC characterization, filtration systems have disadvantages that make the automation of microscopy challenging to implement. Manual analysis of filtration-enriched CTCs is time-consuming and highly operator-dependent for large scale analyzes and clinical validation of CTC filtration assays. Here we report a semi-automated microscopy method established to identify filtration-enriched CTCs from NSCLC and mPCa, and detect molecular biomarkers such as *ALK*-, *ROS1*- and *ERG*-rearrangements in CTCs. This method may help to improve reproducibility, reduce inter-operator difference and duration of filtration-enriched CTC assays. In addition, data issued from successive experiments may be gathered, further improving and refining CTC characterization. By increasing the feasibility and reliability of filtration-enriched CTC assays, the present method may be helpful to progress towards their standardization and validation. This will contribute to advancing these assays towards the clinic using a routine clinical test.

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Examples of gene rearrangement and gain/amplification detection in filtration enriched-cell lines by filter-adapted-FISH (FA-FISH). (A) Example of gene rearrangement detection. (B) Example of gain/amplification detection. Scale: white bars = 10  $\mu$ m. (TIF 8523 kb)

**Additional file 2: Table S1.** FISH spots detected per CTC in a patient with a *ROS1*-rearranged tumor depending on the step. (DOC 68 kb)

**Additional file 3: Table S2.** FISH spots per CTC of a patient with an *ERG*-rearranged tumor depending on the step. (DOC 63 kb)

## Abbreviations

AF, alexa fluor; *ALK*, anaplastic lymphoma kinase; APC, allophycocyanin; *AR*, androgen receptor; CK, cytokeratin; *c-MET*, MET proto-oncogene; CTC, circulating tumor cell; Cy5, cyanine 5; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, dulbecco/vogt modified eagle's minimal essential medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; EMT, epithelial-mesenchymal transition; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; *ERG*, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog; FA-FISH, filter-adapted-FISH; FDA, U.S. Food and Drug Administration; FGFR1, fibroblast growth factor receptor 1; *FIP1L1*, FIP1 like 1; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; FITC, fluorescein isothiocyanate; HCL, hydrogen chloride; IgG, immunoglobulin G; ISET, isolation by size of epithelial tumor cells; MB, multibay; mPCa, metastatic prostate cancer; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PBS, phosphate buffered saline; *PDGFRA*, platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide; *RET*, RET proto-oncogene; *ROS1*, c-ros oncogene 1; RPMI, roswell park memorial institute medium; TBS, tris- buffered saline

## Acknowledgements

We thank the patients and their families; Robert Sykes, Matthew Gorton and Karl Laczko (Leica Biosystems Richmond Inc) for helping in the semi-automated method development.

## Funding

EP is supported by the LabEx LERMIT (grant no ANR-10-LABX-0033-LERMIT) and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no FDT20150532072). The authors are grateful for the research support of the Fondation de France

(grant no 201300038317), the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant no 20131200417), Innovative Medicines Initiative 11<sup>th</sup> Call CANCER ID (IMI-JU-11-2013, 115749), Institut National du Cancer (PRT-K14-032) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-CE17-0006-01). CRL was supported by ESMO [translational research fellowship] with the aid of a grant from Hoffmann-La Roche. Any views, opinions, findings, conclusions, or recommendations expressed in this material are those solely of the author (s) and do not necessarily reflect those of ESMO or Hoffmann-La Roche. CRL is also a recipient for the grant DUERTECC/EURONCO (Diplôme Universitaire Européen de Recherche Translationnelle et Clinique en Cancérologie).

## Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are stored in Gustave Roussy lab archive directories named immunomonitorage srv-fs-01 and nas-01 for images.

## Authors' contributions

EP performed laboratory analysis, participated to Ariol development and data interpretation. MO performed laboratory analysis, participated to Ariol development and data interpretation. FB contributed to laboratory analysis. AG participated to Ariol development. NA validated FISH experiments. VF contributed to laboratory analysis. CLB contributed to fluorescence staining development. BB recruited NSCLC patients. YL recruited mPCa patients. MN was in charge of blood sample collection. MH participated to Ariol development. CRL was responsible for critical revision of the manuscript. JCS recruited NSCLC patients and contributed to the conception of the study. PV validated cytomorphological images patients and contributed to the conception of the study. FF conceived and supervised the study and the drafting of the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

## Author's information

We have no further relevant information about authors to include in this section.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

The IDRBC2008-A00585-50 study was approved by the Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), ethics committees (Ile de France VI, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière) and local institutional board. According to the protocol informed written consent for blood sample collection was obtained from all patients.

## Endnotes

Not applicable.

## Author details

<sup>1</sup>“Circulating Tumor Cells” Translational Platform AMMICA CNRS UMS3655–INSERM US23, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France. <sup>2</sup>INSERM U981 “Identification of Molecular Predictors and new Targets for Cancer Treatment”, F-94805 Villejuif, France. <sup>3</sup>Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>4</sup>Pathology Imaging, Leica Biosystems, F92737 Nanterre, France. <sup>5</sup>Department of Biopathology, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France. <sup>6</sup>Imaging and Cytometry Platform AMMICA CNRS UMS3655–INSERM US23, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France. <sup>7</sup>Department of Medicine, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France.

Received: 12 January 2016 Accepted: 27 June 2016

Published online: 14 July 2016

## References

1. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11:129–44.
2. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:448–56.



3. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009;139:1315–26.
4. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:623–31.
5. Allard WJ, Matera J, Miller MC, 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*. 2004;10:6897–904.
6. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:781–91.
7. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6302–9.
8. 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*. 2008;26:3213–21.
9. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:1556–63.
10. Farace F, Massard C, Vimond N, et al. A direct comparison of Cell Search and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer*. 2011;105:847–53.
11. Hou JM, Krebs M, Ward T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol*. 2011;178:989–96.
12. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, et al. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2011;105:1338–41.
13. Hayes DF, Walker TM, Singh B, et al. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol*. 2002;21:1111–7.
14. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*. 2008;359:366–77.
15. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2009;69:2912–8.
16. Leversha MA, Han J, Asgari Z, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:2091–7.
17. Ilie M, Long E, Butori C, et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2012;23:2907–13.
18. Pailler E, Adam J, Barthelemy A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:2273–81.
19. Ross K, Pailler E, Faugueroux V, et al. The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15:1605–29.
20. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26:1408–15.
21. Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*. 2000;156:57–63.
22. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*. 2007;253:180–204.
23. Young R, Pailler E, Billiot F, et al. Circulating tumor cells in lung cancer. *Acta Cytol*. 2012;56:655–60.
24. Desitter I, Guerrohahen BS, Benali-Furet N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res*. 2011;31:427–41.
25. Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, et al. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining. *BMC Cancer*. 2015;15:360.
26. Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the Cell Search ((R)) CTC test. *Cytometry A*. 2015;87:137–44.
27. Lin HK, Zheng S, Williams AJ, et al. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2010;16:5011–8.
28. De Wit S, Van Dalum G, Lenferink AT, et al. The detection of EpCAM (+) and EpCAM (-) circulating tumor cells. *Sci Rep*. 2015;5:12270.
29. Magbanua MJ, Puglia M, Lee JS, et al. A Novel Strategy for Detection and Enumeration of Circulating Rare Cell Populations in Metastatic Cancer Patients Using Automated Microfluidic Filtration and Multiplex Immunoassay. *PLoS ONE*. 2015;10, e0141166.
30. Hvichia GE, Parveen Z, Wagner C, et al. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer*. 2016;138:2894–904.
31. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*. 2011;17:827–35.
32. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol*. 2012;7:306–15.
33. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res*. 2011;9:997–1007.
34. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, et al. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R59.
35. Faugueroux V, Pailler E, Auger N, et al. Clinical Utility of Circulating Tumor Cells in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:281.
36. Hofman VJ, Ilie MI, Bonnetaud C, et al. Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method: promises and pitfalls. *Am J Clin Pathol*. 2011;135:146–56.
37. Hofman V, Ilie MI, Long E, 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 Cell Search Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer*. 2011;129:1651–60.

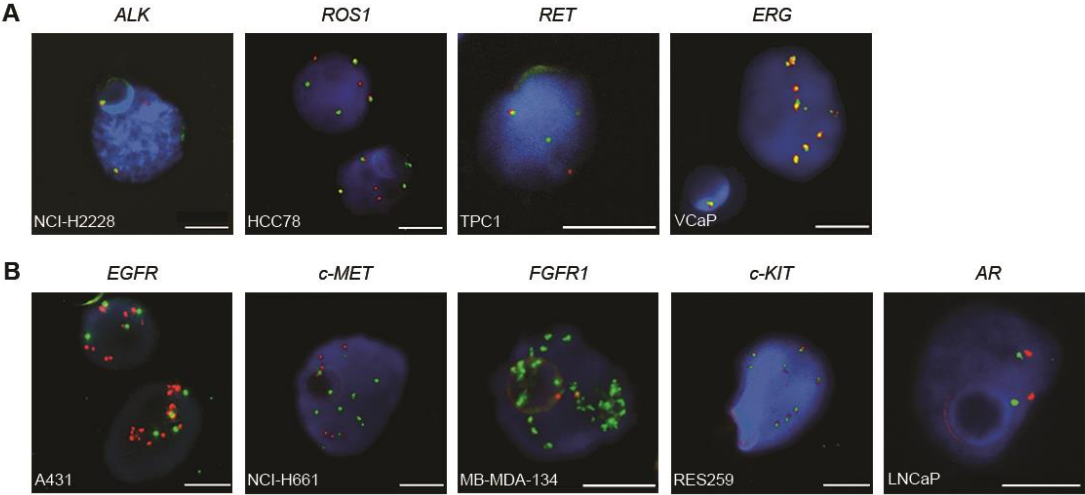
Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- 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](http://www.biomedcentral.com/submit)



**Supplementary Figure 1**



**Supplementary Table 1.** FISH spots detected per CTC in a patient with a *ROS1*-rearranged tumor depending on the step.

CTC ID	Number of FA-FISH spots			
	0.5 $\mu$ m	0.6 $\mu$ m	0.7 $\mu$ m	0.8 $\mu$ m
1	11	<b>30</b>	n.i.*	28
2	8	16	17	<b>26</b>
3	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
4	29	28	<b>30</b>	<b>30</b>
5	n.i.*	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
6	30	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>
7	26	<b>28</b>	<b>28</b>	26
8	27	<b>28</b>	<b>28</b>	22
9	53	62	61	<b>63</b>
10	29	<b>30</b>	29	28
11	19	<b>32</b>	n.i.*	<b>32</b>
12	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	n.i.*
13	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
14	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	12
15	<b>14</b>	13	<b>14</b>	12
16	10	<b>14</b>	<b>14</b>	n.i.*
17	<b>32</b>	<b>32</b>	31	31
18	<b>16</b>	<b>16</b>	n.i.*	<b>16</b>
19	<b>16</b>	<b>16</b>	13	12
20	<b>16</b>	<b>16</b>	15	15
21	12	<b>16</b>	n.i.*	10
22	25	25	<b>27</b>	26
23	8	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>
24	14	<b>15</b>	13	14
25	15	<b>28</b>	n.i.*	18
26	12	12	<b>13</b>	<b>13</b>
%**	<b>35%</b>	<b>77%</b>	<b>54%</b>	<b>42%</b>

Abbreviations: CTC, circulating tumor cell; FISH, fluorescence *in Situ* hybridization ; n.i., non-interpretable; *ROS1*, *c-ros oncogene 1*.

\* Number of FISH spots is uncountable due to non-optimal focus in the DAPI channel.

\*\* Percentage of cases where a higher number of FISH spots were observed.

The numbers in bold orange correspond to the highest number of spots for this CTC.

**Supplementary Table 2.** FISH spots per CTC of a patient with an *ERG*-rearranged tumor depending on the step.

CTC ID	Number of FA-FISH spots			
	0.5 $\mu$ m	0.6 $\mu$ m	0.7 $\mu$ m	0.8 $\mu$ m
1	28	<b>31</b>	27	20
2	26	<b>28</b>	<b>28</b>	27
3	32	<b>35</b>	28	25
4	50	<b>65</b>	53	n.i*
5	24	<b>26</b>	21	12
6	<b>23</b>	<b>23</b>	21	n.i.
7	12	<b>19</b>	13	17
8	<b>32</b>	<b>32</b>	30	30
9	17	16	<b>20</b>	18
10	<b>52</b>	<b>52</b>	46	28
11	27	<b>39</b>	28	n.i*
12	22	<b>27</b>	22	22
13	28	<b>34</b>	25	21
14	35	<b>38</b>	25	35
15	32	50	55	<b>62</b>
16	19	<b>23</b>	19	16
17	13	<b>16</b>	15	11
18	30	24	32	<b>34</b>
19	30	<b>32</b>	30	24
20	18	<b>30</b>	24	26
21	14	<b>20</b>	11	15
22	10	8	8	<b>12</b>
<b>%**</b>	<b>14%</b>	<b>82%</b>	<b>9%</b>	<b>14%</b>

Abbreviations: CTC, circulating tumor cell; *ERG*, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; n.i., non-interpretable.

\* Number of FISH spots is uncountable due to non-optimal focus in the DAPI channel.

\*\* Percentage of cases where a higher number of FISH spots were observed.

The numbers in bold orange correspond to the highest number of spots for this CTC.



### 3. Détection du remaniement de gène *ALK* dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules

#### Article 2. Detection of Circulating Tumor Cells Harboring a Unique *ALK* Rearrangement in *ALK*-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer

(*Journal of Clinical Oncology*, 2013 Jun 20;31(18):2273-81)

Emma Paillet, Julien Adam, Amélie Barthélémy, Marianne Oulhen, Nathalie Auger, Alexander Valent, Isabelle Borget, David Planchard, Melissa Taylor, Fabrice André, Jean Charles Soria, Philippe Vielh, Benjamin Besse, Françoise Farace

Publication reproduite avec l'autorisation de American Society of Clinical Oncology Ltd: *Journal of Clinical Oncology*, copyright 2013.

La seconde partie de mon projet avait pour objectif d'évaluer dans les CTC le biomarqueur de sensibilité au traitement chez des patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement *ALK*. En utilisant la méthode de FA-FISH et son analyse manuelle, ce travail a permis de montrer pour la première fois qu'il est possible d'identifier le remaniement *ALK* dans des CTC chez des patients atteints de CBNPC porteurs de ce remaniement. L'étude réalisée chez 32 patients atteints de CBNPC métastatiques (18 patients porteurs du remaniement dans la tumeur et 14 patients non porteurs du remaniement) a montré qu'avec un seuil de quatre CTC remaniées dans 1 mL de sang, notre méthode de FA-FISH *ALK* a une spécificité et une sensibilité de 100 % pour déterminer si un patient est porteur ou non du remaniement. Alors que les tumeurs peuvent présenter des remaniements de type « *break-apart* » (signaux vert et rouge (vert, côté centromérique 5' *ALK* ; rouge, côté télomérique 3' *ALK*) et/ou « rouge isolé » (signal rouge), j'ai observé que l'ensemble des CTC détectées chez ces patients ont uniquement un remaniement « *break-apart* ». En effet, aucune CTC présentant le remaniement « rouge isolé » n'a été retrouvée, y compris chez les patients présentant exclusivement ce remaniement dans la biopsie tumorale. Nous avons ré-analysé extensivement les tumeurs de ces patients et dans certains cas, nous n'avons pas retrouvé de remaniement « *break-apart* ». Ce résultat nous a amené à émettre l'hypothèse que les CTC présentant ce type unique de remaniement auraient pu acquérir des capacités migratoires et d'invasivité ; cette hypothèse nous a incités à analyser dans les CTC remaniées pour le gène *ALK*, l'expression de marqueurs de l'EMT classiquement utilisés. En utilisant l'approche combinée du quadruple marquage immunofluorescent et de la FA-FISH sur filtre, présentée dans la section Matériel & Méthode D.4 et rapportée dans la section Résultats A.2, nous avons observé chez six patients que les CTC remaniées pour le gène *ALK* présentent un phénotype mésenchymateux avec l'expression des marqueurs vimentine et N-cadhérine et l'absence de marqueurs épithéliaux. Les CTC

porteuses de cet unique remaniement *ALK* et d'un phénotype mésenchymateux pourraient résulter d'un fort processus de sélection et jouer un rôle dans la progression métastatique de ces patients.

Le suivi de la maladie sous traitement est actuellement difficilement réalisable du fait de la complexité de biopsier la tumeur à plusieurs reprises. Nous avons mis en évidence différentes sous-populations moléculaires de CTC avec des cellules présentant des gains de copies du gène *ALK* avec ou sans copie(s) remaniée(s) « *break-apart* », le nombre de copies pouvant être très élevé. Chez cinq patients nous avons montré qu'il est possible de suivre ces CTC sous crizotinib (*monitoring*). Ainsi, ce résultat permet d'envisager le suivi des CTC en tant que biomarqueur pharmacodynamique d'efficacité d'un traitement ainsi que l'étude des anomalies génomiques de résistance aux inhibiteurs de *ALK*.

## Detection of Circulating Tumor Cells Harboring a Unique *ALK* Rearrangement in *ALK*-Positive Non–Small-Cell Lung Cancer

Emma Paillet, Julien Adam, Amélie Barthélémy, Marianne Oulhen, Nathalie Auger, Alexander Valent, Isabelle Borget, David Planchard, Melissa Taylor, Fabrice André, Jean Charles Soria, Philippe Vielh, Benjamin Besse, and Françoise Farace

See accompanying editorial on page 2236

All authors: Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France.

Published online ahead of print at www.jco.org on May 13, 2013.

Supported by Pfizer France, by doctoral Grant No. ANR-10-LBX-0033 from the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (E.P.) and by the Institut Thématique Multi-Organismes Cancer and the Institut National du Cancer (J.A.).

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Françoise Farace, PhD, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vailant, 94805 Villejuif, France; e-mail: farace@igr.fr.

© 2013 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/13/3118w-2273w/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2012.44.5932

### A B S T R A C T

#### Purpose

The diagnostic test for *ALK* rearrangement in non–small-cell lung cancer (NSCLC) for crizotinib treatment is currently done on tumor biopsies or fine-needle aspirations. We evaluated whether *ALK* rearrangement diagnosis could be performed by using circulating tumor cells (CTCs).

#### Patients and Methods

The presence of an *ALK* rearrangement was examined in CTCs of 18 *ALK*-positive and 14 *ALK*-negative patients by using a filtration enrichment technique and filter-adapted fluorescent in situ hybridization (FA-FISH), a FISH method optimized for filters. *ALK*-rearrangement patterns were determined in CTCs and compared with those present in tumor biopsies. *ALK*-rearranged CTCs and tumor specimens were characterized for epithelial (cytokeratins, E-cadherin) and mesenchymal (vimentin, N-cadherin) marker expression. *ALK*-rearranged CTCs were monitored in five patients treated with crizotinib.

#### Results

All *ALK*-positive patients had four or more *ALK*-rearranged CTCs per 1 mL of blood (median, nine CTCs per 1 mL; range, four to 34 CTCs per 1 mL). No or only one *ALK*-rearranged CTC (median, one per 1 mL; range, zero to one per 1 mL) was detected in *ALK*-negative patients. *ALK*-rearranged CTCs harbored a unique (3'5') split pattern, and heterogeneous patterns (3'5', only 3') of splits were present in tumors. *ALK*-rearranged CTCs expressed a mesenchymal phenotype contrasting with heterogeneous epithelial and mesenchymal marker expressions in tumors. Variations in *ALK*-rearranged CTC levels were detected in patients being treated with crizotinib.

#### Conclusion

*ALK* rearrangement can be detected in CTCs of patients with *ALK*-positive NSCLC by using a filtration technique and FA-FISH, enabling both diagnostic testing and monitoring of crizotinib treatment. Our results suggest that CTCs harboring a unique *ALK* rearrangement and mesenchymal phenotype may arise from clonal selection of tumor cells that have acquired the potential to drive metastatic progression of *ALK*-positive NSCLC.

*J Clin Oncol* 31:2273-2281. © 2013 by American Society of Clinical Oncology

### INTRODUCTION

Non–small-cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 80% of lung cancers and remains a major cause of cancer death in developed countries.<sup>1</sup> A fusion gene between the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene and echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (*EML4*) was recently identified in 3% to 7% of unselected patients with NSCLC.<sup>2,3</sup> The discovery that the *EML4*-*ALK* fusion protein kinase was a potent oncogenic driver in NSCLC<sup>4-6</sup> fueled the rapid development of crizo-

tinib, a drug inhibitor of *ALK*,<sup>7,8</sup> and its accelerated approval by the US Food and Drug Administration for treating patients with advanced *ALK*-positive NSCLC.<sup>9,10</sup> Crizotinib was approved with a companion diagnostic test, the Vysis *ALK* Break Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). Detection of an *ALK* rearrangement is currently performed on small biopsies or fine-needle aspirates but is hindered by the limited tissue quantities available. Tumor tissue is difficult to obtain in patients with advanced/metastatic NSCLC for whom surgery is rarely a component of treatment. Finding

alternative and more effective means of diagnosing an *ALK* rearrangement is a critical issue for identifying patients with NSCLC who may benefit from treatment with crizotinib.

Circulating tumor cells (CTCs) may represent a noninvasive and easily accessible source of tumor material for assessing predictive molecular biomarkers and screening patients eligible for targeted treatments. Recent advances in technology have enabled significant progress in detecting CTCs.<sup>11</sup> By using the CellSearch platform (Veridex, Raritan, NJ), a method based on the detection of epithelial cells that express epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), CTC levels were observed to be prognostic in various metastatic solid tumors, including NSCLC and SCLC.<sup>12-16</sup> By using an enrichment technique based on blood filtration (ISET [isolation by size of epithelial tumor cells]), the prognostic value of CTCs was also reported in patients with resected NSCLC.<sup>17</sup> We and others have reported that larger numbers of CTCs are identified by using this technique compared with the CellSearch method in NSCLC,<sup>18-20</sup> most likely because CTCs that express markers of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and that have lost epithelial features can be missed by CellSearch. In this regard, CTCs expressing a mesenchymal phenotype were recently reported in patients with NSCLC.<sup>19,21,22</sup> Because the number of cells is critical for exploiting CTCs as predictive biomarkers of personalized treatments, we developed a fluorescent in situ hybridization (FISH) method on filters (filter-adapted FISH [FA-FISH]) that was optimized for high cell recovery. Our objective was to determine whether an *ALK* rearrangement could be detected in CTCs of patients with *ALK*-positive NSCLC by using this method.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

This study was approved by our institutional review board and local ethics committee. Informed written consent was obtained from all patients enrolled onto two clinical trials (IDRCB A2008-A00585-50 and IDRCB A2008-A00373-52). Peripheral blood samples were collected from all patients. An optional second sample was collected from patients undergoing crizotinib treatment (at day 30, 45, or 90, depending on patient visits).

### FISH Assay on Tumor Tissue

The dual-color FISH assay using the Vysis LSI *ALK* Break Apart Rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular) is described in the Data Supplement. The Vysis *ALK* Break Apart FISH Probe Kit consists of two probes adjacent to the 3' (red) and 5' (green) ends of *ALK*. In cells with a native *ALK* status, the overlapping of probes results in a fused (3'5', yellow) signal. The two characteristic *ALK*-rearrangement split patterns are the split of the 3' (red) and 5' (green) probes (a distance of more than two signal diameters is considered a split) or an isolated single or amplified 3' (red) signal. Signals were enumerated in at least 100 tumor nuclei, and FISH-positive cases were defined as those with more than 15% split or isolated signals.<sup>9,23</sup>

### Immunohistochemistry on Tumor Tissue

The immunohistochemistry and semiquantification of protein expression protocols are described in the Data Supplement.

### CTC Detection by CellSearch and Enrichment by ISET

CTC enrichment by ISET (Rarecells, Paris, France) was performed on 10 mL of blood as previously reported.<sup>16,20,24,25</sup> CTCs were enumerated by using CellSearch (Veridex) on 7.5 mL of blood as previously described.<sup>12-14,20</sup> Experimental approaches used to characterize CTCs on filters are detailed in the Data Supplement.

### FA-FISH Assay of Enriched CTCs on Filters

Each step of the FA-FISH method was optimized for highest cell recovery as described in the Data Supplement. Hybridization was performed by using

the Vysis LSI Dual Color *ALK* Break Apart Rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular). Filters were analyzed by trained experimenters (E.P., A.B., M.O.). The *ALK* status was validated by an experienced cytogenetician (N.A.). Immunofluorescent staining of filters was performed according to a method we previously established.<sup>22</sup> Monoclonal antibodies, imaging, cell lines, culture methods, and statistical analysis are described in the Data Supplement.

## RESULTS

### Detection of *ALK* Rearrangement in CTCs

Thirty-two patients with metastatic NSCLC, including 18 *ALK*-positive and 14 *ALK*-negative patients, were examined herein. All 18 *ALK*-positive patients were tested for an *ALK* rearrangement by using the US Food and Drug Administration–approved Vysis *ALK* Break Apart FISH Probe Kit in tumor biopsies of primary tumors (eight patients) or metastases (10 patients). The *ALK* rearrangement was identified by FISH in 17 patients, four of whom needed a second biopsy because initial FISH results were negative (< 15% rearranged cells) or not interpretable. For one patient (P8) with a negative FISH test, the *EML4-ALK* fusion transcript was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in the tumor specimen. The percentage of *ALK*-rearranged cells in tumor biopsies ranged from 25% to 97% in 17 of the 18 patients (median, 30%; Table 1). Among the 14 *ALK*-negative patients included, six patients had a *KRAS*-mutated adenocarcinoma, and nine patients had a *KRAS*-nonmutated adenocarcinoma or squamous cell carcinoma and a negative FISH test (Data Supplement). In blood samples, median values of zero CTCs per 7.5 mL (range, zero to 16 CTCs per 7.5 mL) were detected by CellSearch in *ALK*-positive and *ALK*-negative patients, respectively (Table 1; Data Supplement). By using blood filtration and FA-FISH, CTCs bearing an *ALK* rearrangement were detected in all 18 *ALK*-positive patients with a mean value of 11 CTCs per 1 mL and a median value of nine CTCs per 1 mL (range, four to 34 CTCs; Table 1; Fig 1; Data Supplement). All *ALK*-positive patients had four or more *ALK*-rearranged CTCs per 1 mL of blood (Table 1; Fig 1). No or only one *ALK*-rearranged CTC was detected in blood samples obtained from the 14 patients with *ALK*-negative NSCLC (mean, 0.64 CTCs per 1 mL; median, one CTC per 1 mL; range, zero to one CTC per 1 mL; Fig 1; Data Supplement). Receiver operating characteristic curve analysis indicated that a cutoff value of four *ALK*-rearranged CTCs per 1 mL blood had a sensitivity and a specificity of 100% (Fig 1). The concordance between CTCs and tumors quantified by the  $\kappa$  coefficient was 99.99%. Total CTCs and CTC subpopulations were identified in independent experiments by combining four-color immunofluorescent staining (cytokeratins/vimentin/CD45/4,6-diamidino-2-phenylindole [DAPI]) and cytomorphologic analysis (Data Supplement).<sup>22</sup> Mean and median percentages of *ALK*-rearranged CTCs were 63% and 57% (range, 28% to 100%), respectively, in *ALK*-positive patients and were 4% and 4% (range, 0% to 100%) in *ALK*-negative patients (Table 1; Data Supplement).

*ALK*-rearrangement patterns present within tumor specimens and also in CTCs of *ALK*-positive patients are described in Table 2. As is commonly observed, two types of split patterns were detected in tumors. Seven patients had a split of the red and green (3' and 5') signals. Five patients had isolated red signals, consisting of either a unique (3') or several (3'  $\geq$  2) red signals. Five other patients had both a split of the red and green signals and isolated red signals (Fig 2A). Each of these rearrangement patterns was detected in tumor cells

**Table 1.** Numbers and Percentages of *ALK*-Rearranged Cells in Tumors and in CTCs of *ALK*-Positive Patients

Patient	Sex	Age (years)	Smoking Status (No. of pack-years) <sup>a</sup>	CTCs					
				Tumor		Characterized by ISET			
				Biopsy Origin <sup>b</sup>	% of Rearranged Cells <sup>c</sup>	Rearranged CTCs (/1 mL)	% of Rearranged CTCs <sup>d</sup>	Total CTCs <sup>e</sup> (/mL)	CTC Counts by CellSearch (/7.5 mL)
P1	M	32	3	Node (MS)	97	9	56	16	0
P2	M	35	0	Pleura (MS)	47	9	53	17	0
P3	F	40	0	Pleura (MS)	30	5	50	10	2
P4	M	54	0	Pleura (MS)	30	4	44	9	N/A
P5	F	79	0	Lung (PT)	60	10	40	25	0
P6	F	69	0	Node (MS)	43	34	100	28 <sup>f</sup>	0
P7	M	69	20	Lung (PT)	27	7	28	25	16
P8	M	48	3.5	Pleura (MS)	RT-PCR+ <sup>g</sup>	24	96	25	12
P9	F	70	40	Lung (PT)	61	6	40	15	0
P10	M	53	0	Lung (PT)	30 <sup>h</sup>	7	41	17	6
P11	F	25	0	Lung (PT)	68	7	44	16	0
P12	F	44	12.5	Lung (PT)	29	9	90	10	0
P13	F	36	0	Node (PT)	77	4	57	7	1
P14	M	48	5	Pleura (MS)	62 <sup>i</sup>	11	65	17	0
P15	F	42	0	Lung (PT)	25 <sup>h</sup>	7	70	10	5
P16	F	52	0	Node (MS)	26 <sup>h</sup>	9	64	14	0
P17	F	42	10	Lung (PT)	25	11	100	10 <sup>f</sup>	0
P18	F	57	0	Node (MS)	28	25	100	18 <sup>f</sup>	0

Abbreviations: *ALK*, anaplastic lymphoma kinase; CTC, circulating tumor cell; F, female; ISET, isolation by size of epithelial tumor cells; M, male; MS, metastatic site; N/A, not available; PT, primary tumor; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

<sup>a</sup>All patients were former smokers or never-smokers (0).

<sup>b</sup>Tumor biopsy was obtained from either PT or MS.

<sup>c</sup>Percentage of rearranged tumor cells determined by FISH in tumor samples.

<sup>d</sup>Proportion of *ALK*-rearranged CTCs determined by FA-FISH (filter-adapted FISH) among total numbers of CTCs determined in independent experiments by combining four-color immunofluorescent staining with cytomorphologic examination.

<sup>e</sup>Total numbers of CTCs per milliliter were calculated as the mean of CTCs identified by combining four-color immunofluorescent staining with cytomorphologic examination in 3 × 1 mL of blood.

<sup>f</sup>In these three patients, numbers of *ALK*-rearranged CTCs were slightly greater compared with the total number of CTCs identified by phenotypic analysis. This difference is due to the fact that numbers of CTCs may differ between each spot of the filter.

<sup>g</sup>The biopsy was negative by FISH but positive by RT-PCR.

<sup>h</sup>Two tumor biopsies were analyzed: the first biopsy was negative (< 15% of rearranged cells) but the second biopsy was positive.

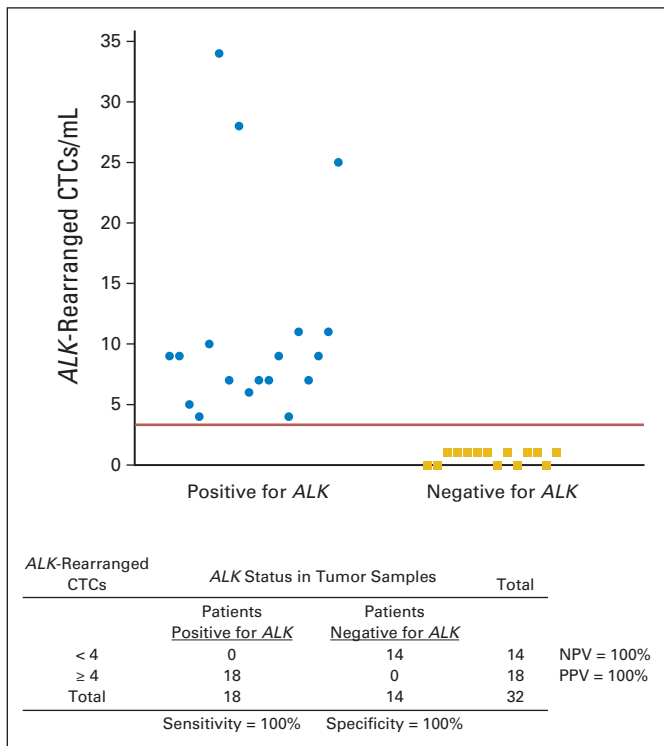
<sup>i</sup>FISH failed but *ALK* protein was detected by immunohistochemistry in the first biopsy. The second biopsy was positive by FISH.

presenting either a single (3'/5' or yellow signal) or several (3'/5' ≥ 2 or yellow signals) native copies of *ALK*, the latter corresponding to a gain of *ALK* copies. Tumor cells presenting only a gain of *ALK* copies were observed in seven patients. In contrast to that observed within tumors, the *ALK*-rearrangement pattern identified in CTCs consisted exclusively of the split of the red and green (3' and 5') signals (Table 2), which was associated with either a single copy or a gain of native *ALK* copies (Fig 2A). An isolated red signal pattern was never detected in CTCs. CTCs harboring this split pattern and a single native copy of *ALK* were observed as isolated cells or within clusters (Table 2; Fig 2A). CTC clusters had variable sizes and carried one or two *ALK*-rearranged CTCs, with other cells harboring two native *ALK* gene copies (normal status; Fig 2A). The nature of cells bearing a normal *ALK* status could not be formally identified by using only FA-FISH, although the large size of cells within these clusters is compatible with CTCs harboring a normal *ALK* status (Fig 2A). Furthermore, clusters carrying both CD45-positive hematopoietic cells and CTC(s) were also detected in experiments combining immunofluorescent staining and cytomorphologic analysis (Data Supplement). A few patients presented an important contingent of isolated CTCs harboring a gain of *ALK* copies (3'/5' ≥ 2; Table 2; Fig 2B). On the basis of total CTCs numbers, the number of *ALK*-rearranged CTCs, and the number of CTCs with gains of *ALK* copies, we estimated that CTCs harboring a

normal *ALK* status represented a non-negligible subset of CTCs ranging from 0% to 42% of total CTCs in half the patients examined (Data Supplement).

The presence of CTCs bearing this unique *ALK* rearrangement—the split of the red and green (3' and 5') signal—was particularly intriguing among patients who did not have this pattern within tumor specimens and only had red (3' or 3' ≥ 2) signals. For this reason, tumor specimens from four of these five patients were re-examined to determine whether a minor subset of tumor cells harboring a split of the red and green (3' and 5') rearrangement had been missed. In one patient (P2), a second area of rearranged cells bearing a red and green split signal or bearing isolated red signals was identified. This second area had initially not been sought since the threshold of 15% of *ALK*-rearranged cells had been obtained on initial examination. In patient P16, two rearranged cells with a split of the red and green signals were detected with a frequency less than 1/1,000 tumor cells after reanalysis. For the last two patients (P1, P9), no cells bearing the red and green split rearrangement were detected on second analysis. Overall, this unique *ALK*-rearrangement pattern was consistently detected in all patient CTCs, regardless of the frequency of cells harboring this rearrangement within the tumor specimen. These findings suggested that CTCs bearing this unique *ALK* rearrangement





**Fig 1.** Determination of the anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged circulating tumor cells (CTCs) optimal cutoff value in ALK-positive and ALK-negative patients. Top, prevalence of ALK-rearranged CTCs in ALK-positive and ALK-negative patients. Bottom, determination of the cutoff value for four ALK-rearranged CTCs per 1 mL blood by using receiver operating characteristic curve analysis. NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

may have acquired invasive and migratory properties that are lacking in tumor cells with other ALK-rearrangement patterns.

### Characterization of EMT Markers in ALK-Rearranged CTCs

This hypothesis prompted us to analyze the expression of EMT markers in ALK-rearranged CTCs. We established a two-step method that combined four-color immunofluorescent staining and FA-FISH. CTCs were stained on filters according to two distinct combinations of markers (vimentin/cytokeratins/CD45/DAPI or N-cadherin/E-cadherin/CD45/DAPI). Next, DAPI<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells were selected, analyzed, and precisely located on the filters. After performing FA-FISH, the FISH signals of DAPI<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells were analyzed, and both the immunofluorescent and FISH signals were precisely relocated. Cells from six patients (P7, P9, P13, P14, P16, P18) were assayed by combining immunofluorescent staining and FA-FISH. Positive controls resulted from spiking normal peripheral blood with the A549 lung cancer cell line (positive for both epithelial and mesenchymal markers; Fig 3A). Similar results were obtained in all six patients. As shown in Figures 3B and 3C, ALK-rearranged CTCs were positive for mesenchymal markers, vimentin and N-cadherin, with a moderate expression level that was significant but generally lower than that of hematopoietic cells. Cytokeratin markers were not detected in ALK-rearranged CTCs. Expressions of cytokeratins or of both cytokeratins and vimentin were detected in CTCs bearing a native ALK status in the one ALK-negative and six ALK-positive patients (Data Supplement). Although a strong E-cadherin expression was detected in the A549 cell

line (Fig 3A), this marker was undetectable in CTCs, including those positive for cytokeratins (data not shown).

### Characterization of ALK-Positive Tumors for Epithelial and Mesenchymal Marker Expression

The observation that ALK-rearranged CTCs expressed a mesenchymal phenotype led us to analyze tumor samples for epithelial and mesenchymal marker expression (Appendix Table A1, online only). All tumors (except those from P4 with a sarcomatoid carcinoma) had a prominently epithelial phenotype with moderate to strong expression of cytokeratins and E-cadherin. However, the expressions of epithelial and, more importantly, mesenchymal markers were not homogeneous between tumors. Tumors (from P7, P13, P14, P15, P18) with moderate expression of cytokeratins and E-cadherin harbored significant vimentin and N-cadherin expression. This finding could reflect different levels of EMT among tumors, as previously described in lung adenocarcinoma.<sup>27</sup> Thus, although ALK-rearranged CTCs appeared to have a homogeneous mesenchymal phenotype, tumor tissues presented greater heterogeneity for epithelial and mesenchymal marker expression.

In addition to the intertumor heterogeneity of epithelial and mesenchymal marker expression, we observed significant intratumor heterogeneity within biopsies. Examples are shown in Figure 4 for two representative patients bearing a prominent mesenchymal phenotype (P4) or a prominent epithelial phenotype (P17). Interestingly, a high expression of ALK protein correlated with areas that were negative for cytokeratins (P17) or in areas with lower cytokeratin and higher vimentin expression (P4). These data show that ALK-rearranged CTCs consistently harbored a mesenchymal phenotype, regardless of the level of mesenchymal marker expression within individual tumor specimens.

### Monitoring of ALK-Rearranged CTCs During Treatment With Crizotinib

ALK-rearranged CTCs were monitored in five patients at baseline and during crizotinib treatment. Three spots (3 × 1 mL) were analyzed per blood sample for quantitative analysis of ALK-rearranged CTCs. The levels of CTC subsets bearing different ALK pattern abnormalities are presented in the Data Supplement. These data mainly highlighted the heterogeneity of responses to crizotinib in CTC subsets. The levels of CTCs harboring an ALK rearrangement and a single ALK native copy (3'/5', 3' and 5') decreased to different degrees in four patients (P6, P8, P14, P18). Despite the small size of our cohort, these data show that monitoring quantitative and qualitative changes of CTCs bearing ALK abnormalities is possible in patients undergoing crizotinib therapy.

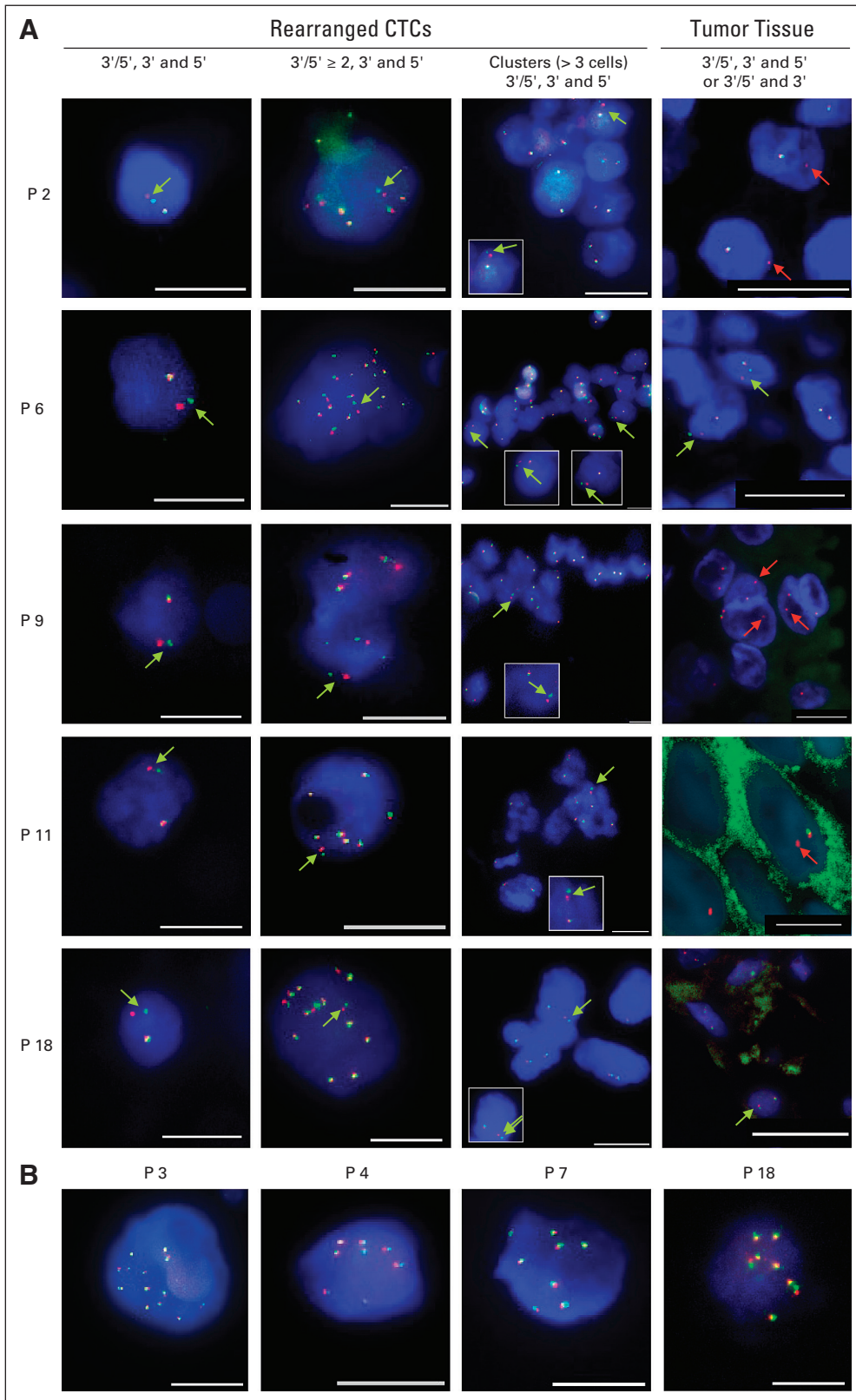
## DISCUSSION

By combining blood filtration and FA-FISH (a FISH assay optimized for CTC characterization), levels of four or more ALK-rearranged CTCs per 1 mL of blood were detected in all 18 ALK-positive patients tested, but no or only one ALK-rearranged CTC was detected in 14 ALK-negative patients. The cutoff value of four or more ALK-rearranged CTCs per 1 mL provided a sensitivity and a specificity of 100% for predicting the ALK-rearrangement status present within the tumors in our cohort. A threshold of 15% of ALK-rearranged cells,

**Table 2.** Description of ALK Rearrangement Patterns in Tumors and in CTCs

Patients	Tumor										CTCs									
	% of Rearranged Cells			Rearranged Cells*			Cells With Gain of ALK Copies (3'/5' > 2)				Total Rearranged CTCs (/1 mL)			Rearranged CTCs (/1 mL)			Only Gain of ALK Copies (/1 mL)			
	3'/5', 3' and 5'	3'/5' ≥ 2, 3' and 5'	3'/5', and 3'	3'/5', and 3' ≥ 2	3'/5' ≥ 2, and 3' ≥ 2	3'/5' ≥ 2, 3' ≥ 2, and 3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2	3' ≥ 2
P1	97	0	0	13	50	0	0	0	34	0	0	0	9	7	0	2	0	0	8	0
P2	47	0	0	47	0	0	0	0	0	0	0	0	9	5	3	1	0	0	1	0
P3	30	0	2	0	0	10	18	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	2	0
P4	30	8	22	0	0	0	0	54	0	0	0	4	3	0	1	0	0	3	0	0
P5	60	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	10	5	0	5	0	0	11	0	0
P6	43	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	34	22	10	2	0	0	1	0	0
P7	27	7	0	0	0	20	0	28	0	0	0	7	6	0	1	0	0	25	0	0
P8	RT-PCR+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	21	3	0	0	0	4	0	0
P9	61	0	0	48	8	5	0	0	0	0	0	6	4	1	1	0	0	5	0	0
P10	30	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	0	0	0	0	3	0	0
P11	68	0	0	41	0	19	8	0	0	0	0	7	5	1	1	0	0	4	0	0
P12	29	12	0	0	0	17	0	0	0	0	0	9	6	3	0	0	0	5	0	0
P13	77	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	1	0	0	0	0
P14	62	9	0	13	2	28	10	15	0	0	0	11	11	0	0	0	0	1	0	0
P15	25	25	0	0	0	0	0	13	0	0	0	7	5	2	0	0	0	0	0	0
P16	26	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	9	5	3	1	0	0	4	0	0
P17	25	25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	11	7	4	0	0	0	1	0	0
P18	28	8	0	20	0	0	0	2	0	0	0	25	17	4	4	0	0	1	0	0

Abbreviations: ALK, anaplastic lymphoma kinase; CTC, circulating tumor cell; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.  
\*Number of rearranged cells for 100 counted tumor cells.

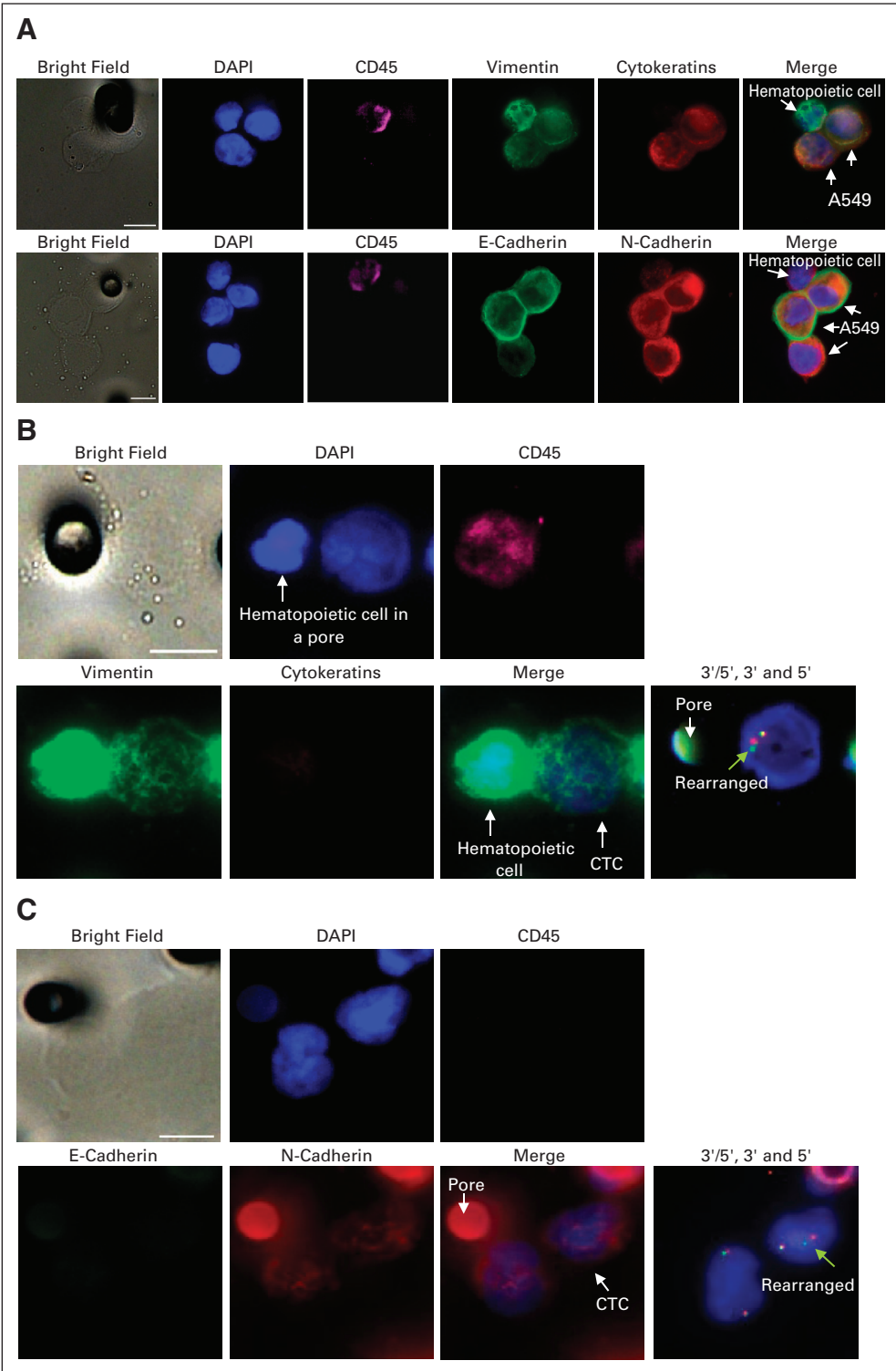


**Fig 2.** Detection of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene abnormalities in circulating tumor cells (CTCs) and tumor specimens of *ALK*-positive patients. (A) Examples of isolated or clusters of *ALK*-rearranged CTCs detected by filter-adapted fluorescent in situ hybridization (FISH) and of *ALK*-rearranged tumor cells in tumor specimens detected by FISH. Green arrows show an *ALK* rearrangement with a split 3' and 5' (red/green) signal. Red arrows show an *ALK* rearrangement with only the 3' signal. (B) Examples of isolated CTCs with a gain of native *ALK* copies. Scale: white bars correspond to 10  $\mu$ m.

which represents two standard deviations above the mean cell count in negative tumor samples,<sup>23</sup> is currently used to diagnose *ALK* rearrangement by FISH on paraffin-embedded tumor samples. Because of small CTC numbers in blood, we propose to use the number of

*ALK*-rearranged CTCs per volume of blood rather than the percentage of *ALK*-rearranged CTCs as a cutoff value for establishing the diagnosis of *ALK* rearrangement. Although further studies are needed to confirm our data in larger cohorts of *ALK*-positive and



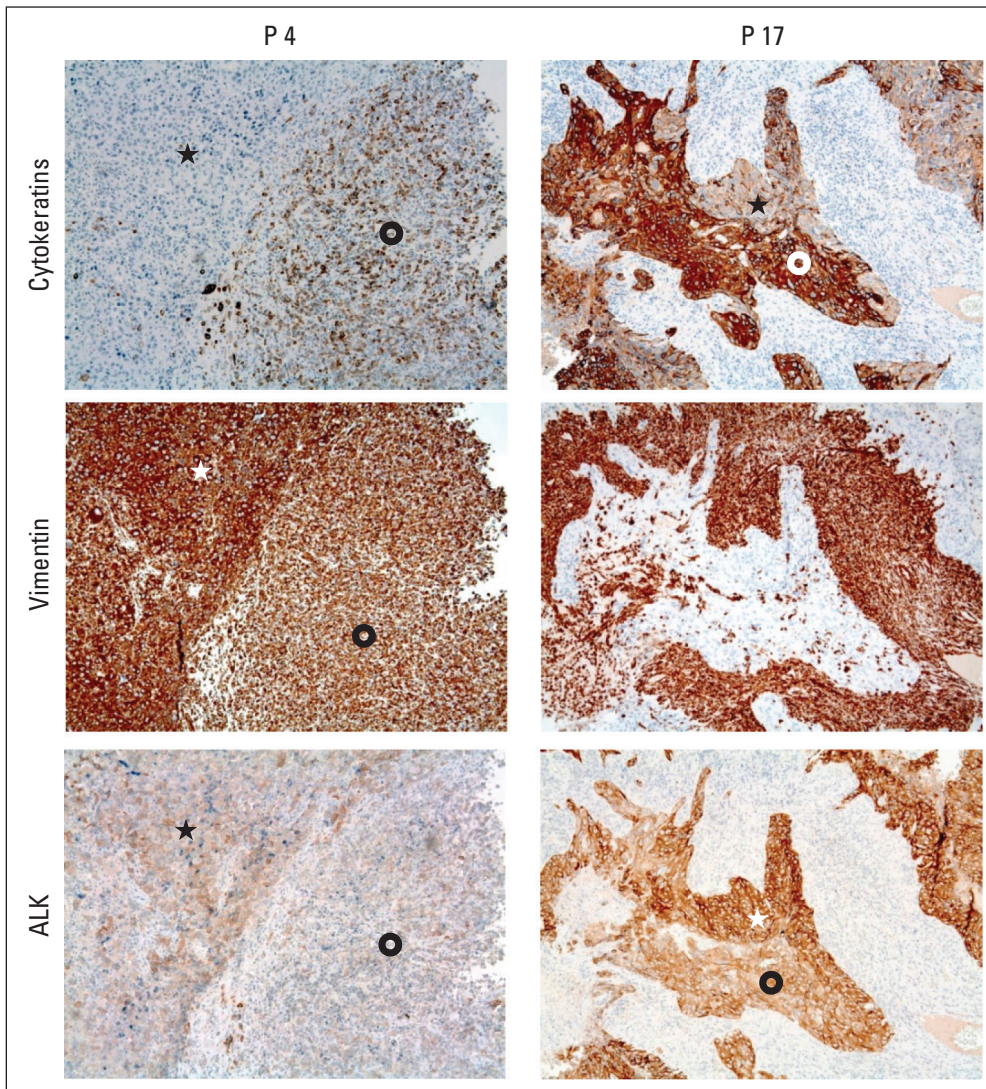


**Fig 3.** Epithelial mesenchymal transition marker detection in anaplastic lymphoma kinase (*ALK*)-rearranged circulating tumor cells (CTCs). (A) Positive control examples of four-color immunofluorescent staining (vimentin/cytokeratins/CD45/4,6-diamidino-2-phenylindole [DAPI] and N-cadherin/E-cadherin/CD45/DAPI) experiments. Positive controls resulted from having the A549 lung cancer cell line spiked into peripheral blood of a healthy patient. (B) Representative example of vimentin/cytokeratins/CD45/DAPI immunofluorescent staining of *ALK*-rearranged CTCs in an *ALK*-positive patient. (C) Representative example of N-cadherin/E-cadherin/CD45/DAPI immunofluorescent staining of *ALK*-rearranged CTCs in an *ALK*-positive patient. Pores are indicated. Green arrows show *ALK* rearrangement with a split 3' and 5' (red/green) signal. Scale: white bars correspond to 10  $\mu$ m.

*ALK*-negative patients and to establish definite cutoff values of *ALK*-rearranged CTCs, our study provides the first proof-of-concept that CTCs can be used for highly sensitive and highly specific diagnostic testing of *ALK* rearrangement in patients with NSCLC.

During EMT, epithelial carcinoma cells acquire a migratory phenotype and express mesenchymal genes, a prerequisite to tumor

infiltration and metastasis.<sup>28-30</sup> The remarkably homogeneous mesenchymal phenotype observed in *ALK*-rearranged CTCs contrasted with the heterogeneity observed between and within tumor specimens in terms of epithelial and mesenchymal marker expression. We also observed that heterogeneity in EMT marker expression correlated with *ALK* protein levels within the tumor specimens of two patients.



**Fig 4.** Intratumoral heterogeneity of cyto keratin and vimentin expression for two representative anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) -positive patients bearing either a prominent mesenchymal phenotype (P4) or a prominent epithelial phenotype (P17) and for whom *ALK* expression protein could be assessed by immunohistochemistry. P4 (sarcomatoid carcinoma): area (\*) shows no expression of cyto keratin, strong expression of vimentin, and strong expression of *ALK*; area (O) shows moderate expression of cyto keratins, moderate expression of vimentin, and low expression of *ALK*. P17 (solid adenocarcinoma): area (\*) shows low expression of cyto keratins, no vimentin, and stronger expression of *ALK* intermixed with area (O), which shows strong expression of cyto keratins, no vimentin, and low expression of *ALK*.

Our results support a role for *ALK* expression in EMT induction in NSCLC and suggest that *ALK*-rearranged CTCs could originate from particular foci of EMT related to *ALK* protein expression. Previously, NPM-*ALK* fusion protein was reported to promote the expression of TWIST1 and tumor cell invasiveness through activation of the NPM-*ALK* Stat3 signaling pathway.<sup>31</sup> In lung adenocarcinoma, inhibition of E-cadherin through the expression of TWIST1 is known to be key in regulating EMT and promoting invasive properties in tumor cells.<sup>28,29,32</sup> Taken together, our results support the hypothesis that downstream signaling pathways triggered by *ALK* tyrosine kinase activation could have a role in promoting invasiveness through EMT regulation in *ALK*-positive NSCLC tumor cells, thereby generating CTCs expressing a mesenchymal phenotype and migratory properties.

The most striking finding was the unique split pattern of *ALK* rearrangement consistently identified in CTCs despite the inter-tumoral heterogeneity of *ALK* rearrangements and the frequency of tumor cells harboring this rearrangement within tumors. Moreover, this unique *ALK*-rearrangement split pattern was detected in CTCs of patients for whom it was not identified within the tumor. Although a

single tumor biopsy sample might not be representative of the entire tumor, these results suggested that CTCs might originate from various metastatic sites. By reflecting the metastatic disease process, CTCs may be more informative of biomarker status than a single biopsy taken at a given time. This hypothesis could have important implications for developing personalized strategies. For patients with *ALK*-positive NSCLC, our results suggested that CTCs that harbor this unique *ALK* rearrangement and express a mesenchymal phenotype may result from the clonal selection of tumor cells that display migratory properties and higher invasive potential and may possibly contain highly metastatic cells, such as cancer stem cells or tumor-initiating cells. Finally, noninvasive molecular analyses performed on CTCs could be easily repeated at different time points during treatment to guide therapeutic decision making in a patient's treatment course. Our results suggest that serial evaluation of CTC subsets could be used to monitor response to crizotinib. Furthermore, CTC assessment could enable detection of resistance markers in *ALK*-positive NSCLC.

By demonstrating that *ALK* rearrangement can be reliably detected in CTCs of all patients with *ALK*-positive NSCLC, our study provides new and important perspectives for diagnosing *ALK*-positive



patients eligible for treatment with crizotinib or other ALK inhibitors and for monitoring the impact of these treatments. Our findings may offer new insights to the overall role of ALK-rearranged CTCs in metastatic progression resulting from the clonal selection of tumor cells undergoing EMT.

#### AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

*Although all authors completed the disclosure declaration, the following author(s) and/or an author's immediate family member(s) indicated a financial or other interest that is relevant to the subject matter under consideration in this article. Certain relationships marked with a "U" are those for which no compensation was received; those relationships marked with a "C" were compensated. For a detailed description of the disclosure categories, or for more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to the Author Disclosure Declaration and the Disclosures of Potential Conflicts of Interest section in Information for Contributors.*

#### REFERENCES

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90, 2011
- Pao W, Girard N: New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 12:175-180, 2011
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, et al: The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 8:11-23, 2008
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al: Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448:561-566, 2007
- Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al: Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 68:4971-4976, 2008
- Horn L, Pao W: EML4-ALK: Honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27:4232-4235, 2009
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al: Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363:1693-1703, 2010
- Scagliotti G, Stahel RA, Rosell R, et al: ALK translocation and crizotinib in non-small cell lung cancer: An evolving paradigm in oncology drug development. *Eur J Cancer* 48:961-973, 2012
- Shaw AT, Solomon B, Kenudson MM: Crizotinib and testing for ALK. *J Natl Compr Canc Netw* 9:1335-1341, 2011
- Camidge DR, Doebele RC: Treating ALK-positive lung cancer: Early successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 9:268-277, 2012
- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, et al: Circulating tumor cells (CTCs): Detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 35:463-474, 2009
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781-791, 2004

- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14:6302-6309, 2008
- 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* 26:3213-3221, 2008
- Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al: Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 29:1556-1563, 2011
- Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al: Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 30:525-532, 2012
- Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al: Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* 17:827-835, 2011
- Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al: Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 7:306-315, 2012
- Hofman V, Ilie MI, Long E, 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
- Farace F, Massard C, Vimond N, et al: A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 105:847-853, 2011
- Hou JM, Krebs M, Ward T, et al: Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* 178:989-996, 2011

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Conception and design:** Jean Charles Soria, Philippe Vielh, Françoise Farace

**Provision of study materials or patients:** Benjamin Besse

**Collection and assembly of data:** Emma Pailler, Julien Adam, Amélie Barthélémy, Marianne Oulhen, Nathalie Auger, Jean Charles Soria, Françoise Farace

**Data analysis and interpretation:** Emma Pailler, Julien Adam, Amélie Barthélémy, Marianne Oulhen, Nathalie Auger, Alexander Valent, Isabelle Borget, David Planchard, Melissa Taylor, Fabrice André, Benjamin Besse, Françoise Farace

**Manuscript writing:** All authors

**Final approval of manuscript:** All authors

**22.** Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, et al: Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 105:1338-1341, 2011

**23.** Ou SH, Bartlett CH, Mino-Kenudson M, et al: Crizotinib for the treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancer: A success story to usher in the second decade of molecular targeted therapy in oncology. *Oncologist* 17:1351-1375, 2012

**24.** Paterlini-Brechot P, Benali NL: Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 253:180-204, 2007

**25.** Vona G, Sabile A, Louha M, et al: Isolation by size of epithelial tumor cells: A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 156:57-63, 2000

**26.** Reference deleted

**27.** Chikaishi Y, Uramoto H, Tanaka F: The EMT status in the primary tumor does not predict post-operative recurrence or disease-free survival in lung adenocarcinoma. *Anticancer Res* 31:4451-4456, 2011

**28.** Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871-890, 2009

**29.** Polyak K, Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9:265-273, 2009

**30.** Mego M, Mani SA, Cristofanilli M: Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer: Clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 7:693-701, 2010

**31.** Zhang J, Wang P, Wu F, et al: Aberrant expression of the transcriptional factor Twist1 promotes invasiveness in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cell Signal* 24:852-858, 2012

**32.** Wang G, Dong W, Shen H, et al: A comparison of Twist and E-cadherin protein expression in primary non-small-cell lung carcinoma and corresponding metastases. *Eur J Cardiothorac Surg* 39:1028-1032, 2011

**Acknowledgment**

We thank the patients and their families as well as Michele Le Calve, PharmD, PhD, for helpful contributions in tumor sample evaluations; Marie-Charlotte Dessoliers and Virginie Marty for expert technical assistance; and Maud NgoCamus for helpful contributions as clinical research associate.

**Appendix****Table A1.** Epithelial and Mesenchymal Marker Expression in Tumor Tissue by Immunohistochemistry

Patients	Tumor Origin	Adenocarcinoma Subtype*	Cytokeratins	E-Cadherin	Vimentin	N-Cadherin
P4	Pleura (MS)	Sarcomatoid	– to ++	–	+ to +++	+ (FS)
P7	Lung (PT)	Solid	++	N/A	±	–
P9	Lung (PT)	Acinar and papillary	+++	++	–	–
P13	Node (MS)	Mucinous	++	++	± (FS)	±
P14	Pleura (MS)	Solid	++	++	+++	±
P15	Lung (PT)	Solid	++	+	++	±
P16	Node (MS)	Mucinous	+++	++	– to +	–
P17	Lung (PT)	Solid	± to ++	++ to +++	–	–
P18	Node (MS)	Mucinous	++	++	± (FS)	+ (FS)

Abbreviations: (–) negative; (±) weak staining in < 50% of tumor cells; (+) weak staining in > 50% of tumor cells; (++) moderate staining; (+++) strong staining; FS, focal staining; MS, metastatic site; N/A, not available; PT, primary tumor.

\*All tumor specimens were biopsies, and invasive adenocarcinoma subtype was determined according to International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification (Travis WD, et al: Proc Am Thorac Soc 8:381-385, 2011).

## Data Supplement

**Table S1.** Numbers and Percentages of *ALK*-Rearranged Cells in Tumor and in CTCs of *ALK*-Negative Patients.

Patients	Sex	Age	Smoking Status (No. of pack-year)	Tumor histology	Molecular status <sup>a</sup>	Biopsy Origin <sup>b</sup>	% of Rearranged Cells <sup>c</sup>	CTCs			CTCs Counts by CellSearch <sup>g</sup>
								CTCs Characterized by ISET			
								Rearranged CTCs (/1 ml)	% of Rearranged CTCs <sup>e</sup>	Total CTCs Identified <sup>f</sup> (/ml)	
PN1	F	42	0	Adenocarcinoma	<i>EGFR</i> (exon 20 in-frame duplication)	Lung (PT)	0%	0	0%	45	1
PN2	M	60	60	Adenocarcinoma	<i>ALK</i> amplification	Lymph node (MS)	0%	0	0%	26	1
PN3	M	67	35	Adenocarcinoma	<i>KRAS</i> (G12A)	Pleura (MS)	0%	1	0%	4	11
PN4	F	57	35	Adenocarcinoma	<i>KRAS</i> (G12C)	Suprarenal (MS)	NA	1	2%	42	3
PN5	M	76	52	Adenocarcinoma	<i>KRAS</i> (G12C)	Lymph node (MS)	NA	0	0%	13	3
PN6	F	53	20	Adenocarcinoma	<i>KRAS</i> (G13C)	Brain (MS)	IHC - <sup>d</sup>	1	5%	20	4
PN7	F	53	45	Adenocarcinoma	<i>KRAS</i> (S19E)	Lung (PT)	NA	1	3%	33	1
PN8	M	44	40	Adenocarcinoma	<i>KRAS</i> (G12C)	Bone (MS)	NA	0	0%	37	1
PN9	M	54	30	Squamous cell carcinoma	No mutation	Lung (PT)	0%	1	5%	20	0
PN10	M	59	40	Squamous cell carcinoma	<i>FGFR1</i> amplification	Brain (MS)	0%	1	5%	19	1
PN11	F	59	20	Squamous cell carcinoma	No mutation	Lung (PT)	0%	1	10%	10	1
PN12	M	66	100	Squamous cell carcinoma	<i>STK11</i> (missense mutation)	Lung (PT)	0%	1	4%	23	0
PN13	M	66	75	Squamous cell carcinoma	No mutation	Lung (PT)	0%	1	8%	12	1
PN14	M	75	60	Squamous cell carcinoma	No mutation	Lung (PT)	0%	1	6%	16	0

Abbreviations: A, alanine; *ALK*, anaplastic lymphoma kinase; C, cysteine; CTC, circulating tumor cell; E, glutamic acid; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; F, female; *FGFR1*, fibroblast growth factor receptor 1; G, guanine; IHC, immunohistochemistry; ISET, isolation by size of epithelial tumor cells; *KRAS*, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; M, male; MS, metastatic site; N/A, not available; PT, primary tumor; S, serine; *STK11*, serine/threonine kinase 11.

<sup>a</sup> Molecular status of genes frequently mutated or amplified in NSCLC.

<sup>b</sup> Tumor biopsy was obtained from either primary tumor (PT) or metastasis (MS).

<sup>c</sup> Percentage of rearranged tumor cells determined by FISH in tumor samples.

<sup>d</sup> FISH failed in the biopsy sample. The ALK protein was found negative by immunohistochemistry.

<sup>e</sup> Proportion of *ALK*-rearranged CTCs determined by FA-FISH (filter-adapted FISH) among total numbers of CTCs determined in independent experiments by combining four-color immunofluorescent staining with cytomorphologic examination.

<sup>f</sup> Total numbers of CTCs per milliliter were calculated as the mean of CTCs identified by combining four-color immunofluorescent staining with cytomorphologic examination in 3 x 1 mL of blood.

**Table S2.** Descriptive Statistic of Numbers of *ALK*-Rearranged CTCs in *ALK*-Positive Patients and *ALK*-Negative Patients.

<b>Status</b>	<b>No.</b>	<b>Label</b>	<b>Mean</b>	<b>Median</b>	<b>Standard Deviation</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Positive</b>	18	Rearranged CTCs	11.00	9.00	8.17	4.00	34.00
		Total CTCs	16.11	16.00	6.24	7.00	28.00
		% Rearranged CTCs	63%	57%	24%	28%	100%
<b>Negative</b>	14	Rearranged CTCs	0.64	1.00	0.50	0.00	1.00
		Total CTCs	22.86	20.00	12.35	4.00	45.00
		% Rearranged CTCs	4%	4%	3%	0%	10%

Abbreviations: *ALK*, Anaplastic Lymphoma Kinase; CTC, Circulating Tumor Cell

**Table S3.** Phenotypic Heterogeneity of CTC Subpopulations According to Cytokeratins and Vimentin Marker Expression in *ALK*-Positive Patients

Patients	Total CTCs (/ml) <sup>a</sup>	CTCs in clusters (/ml)	Phenotypic characterization <sup>b</sup>			
			DAPI+ Vimentin+ (/ml)	DAPI+ Cytokeratins+ (/ml)	DAPI+ Vimentin+ Cytokeratins+ (/ml)	DAPI+ $\geq 16 \mu\text{m}$ (/ml) <sup>c</sup>
P1	16	0	3	1	3	9
P2	17	3	4	1	1	8
P3	10	0	2	0	5	3
P4	9	0	2	0	5	2
P5	25	0	5	3	0	17
P6	28	10	5	1	0	12
P7	25	0	1	2	0	22
P8	25	3	8	0	12	2
P9	15	1	4	1	3	6
P10	17	0	3	2	0	12
P11	16	1	1	2	2	10
P12	10	3	0	1	2	4
P13	7	1	1	1	1	3
P14	17	0	5	0	1	11
P15	10	2	0	2	2	4
P16	14	3	2	3	3	3
P17	11	4	3	1	0	3
P18	18	4	5	2	0	7



Abbreviations: *ALK*, Anaplastic Lymphoma Kinase; *CTC*, Circulating Tumor Cell; *DAPI*, 4,6-diamidino-2-phenylindole.

<sup>a</sup> Total numbers of *CTCs* per milliliter were calculated as the mean of *CTCs* identified by combining four-color immunofluorescent staining with cytomorphologic examination in 3 x 1 mL of blood.

<sup>b</sup> *CTC* subpopulations were characterized by combining a four-color immunofluorescent staining with cytomorphological as previously reported.<sup>22</sup> Data are presented as the mean of 3 x 1 ml of blood.

<sup>c</sup> Large cells ( $\geq 16 \mu\text{m}$ ) negative for cytokeratin and vimentin markers and only positive for *DAPI* were consistently detected in all patients.

## Supplementary Methods

### Immunohistochemistry on Tumor Tissue

Immunohistochemistry was performed using a Ventana Benchmark autostainer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and standard procedures. Primary antibodies included anti-cytokeratins (clones AE1-AE3; 1:75; Diagnostics BioSystems, Pleasanton, CA, USA), anti-vimentin (clone V9; 1:200; Dako, Glostrup, Denmark), anti-E-cadherin (clone 4A2C7; 1:30; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-N-cadherin (clone 6G11; 1:30; Dako) and anti-ALK (clone 5A4; 1:50; Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK). Epithelial and mesenchymal protein expressions were scored semi-quantitatively based on the percentage and intensity of stained tumor cells (-: no staining, +/-: weak staining in less than 50% of cells, +: weak staining in more than 50% of cells, ++: moderate staining, +++: strong staining). ALK staining was considered positive when a diffuse cytoplasmic staining was observed in tumor cells, the intensity being variable between cases.

### Fluorescent *In Situ* Hybridization Assay on Tumor Tissue

For each biopsy, 5 µm paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and stained with Hematoxylin-Eosin-Safran for tumor tissue examination. An adjacent biopsy section was then submitted to dual-color FISH assay using Dako Pre-treatment Kit (Dako) and Vysis *ALK* Break Apart Rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) according to previously described protocols.<sup>34,35</sup> Signals were enumerated in at least 100 tumor nuclei using an epi-fluorescence microscope Eclipse Ti Nikon (Nikon Instrument Europe B.V., Surrey, England) with single interference filters for green (FITC), red (Texas red) and blue (4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI]) and a dual (red/green) band-pass filter. The commercial break apart probes consist of two probes that flank the highly conserved inversion breakpoint within *ALK*. In cells with a native status of *ALK*, the overlapping of the probes adjacent to the 3' (red) and 5' (green) ends of the gene results in a fused (3'5', yellow) signal. The *ALK*-rearrangement with a breakpoint at the 2p23 *ALK* region results in two characteristic split patterns: - one pattern is the split of the 3' (red) and 5' (green) probes (a distance greater than two signal diameters is considered as a split), - the second pattern consists in an isolated, unique or amplified red (3') signal. FISH-positive cases were defined as those with more than 15% split or isolated signals.<sup>9,23</sup>

### Filter Adapted - Fluorescent *In Situ* Hybridization Assay of Enriched CTC on Filters

Three experimental approaches were used to characterize CTCs on filters: (i) the first consisted in performing FA-FISH directly; (ii) the second in performing four-color immunofluorescent staining combined to cytomorphological examination in order to determine CTC counts (iii) and the third in evaluating EMT markers in *ALK*-rearranged CTCs by combining a four-color immunofluorescent staining approach with FA-FISH. ISET filters are composed of 10 spots. Each spot (corresponding to filtration of 1 ml of blood) was precisely cut out for independent analysis. Filters were thawed and individual spots were immobilized on glass slides using adhesive ribbon. Filters were incubated for 2 hours at room temperature in a solution of methanol: acetic acid (9:1) for optimized fixation and then digested with pepsin solution. Pepsin digestion conditions on filters were specifically

established for the Vysis LSI Dual Color *ALK* Break Apart Rearrangement Probe Kit (37°C, pepsin (Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, USA) at 10% in an HCL 0.01N). After washing with PBS 1X, filters were fixed at room temperature in a fixative solution containing formaldehyde (Sigma-Aldrich Corp.) and dehydrated using successive baths containing increasing concentrations of ethanol. Hybridization on filters was optimized for the the Vysis LSI Dual Color *ALK* Break Apart Rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular Inc.). Filters were co-denatured then hybridized in a dark humid chamber overnight at 44°C. After incubation, filters were washed in Stringent Wash Buffer 1X (Dako) and then with Wash Buffer 1X (Dako) and dehydrated again in successive ethanol solutions. Filters were finally mounted using DAPI Vectashield (Dako). FA-FISH signals were analysed either manually using an epi-fluorescence microscope Eclipse Ti Nikon, or an automated scanning Ariol system with a Leica DM6000 microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Cells were detected with a X100 magnification for a manual scan or with a X63 magnification for an automatic scan. Single interference filter sets for blue (DAPI), green (FITC), red (Texas red), and dual (red/green) band-pass filters were used. Images were analysed with the NIS-Elements software (Nikon Instrument Europe B.V, version 3.2) or with the 3.5 Ariol software (Leica Microsystems). Filters were analysed by trained experimenters (EP, AB, MO) and validated by an experienced cytogenetician (NA). FA-FISH method was established using serial dilutions of *ALK*-rearranged H2228 cell line spiked into peripheral blood samples of healthy individuals (Data Supplement S5).

### **Immunofluorescent Staining of Enriched CTC on Filters**

Immunofluorescent staining of filters was performed as previously reported.<sup>22</sup> Monoclonal antibodies included Alexa Fluor 488 conjugated anti-vimentin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), Alexa Fluor 488 conjugated anti-E-cadherin (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada), anti-pancytokeratins (Dako), anti-N-cadherin (BD Biosciences) and allophycocyanin-conjugated anti-CD45 (BD Biosciences). The anti-pancytokeratins (Dako) and the anti-N-cadherin antibodies were conjugated with Alexa Fluor 546 using Zenon Mouse IgG Labeling Kit (Invitrogen). The specificity of antibodies directed against vimentin, N-cadherin, cytokeratins and E-cadherin was carefully validated by FACS and fluorescent immunostaining on filters using a panel of cell lines with known mesenchymal or epithelial phenotype (Fig 3A; Data Supplement S6). Imaging was carried out either manually with the epi-fluorescence microscope Eclipse Ti Nikon with a X60 magnification or with the automatic Ariol system with X20 magnification. Pictures were treated with either the NIS-Elements software, the 3.5 Ariol software (Leica Microsystems) or the ImageJ software (NIH ImageJ, Version 1.45). For determining CTC counts, filters were stained with Mayer Hemalun at room temperature for 30 min after fluorescent imaging with X20 magnification. Then, filters were analysed by the automated Ariol system in order to relocate images obtained after cytological coloration within different phenotypical subpopulations. The determination of the total numbers of CTCs present on filters was carried out by combining immunofluorescence staining and cytomorphological examination in three spots per patient sample. For characterizing *ALK*-rearranged CTCs with EMT markers, a two-step method combining the four-color immunofluorescent staining and FA-FISH on filters was established. After four-color immunofluorescent staining, filters were

treated for FA-FISH as previously detailed. Finally, FISH signals were precisely relocated in phenotypically characterized CTCs with either the Nikon microscope with a X60 magnification or the automated ARIOL system with a X63 magnification.

### Cell Lines

The H2228 cell line was used for the development of FA-FISH (Data Supplement S6). A panel of epithelial and mesenchymal cell lines including MCF7 (breast carcinoma), Hela (cervix carcinoma) and A549 (lung carcinoma) was used to test the specificity of EMT markers (Fig 3A; Data Supplement S6). The H2228 and A549 cell lines were cultured in 1640 RPMI medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France), SK-BR-3, MDA-MB435S, Hela in DMEM medium (Life Technologies Corp., Grand Island, NY, USA), MCF7 in EMEM medium (ATCC, Manassas, VA, USA) supplemented 10% fetal bovine and maintained in a humidified incubator in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cell lines were spiked at various dilutions into blood from healthy donors and filtered as done for patient samples.

### Statistical Analysis

In order to differentiate between ALK-positive and ALK-negative patients, the optimal cutoff of *ALK*-rearranged CTC levels was evaluated using receiver operating characteristic (ROC) curve. Optimal cutoff levels of the number and the percentage of *ALK*-rearranged CTCs were determined by maximizing the sum of sensitivity plus specificity in terms of *ALK* status prediction. Concordance between tumor status and levels of *ALK*-rearranged CTCs (less or more than the cut-off) was determined by Cohen's kappa coefficient defined as  $\kappa = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$ , when  $p_o$  is the observed percentage agreement and  $p_e$  the expected percentage agreement.

### Supplementary References

33. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, *et al*: Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 13:R59, 2011
34. Hofman P, Ilie M, Hofman V, *et al*: Immunohistochemistry to identify *EGFR* mutations or *ALK* rearrangements in patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol*, 2011
35. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, *et al*: Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor *EML4-ALK*. *J Clin Oncol* 27:4247-53, 2009

## Legends for Supplementary Figures

**Figure S1.** Representative example of a cluster carrying hematopoietic cells and a CTC. Two CD45 positive cells together with a CTC expressing both cytokeratins and vimentin markers are shown.

**Figure S2.** Estimation of the percentages of CTC subsets according to anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) *ALK* status in the 18 *ALK*-positive patients. Numbers of CTCs harboring abnormal *ALK* patterns ( $3'/5' > 2$  or  $3'/5' \geq 2$ ,  $3'$  or  $5'$ ,  $3'/5' \geq 2$ ,  $3'$  and  $5'$ ) were determined using FA-FISH. Total numbers of CTCs were determined in independent experiments by combining four-color immunofluorescent staining (cytokeratins/vimentin/CD45/DAPI) and cytomorphologic analysis. The percentages of CTCs with a native status of *ALK* were estimated using the numbers of CTCs harboring abnormal *ALK* patterns and of total CTCs.

**Figure S3.** Marker detection in circulating tumor cells (CTCs) harboring a native anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene status. (A) Representative example of vimentin/cytokeratins/CD45/DAPI immunofluorescent staining allowing to identify a CTC expressing both cytokeratins and vimentin and harboring a native *ALK* status in an *ALK*-positive patient. (B) Representative example of vimentin/cytokeratins/CD45/DAPI immunofluorescent staining allowing to identify a CTC expressing only cytokeratins and harboring a native *ALK* status in an *ALK*-negative patient. Pores are indicated. Yellow arrows show fused  $3'5'$ *ALK*-native signals.

**Figure S4.** Levels of circulating tumor cells (CTCs) harboring different patterns of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) abnormalities detected before and during crizotinib treatment in five *ALK*-positive patients. Data are presented as the mean of values obtained from three spots (3 x 1 ml).

**Figure S5.** Detection of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*)-rearrangement in H2228 cell line on filters using filter-adapted fluorescent *in situ* hybridization (FA-FISH). H2228 cell line was spiked into peripheral blood sample from a healthy individual. Examples of *ALK*-rearrangement patterns and of gain of *ALK* gene copies present in H2228 cell line. Scale: white bars correspond to 10  $\mu$ m.

**Figure S6.** Detection of epithelial mesenchymal transition (EMT) markers on filters of HeLa and MCF7 cell lines spiked into peripheral blood of a healthy individual. Four-color immunofluorescent staining with monoclonal antibodies specific for vimentin, cytokeratins, CD45 and DAPI and for E-cadherin, N-cadherin, CD45 and DAPI experiments are shown. (A) HeLa cell line expressing mesenchymal markers.<sup>33</sup> (B) MCF7 cell line expressing epithelial markers.

**Fig S1.**

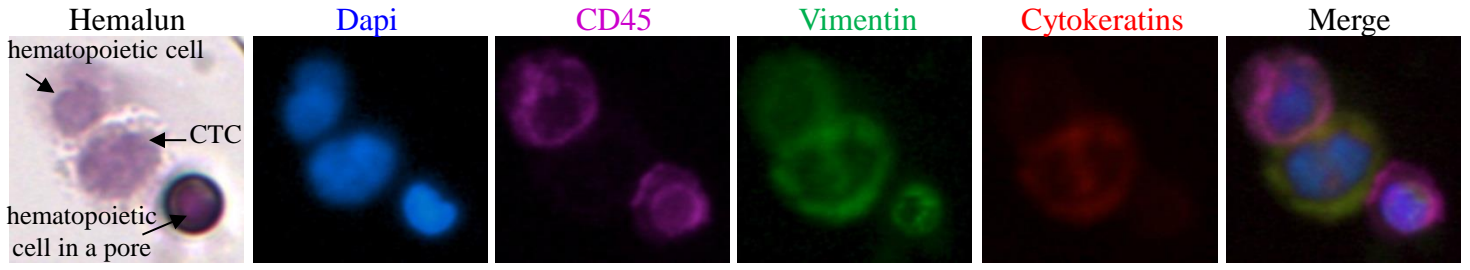
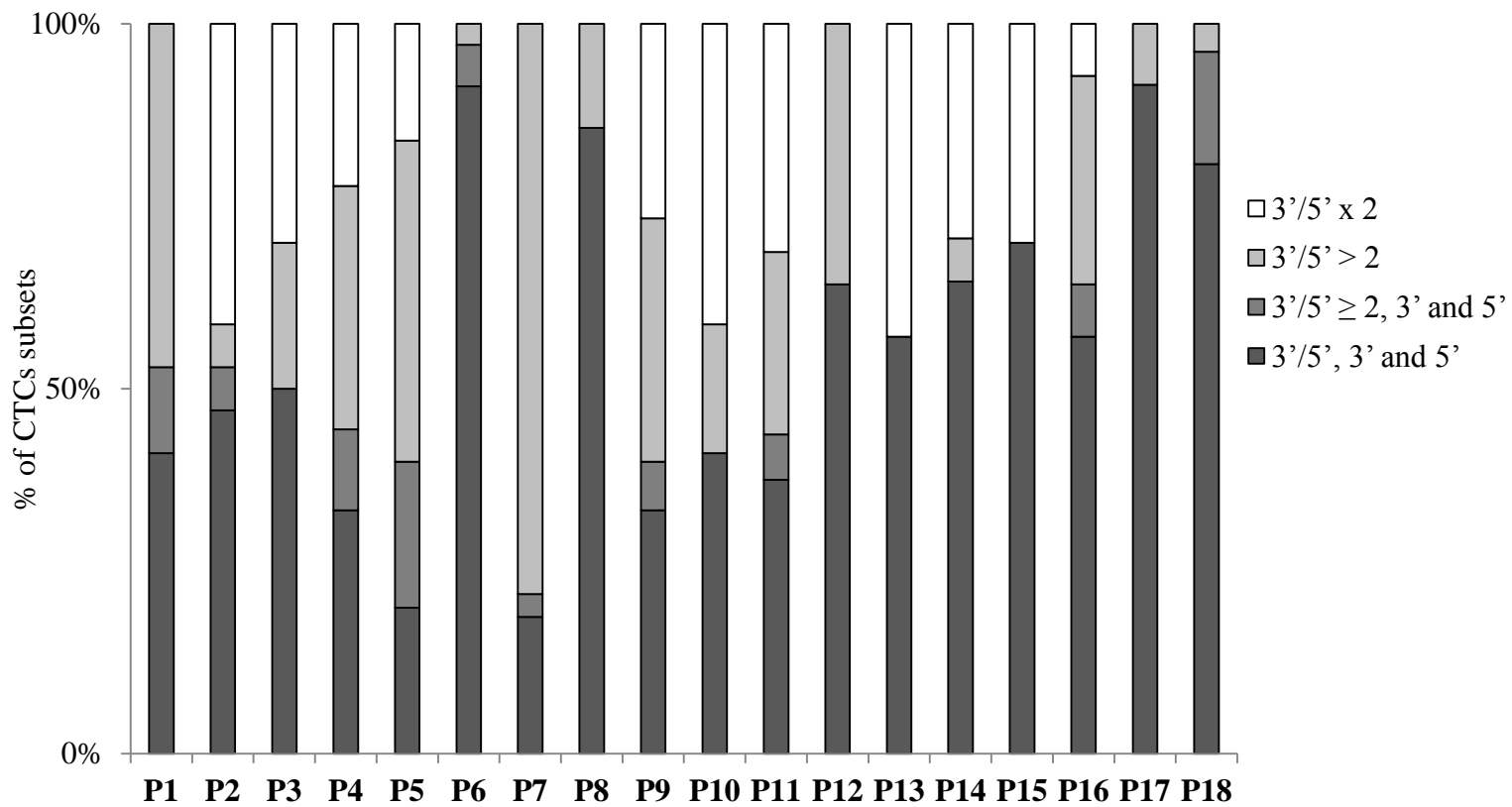


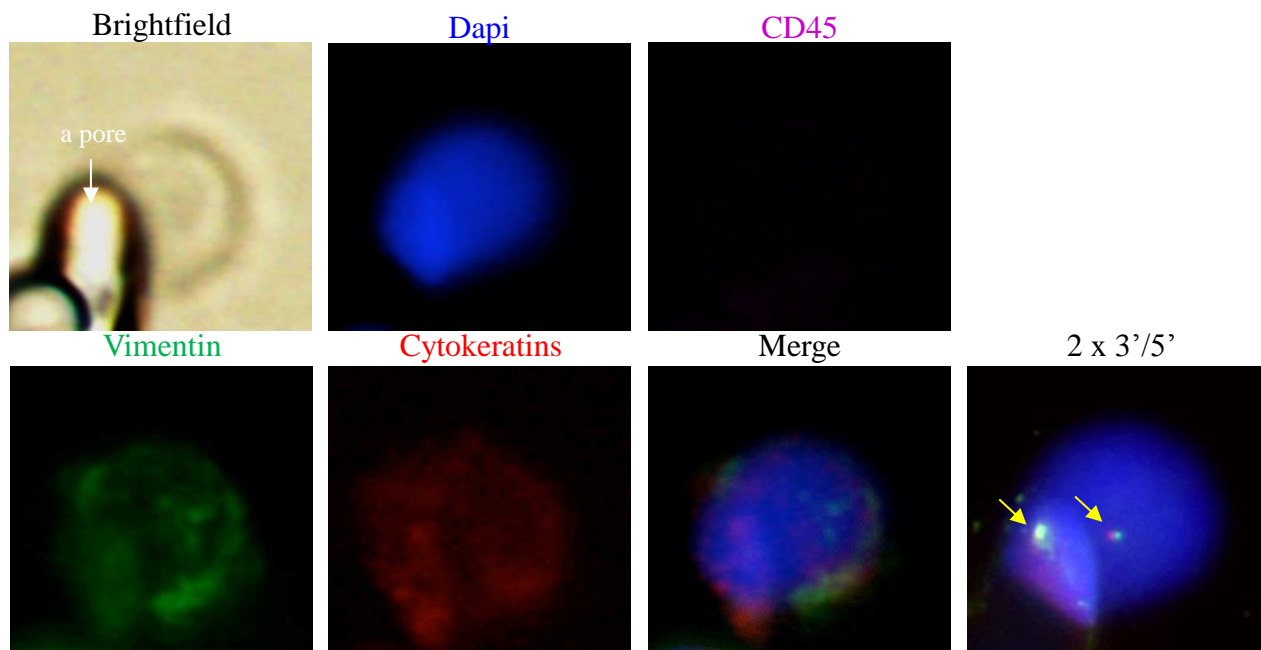
Fig S2.





**Fig S3.**

**A**



**B**

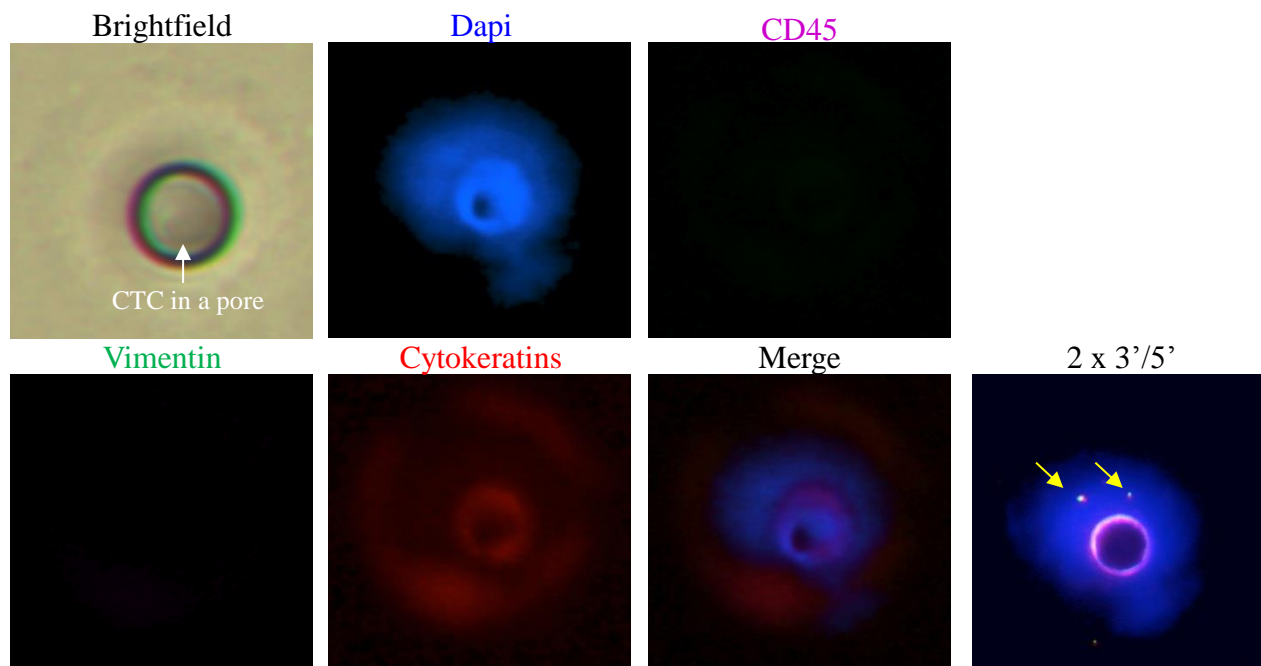


Fig S4.

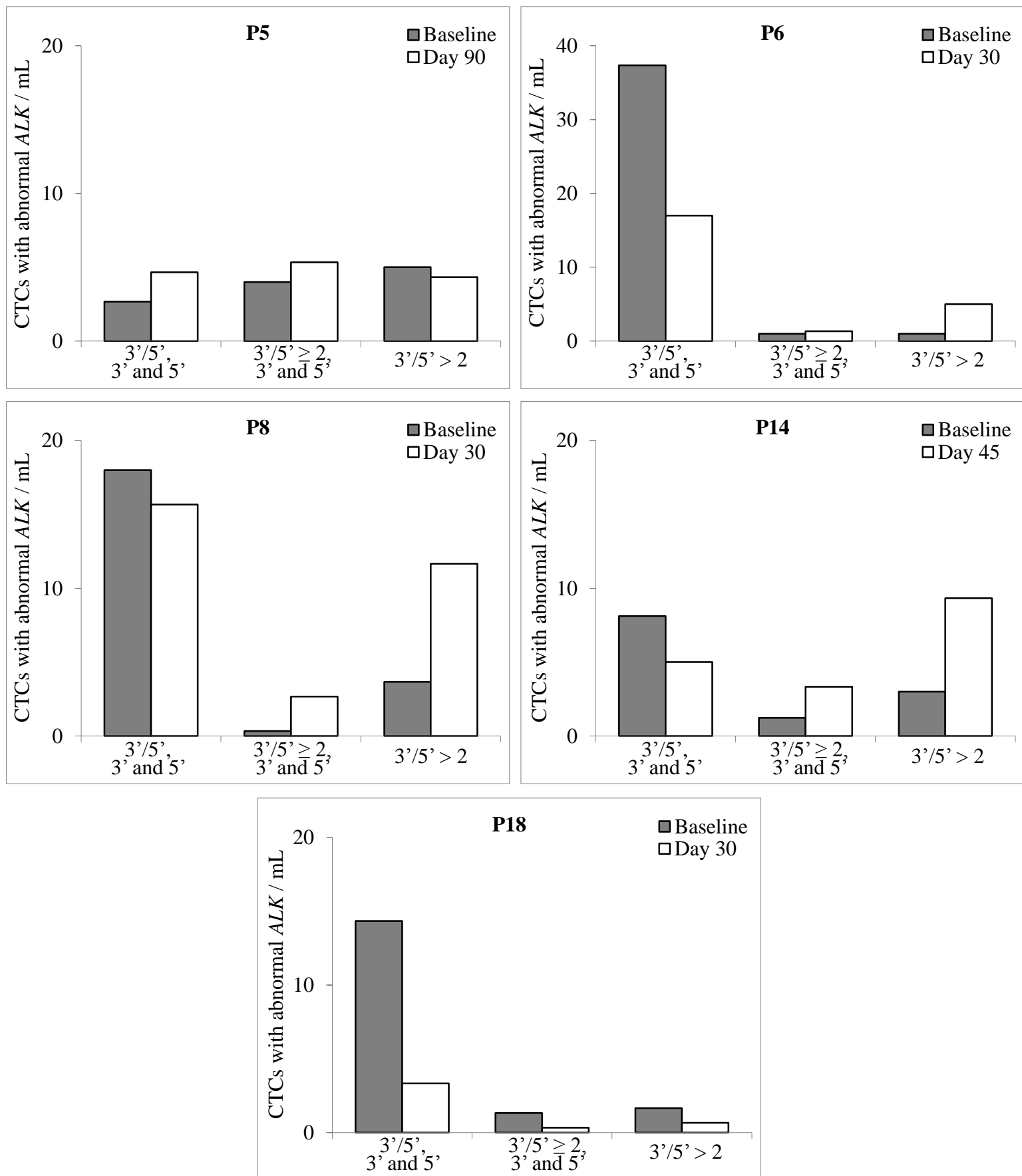


Fig S5.

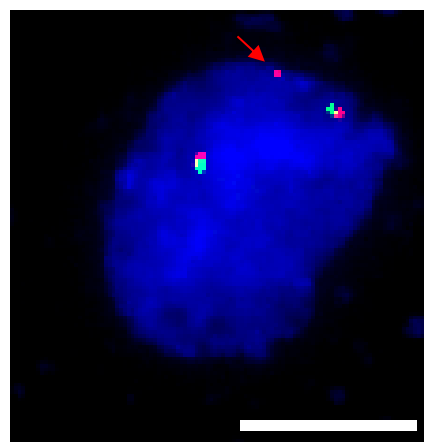
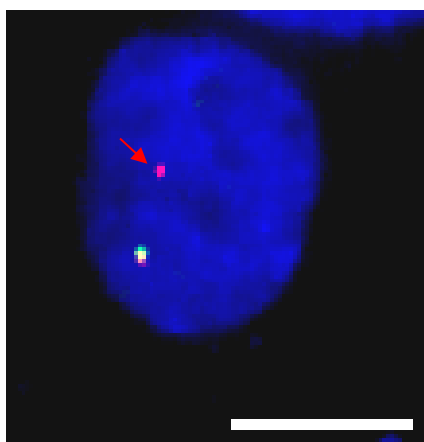
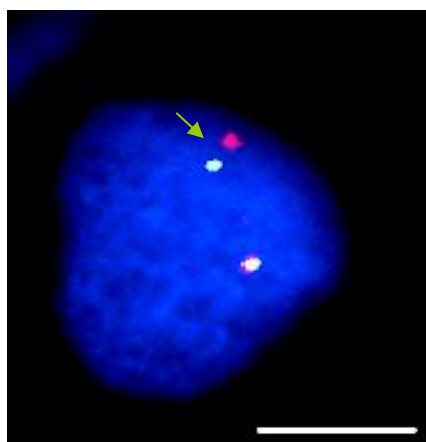
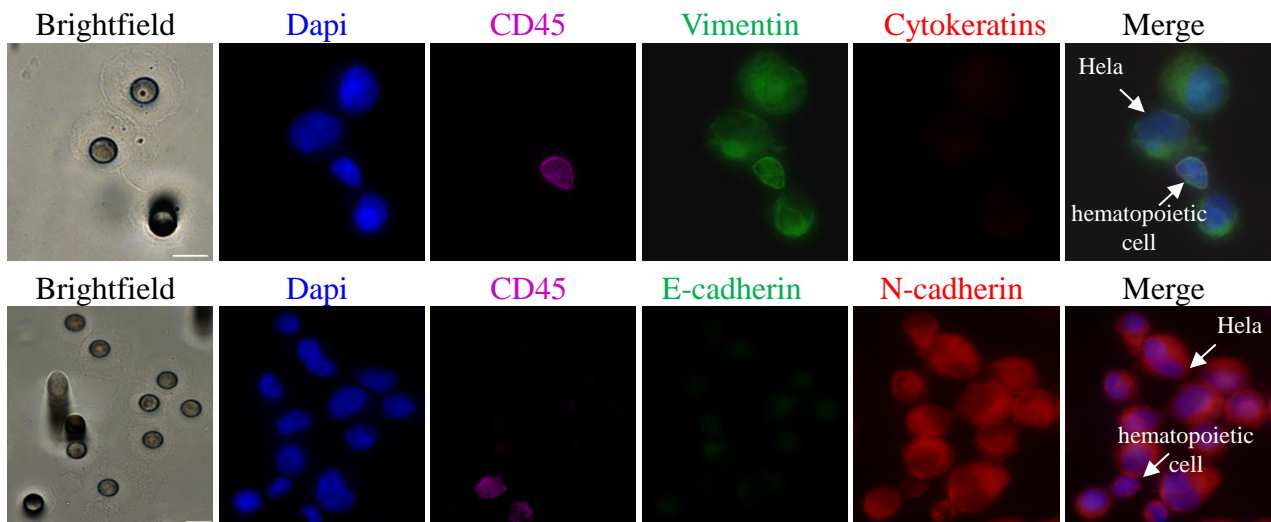
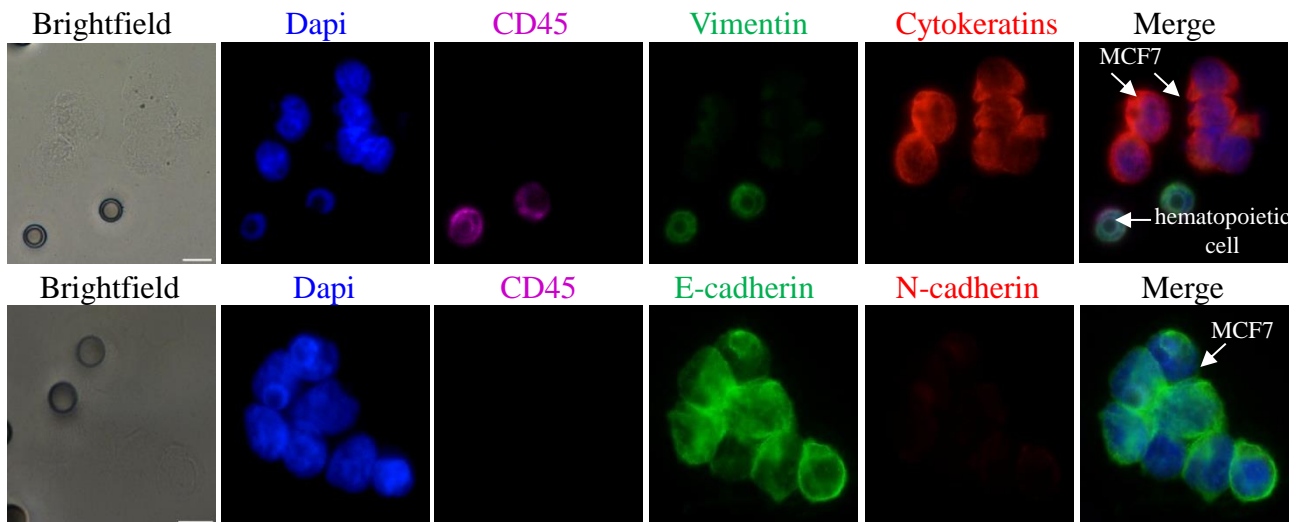
 $3'/5'$ ,  $3'$  and  $5'$  $3'/5'$ , and  $3'$  $3'/5' \geq 2$ , and  $3'$ 

Fig S6.

A



B



#### 4. Détection du remaniement de gène *ROS1* dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules

##### Article 3. High Level of Chromosomal Instability in Circulating Tumor Cells of *ROS1*-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer

(*Annals of Oncology*, 2015 Jul;26(7):1408-15)

Emma Pailler, Nathalie Auger, Colin R Lindsay, Philippe Vielh, Alan Islas-Morris-Hernandez, Isabelle Borget, Maud NgoCamus, David Planchard, Jean-Charles Soria, Benjamin Besse\*, Françoise Farace\*

Publication reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press Ltd: *Annals of Oncology*, copyright 2015.

A la suite du travail mené chez les patients *ALK* remanié (Résultats A.3), et en utilisant la même approche technologique présentée dans la section Matériel & Méthode D.4 et D.5 et rapportée dans la section Résultats A.2, j'ai recherché puis caractérisé chez quatre patients *ROS1* remanié dans la tumeur biopsiée (1 % à 2 % des CBNPC) les CTC présentant un remaniement ; j'ai également réalisé le suivi sous traitement de ces cellules. Lorsque nous avons commencé ce travail, le remaniement *ROS1* venait d'être très récemment rapporté dans les tumeurs de patients atteints de CBNPC et quatre patients avaient été diagnostiqués en quelques mois à Gustave Roussy. Nous avons souhaité saisir cette opportunité pour élargir et confronter notre méthode à la détection d'un autre remaniement. Pour les quatre patients *ROS1* remanié, la médiane de CTC remaniées pour ce gène dans 3 mL de sang est de 34,5 tandis que pour les patients négatifs elle est de 7,5 CTC (bruit de fond inhérent à l'approche de FISH et dépendant du type de sonde utilisé). Comme pour les patients *ALK* remanié, ce travail montre donc qu'il est possible d'utiliser les CTC pour détecter le remaniement du gène *ROS1*. J'ai compté précisément le nombre de copies natives et remaniées du gène *ROS1* dans chacune des cellules tumorales identifiées. Pour les trois patients présentant une réponse partielle ou une maladie stable, le nombre de copies du gène *ROS1* est significativement plus élevé dans les CTC en comparaison avec la tumeur biopsiée ( $p < 0,0001$ ). Ce nombre de copies *ROS1* (remanié ou non) révèle une plus forte hétérogénéité intratumorale dans les CTC que dans les cellules tumorales de la biopsie. J'ai également évalué l'effet du crizotinib sur les CTC. Le nombre de copies du gène *ROS1* dans les CTC remaniées augmente significativement chez deux patients présentant une progression tumorale ( $p < 0,05$ ) tandis qu'aucun changement n'est observé dans les CTC présentant uniquement des gains de copies natives du gène. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une forte aneuploidie pourrait être présente dans ces cellules. J'ai donc caractérisé l'instabilité chromosomique (CIN, *chromosomal instability*) numérique dans les CTC. Pour cela, j'ai mis au point une méthode de quantification de l'ADN (marquage nucléaire

stoechiométrique à l'aide du Hoechst 33342) et une approche de multi-FA-FISH avec le kit AneuVysion Multicolor DNA Probe. Ce dernier permet de dénombrer les chromosomes 13, 18, 21, X et Y. J'ai ainsi mis en évidence que les CTC présentant des anomalies du gène *ROS1* ont un fort contenu en ADN et des gains de chromosomes indiquant un haut niveau d'aneuploïdie et une CIN numérique de ces CTC. Ainsi, nous montrons que les CTC de patients *ROS1* remanié sont caractérisées par une grande hétérogénéité des anomalies *ROS1* et une CIN numérique élevée ce qui pourraient potentiellement être un mécanisme d'échappement aux inhibiteurs de *ROS1* tel que le crizotinib.

- advanced non-small-cell lung cancer: results of a west Japan oncology group study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 5240–5246.
21. Horinouchi H, Kubota K, Itani H et al. Short hydration in chemotherapy containing cisplatin ( $\geq 75$  mg/m<sup>2</sup>) for patients with lung cancer: a prospective study. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43: 1105–1109.
22. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3543–3551.

*Annals of Oncology* 26: 1408–1415, 2015  
doi:10.1093/annonc/mdv165  
Published online 6 April 2015

## High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of *ROS1*-rearranged non-small-cell lung cancer

E. Pailler<sup>1,2</sup>, N. Auger<sup>3</sup>, C. R. Lindsay<sup>1,2</sup>, P. Vielh<sup>1,2,3</sup>, A. Islas-Morris-Hernandez<sup>2</sup>, I. Borget<sup>4</sup>, M. Ngo-Camus<sup>5</sup>, D. Planchard<sup>5</sup>, J.-C. Soria<sup>1,5</sup>, B. Besse<sup>5,†</sup> & F. Farace<sup>1,2,†\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U981 "Identification of Molecular Predictors and new Targets for Cancer Treatment", University of Paris-Sud XI, Gustave Roussy, Villejuif; <sup>2</sup>Translational Research Laboratory, Gustave Roussy, Villejuif; <sup>3</sup>Biopathology; <sup>4</sup>Biostatistics and Epidemiology; <sup>5</sup>Medicine, Gustave Roussy, Villejuif, France

Received 26 November 2014; revised 17 February 2015; accepted 16 March 2015

**Background:** Genetic aberrations affecting the *c-ros oncogene 1 (ROS1)* tyrosine kinase gene have been reported in a small subset of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC). We evaluated whether *ROS1*-chromosomal rearrangements could be detected in circulating tumor cells (CTCs) and examined tumor heterogeneity of CTCs and tumor biopsies in *ROS1*-rearranged NSCLC patients.

**Patients and methods:** Using isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) filtration and filter-adapted-fluorescence *in situ* hybridization (FA-FISH), *ROS1* rearrangement was examined in CTCs from four *ROS1*-rearranged patients treated with the *ROS1*-inhibitor, crizotinib, and four *ROS1*-negative patients. *ROS1*-gene alterations observed in CTCs at baseline from *ROS1*-rearranged patients were compared with those present in tumor biopsies and in CTCs during crizotinib treatment. Numerical chromosomal instability (CIN) of CTCs was assessed by DNA content quantification and chromosome enumeration.

**Results:** *ROS1* rearrangement was detected in the CTCs of all four patients with *ROS1* rearrangement previously confirmed by tumor biopsy. In *ROS1*-rearranged patients, median number of *ROS1*-rearranged CTCs at baseline was 34.5 per 3 ml blood (range, 24–55). In *ROS1*-negative patients, median background hybridization of *ROS1*-rearranged CTCs was 7.5 per 3 ml blood (range, 7–11). Tumor heterogeneity, assessed by *ROS1* copy number, was significantly higher in baseline CTCs compared with paired tumor biopsies in the three patients experiencing PR or SD ( $P < 0.0001$ ). Copy number in *ROS1*-rearranged CTCs increased significantly in two patients who progressed during crizotinib treatment ( $P < 0.02$ ). CTCs from *ROS1*-rearranged patients had a high DNA content and gain of chromosomes, indicating high levels of aneuploidy and numerical CIN.

**Conclusion:** We provide the first proof-of-concept that CTCs can be used for noninvasive and sensitive detection of *ROS1* rearrangement in NSCLC patients. CTCs from *ROS1*-rearranged patients show considerable heterogeneity of *ROS1*-gene abnormalities and elevated numerical CIN, a potential mechanism to escape *ROS1*-inhibitor therapy in *ROS1*-rearranged NSCLC tumors.

**Key words:** *ROS1*-rearranged non-small-cell lung cancer, circulating tumor cells, filtration enrichment, FA-FISH, predictive biomarker

### introduction

Lung cancer is the leading global cause of cancer death, with non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients accounting for ~80% of its cases. A new paradigm for NSCLC treatment

\*Correspondence to: Dr Françoise Farace, University of Paris-Sud XI, INSERM U981, Translational Research Laboratory, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France. Tel: +33-1-42-11-51-98; E-mail: francoise.farace@gustaveroussy.fr

<sup>†</sup>Both authors contributed equally to the study.

recently emerged with the discovery of molecularly defined subsets of patients who can be treated effectively by therapies targeted to a specific driver gene [1, 2]. Small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) tailored for oncogenic ‘driver’ alterations have shown unprecedented success in molecularly selected NSCLC patients harboring *epidermal growth factor receptor* (*EGFR*) mutations (EGFR TKI: gefitinib, erlotinib, and afatinib), or *anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*) fusion gene (ALK TKI: crizotinib, alectinib, ceritinib) [3, 4].

*C-ros oncogene 1* (*ROS1*) fusion genes have recently been identified in ~1% of NSCLC [5, 6]. Rearrangement leads to fusion of the *ROS1* gene on chromosome 6 with a number of different genetic partners, a process that can drive cellular transformation and constitutive *ROS1* kinase activity [7]. *ROS1*-rearranged NSCLCs have been associated with adenocarcinoma histology, never smokers, and younger patient age at diagnosis—clinical features that are also associated with *EGFR/ALK* genetic modifications [5]. It has also been reported that patients with *ROS1*-rearranged NSCLC can benefit from crizotinib therapy; clinical trials are ongoing in this population to evaluate this further [6, 8].

Patient genotyping and eligibility for targeted treatment is currently identified using tumor biopsy, a process that can be limited by small sample size and technical difficulties with biopsy. A single biopsy sample may also not reflect the genetic diversity of a patient’s tumor [9]. Recent pioneering studies have shown differences in tumor mutational profiles within distinct regions of the primary tumor and respective metastases, demonstrating intratumor heterogeneity in both space and time [9]. The development of efficient, noninvasive methods to identify molecular alterations and biomarkers of tumor heterogeneity will be a key future challenge which circulating tumor cells (CTCs) have the potential to exploit.

CTCs migrate from primary tumor or metastatic sites and are an easily accessible, noninvasive source of tumor material [10–12]. Molecular characterization of CTCs can shed light on tumor heterogeneity, genomic diversity of metastatic disease, and underlying oncogenic alterations, thereby serving as a predictive biomarker of drug sensitivity [13]. Using the CellSearch platform, a method based on detecting EpCAM-positive epithelial cells, CTC levels were shown to have prognostic significance in several metastatic tumors, including NSCLC [14–16]. A few studies have demonstrated the feasibility of CTC assays for predictive biomarker detection and, previously, we and another group reported the detection of *ALK* rearrangement in CTCs enriched by filtration in *ALK*-positive NSCLC patients [17, 18]. Currently, the genomic heterogeneity of CTCs remains poorly characterized. Numerical chromosomal instability (CIN) is a type of genomic instability which is defined by a high rate of gain/loss of whole chromosomes, or fractions of chromosomes. It causes widely heterogeneous chromosomal aberrations as well as aneuploidy and intratumor heterogeneity [19]. It is also known to be associated with poor patient outcome and drug resistance in multiple cancer types, but has never been explored in CTCs [19–22].

Here, we offer a proof-of-concept that *ROS1* rearrangement can be detected in CTCs from *ROS1*-rearranged NSCLC patients using filter-adapted-fluorescent *in-situ* hybridization (FA-FISH), a FISH assay optimized for CTC analysis on filters [18]. We further characterize the heterogeneity of these CTCs through assessment of their CIN.

## methods

### patients

*ROS1*-rearranged and *ROS1*-negative patients were recruited at Gustave-Roussy, Paris. All *ROS1*-rearranged patients were offered crizotinib treatment ‘off label’. Informed written consent for blood sample collection was obtained from patients (IDRCB2008-A00585-50). The study was approved by local institutional board and ethics committees.

### FISH on tumor tissue

FISH for tumor biopsy was carried out as described in the supplementary Methods, available at *Annals of Oncology* online. The *ROS1* Break Apart kit consists of two probes adjacent to the 3′ (green) and 5′ (red) ends of *ROS1*. In cells with native *ROS1* status, overlapping of probes results in a fused (3′/5′, yellow) signal. The two characteristic *ROS1*-rearrangement split patterns are the split of the 3′ and 5′ probes (a distance >2 signal diameters is considered as a split), or an isolated, single or amplified, 3′ signal. Signals were enumerated in at least 50 tumor nuclei and FISH-positive cases were defined as those with >15% of split or isolated signals [5, 6].

### CTC detection by CellSearch and enrichment by ISET filtration

Enumeration of CTCs using the CellSearch system (Johnson and Johnson, Raritan, NJ) was done according to the manufacturer’s protocol [14, 15]. CTC enrichment by isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) (Rarecells, Paris, France) was carried out as previously reported [15].

### immunofluorescent staining and FA-FISH of filtration-enriched CTCs

Immunofluorescent staining and FA-FISH on filters was used as previously reported [18] and described in the supplementary Methods, available at *Annals of Oncology* online. FA-FISH was carried out with the Vysis 6q22 *ROS1* Break Apart FISH probe RUO Kit (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) as shown in the supplementary Figure S1, available at *Annals of Oncology* online.

### immunofluorescent staining and DNA quantification of filtration-enriched CTCs using Hoechst 33342 staining

Enumeration of CTCs present on filters was done by combining immunofluorescence staining and cytomorphological examination as previously reported [18] and described in the supplementary Methods, available at *Annals of Oncology* online. DNA quantification is described in the supplementary Methods and Figure S2, available at *Annals of Oncology* online.

### multi-FA-FISH of filtration-enriched CTCs

The method and CIN degree grade determination are detailed in the supplementary Methods, available at *Annals of Oncology* online. Multi-FA-FISH was carried out with the AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit (Abbott Molecular, Inc.).

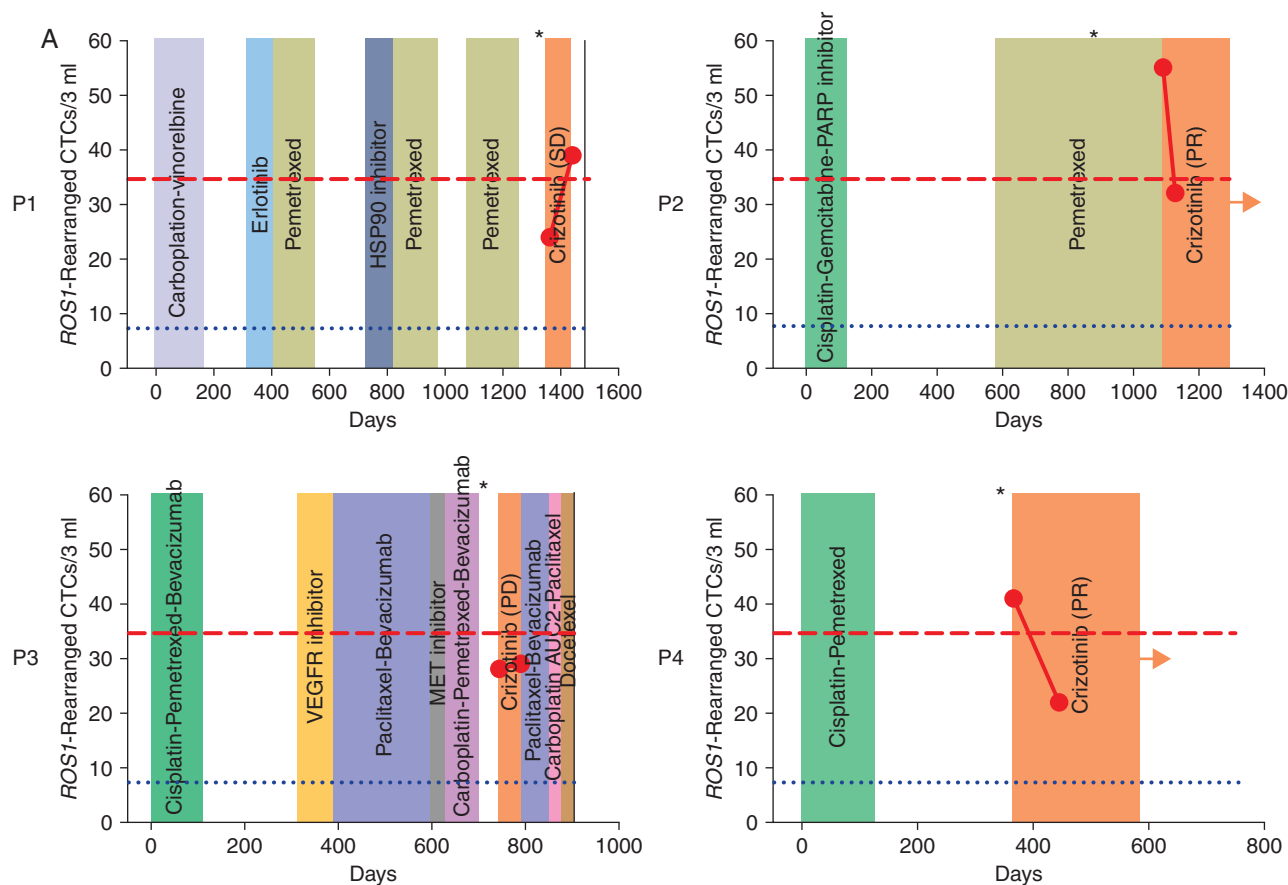
### cell lines

Cell lines and culture methods are described in the supplementary Methods, available at *Annals of Oncology* online.

### statistical methods

Statistical methods are described in the supplementary Methods, available at *Annals of Oncology* online.



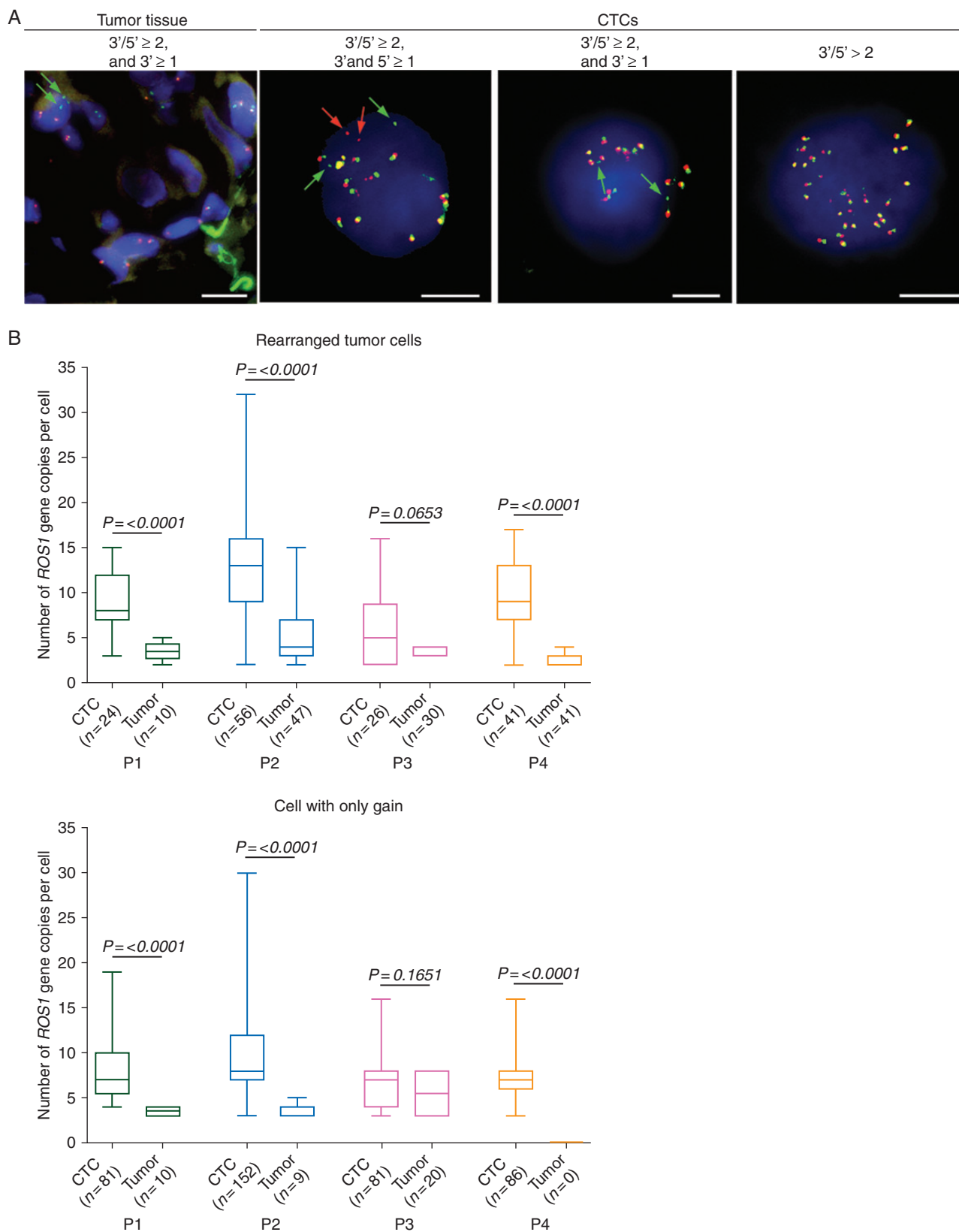


**B**

Patients	Sex	Age	Smoking status	BOR	PFS	Tumor		CTCs		
						Biopsy origin <sup>a</sup>	% of rearranged cells	Sample	Rearranged CTCs counts detected by ISET (/3 ml)	CTCs counts by Cellsearch (/7.5 ml)
P1	F	74	0	SD	3.3	Lung (MT)	20%	Day 1	24	NA
								Day 75 <sup>b</sup>	39	0
P2	M	66	0	PR	6.8+	Pleura (MT)	44%	Day 1	55	0
								Day 40	32	0
P3	F	37	16	PD	1.5	Node (MT)	60%	Day 1	28	2
								Day 45	29	6
P4	M	63	2	PR	7.1+	Node (MT)	82%	Day 1	41	2
								Day 80	22	0
PN1	M	35	0	-	-	Pleura (MS)	-	-	7	0
PN2	M	55	0	-	-	Lung (PT)	-	-	8	6
PN3	F	43	10	-	-	Lung (PT)	-	-	7	0
PN4	F	68	40	-	-	Node (MS)	-	-	11	1

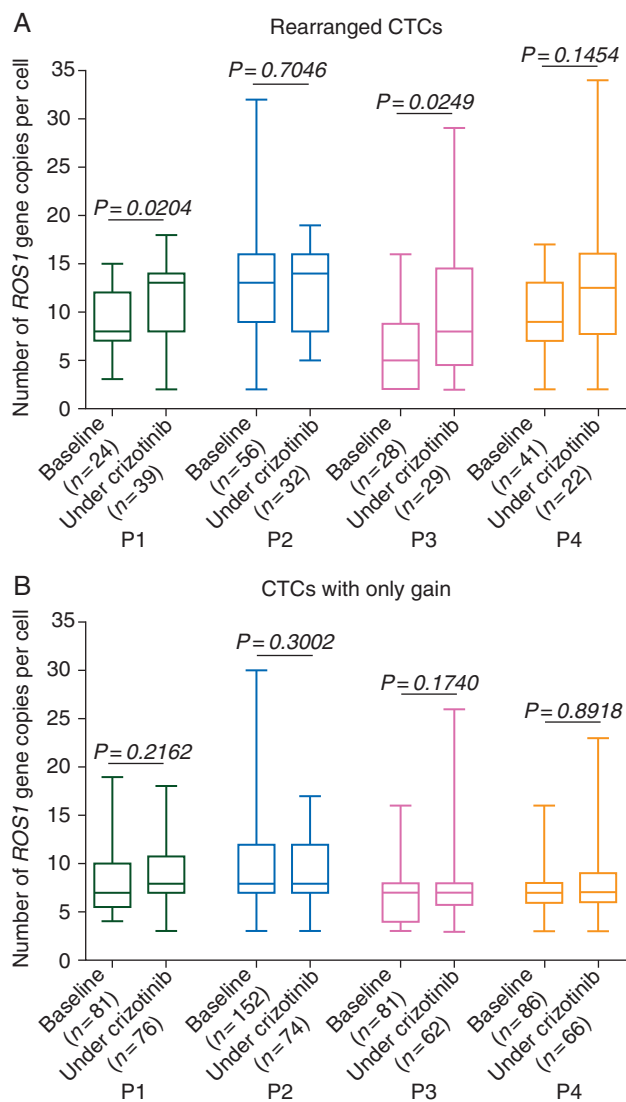
**Figure 1.** (A) Treatment lines and quantification of *ROS1*-rearranged CTCs in the four *ROS1*-rearranged patients. Blue dotted lines indicate the median value of *ROS1*-rearranged CTCs detected in 3 ml blood in control *ROS1*-negative patients. Red dashed lines indicate the median value of *ROS1*-rearranged CTCs detected in 3 ml blood in *ROS1*-rearranged patients. Asterisks show the day of *ROS1*-rearrangement diagnosis in tumor biopsy. Arrows indicate treatment is ongoing. The black line indicates that the patient died. (B) *ROS1*-rearranged cells in tumor and in CTCs of *ROS1*-rearranged and *ROS1*-negative patients. BOR, best overall response; F, female; M, male; MT, metastasis; NA, non-available; P, *ROS1*-rearranged patients; PD, progressive disease; PFS, progression-free survival; PN, *ROS1*-negative patient; PR, partial response; PT, primary tumor; SD, stable disease. <sup>a</sup>Tumor biopsy obtained from primary tumor or metastasis. <sup>b</sup>P1 received discontinuous crizotinib treatment; at the time of the study, patient had discontinued crizotinib for 2 weeks.

Downloaded from <http://annonc.oxfordjournals.org/> at Institut Gustave Roussy on June 29, 2015



**Figure 2.** Detection of *ROS1*-gene alterations in CTCs and tumor specimens from *ROS1*-rearranged patients. (A) Examples of *ROS1*-rearranged tumor cells in the tumor biopsy specimen and CTCs from patient P2. Green and red arrows show 3' and 5' *ROS1*-rearrangement extremities, respectively. Scale: white bars = 10 μm. (B) Tumor heterogeneity evaluated by enumerating *ROS1*-gene copies in tumor cells harboring a *ROS1*-rearrangement or only a gain of *ROS1* native copies in baseline CTCs and tumor biopsies.

Downloaded from <http://annonc.oxfordjournals.org/> at Institut Gustave Roussy on June 29, 2015



**Figure 3.** Numbers of *ROS1*-gene copies in *ROS1*-rearranged CTCs and CTCs harboring only gain at baseline and under crizotinib treatment in *ROS1*-rearranged patients. (A) Numbers of *ROS1*-gene copies in *ROS1*-rearranged CTCs from *ROS1*-rearranged patients. (B) Numbers of *ROS1*-gene copies in CTCs harboring only gain from *ROS1*-rearranged patients.

**results**

Four patients (P1-P4) with *ROS1*-rearranged NSCLC treated by crizotinib were recruited to the study. Two patients (P2, P4) displayed a partial response (PR) to crizotinib for 6.8 and 7.1 months, respectively (Figure 1). One patient (P1) had stable disease (SD) for 3 months, and one patient (P3) had disease progression (PD). Previous number of treatment lines ranged from 1 to 5, with PRs observed in the two patients who had received the smallest number of previous treatment lines (Figure 1A).

Percentage of *ROS1*-rearranged cells in metastatic biopsies ranged from 20% to 82% (Figure 1B). Using CellSearch, CTC values at baseline were 0, 2, and 2 CTCs per 7.5 ml blood in patients P2, P3, and P4, respectively (not carried out in P1) (Figure 1B). While receiving crizotinib, patients P1, P2, and P4

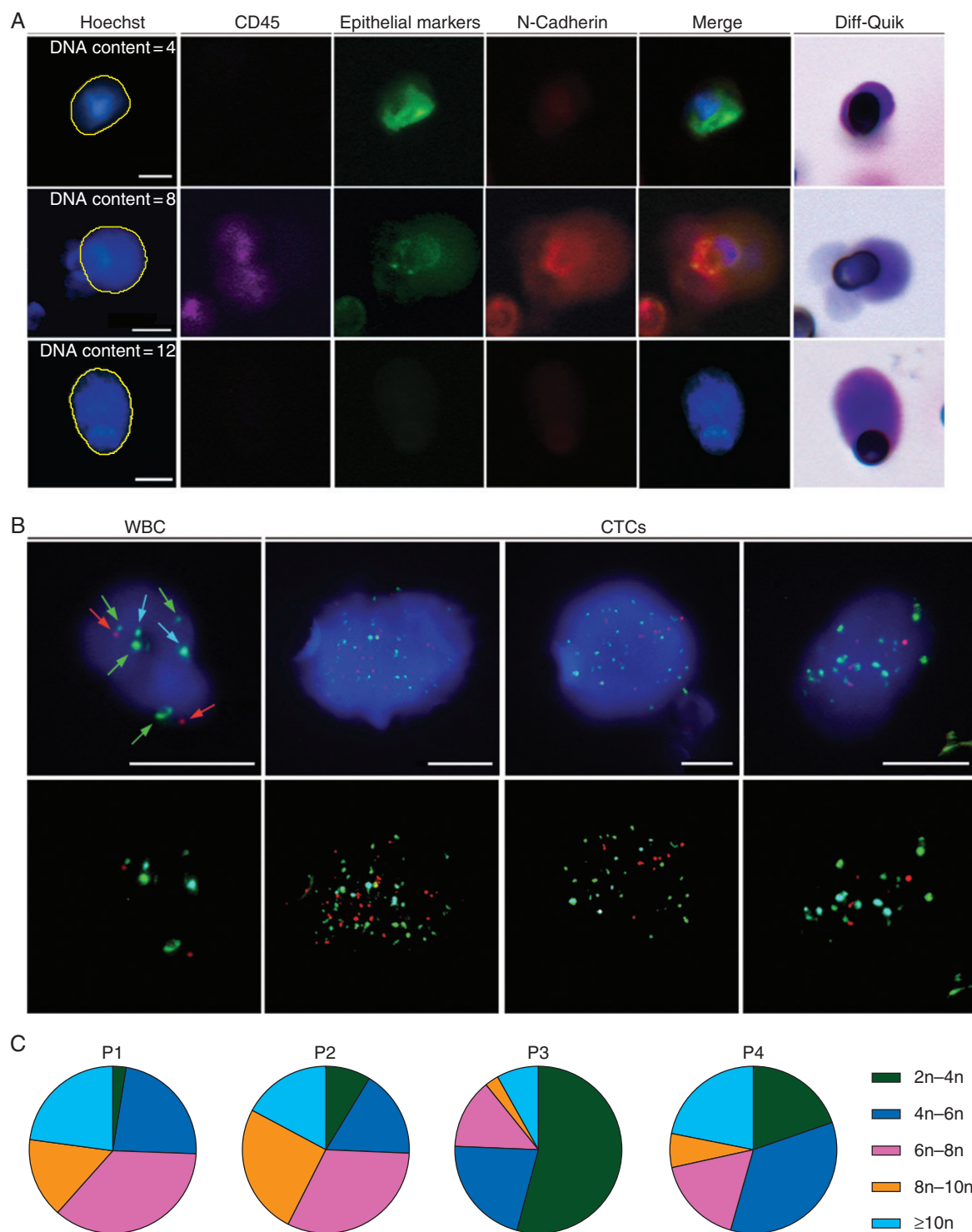
had no CTCs detected by CellSearch; CTCs increased to 6 per 7.5 ml blood in P3 who did not respond to crizotinib.

*ROS1* rearrangement was next examined in CTCs using ISET filtration and combined immunofluorescent staining and FA-FISH, as previously reported [18]. Median number of *ROS1*-rearranged CTCs at baseline was 34.5 per 3 ml blood (range, 24–55) in *ROS1*-rearranged patients. In P2 and P4, who responded to crizotinib, *ROS1*-rearranged CTCs dropped from 55 at baseline to 32 per 3 ml at day 40 in P2, and from 41 at baseline to 22 per 3 ml at day 80 in P4. In P1, who had initially SD, *ROS1*-rearranged CTCs increased from 24 to 39 per 3 ml blood 2 weeks after crizotinib discontinuation, a change consistent with the patient’s radiological PD by computed tomography (CT) (Figure 1). In P3, who did not respond to treatment, the level of *ROS1*-rearranged CTCs was stable: 28/3 ml blood at baseline, and 29/3 ml blood at crizotinib interruption. The median number of *ROS1*-rearranged CTCs was 7.5 per 3 ml blood (range, 7–11) in *ROS1*-negative patients (representing background hybridization of *ROS1* probes in FA-FISH experiments). Overall, these data showed that *ROS1* rearrangement could be specifically detected in CTCs from *ROS1*-rearranged NSCLC patients undergoing crizotinib treatment. Variations in *ROS1*-rearranged CTC levels were consistent with clinical evolution in three of four patients.

Next, patterns of *ROS1* rearrangement were examined within paired biopsy specimens and CTCs of *ROS1*-rearranged patients (supplementary Table S1, available at *Annals of Oncology* online). As previously reported, two split patterns were detected in tumor biopsies consisting in either the split of green and red signals or isolated green signals [5, 6]. In contrast to tumor biopsies, both types of split pattern were identified in *ROS1*-rearranged CTCs, with gain of native *ROS1* copies far more prevalent (Figure 2A, supplementary Table S1, available at *Annals of Oncology* online). This included an important subset of CTCs exclusively harboring a gain of native *ROS1* copies (supplementary Table S1, available at *Annals of Oncology* online). In CTCs with both types of *ROS1* split pattern, tumor heterogeneity, as assessed by *ROS1* copy number, was significantly higher in CTCs compared with paired tumor biopsy in the three patients who experienced PR (P2, P4) or SD (P1) ( $P < 0.0001$ ) (Figure 2B).

We next evaluated the effect of crizotinib on *ROS1*-gene copy number. The number of *ROS1*-gene copies present in *ROS1*-rearranged cells increased significantly during treatment in the two patients (P1, P3) who had tumor progression ( $P < 0.05$ ) (Figure 3A). No change was observed in the number of *ROS1*-gene copies present in cells harboring only gains (Figure 3B). Taken together, these results suggested that spatial heterogeneity at treatment baseline (assessed by *ROS1* copy number between primary tumor and CTCs pretreatment) did not impede response, but subsequent temporal heterogeneity of *ROS1* copy number (assessed in CTCs before and during treatment) emerged in parallel with tumor progression.

As *ROS1* FISH patterns within CTCs were strongly suggestive of the presence of highly aneuploid cells, we sought to characterize CTCs from *ROS1*-rearranged patients by means of two tests (DNA quantification by Hoechst 33342 measurement, multi-FISH assay) used to assess aneuploidy and numerical CIN status. CTCs from *ROS1*-rearranged patients were identified on filters as previously reported [18], and their DNA content determined



**Figure 4.** CIN status assessment in baseline CTCs from *ROS1*-rearranged patients. (A) Examples of CTCs with distinct epithelial and mesenchymal marker expression and high DNA content in a representative *ROS1*-rearranged patient. (B) Examples of hybridized WBCs and CTCs using fluorescently labeled probes. Green spots indicate probe hybridization at chromosome LSI 13 and CEP X, red spots at LSI 21 and CEP Y and blue spots at CEP 18. Scale: white bars = 10  $\mu$ m. (C) Distribution of baseline CTC ploidy.

relative to WBCs (Figure 4A, supplementary Table S2 and Figure S2, available at *Annals of Oncology* online). Immunofluorescence of CTCs revealed distinct epithelial and mesenchymal marker expression patterns, as well as high DNA content (Figure 4A). Numerical CIN status in CTCs from *ROS1*-

rearranged patients was further characterized using the AneuVysion multi-FISH assay, which is used in prenatal diagnosis to enumerate chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. Examples of chromosome 13, 18, 21, X and Y enumerations in CTCs are shown (Figure 4B). Patients P1, P2, and P4 had similar CTC



profiles characterized by various stages of ploidy and the presence of highly aneuploid cells, while patient P3 had less CTCs bearing high ploidy (Figure 4C). Mean ploidy of CTCs in patients P1, P2, and P4 was approximately seven, while it was of 4.5 in patient P3 (supplementary Table S3, available at *Annals of Oncology* online). The four patients had the maximal numerical CIN score of 3.

## discussion

Using an approach, we previously described for *ALK*-rearrangement detection [18], here we report for the first time that *ROS1* rearrangement can be detected in CTCs of patients with *ROS1*-rearranged NSCLC. The median number of *ROS1*-rearranged CTC levels was 34.5 per 3 ml blood at baseline in *ROS1*-rearranged patients. The level of nonspecific hybridization of *ROS1* probes (median of 7.5 *ROS1*-rearranged CTCs per 3 ml blood) in *ROS1*-negative patients was higher than that which we previously observed for *ALK* probes (median 1 *ALK*-rearranged CTC per 1 ml blood in *ALK*-negative patients) [18]. As *ROS1*-rearranged patients are rare, these results can only involve small numbers of patients: they will now require further validation in larger cohorts of *ROS1*-rearranged and negative patients to establish clear numerical thresholds for their prognostic and/or predictive potential.

Molecular analysis of CTCs can be easily repeated at different time-points during treatment to guide therapeutic decisions in a patient's treatment course. We show that qualitative and quantitative analysis of CTCs bearing *ROS1* abnormalities is possible in *ROS1*-rearranged patients undergoing *ROS1*-inhibitor therapy. In two patients, a reduction in *ROS1*-rearranged CTCs was consistent with radiological efficacy of crizotinib treatment, suggesting that the predictive potential of these CTCs will require further assessment in forthcoming clinical trials. In patient P3 who did not respond to treatment, the level of *ROS1*-rearranged CTCs was stable, reflecting perhaps a partial control by crizotinib although another oncogenic pathway may have driven PD.

A high level of heterogeneity of *ROS1* abnormalities was observed in CTCs from *ROS1*-rearranged patients at baseline crizotinib treatment. This heterogeneity was much greater than that observed in an isolated site corresponding tumor biopsies. We show that CTCs from *ROS1*-rearranged patients have high DNA content, as well as a high level of aneuploidy and numerical CIN. Elevated CIN may be one mechanism by which the genetic diversity of CTCs is generated in *ROS1*-rearranged patients. By generating genetic diversity, CIN may provide cells with an increased probability of acquiring tumor-promoting alterations and an increased adaptive potential when challenged by treatment. CIN has been associated with poor patient prognosis across a range of cancer types, including NSCLC, and has also been linked with intrinsic/acquired drug resistance and the probability of disease recurrence [19–22]. However, measuring CIN remains investigational and none of methods described in the present manuscript can detect emergence of secondary mutations.

High *ROS1* copy number was rarely detected in tumor specimens and the difference in *ROS1* copy numbers between tumors and CTCs observed here cannot be merely explained by the different nature of samples (paraffin tissue section versus whole cells). Spatial heterogeneity, as assessed by *ROS1* copy number between tumor and CTCs at baseline, observed in three patients

(P1, P2, P4), did not impede their subsequent disease response or control. Temporal heterogeneity of *ROS1*-rearranged CTCs during crizotinib treatment, increased in two patients in our study at the point of PD, while remaining unchanged in cells harboring only a gain. Increased heterogeneity of *ROS1*-rearranged CTCs may result in an increased potential of tumor cells targeted by crizotinib to evolve and adapt in response to treatment. Elevated CIN may thus promote the emergence of drug resistant CTC subclones with an increased metastatic capacity, offering a potential mechanism of *ROS1*-inhibitor-therapy resistance in *ROS1*-rearranged NSCLC tumors.

By demonstrating that *ROS1* rearrangement can be specifically detected in CTCs from *ROS1*-rearranged NSCLC patients, our study offers new perspective for diagnosing and monitoring *ROS1*-rearranged NSCLC patients eligible for crizotinib treatment. CTCs from *ROS1*-rearranged patients show considerable heterogeneity of *ROS1*-gene abnormalities and elevated numerical CIN, which may offer a mechanism by which tumor cells can escape sensitivity to *ROS1*-inhibitor therapy in *ROS1*-rearranged NSCLC tumors. Elevated CIN is an unreported feature of CTCs which provides a new insight into their biology.

## acknowledgements

The authors thank Prof. Christiane Copie, Dr Leila Zemoura and Dr Valérie Koubi-Pick for cytogenetic analysis of tumor biopsies and Benoit Coudert and Olivier Zajac for technical assistance. The authors also thank Dr Melissa Taylor for critical reading of the manuscript.

## funding

EP is supported by the LabEx LERMIT (grant no ANR-10-LABX-0033-LERMIT). CRL is supported by an ESMO research translational fellowship and is acting as the recipient for the grant for DUERTECC/EURONCO (Diplome Universitaire Européen de Recherche Translationnelle et Clinique en Cancérologie). This work was supported by the Fondation de France (grant no 201300038317) and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant no 20131200417). This research project was supported by ESMO with the aid of a grant from F. Hoffmann-La Roche. Any views, opinions, findings, conclusions, or recommendations expressed in this material are those solely of the author(s) and do not necessarily reflect those of ESMO or F. Hoffmann-La Roche.

## disclosure

The authors have declared no conflicts of interest.

## references

- Schilsky RL. Personalized medicine in oncology: the future is now. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 363–366.
- Shames DS, Wistuba II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol* 2014; 232: 121–133.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947–957.

4. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 2385–2394.
5. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30: 863–870.
6. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013; 18: 865–875.
7. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 4040–4045.
8. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 20: 1963–1971.
9. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366: 883–892.
10. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 539–544.
11. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014; 20: 897–903.
12. Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 2013; 23: 573–581.
13. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L et al. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11: 129–144.
14. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781–791.
15. Farace F, Massard C, Vimond N et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 2011; 105: 847–853.
16. Krebs MG, Sloane R, Priest L et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1556–1563.
17. Ilie M, Long E, Butori C et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2012; 23: 2907–2913.
18. Pailler E, Adam J, Barthelemy A et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2273–2281.
19. McGranahan N, Burrell RA, Endesfelder D, Novelli MR, Swanton C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep* 2012; 13: 528–538.
20. Lee AJ, Endesfelder D, Rowan AJ et al. Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance. *Cancer Res* 2011; 71: 1858–1870.
21. Sato H, Uzawa N, Takahashi K et al. Prognostic utility of chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspirates from oral squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 2010; 10: 182.
22. Nakamura H, Saji H, Idris A et al. Chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in surgical specimens of non-small cell lung cancer is associated with poor survival. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2294–2299.

*Annals of Oncology* 26: 1415–1421, 2015  
doi:10.1093/annonc/mdv208  
Published online 28 April 2015

## Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer<sup>†</sup>

C. Lim<sup>1</sup>, M. S. Tsao<sup>2</sup>, L. W. Le<sup>3</sup>, F. A. Shepherd<sup>1</sup>, R. Feld<sup>1</sup>, R. L. Burkes<sup>4</sup>, G. Liu<sup>1</sup>, S. Kamel-Reid<sup>2,5</sup>, D. Hwang<sup>2</sup>, J. Tanguay<sup>2</sup>, G. da Cunha Santos<sup>2</sup> & N. B. Leighl<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Medical Oncology, Princess Margaret Cancer Centre, Toronto; <sup>2</sup>Laboratory Medicine Program, University Health Network and Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto; <sup>3</sup>Department of Biostatistics, Princess Margaret Cancer Centre, Toronto; <sup>4</sup>Division of Medical Oncology, Mount Sinai Hospital, Toronto; <sup>5</sup>Molecular Diagnostics Laboratory, University Health Network, Toronto, Canada

Received 19 November 2014; revised 30 March 2015; accepted 20 April 2015

**Background:** Testing for *EGFR* mutations and *ALK* rearrangement has become standard in managing advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). However, many institutions in Europe, North America and other world regions continue to face a common challenge of facilitating timely molecular testing with rapid result turnaround time. We assessed the prevalence of biomarker testing for advanced NSCLC patients and whether testing affected the timeliness of treatment decisions.

**Methods:** We conducted a retrospective chart review of a random sample of one-quarter of all patients with advanced NSCLC referred to the Princess Margaret Cancer Centre from 1 April 2010 to 31 March 2013.

**Results:** Of 300 patients reviewed, 175 seen by medical oncology had nonsquamous NSCLC, 72% of whom had biomarker testing carried out. Patients tested for biomarkers were more likely to be female (47% versus 21%,  $P = 0.002$ ), Asian (27% versus 6%,  $P = 0.005$ ) and never smokers (42% versus 8%,  $P < 0.0001$ ). Only 21% of patients with biomarker testing had results available at their initial oncology consultation. This group had a shorter median time from consultation to treatment

\*Correspondence to: Dr Natasha B. Leighl, Division of Medical Oncology, Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, 5-105, 610 University Avenue, Toronto, ON, Canada M5G 2M9. Tel: +1-416-946-4645; E-mail: natasha.leighl@uhn.ca

<sup>†</sup>Study previously presented at: American Society of Clinical Oncology 2014 Annual Scientific Meeting, Canadian Association of Medical Oncologists 2014 Annual Scientific Meeting.

## Supplementary Data

### Supplementary Methods

#### FISH on tumor tissue

For tumor tissue examination, hematoxylin-eosin-safran staining was performed on deparaffinized 3  $\mu$ m formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. An adjacent biopsy section was then submitted to dual-color FISH assay using Dako pre-treatment Kit (Dako, Glostrup, Denmark) according to previously described protocols [5]. Hybridization was performed with the ZytoLight® SPEC *ROS1* Dual Color Break Apart Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany). Signals were enumerated using an epi-fluorescence microscope Eclipse Ti Nikon (Nikon Instrument Europe B.V., Surrey, England) with single interference filters for green (FITC), red (Texas Red) and blue (4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)) and a dual (red/green) band-pass filter. The *ROS1* Break Apart kit consists of two probes adjacent to the 3' (green) and 5' (red) ends of *ROS1*. In cells with a native *ROS1* status, the overlapping of probes results in a fused (3'/5', yellow) signal. The two characteristic *ROS1*-rearrangement split patterns are the split of the 3' and 5' probes (a distance > two signal diameters is considered as a split), or an isolated, single or amplified, 3' signal. Signals were enumerated in at least 50 tumor nuclei and FISH positive cases were defined as those with > 15% of split or isolated signals [5, 6]. *ROS1*-rearranged cells were validated by an experienced cytogenetician (NA).

#### Immunofluorescent staining and FA-FISH of filtration-enriched CTCs

A two-step method that combined immunofluorescent staining and FA-FISH on filters was used as previously reported [18]. Each ISET spot (corresponding to the filtration of one ml of blood) was precisely cut out for independent analysis. Immunofluorescent staining of filters was performed as previously reported [23] with monoclonal antibody allophycocyanin-conjugated anti-CD45 (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and DAPI. Immunofluorescent experiments were scanned using an Ariol scanning system with a Leica DM6000 microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Cells were detected at X20 magnification. Images were analyzed with the 3.5 Ariol software (Leica Microsystems). Single interference filter sets for blue (DAPI), green (FITC) and red (Texas Red) filters were used. DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells were precisely located using X63 magnification. Three spots were performed for each patient. FA-FISH was initially performed with the ZytoLight® SPEC *ROS1* Dual Color Break Apart Probe from Zytovision according to the FISH protocol used on tumor tissue. Because the Zytovision probe kit gave repeatedly a duplication of red and green signals both on the *ROS1*-rearranged HCC78 cell line spiked into normal blood samples of healthy individuals and patient CTCs enriched by ISET, the Vysis 6q22 *ROS1* Break Apart FISH probe RUO Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) was selected for testing patient samples. All DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells present in three ISET spots were analyzed by a trained experimenter (EP) and *ROS1*-rearranged CTCs were validated by an experienced cytogenetician (NA). Examples of FA-FISH experiments performed with the Zytovision and Vysis probe kits on the HCC78 cell line spiked into blood samples of healthy individuals and filtered using ISET are shown in Supplementary Figure 1.

#### Immunofluorescent staining and DNA quantification of filtration-enriched CTCs using Hoechst 33342 staining

Enumeration of CTCs present on filters was carried out by combining immunofluorescence staining and cytomorphological examination as previously reported [18] and was performed in three spots per patient sample. Immunofluorescent staining was

performed as described above using Hoechst 33342 (Bis-benzimide, B-2261, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) (1 µg/ml) instead of DAPI. Epithelial markers were used in the “green” channel including Alexa Fluor 488 conjugated mouse anti-EpCAM/CD326 (clone VU1D9, Novus Biological LLC, Littleton, CO, USA), mouse anti-pancytokeratins (clone A45B/B3, AS Diagnostik, Hueckeswagen, Germany and clone OV-TL 12/30, Dako, Glostrup, Denmark), rabbit anti-EGFR (clone D38B1, Cell Signaling Technology Inc.). Anti-pancytokeratins monoclonal antibody was conjugated with Alexa Fluor 488 using Zenon Mouse IgG Labeling Kit (Life Technologies Corp., Grand Island, NY, USA). An anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody (Life Technologies Corp.) was used for EGFR detection. An anti-N-cadherin (clone 32/N-cadherin, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) conjugated with Alexa Fluor 546 using Zenon Mouse IgG Labeling Kit (Life Technologies Corp.), and allophycocyanin-conjugated anti-CD45 (clone HI30, BD Biosciences) were used. Imaging was performed at X20 magnification using the Ariol scanner as mentioned above. After fluorescent imaging, filters were stained with Diff Quik set (Siemens Healthcare diagn., Munich, Germany) and scanned again at X20 magnification using the Ariol system. To identify CTCs, the images obtained after cytological coloration were relocated within the different phenotypical subpopulations. After CTC identification, immunofluorescent staining images were processed using the 3.5 Ariol software (Leica Microsystems) and ImageJ software (NIH Image J 1.47V) for Hoechst 33342 quantification. For DNA content calculation, integrated optical density of Hoechst 33342 was calculated for CTCs as the average pixel intensity value multiplied by the area. Integrated optical density values of CTCs were then normalized relative to the integrated optical density of hematopoietic cells (white blood cell, WBC) present on the same filter. A DNA content of 2.0 was assigned to WBCs. The Hoechst 33342 quantification method was established using diploid and tetraploid HCT116 cell lines (Supplementary Figure 2).

### **Multi-FA-FISH of filtration-enriched CTCs**

Immunofluorescent staining was performed as described below using Hoechst 33342 and allophycocyanin-conjugated anti-CD45. After scanning and selection of Hoechst 33342<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells, multi-FA-FISH was performed with the AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit (Abbott Molecular Inc.). The AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit includes a probe targeting a specific locus (LSI) on chromosome 13 and the centromere (CEP) X in green, LSI 21 and CEP Y in red and CEP 18 in blue. Using this approach, the normal copy number of each chromosome was determined on WBCs for each patient. A WBC is characterized by four green spots, two red spots and two blue spots in a female and by three green spots, three red spots and two blue spots in a male. For all Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells, copy number of the five chromosomes was counted and ploidy was determined as follows: DNA ploidy = number of copies (13 + 18 + 21 + X + Y)/4, where 13, 18, 21, X and Y are chromosomes respectively. Filters were analyzed by a trained experimenter (EP). Multi-FA-FISH was established using serial dilutions of HCT116 cell lines spiked into peripheral blood samples of healthy individuals and filtered using ISET. Multi-FA-FISH was established using HCT116 cell lines spiked into peripheral blood samples of healthy individuals and filtered using ISET. The degree of chromosomal instability (CIN) was graded as reported [21]: CIN1, the percent of cells with DNA ploidy was < 20% of the cells; CIN2, DNA ploidy was ≥ 20% but < 40% of the cells; CIN3, DNA ploidy was ≥ 40 of the cells.

### **Cell lines**

The *ROS1*-rearranged HCC78 lung carcinoma cell line was used in FA-FISH experiments. Cells were spiked into blood from healthy donors and filtered using ISET. Two subclones (diploid and tetraploid) of the HCT116 (colon carcinoma) cell line, generously



given by Dr Maria Castedo (INSERM U848, Gustave Roussy), were used in DNA content quantification and multi-FA-FISH experiments. The HCC78 cells were cultured in 1640 RPMI medium (Life Technologies), and HCT116 cells in DMEM medium (Life Technologies) supplemented with 10 % fetal bovine serum and maintained in a humidified incubator in 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C.

### **Statistical methods**

Data are expressed as median with range. The D'Agostino-Pearson omnibus normality test was used to test the Gaussian distribution of *ROSI* copy numbers per cell values. In the case of normal distribution, the unpaired t-test was used. In the case of non-parametric distribution, the Mann-Whitney test was used. These two-tailed tests were used to compare both *ROSI* copy numbers in CTCs to those of paired tumor biopsy, and *ROSI* copy numbers in CTCs at baseline and during crizotinib treatment. The Kruskal-Wallis test for multiple comparisons was used to compare DNA content or integrated optical density between WBC, HCT116 Diploid and HCT116 Tetraploid. *P* values below 0.05 were considered to denote statistical significance. Data were analyzed by the use of Graph Pad Prism<sup>®</sup> V6.0 software.

### **Supplementary Reference**

23. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P et al. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011; 105: 1338-1341.

## Legends for Supplementary Figures

### Supplementary Figure 1

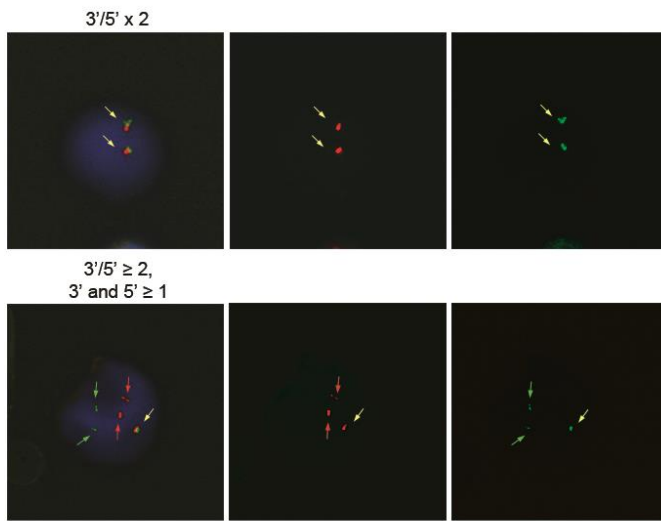
Detection of rearranged *ROS1* gene in HCC78 cell line by FA-FISH using the ZytoLight® SPEC *ROS1* Dual Color Break Apart Probe kit and the Vysis 6q22 *ROS1* Break Apart FISH probe RUO Kit. HCC78 cell line was spiked into peripheral blood samples from a healthy individual. (A) Example of FA-FISH using the ZytoLight® SPEC *ROS1* Dual Color Break Apart Probe kit. (B) Example of FA-FISH using the Vysis 6q22 *ROS1* Break Apart FISH probe RUO Kit. WBC with two *ROS1* native copies and *ROS1*-rearrangement pattern in HCC78 cell line are shown for both probe kits. Yellow arrows show *ROS1* native copies. Green arrows and red arrows show 3' and 5' *ROS1*-rearrangement extremities, respectively. Scale: white bars = 10  $\mu$ m.

### Supplementary Figure 2

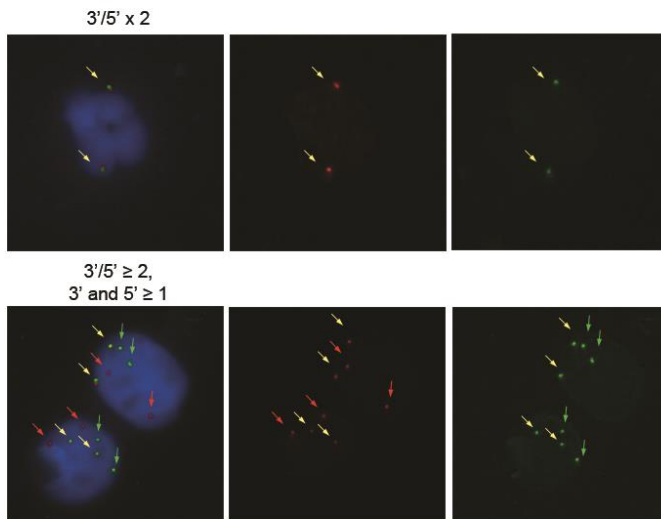
DNA content quantification for CIN status assessment in HCT116 cell lines. (A) Examples of image segmentation and processing using ImageJ macro of cells stained with Hoechst 33342. Yellow line delineates cell nuclei for area and mean fluorescence intensity measurement and calculation of optical integrated density. Scale: white bars = 10  $\mu$ m. (B) DNA content of HCT116 diploid and tetraploid cells relative to control WBCs (diploid). HCT116 tetraploid cells had a DNA content twice greater than that of HCT116 diploid cells and WBCs retained on filters. (C) Integrated optical density of HCT116 tetraploid cells present or not within a pore did not significantly differ.

**Supplementary Figure 1**

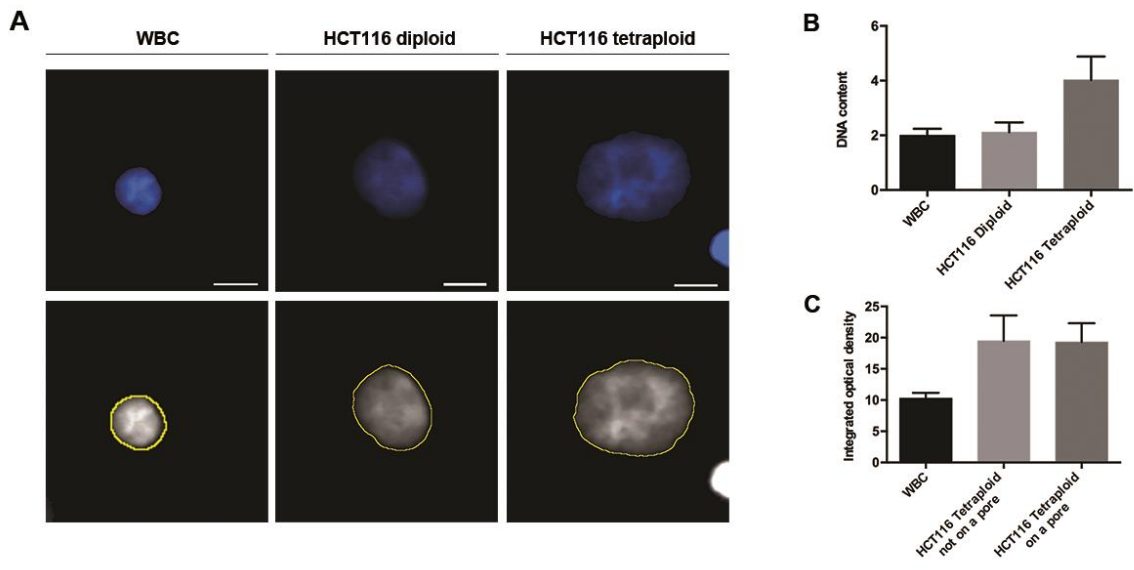
**A**



**B**



Supplementary Figure 2



**Table S1.** Description of *ROS1*-rearrangement patterns in tumor and in CTCs in the four *ROS1*-rearranged patients.

Patient	Sample	Number of cells	Rearranged tumor cells				Only gain
			$3'/5', 3' \text{ and } 5'$	$3'/5', \text{ and } 3'$	$3'/5' \geq 2, 3' \text{ and } 5' \geq 1$	$3'/5' \geq 2, \text{ and } 3' \geq 1$	$3'/5' > 2$
P1	Tumor	50	2	0	8	0	10
	CTC Day 1 (/3ml)	124	0	0	18	6	81
	CTC Day 75 (/3ml)	118	1	0	27	11	76
P2	Tumor	50	0	2	0	20	4
	CTC Day 1 (/3ml)	212	1	0	48	6	153
	CTC Day 40 (/3ml)	108	0	0	28	4	74
P3	Tumor	50	0	0	0	30	20
	CTC Day 1 (/3ml)	176	9	0	15	4	81
	CTC Day 45 (/3ml)	138	3	0	21	5	62
P4	Tumor	50	1	17	0	23	0
	CTC Day 1 (/3ml)	138	1	0	28	12	85
	CTC Day 80 (/3ml)	108	1	1	17	3	68

Abbreviations: CTC, circulating tumor cell; P, *ROS1*-rearranged patients; *ROS1*, *c-ros oncogene 1*

**Table S2.** Counts of CTC subpopulations according to epithelial and mesenchymal markers expression in *ROS1*-rearranged patients.

Patients	CTCs counts by ISET						CTCs counts by CellSearch
	Total CTCs <sup>a</sup> (/3ml)	Microclusters (/3ml)	Phenotypic characterization <sup>b</sup>				CTCs (/7.5ml)
			Nucleus+ Epithelial+ (/3ml)	Nucleus+ Mesenchymal+ Epithelial+ (/3ml)	Nucleus+ ≥ 16 μm Mesenchymal+ (/3ml)	Nucleus+ ≥ 16 μm <sup>c</sup> (/3ml)	
P1	51	3	0	4	2	33	NA
P2	63	4	2	4	2	43	0
P3	18	0	1	0	0	17	2
P4	41	0	2	0	1	38	2

Abbreviations: CTC, Circulating Tumor Cell; P, *ROS1*-rearranged patients, *c-ros oncogene 1*

<sup>a</sup> Total numbers of CTCs are CTCs identified by combining a four-color immunofluorescent staining with cytomorphological examination in three ml of blood.

<sup>b</sup> CTC subpopulations were characterized by combining a four-color immunofluorescent staining with cytomorphological as previously reported [23]. Data are presented for three ml of blood.

<sup>c</sup> Large cells (≥ 16 μm) negative for epithelial and mesenchymal markers but harboring cytomorphological criteria of CTCs or of atypical cells [15] were consistently detected in all patients.

**Table S3.** Descriptive statistics of the ploidy of baseline CTCs from *ROS1*-rearranged patients determined by chromosomes 13, 18, 21, X, Y enumeration using multi-FA-FISH.

Patients		Mean	Median	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Numerical CIN3 Score (%)
<b>P1</b>	CTCs (n=42)	7.44	7.00	2.88	1.75	13.00	93%
	WBC (n=15)	2.04	2.00	0.17	1.75	2.25	-
<b>P2</b>	CTCs (n=61)	7.68	7.25	3.29	2.25	15.50	77%
	WBC (n=15)	2.05	2.00	0.26	1.50	2.75	-
<b>P3</b>	CTCs (n=58)	4.55	3.75	2.58	2.25	11.25	64%
	WBC (n=15)	1.93	2.00	0.22	1.50	2.25	-
<b>P4</b>	CTCs (n=66)	6.62	5.50	3.73	2.25	18.00	70%
	WBC (n=15)	2.06	2.00	0.28	1.75	2.75	-





## **B. LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES : BIOMARQUEURS PHARMACODYNAMIQUES ?**

Chez les patients *ALK* remanié, le TKI crizotinib induit un taux de réponse objective élevé (ORR, 60,8 %) et une médiane de survie sans progression de 9,7 mois. Cependant, la durée de réponse est très variable d'un patient à l'autre (de quelques mois à plusieurs années) et l'efficacité à long terme du crizotinib est invariablement limitée par le développement de résistance. Lorsque nous avons débuté ce travail, aucun biomarqueur pharmacodynamique n'était connu afin d'identifier les patients *ALK* remanié qui ont un risque élevé de progresser rapidement. Dans notre précédente étude (Résultats A.3), j'ai montré qu'il est possible de suivre les différentes sous-populations de CTC présentant un statut anormal du gène *ALK* (remaniement et/ou gain de copies du gène) par FISH et que ces populations ont une évolution différente sous traitement par crizotinib. Cette observation nous a amenés à émettre l'hypothèse que ces sous-populations pourraient avoir des caractéristiques biologiques et un potentiel métastatique différents, et donc pourraient être plus ou moins bien contrôlées par la thérapie ciblée crizotinib. Nous avons donc poursuivi les inclusions de patients atteints de CBNPC *ALK* remanié afin d'évaluer dans une cohorte élargie de patients si la présence ou l'évolution sous traitement de certaines sous-populations de CTC étaient corrélées à l'évolution clinique des patients.

### **1. Évaluation des cellules tumorales circulantes en tant que biomarqueur pharmacodynamique chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules porteurs du remaniement *ALK***

#### **Article 4. Circulating Tumor Cells with Aberrant *ALK*-Copy Number Predicts Progression-Free Survival to Crizotinib in *ALK*-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients.**

Emma Pailler, Marianne Oulhen, Isabelle Borget, Jordi Remon, Kirsty Ross, Nathalie Auger, Fanny Billiot, Maud Ngo Camus, Frédéric Commo, Colin R Lindsay, David Planchard, Jean-Charles Soria, Benjamin Besse\*, Françoise Farace\*

Publication soumise.

Nous avons souhaité dans un premier temps clarifier le statut des CTC présentant un nombre élevé de copies du gène *ALK* en levant l'ambiguïté qui est souvent présente entre les termes de « gain » et d'« amplification » de gène ; par définition, une amplification correspond à un ratio gène/centromère supérieur à 2,5 et à un nombre de copies du gène supérieur à 6. Nous avons réalisé la technique de FA-FISH avec la sonde ciblant le remaniement *ALK* et une sonde complémentaire ciblant le centromère

du chromosome 2. Nous avons observé que les CTC avec une augmentation du nombre de copies de *ALK* présentent un gain de ce gène et non une amplification.

Nous avons réalisé l'analyse des CTC avant traitement (*baseline*) et à un point précoce (généralement deux mois) sous crizotinib de 39 patients *ALK* remanié. Pour cela, nous avons utilisé la combinaison du double marquage immunofluorescent, de la FA-FISH sur filtre et de l'analyse microscopique semi-automatisée. Les CTC ont été catégorisées en deux sous-populations : les CTC remaniées présentant ou non un gain de copies du gène (*ALK*-remanié), les CTC présentant uniquement un gain de copies natives du gène *ALK* (*ALK*-CNG). En accord avec les travaux rapportés dans les biopsies tumorales au moment du diagnostic, nous avons constaté que les nombres de CTC avant traitement dans ces deux sous-populations ne sont pas corrélés avec la PFS. L'analyse par régression linéaire montre une corrélation entre les nombres de CTC *ALK*-remanié avant traitement et à deux mois sous crizotinib ( $R^2 = 0,278$ ,  $p = 0,003$ ) tandis que les nombres de CTC *ALK*-CNG entre ces deux prélèvements ne sont pas corrélés ( $R^2 = 0,017$ ,  $p = 0,503$ ). Ces résultats suggèrent que les nombres de CTC *ALK*-CNG évoluent sous traitement par crizotinib. Nous avons donc évalué la corrélation entre le changement dynamique des nombres de CTC *ALK*-CNG avant traitement et à 2 mois sous crizotinib et l'évolution clinique des patients. Nous avons observé une association significative entre ce changement dynamique et la PFS ( $p = 0,025$ ). Ainsi une diminution du nombre de CTC *ALK*-CNG est associée à une médiane de PFS de 14 mois, alors qu'une stabilisation ou une augmentation du nombre de ces cellules est associée à une médiane de PFS de 6,1 mois. De plus, dans l'analyse statistique multivariée, nous avons constaté que ce changement dynamique est le facteur le plus significatif associé à la PFS ( $p = 0,006$ ).

Cette étude montre la possibilité d'utiliser les CTC pour des analyses moléculaires non invasives afin d'identifier un biomarqueur de substitution (biomarqueur *surrogate*) de l'efficacité thérapeutique du crizotinib, et d'identifier les patients *ALK* remanié qui ont un risque élevé de progresser rapidement. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer nos résultats et évaluer ce biomarqueur d'efficacité pour d'autres TKI de seconde et troisième génération.

**Circulating Tumor Cells with Aberrant *ALK*-Copy Number Predicts Progression-Free Survival to Crizotinib in *ALK*-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients**

Emma Pailler<sup>1,2,3</sup>, Marianne Oulhen<sup>1,2</sup>, Isabelle Borget<sup>4,5</sup>, Jordi Remon<sup>6</sup>, Kirsty Ross<sup>1,2</sup>, Nathalie Auger<sup>7</sup>, Fanny Billiot<sup>1,2</sup>, Maud Ngo Camus<sup>6</sup>, Frédéric Commo<sup>2</sup>, Colin R. Lindsay<sup>1,6</sup>, David Planchard<sup>6</sup>, Jean-Charles Soria<sup>2,3,6</sup>, Benjamin Besse<sup>6†</sup>, Françoise Farace<sup>1,2,3†§</sup>

<sup>1</sup> Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, “Circulating Tumor Cells” Translational Platform, CNRS UMS3655 – INSERM US23 AMMICA, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>2</sup> INSERM, U981 “Identification of Molecular Predictors and new Targets for Cancer Treatment”, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>3</sup> Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, Faculty of Medicine, F-94270, LE KREMLIN-BICETRE France

<sup>4</sup> Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Department of Biostatistics and Epidemiology, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>5</sup> Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Faculty of Pharmacy, F-92296, CHÂTENAY-MALABRY France

<sup>6</sup> Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Department of Medicine, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>7</sup> Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Department of Biopathology, F-94805, VILLEJUIF France

†Both authors contributed equally to the study

<sup>§</sup>**Corresponding author:** Dr Françoise Farace, INSERM U981, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, 114 rue Édouard Vaillant, F-94805, VILLEJUIF France. Phone: (33)142115198. Email: [francoise.farace@gustaveroussy.fr](mailto:francoise.farace@gustaveroussy.fr)

Authors disclose no potential conflicts of interest

Running title: Serial analysis of CTCs in *ALK*-rearranged NSCLC

## Abstract

The duration and magnitude of clinical response is unpredictable in *ALK*-rearranged non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients treated by crizotinib but all patients invariably develop resistance. We evaluated whether circulating tumor cells (CTCs) with aberrant *ALK*-fluorescence *in situ* hybridization (FISH) patterns (*ALK*-rearrangement, gain of *ALK*-copy number (*ALK*-CNG)) monitored on crizotinib could predict progression-free survival (PFS) in a cohort of *ALK*-rearranged patients. Thirty-nine *ALK*-rearranged patients treated by crizotinib as first *ALK*-inhibitor were prospectively recruited. Blood samples were collected at baseline and at an early time-point (two months). Aberrant *ALK*-FISH patterns were examined in CTCs using immunofluorescence staining combined with filter-adapted-FISH (FA-FISH) after filtration-enrichment. CTCs were classified into distinct subsets according to the presence of *ALK*-rearrangement and/or *ALK*-CNG signals. No significant association between baseline numbers of *ALK*-rearranged or *ALK*-CNG CTCs, and PFS was observed. However we observed a significant association between a decrease in the numbers of CTCs with *ALK*-CNG on crizotinib and a longer PFS (likelihood ratio test,  $p=0.025$ ). In multivariate analysis the dynamic change of CTCs with *ALK*-CNG was the strongest factor associated with PFS (HR, 4.485; 95% CI, 1.543 to 13.030,  $p=0.006$ ). Although not dominant, *ALK*-CNG has been reported to be one mechanism of acquired resistance to crizotinib in tumor biopsies. Our results suggest that the dynamic change in the numbers of CTCs with *ALK*-CNG may be a predictive biomarker for crizotinib efficacy in *ALK*-rearranged NSCLC patients. Serial molecular analysis of CTCs shows promise for real-time patient monitoring and clinical outcome prediction in this population.

**Key words:** circulating tumor cells; *anaplastic lymphoma kinase* gene (*ALK*); non-small-cell lung cancer; crizotinib; ISET; filter-adapted fluorescence *in situ* hybridization (FA-FISH)

## Introduction

A new paradigm has recently emerged for the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC) with the discovery of molecularly defined subsets of patients who can be treated effectively by therapies targeted to a specific oncogenic driver alteration (1). The discovery of *anaplastic lymphoma kinase (ALK)*-rearrangements in NSCLC was triggered by their validation as a therapeutic target (2,3). In 2011, crizotinib received US Food & Drug Association (FDA) approval as the first ALK-inhibitor for advanced *ALK*-rearranged NSCLC patients after demonstration of impressive clinical results in the 3-5% of *ALK*-rearranged NSCLC patients (3,4). The latest update of the phase I clinical trial demonstrated high overall response rate (ORR, 60.8%) and a median progression-free survival (PFS) of 9.7 months (5). In two randomized phase III trials, crizotinib as compared to standard first- or second-line chemotherapy prolonged the PFS and increased the ORR in treatment naive *ALK*-rearranged patients (6,7). However there is a marked heterogeneity in the magnitude and duration of patient response. Response duration varies from few months to several years, the long-term effectiveness of crizotinib being invariably limited by the development of resistance (8-16). Mechanisms of acquired resistance have been identified in approximately 30-40% of crizotinib-resistant patients and have been grouped into two main categories including additional genetic alteration in *ALK*-gene itself through secondary mutations, gene amplification or gain of copy number, or various other therapy-induced adaptive responses independently of *ALK*-gene (15,17). New therapeutic agents have been developed to combat resistance, such as 2<sup>nd</sup>/3<sup>rd</sup> generation ALK-inhibitors – ceritinib, alectinib, brigatinib or lorlatinib – and combination with heat-shock protein 90 inhibitors (13,18-23). There are currently no known predictive biomarkers to identify patients who will benefit of a long-term response to crizotinib from those who are at risk of acquired resistance shortly after starting crizotinib and could be treated without delay by an alternate therapy.



In current practice, predictive biomarkers for drug sensitivity and therapy selection could be assessed either in the primitive tumor tissue taken at diagnosis or in tumor biopsies collected from metastasis during the course of the disease. Primitive tumor tissue can be difficult to obtain in patients with certain tumor types such as NSCLC where surgery is frequently not a component of treatment. In NSCLC, genotyping and eligibility for targeted therapy is currently identified by using tumor biopsies which could be challenging to perform, are invasive and may provide limited tissue quantities. Because tumors continually evolve and adapt to targeted therapies, it is becoming increasingly important in clinical practice to monitor “in real-time” the genetic changes occurring in tumors particularly for selecting second or third line therapies. Subjecting patients to serial and repeated tumor biopsies for monitoring tumor evolution during treatment course and at the time of resistance is, in most cases, clinically not feasible. Thus, finding alternative means to monitor tumor evolution and emergence of acquired resistance is a critical issue for improving the success rate of targeted therapies. Circulating tumor cells (CTCs) can be obtained through a non-invasive and easily repeatedly procedure (24-26). In contrast to tumor biopsies, CTCs have the potential to allow longitudinal monitoring of tumor features at different time-points during treatment, guiding therapeutic decisions in a patient’s clinical course. Another interesting characteristic of CTCs is that they are likely to be released from different metastatic sites and may have the potential to inform on the genetic heterogeneity of metastatic deposits. Thereby, CTCs may represent the metastatic disease as well or even better than a single-site biopsy (25).

Using the CellSearch, a method based on the detection of EpCAM-positive epithelial cells, CTC levels were shown to have a prognostic significance in several metastatic cancers, including NSCLC (25,27). Longitudinal monitoring of the change in total CTC counts also indicated a potential role of CTC to predict whether a patient may benefit or not from anti-

cancer treatment (27,28). A few studies have until now demonstrated the feasibility of CTC assays for the detection of predictive biomarkers. Three groups including our own have reported *ALK*-rearrangement detection in CTCs using a size-based technique for CTC enrichment and FISH, the choice of this approach being justified by higher number of CTCs recovered by this technique as compared to the CellSearch in NSCLC (29-31). Using ISET (isolation by size of epithelial tumor cells) and filter-adapted fluorescent *in situ* hybridization (FA-FISH), we determined a cut-off value of four or more *ALK*-rearranged CTCs per 1 mL blood to predict whether *ALK*-rearrangement was present or not within the tumor tissue (29). In this study, several CTC subsets harboring distinct *ALK*-FISH patterns including *ALK*-rearranged CTCs and CTCs with a gain of *ALK*-copy number (*ALK*-CNG) were identified, and had a variable evolution on crizotinib treatment in the five examined patients (29). Based on this latter observation, we hypothesized that CTC subsets differing in *ALK*-FISH patterns might be associated with different clinical outcome in *ALK*-rearranged patients treated by crizotinib. In the present study, we evaluated whether these CTC subsets monitored on crizotinib may inform on treatment benefit in an extended cohort of 39 *ALK*-rearranged patients. The association between *ALK*-rearranged and *ALK*-CNG CTC subsets and clinical parameters including PFS and overall survival (OS) is presented.

## Methods

### Study Design

The study (IDRCB2008-A00585-50) was conducted at Gustave Roussy (Villejuif, France), authorized by the French national regulation agency ANSM (*Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé*), and approved by the Ethics Committee and our institutional review board. Stage IV *ALK*-rearranged NSCLC patients were recruited into the study between March 2011 and November 2014 and included the eighteen patients of our first study (29). Informed written consent was obtained from all patients. All patients received 250 mg crizotinib twice daily at initiation of therapy. Peripheral blood samples were collected at baseline and at an early time-point on crizotinib (usually two months depending on patient visits). *ALK*-rearrangement was tested by FISH, immunochemistry (IHC) or reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (32).

Medical records were reviewed and clinical characteristics were collected retrospectively – including age, sex, smoking status, tumor histologic type, number of previous treatment lines before crizotinib, ECOG (eastern cooperative oncology group) performance status, number of metastatic sites, level of lymphocytes, PFS and OS.

PFS was defined as the time between the date of the start of crizotinib and the date of clinical or radiological progression. OS was defined as the time between the date of the start of crizotinib and the date of death. Patients who were progression-free and alive at the time of analysis were censored.

### **CTC Detection by CellSearch and Enrichment by ISET**

CTCs were enumerated using the CellSearch (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, USA) as previously reported (27,33). CTC enrichment by ISET (Rarecells, Paris, France) was performed on 10 mL of blood as previously reported (29,33).

### **Combination of immunofluorescent staining and *ALK* FA-FISH in ISET-enriched CTCs**

Immunofluorescent staining (DAPI/CD45) and FA-FISH were performed on three ISET spots as previously reported (29,34,35). Scanning and analysis of immunofluorescent staining and FISH signals was performed on an ARIOL (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL, USA) according to a previously reported sequential process briefly described in the Data Supplement (35).

### **Combination of immunofluorescent staining and FA-FISH using *ALK* break-apart probe combined with the chromosome 2-specific centromeric probe of ISET-enriched CTCs**

Immunofluorescent staining of filters, FA-FISH and scanning were performed as described below. The detection of the aneusomy of chromosome 2 was performed using the Vysis *ALK* Break Apart rearrangement Probe Kit combined with XCyting Centromere Enumeration Probe XCE 2 in blue (MetaSystems GmbH, Altussheim, Germany) (1:1). FA-FISH method was established using *ALK*-rearranged H2228 cell line spiked into peripheral blood samples of healthy donors (Supplementary Figure 1). The amplification was defined either by a cluster of isolated red signals (10) or  $\geq 6$  copies of *ALK* and a ratio of *ALK* to centromere copies superior to 2.5 while a ratio inferior to this with a copy number superior to 2 defines a CNG (36).

## **Scanning and image analysis of combined immunofluorescent staining and *ALK* FA-FISH in ISET-enriched CTCs**

Scanning was performed on an ARIOL (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL, USA) according to a sequential process which includes (i) scanning of filters after fluorescent staining, (ii) automated selection of DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells, (iii) FISH scanning in DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells, (iv) analysis of FISH signals in DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells. Specific FISH scanning settings have been established to detect a maximum number of FISH spots in filter-enriched CTCs including 30 z-stacks, a distance of 0.6 μm between two z-stacks and a multi-exposure protocol consisting of three separate exposure times for the green and red fluorochromes (35). Filters were analyzed by experienced experimenters (EP, MO). The *ALK*-status was validated by a cytogeneticist (NA). The dual-color FISH assay using the Vysis *ALK* Break Apart rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) was performed as we previously reported (29). The *ALK* Break Apart kit consists of two probes adjacent to the 3' (red) and 5' (green) ends of *ALK*. In cells with a native status of *ALK*, the overlapping of the probes results in a fused (3'5', yellow) signal. The two characteristic *ALK*-rearrangement split patterns are the split of the 3' (red) and 5' (green) probes (a distance greater than two signal diameters is considered as a split), or an isolated 3' (red) signal.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis were performed using R software version 3.3.0 for Mac (packages MASS v-7.3.45 and survival v-2.39.3 were used) (37) and SAS/STAT software version 9.4 of the SAS system for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). *ALK*-rearranged and *ALK*-CNG CTC counts were considered as distinct scores and descriptive statistics were calculated separately. Wilcoxon tests were used to compare CTC counts (i.e.

*ALK*-rearranged, *ALK*-CNG) between groups, for each covariate. Linear regressions were performed to assess the correlation between CTC number at baseline and on crizotinib, for each gene alteration independently. Cox proportional hazard models were used to estimate hazard ratio (HRs) and 95% confidence interval (CI) for PFS and OS. Each continuous covariate was scored as 0 and 1, < median and  $\geq$  median, respectively, except for age at baseline where a cut-off was applied (0: <55 y/o 1:  $\geq$ 55 y/o). A stepwise backward/forward procedure was applied to the full multivariate model in order to objectively select the optimal predictors (38). For each statistical analysis, including Cox models, a *p*-value  $\leq 0.05$  was considered significant.

## Results

### Detection of CTCs with aberrant *ALK*-FISH patterns at baseline and on crizotinib

Thirty-nine metastatic *ALK*-rearranged NSCLC patients treated by crizotinib as first *ALK*-inhibitor were examined. Patient characteristics are presented in Table 1. Median age was 53 years (range, 25-81). A majority of patients were never or light smokers (67%) with adenocarcinoma tumor histology (97%). All patients have received one or more previous treatment. The mean duration of crizotinib was 15.4 months (median 10.2 months; range, 0.8 to 48.1) – 7/39 patients being censored as they were continuing treatment at time of analysis. One patient (P6) received discontinued crizotinib due to hepatic toxicity. All the 39 patients had a blood sample for *ALK*-rearrangement detection in CTCs at baseline. Twenty-nine patients had a blood sample drawn at an early time-point (usually two months, but depending on patient visit) of crizotinib therapy. Ten patients were not monitored at this early time-point due to medical follow-up in another hospital. *ALK*-rearrangement was tested by FISH in tumor biopsies for all 39 *ALK*-rearranged patients. When useful to assess or confirm positivity, FISH was coupled to IHC or RT-PCR (Supplementary Table 1). *ALK*-rearrangement was tested in ISET filtration-enriched CTCs from 3 mL blood using a recently developed two-step method that combined two-color (DAPI/CD45) immunofluorescent staining, FA-FISH and semi-automated microscopy analysis (35).

Two main subsets with aberrant *ALK*-FISH patterns were detected in CTCs: *ALK*-rearranged CTCs and *ALK*-CNG CTCs (Supplementary Table 1, Figure 1A). The *ALK*-rearranged CTC subset included CTCs with variable numbers of splits of the red and green signal (3' and 5') and of *ALK*-native copies (3'/5'≥2). In contrast to our previous study performed on a limited number of *ALK*-rearranged patients, very rare *ALK*-rearranged CTCs with an isolated red signal (3') were observed in 10 patients of this extended cohort

(Figure 1A). The numbers of *ALK*-native copies ( $3'/5' \geq 2$ ) was highly variable in CTCs harboring only a CNG (Figure 1A). Using a specific third color FISH probe for the chromosome 2 centromere (Figure 1B), the same number of *ALK*-copies and centromeres were observed, confirming that these CTCs harbor a gain of chromosome 2 (i.e. a polysomy of chromosome 2) and not an amplification of *ALK*-gene.

At baseline the median numbers of *ALK*-rearranged CTCs and *ALK*-CNG CTCs were 14 per 3 mL (range, 1 to 119) and 12 per 3 mL (range, 1 to 53) respectively (Supplementary Table 1, Supplementary Table 2). On crizotinib, median number of *ALK*-rearranged CTCs and *ALK*-CNG CTCs were 13 per 3 mL (range, 3 to 60) and 15 per 3 mL (range, 2 to 177), respectively (Supplementary Table 1, Supplementary Table 2). By CellSearch, median values of zero CTCs per 7.5 mL were detected both at baseline and on crizotinib (range, 0 to 713 and range, 0 to 544 respectively) (Supplementary Table 1, Supplementary Table 2). Linear regressions showed a significant correlation between the number of *ALK*-rearranged CTCs at baseline and on crizotinib ( $R^2=0.278$ ,  $p=0.003$ ), while no correlation was observed in *ALK*-CNG CTC numbers ( $R^2=0.017$ ,  $p=0.503$ ) (Figure 1C). These results suggested that the number of *ALK*-CNG CTCs on crizotinib was independent from numbers at baseline and possibly impacted by the treatment.

### **Association between CTC subsets and clinical parameters or outcome**

Associations between *ALK*-rearranged or *ALK*-CNG CTC counts at baseline and clinical parameters are presented in Supplementary Table 3. A significant association was observed between the numbers of *ALK*-CNG CTCs and the smoking status ( $p=0.002$ ). All the other clinical parameters were not significantly associated with *ALK*-rearranged or *ALK*-CNG CTC counts at baseline. After a median follow-up of 16.1 months (mean 19.4 months), 33 of the 39 (84.6%) evaluable patients had disease progression by RECIST criteria. Median PFS



was 6.9 months (mean 11.2 months; 95% confidence interval (CI), 2.4 to 9.7 months). Twenty-five (64.1%) patients died resulting in a median OS of 16.7 months (mean 19.9 months; 95% CI, 11.4 to 32.9 months).

For univariate analysis, counts of *ALK*-rearranged and *ALK*-CNG CTCs at baseline and on crizotinib were assigned into low/high groups according to their respective medians (Table 2, Supplementary Table 2). No significant association between baseline *ALK*-rearranged CTCs or *ALK*-CNG CTCs, and PFS (Table 2) or OS was observed (data not shown). No clinical parameter was significant for PFS (Table 2) or OS (data not shown).

Due to the non-correlated counts of *ALK*-CNG CTCs at baseline and on crizotinib, we considered the dynamic change of these CTC counts as a possible parameter to evaluate. Patients were assigned into two groups: 16 patients presented with stasis or increase of *ALK*-CNG CTCs (mean increase 27; range, 0 to 169) while 13 patients presented a decrease of the same cells (mean decrease -8; range, -18 to -2) (Figure 2A). PFS according to the dynamic change of the number of *ALK*-CNG CTCs are presented in Figure 2B. We observed a statistically significant association between the dynamic change of numbers of *ALK*-CNG CTCs and PFS on univariate analysis (likelihood ratio test,  $p=0.025$ ) (Table 2). Median PFS were 14.0 months (95% CI, 2.3 months to NA) for patients with a decrease of *ALK*-CNG CTC numbers, and 6.1 months (95% CI, 2.5 to 9.8 months) for patients with a stasis or increase of the numbers of the same cells (Figure 3). The dynamic change of those numbers was not correlated with OS (Table 2, Figure 3). No significant association between the dynamic change of *ALK*-rearranged CTCs, and PFS (Table 2) or OS was observed on univariate analysis (data not shown).

Multivariate Cox proportional hazards regression analysis, using all the clinical covariates and CTC numbers was significant for PFS (Table 2) but not for OS (data not shown) (likelihood ratio test  $p$ -values: 0.038 and 0.491, respectively). Smoking status, number

of treatment lines, number of metastatic sites and dynamic change of *ALK*-CNG CTCs had significantly non-zero coefficients ( $p \leq 0.05$ ). This result was reinforced by a stepwise backward/forward optimization applied on the full model, which selected the same four covariates and improved the model (likelihood ratio test,  $p=0.005$ ) (Table 2) (38). In this model, the dynamic change of *ALK*-CNG CTCs remained the most significant factor associated with the duration of PFS (HR, 4.485; 95% CI, 1.543 to 13.030,  $p=0.006$ ) (Table 2). The Cox model for OS remained non-significant after the same optimization procedure (likelihood ratio test  $p$ -value: 0.209).

## Discussion

Here we examined aberrant *ALK*-FISH patterns in CTCs collected at initiation of crizotinib therapy from 39 *ALK*-rearranged patients. After having classified CTCs into two subsets including *ALK*-rearranged and *ALK*-CNG CTCs, we found that baseline CTC numbers in these two subsets were not predictive of crizotinib benefit. However in 29 of these patients monitored at an early time-point of crizotinib therapy, a significant association between the dynamic evolution on treatment of the numbers of *ALK*-CNG CTCs and the median PFS was observed. The dynamic change of those numbers of CTCs was not associated with OS, probably as a consequence of subsequent treatment-lines in this population after crizotinib resistance. These results show for the first time that molecular analyses of CTCs could identify a predictive biomarker of early progression on crizotinib treatment in *ALK*-rearranged patients. Further studies are needed to confirm our results and evaluate whether it may be extended to other *ALK*-inhibitors. Although our findings should be interpreted in the context of a small size cohort, our study offers a promising perspective on the potential use of CTCs, accessible by a simple blood test, to monitor tumor genetic characteristics, which could be exploited as a predictive biomarker of treatment efficacy among this lung cancer population.

In our first study, ISET-filtration, FA-FISH and manual microscope analysis were used to detect *ALK*-rearrangement in CTCs captured in 1 mL blood from 18 *ALK*-positive and 14 *ALK*-negative patients. All *ALK*-positive patients had four or more *ALK*-rearranged CTCs per 1 mL blood while no or only one *ALK*-rearranged CTC was detected in *ALK*-negative patients. Manual analysis of filtration-enriched CTCs is time-consuming and may be operator-dependent. To improve the feasibility of FISH in filtration-enriched CTCs, to reduce

inter-operator difference and assay duration, we have introduced some technical changes and automated the microscope and imaging analysis. To limit FISH scanning to CTC candidates (DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells) we have combined immunofluorescent staining and FA-FISH and developed a specific automated FISH scanning protocol. The latter has been optimized for filters using 30 z-stacks spaced 0.6 μm apart as well as a multi-exposure protocol for optimal capture and definition of FISH signals (35). Thus thanks to this semi-automated FISH analysis method, we were able to analyze larger blood volumes (3 mL blood corresponding to three independent ISET spots) and more samples from an extended patient cohort. By this approach, about 80% of the patients had at least four *ALK*-rearranged CTCs per 1 mL blood. This discrepancy from our first study could be explained by a difference between spots of the same sample or a possible underestimation of some FISH signals (due to insufficient number of z-stacks in the case of very large CTCs) during the semi-automated analysis. However, in spite of this disadvantage, the method used here increases the feasibility and reliability of *ALK*-FISH testing in filtration-enriched CTCs and may contribute to progress towards the validation and qualification of CTC assays in *ALK*-rearranged NSCLC.

In *ALK*-rearranged NSCLC treated by crizotinib as first-line treatment, the median PFS is 9.7 months but the duration and magnitude of clinical benefit vary widely between patients ranging from a few months to several years (5). The biologic mechanisms underlying the heterogeneity in crizotinib responses are unknown (17). Extensive analyses of diagnostic tumor biopsies according to *ALK*-FISH patterns performed prior to crizotinib therapy have failed to identify informative parameters associated with treatment benefit (39,40). Our results showing that baseline numbers of *ALK*-rearranged and *ALK*-CNG CTCs were not predictive of crizotinib benefit are in agreement with these data. One of the earliest mechanistic hypothesis for the heterogeneous responses to crizotinib was the differential sensitivity of the

four *EML4-ALK* variants (41-43). Recently, in a retrospective study of 35 patients, patients positive for *ALK*-variant 1 in tumor specimens were reported to have a significantly longer PFS to crizotinib than patients with non-variant 1, a result which differed from *in vitro* studies showing that *ALK*-variant 2 was the most sensitive to *ALK*-inhibitors, variant 1 having an intermediate sensitivity (42,44-46). Here we report that the dynamic change on treatment of a CTC subset with an aberrant *ALK*-copy number can identify patients who will experience a durable response to crizotinib. In tumor biopsies from *ALK*-rearranged patients, *ALK*-CNG is frequent but in most cases limited to three or four *ALK*-copies. The presence of *ALK*-CNG tumor cells was also associated with aggressive clinical outcome in several cancers such as neuroblastoma, breast and colorectal cancer, most of *ALK*-CNG co-occurring with other gene aberrations such as *MYCN*, *MET* or *EGFR* (36,47-50). Hyperploid tumor cells harboring a high number of *ALK*-copies are rarely found in tumor biopsies from *ALK*-rearranged patients but are a large contingent of CTCs. Here we have clarified the FISH status of these CTCs by three-color FISH experiments using a chromosome 2 centromere probe and showed unambiguously that CTCs harbor a gain of the native *ALK*-gene and not amplification. The rarity of these hyperploid cells in tumor biopsies from *ALK*-rearranged patients can explained why they have been unexplored.

The results of our study can be unintuitive to the extent that one might rather expect an association between *ALK*-rearranged CTCs and therapeutic outcome than between *ALK*-CNG CTCs. *ALK*-CNG have been identified in two cases of 11 resistance biopsy specimens whereas another study reported high-level amplification of *ALK*-fusion in one case of 15 patients (9,10). Consistent with earlier studies, it was recently reported that only a minority of *ALK*-rearranged patients (~20%) developed *ALK* resistance mutations on crizotinib, thus meaning that others mechanisms including gain or amplification of *ALK*-gene, the up

regulation of bypass signaling pathways (e.g. EGFR, KIT, MEK/ERK) or histological transition (e.g. epithelial-mesenchymal transition (EMT)) may be the dominant resistance mechanisms (15,17). Such pathways or biological processes may be activated in hyperploid tumor cells with aberrant *ALK*-copy number which could be prone to genomic instability and thereby to acquire tumor-promoting alterations. Resistance to ALK-inhibitor is heterogeneous and single site biopsies may be unable to represent the full scope of resistance alterations. Issued from different metastatic sites, CTCs are enriched in cancer cells with specific biological characteristics such as EMT properties or tumor-initiating cell capacity and may be a valuable tool to evaluate tumor heterogeneity and monitor resistance aberrations in real-time.

We report for the first time that serial molecular analysis of CTCs could identify a predictive biomarker of therapeutic efficacy in *ALK*-rearranged NSCLC and help to stratify patients at risk of early resistance. Although confirmatory studies are needed, our results offer a new and important perspective on the potential use of CTCs to replace biopsies for patient monitoring in real time and clinical outcome prediction in this population.

## References

1. Hiley CT, Le Quesne J, Santis G, Sharpe R, de Castro DG, Middleton G, *et al.* Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *Lancet* **2016**;388(10048):1002-11 doi 10.1016/S0140-6736(16)31340-X.
2. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **2007**;448(7153):561-6 doi 10.1038/nature05945.
3. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2013**;31(8):1105-11 doi 10.1200/JCO.2012.44.5353.
4. Solomon B, Soria JC. The continuum of care for ALK-positive NSCLC: from diagnosis to new treatment options - an overview. *Ann Oncol* **2016**;27 Suppl 3:iii1-iii3 doi 10.1093/annonc/mdw300.
5. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, *et al.* Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *The Lancet Oncology* **2012**;13(10):1011-9 doi 10.1016/S1470-2045(12)70344-3.
6. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine* **2013**;368(25):2385-94 doi 10.1056/NEJMoa1214886.
7. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine* **2014**;371(23):2167-77 doi 10.1056/NEJMoa1408440.
8. Katayama R, Khan TM, Benes C, Lifshits E, Ebi H, Rivera VM, *et al.* Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**;108(18):7535-40 doi 10.1073/pnas.1019559108.
9. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, *et al.* Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2012**;18(5):1472-82 doi 10.1158/1078-0432.CCR-11-2906.
10. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, *et al.* Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Science translational medicine* **2012**;4(120):120ra17 doi 10.1126/scitranslmed.3003316.

11. Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, *et al.* ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2013**;19(15):4273-81 doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-0318.
12. Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2013**;31(31):3987-96 doi 10.1200/JCO.2012.45.2029.
13. Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, *et al.* The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* **2014**;4(6):662-73 doi 10.1158/2159-8290.CD-13-0846.
14. Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, Yoshida T, Nosaki K, Takenaka T, *et al.* Secondary mutations at I1171 in the ALK gene confer resistance to both Crizotinib and Alectinib. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **2014**;9(12):e86-7 doi 10.1097/JTO.0000000000000358.
15. Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nature reviews Clinical oncology* **2014**;11(8):473-81 doi 10.1038/nrclinonc.2014.104.
16. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, *et al.* Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov* **2016** doi 10.1158/2159-8290.CD-16-0596.
17. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies. *Ann Oncol* **2016**;27 Suppl 3:iii42-iii50 doi 10.1093/annonc/mdw305.
18. Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, *et al.* CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer cell* **2011**;19(5):679-90 doi 10.1016/j.ccr.2011.04.004.
19. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, *et al.* CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *The Lancet Oncology* **2013**;14(7):590-8 doi 10.1016/S1470-2045(13)70142-6.
20. Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, Friboulet L, Niederst MJ, Lockerman EL, *et al.* Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* **2014**;346(6216):1480-6 doi 10.1126/science.1254721.
21. Shaw AT, Engelman JA. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **2014**;370(26):2537-9 doi 10.1056/NEJMc1404894.



22. Katayama R, Lovly CM, Shaw AT. Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: a paradigm for precision cancer medicine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2015**;21(10):2227-35 doi 10.1158/1078-0432.CCR-14-2791.
23. Zou HY, Friboulet L, Kodack DP, Engstrom LD, Li Q, West M, *et al.* PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer cell* **2015**;28(1):70-81 doi 10.1016/j.ccell.2015.05.010.
24. Faugeroux V, Pailler E, Auger N, Taylor M, Farace F. Clinical Utility of Circulating Tumor Cells in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol* **2014**;4:281 doi 10.3389/fonc.2014.00281.
25. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology* **2014**;11(3):129-44 doi 10.1038/nrclinonc.2013.253.
26. Ross K, Pailler E, Faugeroux V, Taylor M, Oulhen M, Auger N, *et al.* The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer. *Expert review of molecular diagnostics* **2015**;15(12):1605-29 doi 10.1586/14737159.2015.1111139.
27. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, *et al.* Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2011**;29(12):1556-63 doi 10.1200/JCO.2010.28.7045.
28. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, *et al.* Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2006**;12(14 Pt 1):4218-24 doi 10.1158/1078-0432.CCR-05-2821.
29. Pailler E, Adam J, Barthelemy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, *et al.* Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2013**;31(18):2273-81 doi 10.1200/JCO.2012.44.5932.
30. Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V, Coelle C, Mauro V, *et al.* ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* **2012**;23(11):2907-13 doi 10.1093/annonc/mds137.
31. Tan CL, Lim TH, Lim TK, Tan DS, Chua YW, Ang MK, *et al.* Concordance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements between circulating tumor cells and tumor in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2016** doi 10.18632/oncotarget.8136.

32. Kerr KM, Lopez-Rios F. Precision medicine in NSCLC and pathology: how does ALK fit in the pathway? *Ann Oncol* **2016**;27 Suppl 3:iii16-iii24 doi 10.1093/annonc/mdw302.
33. Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, *et al.* A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *British journal of cancer* **2011**;105(6):847-53 doi 10.1038/bjc.2011.294.
34. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I, *et al.* High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **2015**;26(7):1408-15 doi 10.1093/annonc/mdv165.
35. Pailler E, Oulhen M, Billiot F, Galland A, Auger N, Faugeroux V, *et al.* Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells. *BMC cancer* **2016**;16(1):477 doi 10.1186/s12885-016-2461-4.
36. Bavi P, Jehan Z, Bu R, Prabhakaran S, Al-Sanea N, Al-Dayel F, *et al.* ALK gene amplification is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma. *British journal of cancer* **2013**;109(10):2735-43 doi 10.1038/bjc.2013.641.
37. Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing **2016**.
38. Venables WNaR, B. D. . *Modern Applied Statistics with S. Statistics and Computing* **2002**;Fourth Edition.
39. Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, Skokan M, O'Brien T, Lu X, *et al.* Correlations between the percentage of tumor cells showing an anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **2012**;118(18):4486-94 doi 10.1002/cncr.27411.
40. Camidge DR, Skokan M, Kiatsimkul P, Helfrich B, Lu X, Baron AE, *et al.* Native and rearranged ALK copy number and rearranged cell count in non-small cell lung cancer: implications for ALK inhibitor therapy. *Cancer* **2013**;119(22):3968-75 doi 10.1002/cncr.28311.
41. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **2010**;363(18):1693-703 doi 10.1056/NEJMoa1006448.
42. Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, Peifer M, Sos ML, Koker M, *et al.* Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2012**;18(17):4682-90 doi 10.1158/1078-0432.CCR-11-3260.

43. Lei YY, Yang JJ, Zhang XC, Zhong WZ, Zhou Q, Tu HY, *et al.* Anaplastic Lymphoma Kinase Variants and the Percentage of ALK-Positive Tumor Cells and the Efficacy of Crizotinib in Advanced NSCLC. *Clin Lung Cancer* **2016**;17(3):223-31 doi 10.1016/j.clcc.2015.09.002.
44. Crystal AS, Shaw AT. Variants on a theme: a biomarker of crizotinib response in ALK-positive non-small cell lung cancer? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2012**;18(17):4479-81 doi 10.1158/1078-0432.CCR-12-1952.
45. Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, Shimizu J, Horio Y, Kuroda H, *et al.* Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2016** doi 10.1200/JCO.2015.65.8732.
46. Lin JJ, Shaw AT. Differential Sensitivity to Crizotinib: Does EML4-ALK Fusion Variant Matter? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2016**;34(28):3363-5 doi 10.1200/JCO.2016.68.5891.
47. Bagci O, Tumer S, Olgun N, Altungoz O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Lett* **2012**;317(1):72-7 doi 10.1016/j.canlet.2011.11.013.
48. Kim MH, Lee S, Koo JS, Jung KH, Park IH, Jeong J, *et al.* Anaplastic lymphoma kinase gene copy number gain in inflammatory breast cancer (IBC): prevalence, clinicopathologic features and prognostic implication. *PLoS One* **2015**;10(3):e0120320 doi 10.1371/journal.pone.0120320.
49. Hanna MG, Najfeld V, Irie HY, Tripodi J, Nayak A. Analysis of ALK gene in 133 patients with breast cancer revealed polysomy of chromosome 2 and no ALK amplification. *Springerplus* **2015**;4:439 doi 10.1186/s40064-015-1235-9.
50. Pietrantonio F, Maggi C, Di Bartolomeo M, Facciorusso MG, Perrone F, Testi A, *et al.* Gain of ALK gene copy number may predict lack of benefit from anti-EGFR treatment in patients with advanced colorectal cancer and RAS-RAF-PI3KCA wild-type status. *PLoS One* **2014**;9(4):e92147 doi 10.1371/journal.pone.0092147.

**Funding:** EP is supported by the LabEx LERMIT (grant no ANR-10-LABX-0033-LERMIT) and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no FDT20150532072). The authors are grateful for the research support of the Fondation de France (grant no 201300038317), the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant no 20131200417), Innovative Medicines Initiative 11<sup>th</sup> Call CANCER ID (IMI-JU-11-2013, 115749), Institut National du Cancer (PRT-K14-032) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-CE17-0006-01). KR and CR are recipient for the grant DUERTECC/EURONCO (Diplôme Universitaire Européen de Recherche Translationnelle et Clinique en Cancérologie). CRL is supported by ESMO [translational research fellowship] with the aid of a grant from Hoffmann-La Roche. Any views, opinions, findings, conclusions, or recommendations expressed in this material are those solely of the author(s) and do not necessarily reflect those of ESMO or Hoffmann-La Roche.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the patients and their families. The authors also thank Doctor Luc Friboulet for fruitful discussion and critical reading of the manuscript, and Laëtitia Millier for very helpful secretary assistance.

## Figures Legends

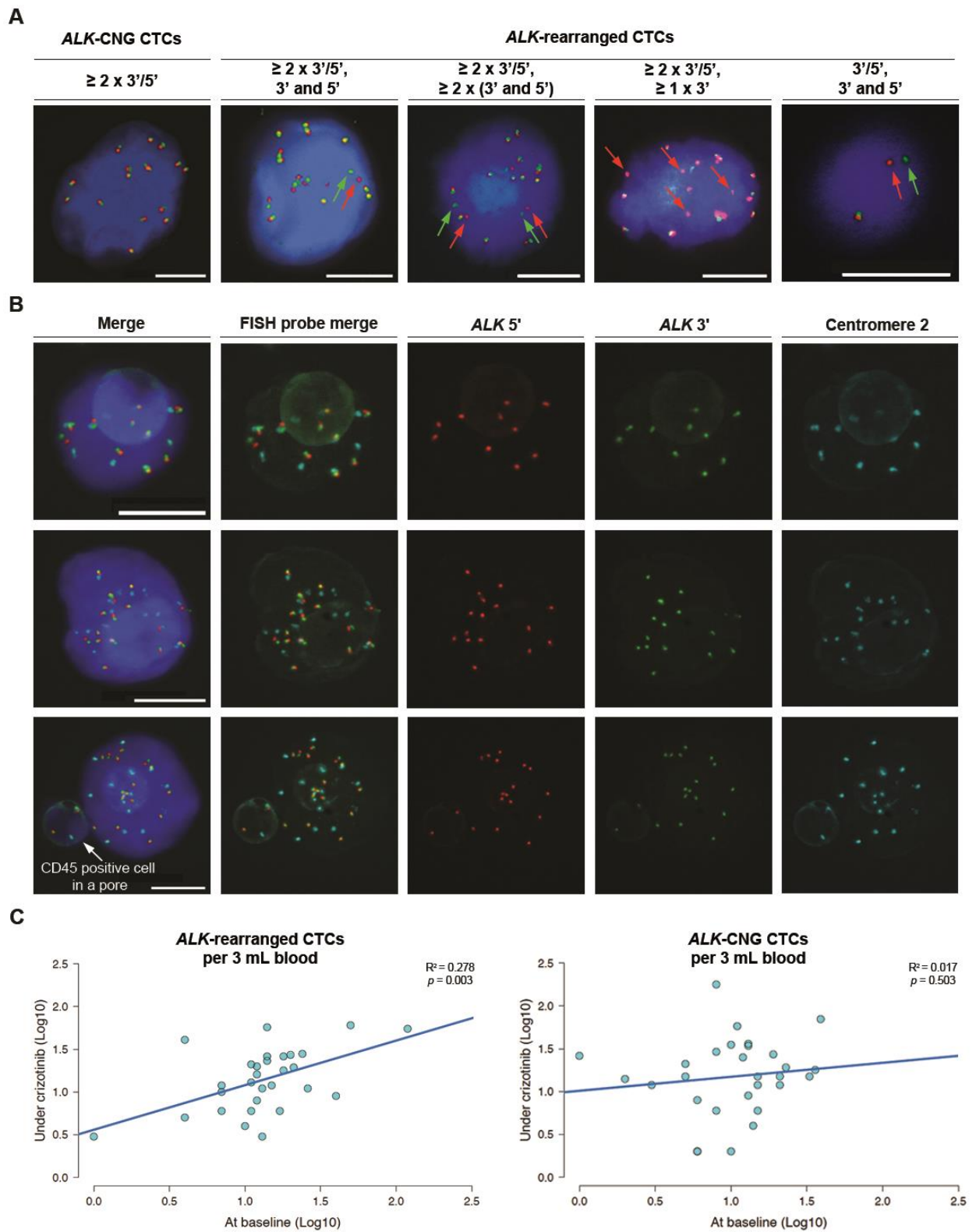
**Figure 1.** Detection of circulating tumor cells (CTCs) harboring *anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*)-gene aberrations at baseline and on crizotinib therapy in *ALK*-rearranged patients. (A) Examples of *ALK*-rearranged CTCs and CTCs with *ALK* copy number gain (*ALK*-CNG) detected by combined fluorescent staining and filter-adapted fluorescent *in situ* hybridization (FA-FISH). Red and green arrows show the *ALK* 5' and the *ALK* 3' probes respectively. Scale: bars = 10  $\mu$ m. (B) Examples of *ALK*-rearranged and *ALK*-CNG CTCs detected by combined fluorescent staining and three-color FA-FISH for *ALK*-gene and chromosome 2 centromeric detection. Scale: white bars = 10  $\mu$ m. (C) Linear regressions for *ALK*-rearranged and *ALK*-CNG CTCs at baseline and on crizotinib therapy.

**Figure 2.** Correlation between the dynamic change of the numbers of circulating tumor cells (CTCs) with an *anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*) copy number gain (CNG) on crizotinib and survival in *ALK*-rearranged patients. (A) Dynamic change of the numbers of *ALK*-CNG CTCs on crizotinib. (B) Progression-free survival (PFS) according to the dynamic change of the number of *ALK*-CNG CTCs.

### **Figure 3.**

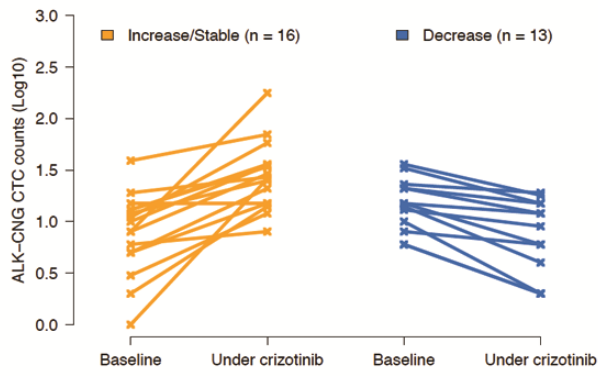
Kaplan-Meier curves for progression-free survival (PFS) (A) and overall survival (OS) (B) of patients with a stasis/increase or decrease of *ALK*-CNG CTCs on crizotinib treatment.

**Figure 1**

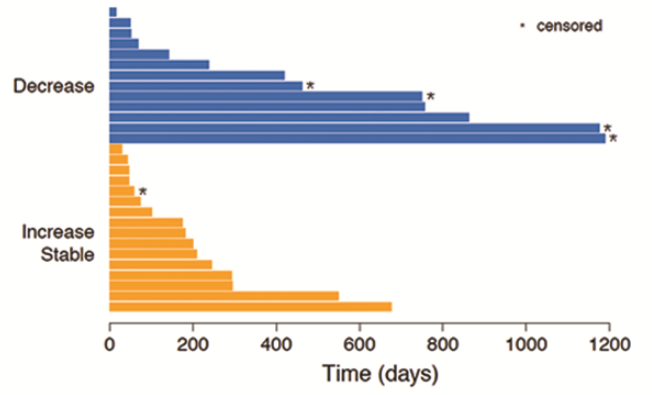


**Figure 2**

**A**

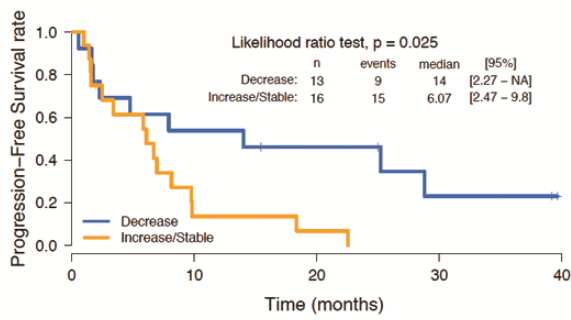


**B**



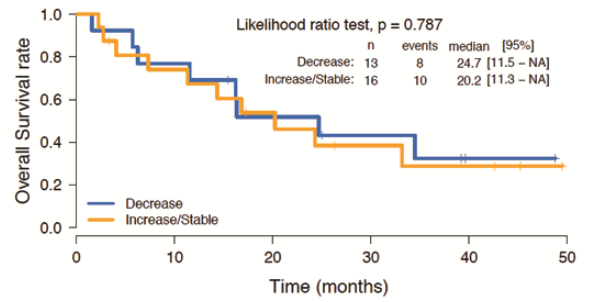
**Figure 3**

**A**



		No. patients at risk				
		0	5	10	15	20
Decrease	13	7	5	2	0	0
Increase/Stable	16	2	1	0	0	0

**B**



		No. patients at risk					
		0	10	20	30	40	50
Decrease	13	10	6	4	1	1	1
Increase/Stable	16	11	7	4	3	3	3



**Table 1.** Demographics and Clinical Parameters

Clinical Parameters	No.	Patients (N = 39)	
			%
<b>Age at baseline (y/o)</b>			
Median		53	
Range		25-81	
<55	20		51
≥55	19		49
<b>Sex</b>			
Female	18		46
Male	21		54
<b>Smoking status (PY)</b>			
<15	26		67
≥15	13		33
<b>Tumor histologic type</b>			
Adenocarcinoma	38		97
Mixed adenocarcinoma & SCC	1		3
<b>Number of previous treatment lines</b>			
1	19		49
≥2	20		51
<b>ECOG PS at baseline</b>			
≤1	33		85
>1	6		15
<b>Number of metastatic sites</b>			
1	16		41
≥2	23		59
<b>Brain metastases at baseline</b>			
Absent	28		72
Present	11		28
<b>Liver metastases at baseline</b>			
Absent	26		67
Present	13		33
<b>Level of lymphocytes at baseline*</b>			
<1.10 <sup>6</sup> /L	10		33
≥1.10 <sup>6</sup> /L	20		67

Abbreviations: ECOG, eastern cooperative oncology group; PS, performance status; PY, pack-year; SCC, squamous cell carcinoma; y/o, years old. \*N=30

**Table 2.** Univariate and Multivariate Cox Regression Analysis for Prediction of Progression-Free Survival

Variables	Univariate Analysis				Multivariate Analysis		
	HR	95% CI	p-value	LR test p-value	HR	95% CI	p-value
Age at baseline (y/o), $\geq 55$ v $< 55$	0.602	0.292-1.244	0.171	0.165	0.120	0.013-1.110	0.062
Sex, M v F	1.375	0.686-2.755	0.369	0.368	0.467	0.129-1.685	0.245
Smoking status (PY), $\geq 15$ v $< 15$	1.430	0.685-2.987	0.341	0.351	57.705	3.823-870.900	0.003
Number of previous treatment, $\geq 2$ v 1	0.924	0.464-1.840	0.822	0.822	0.250	0.082-0.759	0.014
ECOG PS at baseline, $> 1$ v $\leq 1$	1.926	0.784-4.732	0.153	0.181	2.741	0.419-17.920	0.293
Number of metastatic sites, $\geq 2$ v 1	1.535	0.760-3.102	0.233	0.227	7.003	1.709-28.700	0.007
Metastases at baseline, liver   brain   both v none	1.124	0.811-1.558	0.481	0.487	1.153	0.648-2.053	0.628
ALK-rearranged CTCs at baseline, $\geq 14$ v $< 14$	0.831	0.417-1.658	0.600	0.600	3.285	0.611-17.650	0.166
ALK-rearranged CTCs on crizotinib, $\geq 13$ v $< 13$	1.676	0.729-3.853	0.224	0.221	0.762	0.142-4.086	0.751
ALK- CNG at baseline, $\geq 12$ v $< 12$	1.017	0.511-2.024	0.961	0.961	0.325	0.087-1.216	0.095
ALK- CNG on crizotinib, $\geq 15$ v $< 15$	1.817	0.810-4.077	0.147	0.147	0.100	0.013-0.767	0.027
Dynamic change of ALK-rearranged CTCs, stable/increase v decrease	2.059	0.838-5.058	0.115	0.102	0.603	0.112-3.241	0.556
Dynamic change of ALK-CNG CTCs, stable/increase v decrease	2.768	1.097-6.988	0.031	0.025	7.331	1.044-51.499	0.045
<b>Optimized Model</b>							
Smoking status (PY), $\geq 15$ v $< 15$					3.034	1.210-7.607	0.018
Number of previous treatment, $\geq 2$ v 1					0.461	0.176-1.205	0.114
Number of metastatic sites, $\geq 2$ v 1					3.413	1.257-9.265	0.016
Dynamic change of ALK- CNG CTCs, stable/increase v decrease					4.485	1.543-13.030	0.006

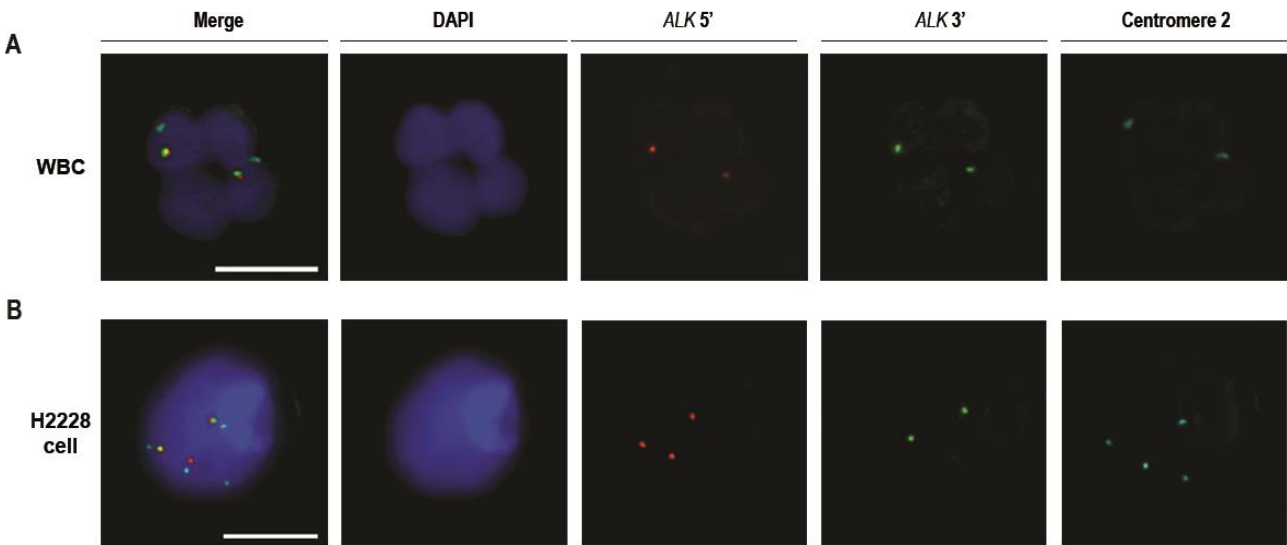
Abbreviations: ALK, anaplastic lymphoma kinase; CNG, copy number gain; ECOG, eastern cooperative oncology group; CI, confidence interval; CTC, circulating tumor cell; HR, hazard ratio; LR, likelihood ratio; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; PS, performance status; PY, pack-year; y/o, years old.

## Supplementary Data

### Legend for Supplementary Figure

**Supplementary Figure 1.** Example of combined immunofluorescent staining and a three-color filter-adapted fluorescent in situ hybridization (FA-FISH) experiment using filtration enriched-H2228 cell line spiked into peripheral blood samples from a healthy donor and *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* break-apart probes coupled to the chromosome 2-specific centromeric probe. (A) Example of a white blood cell (WBC). (B) Example of a H2228 cell. Scale: bars = 10  $\mu\text{m}$ .

Supplementary Figure 1



**Supplementary Table 1.** Detection of *anaplastic lymphoma kinase (ALK)*-Rearrangement and *ALK* copy number gain in Tumors and Circulating Tumor Cells of *ALK*-Rearranged Patients

Patients	ORR	Tumor <sup>a</sup>		CTCs					
		% of <i>ALK</i> -Rearranged Cells	% of <i>ALK</i> -CNG Cells	Characterized by ISET <sup>b</sup>				CellSearch	
				Baseline		On crizotinib		Baseline	On crizotinib
				<i>ALK</i> -Rearranged CTCs (/3 mL)	<i>ALK</i> -CNG CTCs (/3 mL)	<i>ALK</i> -Rearranged CTCs (/3 mL)	<i>ALK</i> -CNG CTCs (/3 mL)	CTCs counts (/7.5 mL)	CTCs counts (/7.5 mL)
P1	PR	97	0	20	12	-	-	0	-
P2	PR	47	0	27	3	-	-	0	-
P3	SD	30	0	18	39	26	70	2	0
P4	PD	30	55	14	8	57	177	713	544
P5	PR	58	16	20	15	27	12	0	1
P6	PR	43	32	119	2	55	14	0	0
P7	NA	27	28	20	44	-	-	16	-
P8	SD	RT-PCR <sup>c</sup>		50	8	60	29	12	0
P9	SD	61	0	13	23	3	19	0	0
P10	NA	31	0	15	9	-	-	6	-
P11	SD	68	0	14	13	23	34	0	0
P12	PR	29	0	14	15	26	15	0	0
P13	PR	44	0	12	21	8	15	1	0
P14	SD	62	8	21	10	20	35	0	0
P15	PD	25	13	11	1	21	26	5	94
P16	PR	87	0	18	5	18	21	0	0
P17	PR	25	1	14	5	-	-	0	-
P18	SD	27	4	40	6	9	2	0	4
P20	PR	77	0	13	6	11	2	0	1
P21	PR	31	53	17	14	6	4	1	0
P22	SD	25	17	4	11	41	58	0	0
P23	PR	4	69	12	6	16	8	0	0
P24	SD	21	41	26	36	11	18	1	0
P25	PD	15	23	24	33	28	15	7	5
P26	PR	9 <sup>d</sup>	16	11	21	13	12	0	0
P27	PD	19	30	13	31	-	-	5	-
P28	PD	12	46	20	40	-	-	N/A	-
P29	PD	33	25	7	5	10	15	19	65

<b>P30</b>	SD		IHC+ <sup>e</sup>	31	53	-	-	1	-
<b>P31</b>	SD	46	32	11	13	6	36	0	0
<b>P32</b>	PR	62	18	15	3	12	12	5	0
<b>P33</b>	PD	26	32	10	15	4	6	2	0
<b>P34</b>	PR	34	6	4	10	5	2	0	0
<b>P35</b>	SD	83	0	12	19	20	27	2	0
<b>P36</b>	SD	76	15	8	7	-	-	0	-
<b>P37</b>	PR	37	0	7	12	12	25	0	0
<b>P38</b>	SD	51	10	26	32	-	-	0	-
<b>P39</b>	PR	78	0	7	13	6	9	0	0
<b>P40</b>	PD	18	15	1	8	3	6	3	1

Abbreviations: *ALK*, anaplastic lymphoma kinase; CNG, copy number gain; CTC, circulating tumor cell; FA-FISH, filter-adapted FISH; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; IF, immunofluorescent staining; IHC, immunohistochemistry; N/A, not available; ORR, overall response rate; PD, progression disease; PR, partial response; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SD, stable disease.

<sup>a</sup> FISH results in the tumor biopsies. When useful, FISH was coupled to IHC or RT-PCR to access positivity.

<sup>b</sup> Three ISET spots were analyzed by combined IF and FA-FISH. Results are expressed as the numbers of *ALK*-rearranged CTC and CTC with gain of *ALK*- copies per 3 mL of blood.

<sup>c</sup> The biopsy was negative by FISH but positive by RT-PCR.

<sup>d</sup> The biopsy was negative by FISH and IHC.

<sup>e</sup> The biopsy was negative by FISH but positive by IHC.

**Supplementary Table 2.** Descriptive Statistics of Numbers of Circulating Tumor Cells in *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)*-Rearranged Patients at Baseline and Under Crizotinib Therapy

	CTC detected by FA-FISH <sup>a</sup>						CTC counts by CellSearch <sup>b</sup>		
	<i>ALK</i> -rearranged CTCs			<i>ALK</i> -CNG CTCs			Baseline (N=38)	Under crizotinib (N=29)	Dynamic change (N=29)
	Baseline (N=39)	Under crizotinib (N=29)	Dynamic change (N=29)	Baseline (N=39)	Under crizotinib (N=29)	Dynamic change (N=29)			
<b>Mean</b>	18.90	19.19	0.41	16.03	24.95	11.50	21.08	24.66	-2.00
<b>Median</b>	14.00	13.00	2.00	12.00	15.00	2.00	0.00	0.00	0.00
<b>Standard Deviation</b>	19.01	16.02	18.40	13.02	33.25	34.04	115.36	102.02	37.17
<b>Minimum</b>	1.00	3.00	-64.00	1.00	2.00	-18.00	0.00	0.00	-169.00
<b>Maximum</b>	119.00	60.00	43.00	53.00	177.00	169.00	713.00	544.00	89.00

Abbreviations: *ALK*, anaplastic lymphoma kinase; CNG, copy number gain; CTC, circulating tumor cell; FA-FISH, filter-adapted fluorescent *in situ* hybridization.

<sup>a</sup> Three ISET spots were analyzed by combined IF and FA-FISH. Results are expressed as the numbers of *ALK*-rearranged CTC and CTC with gain of *ALK* copies per 3 mL of blood.

<sup>b</sup> CTC count by CellSearch per 7.5 mL of blood.



**Supplementary Table 3.** Levels of Significant Association between Circulating Tumor Cells Subsets and Clinical Parameters at Baseline

Clinical Parameters	No. of Patients	CTC subsets	
		<i>ALK</i> -rearranged CTCs	<i>ALK</i> -CNG CTCs
Age at baseline (y/o), $\geq 55$ v $< 55$	39	0.162	0.086
Smoking status (PY), $\geq 15$ v $< 15$	39	0.121	0.002
Number of previous treatment, $\geq 2$ v 1	39	0.226	0.855
ECOG PS at baseline, $\geq 2$ v $< 2$	39	0.424	0.495
Number of metastatic sites, $\geq 2$ v 1	39	0.381	0.621
Brain metastases at baseline, present v absent	39	0.281	0.731
Liver metastases at baseline, present v absent	39	0.111	0.251
Level of lymphocytes at baseline (/L), $< 1.10^6/L$ v $\geq 1.10^6/L$	30	0.481	0.597

Abbreviations: *ALK*, anaplastic lymphoma kinase; CNG, copy number gain; ECOG, eastern cooperative oncology group; PS, performance status; PY, pack-year; y/o, years old.

## C. LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES : BIOMARQUEURS DE RÉSISTANCE ?

Nous avons ensuite cherché à identifier des altérations génomiques de résistance au crizotinib dans les CTC de patients *ALK* remanié résistants à cette thérapie ciblée. Pour cela, j'ai collecté chez ces patients des prélèvements pendant toute la durée du traitement par le crizotinib. Précédemment, nous avons pu mettre en évidence une hétérogénéité moléculaire des CTC enrichies par filtration, présentant un statut anormal du gène *ALK*, avec des sous-populations ayant un nombre variable de copies remaniées ou non. Afin de prendre en compte cette hétérogénéité mais également de détecter des clones minoritaires, nous avons mis au point et optimisé des approches combinant la caractérisation phénotypique, l'isolement et l'analyse moléculaire de CTC à l'échelle de cellule unique. En nous appuyant sur nos résultats précédents, nous avons prioritairement recherché ces anomalies génomiques dans des CTC enrichies par filtration et caractérisées phénotypiquement grâce à des marqueurs de l'EMT.

### 1. Approches de PCR multiplexes ciblées et séquençage à haut débit de nouvelle génération : détection des mutations connues de résistance

#### a. *Isolement de cellules tumorales circulantes uniques par microdissection laser et recherche de mutations connues de résistance par la technologie Access Array*

Les étapes de caractérisation phénotypique et d'isolement des CTC à l'échelle de cellule unique par microdissection laser ont nécessité de nombreuses mises au point. Ces travaux d'évaluation et d'optimisation de méthodes de détection et d'isolement ont été menés avec Vincent Faugeroux (doctorant qui menait un projet de séquençage de l'exome dans des CTC de patients atteints de cancer métastatique de la prostate). Ces travaux ne sont pas présentés dans leur globalité dans ce manuscrit. Seuls les grands points sont retracés. Pour les mises au point, nous avons réalisé des expériences avec des lignées cellulaires de CBNPC mélangées dans du sang de donneur sain afin de « mimer » les CTC.

#### Mises au point de l'approche sur lignée cellulaire

La première méthode développée consiste à caractériser phénotypiquement les CTC enrichies par filtration ISET par une approche d'immunofluorescence avec des marqueurs de l'EMT classiquement utilisés, puis à les isoler à l'échelle de CTC unique par microdissection laser afin de les caractériser moléculairement avec la technologie Access Array permettant de réaliser des PCR multiplexes ciblées suivies de NGS.

### *Évaluation et choix du kit pour l'amplification totale du génome*

Plusieurs kits de WGA présentant des principes d'amplification différents (amplification aléatoire du génome avec le kit GenomePlex de Sigma-Aldrich, *multiple displacement amplification* reposant sur l'amplification isotherme par l'ADN polymérase du bactériophage phi29 avec le kit RepliG de Qiagen ou amplification de type LM-PCR avec le kit Ampli1 WGA de Silicon Biosystems) ont été évalués sur des cellules de lignées enrichies par filtration puis microdisséquées. Le seul kit qui permet une lyse et une amplification totale du génome correcte pour ce type d'échantillon est Ampli1 WGA développé par Silicon Biosystems.

### *Mise au point des conditions de marquage par immunofluorescence*

L'utilisation du protocole de marquage par immunofluorescence précédemment décrit (Matériel & Méthode D.4 et Résultats A.2) ne permettait pas un WGA correct des cellules microdisséquées. Une amplification de bonne qualité est néanmoins obtenue sur des cellules enrichies par filtration mais n'ayant pas subi l'étape d'immunofluorescence. La question était donc de savoir si le WGA était inhibé par un réactif utilisé lors du marquage par immunofluorescence ou par l'accumulation de l'ensemble des étapes. Pour y répondre, chaque étape du protocole a été testée indépendamment et optimisée afin d'être compatible avec le WGA utilisé. Nous avons observé que l'étape critique était celle du marquage nucléaire avec le Hoechst 33342 ; des contrôles de qualité corrects du WGA sont obtenus avec une concentration n'excédant pas 0,5 µg/mL. La digitalisation des spots des filtres et l'analyse du scan étant possibles avec une concentration de Hoechst 33342 de 0,3 µg/mL, nous avons préféré cette concentration.

### *Conditions de microdissection et développement d'un logiciel permettant la relocation des cellules tumorales circulantes entre le scanner Ariol et le microdissecteur laser*

Différents paramètres du laser incluant la puissance, l'ouverture et la vitesse de découpe ont été testés afin de pouvoir microdisséquer le support filtre. La forme de la zone à microdisséquer doit être circulaire afin que le microdissécat tombe correctement dans le capuchon du tube.

Notre objectif était de pouvoir relocaliser précisément les CTC identifiées phénotypiquement suite au scan sur l'Ariol afin de pouvoir les microdisséquer pour les caractériser moléculairement. Suite à l'évaluation de plusieurs systèmes de microdissection laser, notre choix s'est porté sur celui développé par Leica Biosystems. En collaboration avec l'équipe R&D, nous avons développé un logiciel (Alter) permettant le transfert des coordonnées cartésiennes x et y des CTC entre les deux systèmes de chez Leica Biosystems. La relocation précise est basée sur la présence d'une encoche réalisée au début de

la technique de marquage par immunofluorescence qui permet de calibrer le système et ainsi de retrouver l'ensemble des CTC d'intérêt à microdisséquer. Le scan sur l'Ariol étant réalisé avec un objectif 20X, la relocalisation et la microdissection des CTC doivent être réalisées à ce même grossissement.

#### *Congélation des échantillons microdisséqués*

Nous avons observé que l'étape de congélation des cellules microdisséquées à -80°C avant le WGA permet d'avoir une meilleure accessibilité à l'ADN et donc d'obtenir de meilleurs contrôles qualité ce qui est possiblement dû à un meilleur accès au noyau.

#### *Optimisation de la récupération des échantillons microdisséqués*

Au fur et à mesure des résultats obtenus sur des échantillons de cellules microdisséquées, nous avons remarqué que l'amplification correcte des échantillons n'était pas reproductible. Ceci provient vraisemblablement d'une part de l'intégrité des cellules et d'autre part du fait que le tampon de lyse ajouté lors de la première étape du WGA ne peut recouvrir correctement l'ensemble du capuchon et par conséquent l'ensemble des microdissécats. Afin de palier au mieux ce deuxième point, nous utilisons dorénavant des tubes 0,2 µL Opticaps dont le capuchon est recouvert d'un gel en silicone permettant un meilleur recueil des microdissécats puis nous ajoutons le tampon de lyse sous le microscope (objectif 5X) afin d'ajuster et de recouvrir au mieux le maximum de microdissécats.

#### *Validation de la technologie Access Array Fluidigm*

La technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie de NGS ont été réalisées avec Integragen. Nous avons souhaité, grâce à cette approche, mettre en évidence les mutations de résistance aux TKI ALK. Pour cela, nous avons développé un panel ciblant 48 mutations (mutation de résistance et mutations cancer les plus décrites) (**Tableau 5**).

Afin de valider cette approche, nous avons réalisé des expériences avec des lignées cellulaires de CBNPC présentant des mutations connues (A549 : KRAS G12S ; NCI-H1975 : EGFR L858R, EGFR T790M, TP53 273H) mélangées dans du sang de donneur sain afin de « mimer » les CTC. Pour cela, une à vingt cellules de lignées enrichies par filtration ont été microdisséquées par tube. Deux contrôles positifs ont été réalisés pour chacune des deux lignées : un contrôle ADN génomique qui a subi le WGA et un contrôle ADN génomique sans WGA. Les taux d'échec d'amplification et de séquençage sont évalués et présentés dans les **Tableaux 8 et 9** respectivement pour les lignées A549 et NCI-H1975. De façon attendue, plus il y a de cellules microdisséquées dans le tube, moins le taux d'échec est élevé. L'analyse des mutations connues dans ces deux lignées cellulaires permet d'évaluer

la distorsion allélique suite au WGA en comparaison à l'ADN génomique. Les résultats sont présentés dans les **Tableaux 10 et 11**. Dans le cas des mutations hétérozygotes (EGFR L858R et EGFR T790M), la balance allélique est perdue dans la quasi-totalité des échantillons avec une cellule microdisséquée. Cependant, l'augmentation du nombre de cellules par échantillon, ne permet pas de rétablir cette balance allélique ; l'allèle muté qui est majoritairement représenté est préférentiellement amplifié comparé à l'allèle sauvage. De plus, l'analyse des mutations homozygotes (KRAS G12S et TP53 273H), a permis de mettre en évidence la présence de contaminants dans les échantillons. Lors de la microdissection laser des filtres, des cellules hématopoïétiques normales peuvent être enchâssées dans le filtre sous ou proche de la cellule à microdisséquer et par conséquent, vont être la source de contamination par de l'ADN « normal ». Au vu de ces résultats, nous avons fait le compromis de travailler, quand cela est réalisable, avec des *pools* de cinq CTC microdisséquées par échantillon.

ID échantillon	Description	Nombre d'échec pour les PCR Access Array (/48 PCR)	Nombre d'échec pour le séquençage MiSeq (/82 positions génomiques)
A549_CTRL_LMPCR_ID14	Contrôle positif WGA : 100 pg ADN <sub>g</sub> A549 / amplification	3	2
A549_CTRL_gDNA_ID15	Contrôle positif : 49 ng/μl ADN <sub>g</sub> A549	0	0
Manip1_1 C A549_ID3	1 cellule A549	6	9
Manip1_1 C A549_ID4	1 cellule A549	4	3
Manip1_1 C A549_ID5	1 cellule A549	30	46
Manip1_1 C A549_ID6	1 cellule A549	NA	NA
Manip1_1 C A549_ID7	1 cellule A549	47	65
Manip2_1 C A549_ID3	1 cellule A549	3	2
Manip2_1 C A549_ID4	1 cellule A549	12	23
Manip2_1 C A549_ID5	1 cellule A549	7	7
Manip2_1 C A549_ID6	1 cellule A549	22	38
Manip2_1 C A549_ID7	1 cellule A549	40	35
Manip2_1 C A549_ID8	1 cellule A549	18	14
Manip1_2 C A549_ID8	2 cellules A549	14	23
Manip1_2 C A549_ID9	2 cellules A549	2	2
Manip1_2 C A549_ID10	2 cellules A549	3	3
Manip2_2 C A549_ID9	2 cellules A549	30	12
Manip2_2 C A549_ID10	2 cellules A549	3	3
Manip2_2 C A549_ID11	2 cellules A549	3	3
Manip1_5 C A549_ID11	5 cellules A549	3	4
Manip1_5 C A549_ID12	5 cellules A549	0	0
Manip2_5 C A549_ID12	5 cellules A549	43	70
Manip1_10 C A549_ID13	10 cellules A549	2	0
Manip2_10 C A549_ID13	10 cellules A549	2	2
Manip2_20 C A549_ID14	20 cellules A549	3	0

**Tableau 8. Évaluation de la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération sur des échantillons de cellules de lignée A549 enrichies par filtration ISET.**

ID échantillon	Description	Nombre d'échec pour les PCR Access Array (/48 PCR)	Nombre d'échec pour le séquençage MiSeq (/82 positions génomiques)
H1975_CTRL_LMPCR_ID15	Contrôle positif WGA : 100 pg ADN <sub>g</sub> A549 / amplification	2	2
H1975_CTRL_gDNA_ID16	Contrôle positif : 49 ng/μl ADN <sub>g</sub> A549	0	0
Manip3_1 C H1975_ID3	1 cellule A549	NA	NA
Manip3_1 C H1975_ID4	1 cellule A549	30	42
Manip3_1 C H1975_ID5	1 cellule A549	32	32
Manip3_1 C H1975_ID6	1 cellule A549	27	21
Manip3_1 C H1975_ID7	1 cellule A549	13	4
Manip4_1 C H1975_ID3	1 cellule A549	44	63
Manip4_1 C H1975_ID4	1 cellule A549	46	56
Manip4_1 C H1975_ID5	1 cellule A549	12	10
Manip4_1 C H1975_ID6	1 cellule A549	44	54
Manip4_1 C H1975_ID7	1 cellule A549	17	22
Manip4_1 C H1975_ID8	1 cellule A549	41	48
Manip3_2 C H1975_ID8	2 cellules A549	28	26
Manip3_2 C H1975_ID9	2 cellules A549	12	19
Manip3_2 C H1975_ID10	2 cellules A549	6	6
Manip4_2 C H1975_ID9	2 cellules A549	3	2
Manip4_2 C H1975_ID10	2 cellules A549	29	34
Manip4_2 C H1975_ID11	2 cellules A549	13	3
Manip3_5 C H1975_ID12	5 cellules A549	5	9
Manip4_5 C H1975_ID12	5 cellules A549	6	2
Manip4_5 C H1975_ID13	5 cellules A549	6	3
Manip3_10 C H1975_ID13	10 cellules A549	2	2
Manip4_10 C H1975_ID14	10 cellules A549	6	2
Manip3_20 C H1975_ID14	20 cellules A549	6	2

**Tableau 9. Évaluation de la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération sur des échantillons de cellules de lignée NCI-H1975 enrichies par filtration ISET.**

ID échantillon	Référence	Génotype	Fréquence allélique			
			KRAS G12S			
A549_CTRL_LMPCR_ID14	C	TT	T	100.00	C	0.00
A549_CTRL_gDNA_ID15	C	TT	T	99.55	C	0.39
Manip1_1 C A549_ID3	C	TT	T	99.60	C	0.31
Manip1_1 C A549_ID4	C	CC	T	0.00	C	100.00
Manip1_1 C A549_ID5	C	TT	T	99.75	C	0.22
Manip1_1 C A549_ID6				NA		
Manip1_1 C A549_ID7				NA		
Manip2_1 C A549_ID3	C	TT	T	99.82	C	0.12
Manip2_1 C A549_ID4	C	TT	T	99.62	C	0.28
Manip2_1 C A549_ID5	C	TT	T	99.73	C	0.21
Manip2_1 C A549_ID6	C	TT	T	99.77	C	0.21
Manip2_1 C A549_ID7	C	CC	C	0.07	C	99.84
Manip2_1 C A549_ID8	C	CC	C	0.12	C	99.88
Manip1_2 C A549_ID8	C	CT	T	4.90	C	95.07
Manip1_2 C A5498_ID9	C	TC	T	62.52	C	37.48
Manip1_2 C A549_ID10	C	TT	T	98.42	C	1.55
Manip2_2 C A549_ID9	C	TT	T	99.80	C	0.19
Manip2_2 C A549_ID10	C	TT	T	99.83	C	0.16
Manip2_2 C A549_ID11	C	TC	T	51.58	C	48.12
Manip1_5 C A549_ID11	C	CT	T	20.40	C	79.53
Manip1_5 C A549_ID12	C	TC	T	66.73	C	33.20
Manip2_5 C A549_ID12	C			NA		
Manip1_10 C A549_ID13	C	TC	T	63.11	C	36.85
Manip2_10 C A549_ID13	C	TT	T	99.52	C	0.50
Manip2_20 C A549_ID14	C	TT	T	98.16	C	1.69

**Tableau 10. Fréquence allélique de la mutation KRAS G12S obtenu sur des échantillons de cellules de lignée A549 enrichies par filtration ISET suite à une amplification totale du génome et une analyse avec la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération.**



	EGFR L858R						EGFR T790M						TP53 273H					
	Référence	Génotype	Fréquence allélique			Référence	Génotype	Fréquence allélique			Référence	Génotype	Fréquence allélique					
H1975_CTRL_LMPCR_ID15	T	GT	G	61.97	T	37.89	C	TC	T	73.72	C	26.05	C	TT	T	99.67	C	0.33
H1975_CTRL_gDNA_ID16	T	GT	G	63.76	T	35.99	C	TC	T	72.45	C	27.40	C	TT	T	99.36	C	0.47
Manip3_1 C H1975_ID3			NA					NA					NA					
Manip3_1 C H1975_ID4	T	GG	G	99.76	A	0.14	C		NA			C	TT	T	99.34	C	0.63	
Manip3_1 C H1975_ID5	T	GG	G	99.76	T	0.11	C		NA			C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Manip3_1 C H1975_ID6	T	GG	G	99.76	A	0.19	C		NA			C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Manip3_1 C H1975_ID7	T	GG	G	99.25	T	0.58	C	TC	T	72.87	C	27.12	C	TT	T	99.77	C	0.23
Manip4_1 C H1975_ID3	T	GG	G	99.83	A	0.17	C		NA			C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Manip4_1 C H1975_ID4			NA					NA					NA					
Manip4_1 C H1975_ID5	T	GG	G	99.60	T	0.21	C	CC	A	0.15	C	99.78	C	TT	T	99.82	C	0.17
Manip4_1 C H1975_ID6	T	TG	G	35.78	T	63.74	C	CT	T	43.20	C	56.77	C	NA	NA	NA	NA	NA
Manip4_1 C H1975_ID7	T	GG	G	99.46	A	0.34	C	TT	T	99.55	C	0.45	C	NA	NA	NA	NA	NA
Manip4_1 C H1975_ID8	T	TT	G	0.21	T	99.69	C		NA					NA				
Manip3_2 C H1975_ID8	T	GG	G	99.75	T	0.13	C		NA			C	TT	T	99.57	C	0.43	
Manip3_2 C H1975_ID9	T	TG	G	45.61	T	54.11	C	CT	T	38.31	C	61.62	C	TT	T	99.74	C	0.25
Manip3_2 C H1975_ID10	T	GG	G	99.81	T	0.18	C	TT	T	99.83	C	0.17	C	TT	T	99.58	C	0.42
Manip4_2 C H1975_ID9	T	TG	G	43.87	T	55.93	C	CT	T	34.26	C	65.74	C	CT	T	44.13	C	55.86
Manip4_2 C H1975_ID10	T	TG	G	39.59	T	60.27	C		NA					NA				
Manip4_2 C H1975_ID11	T	GG	G	99.34	A	0.57	C	CC	T	0.29	C	99.71	C	TT	T	99.82	C	0.18
Manip3_5 C H1975_ID12	T	GT	G	53.01	T	46.83	C		NA			C	TC	T	87.98	C	12.02	
Manip4_5 C H1975_ID12	T	GT	G	65.73	T	33.90	C	TT	T	91.05	C	8.95	C	TT	T	99.51	C	0.40
Manip4_5 C H1975_ID13	T	TT	C	0.52	T	99.36	C	CC	T	5.19	C	94.81	C	TT	T	99.72	C	0.28
Manip3_10 C H1975_ID13	T	GT	G	73.18	T	26.75	C	TT	T	99.80	C	0.20	C	TT	T	98.67	C	1.33
Manip4_10 C H1975_ID14	T	GT	G	70.07	T	29.69	C	TT	T	99.59	C	0.41	C	TT	T	99.76	C	0.24
Manip3_20 C H1975_ID14	T	GG	G	99.27	T	0.36	C	TT	T	99.92	C	0.08	C	TT	T	99.79	C	0.21

**Tableau 11. Fréquences alléliques des mutations EGFR L858R, EGFR T790M et TP53 R273H obtenus sur des échantillons de cellules de lignée NCI-H1975 enrichies par filtration ISET suite à une amplification totale du génome et une analyse avec la technologie de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération.**

### Recherche dans des CTC de mutations connues de résistance

Après avoir validé le protocole sur lignées cellulaires et dans le but de mettre en évidence des mutations connues de résistance dans les CTC, j'ai isolé et analysé les *pools* de CTC issues de prélèvements de six patients *ALK* remanié résistants au crizotinib. Avant isolement par microdissection laser et afin de pouvoir réaliser des *pools* de CTC phénotypiquement semblables, nous avons classé les cellules Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> caractérisées phénotypiquement grâce à des marqueurs de l'EMT selon les catégories suivantes : épithéliales (E<sup>+</sup>/M<sup>-</sup>), hybrides (E<sup>+</sup>/M<sup>+</sup>), mésenchymateuses (E<sup>-</sup>/M<sup>+</sup>), sans marqueur mais avec un diamètre du noyau supérieur à 16 µm (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> >2 pores), sans marqueur et avec un diamètre du noyau inférieur à 16 µm (E<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> <2 pores), cluster (CTC ≥ 4), cluster mixte (nombre de cellules ≥ 4) et microcluster (nombre de cellules ≥ 3).

Les résultats obtenus pour deux des six patients sont présentés ci-dessous.

#### *Patient 4*

Le patient P4 est un homme âgé de 53 ans, atteint d'un CBNPC métastatique. L'analyse de la biopsie pleurale a permis de mettre en évidence le remaniement du gène *ALK* dans 30 % des cellules tumorales. Le premier prélèvement CTC recueilli correspond au début du traitement par crizotinib suite à l'échec de deux lignes thérapeutiques par chimiothérapie. Deux mois après le début du traitement, ce patient présente une réponse dissociée lors de l'examen radiologique avec une progression au niveau hépatique. Ce patient présente une résistance primaire au crizotinib.

L'isolement et la caractérisation des CTC ont été réalisés sur le prélèvement de résistance (2 mois crizotinib). Les résultats relatant la qualité des WGA et les taux d'échec suite à l'*Access Array* et au NGS sont présentés dans le **Tableau 12**.

Aucune mutation ciblée avec ce panel n'a été mise en évidence dans les 22 *pools* de CTC analysés.

Patient	Prélèvement	ID échantillon	Contrôle Qualité 1 (/5 PCR)	Nombre d'échec pour les PCR Access Array (/48 PCR)	Nombre d'échec pour le séquençage MiSeq (/82 positions génomiques)
P4	2 mois	Contrôle : 10 cellules CD45+	4	8	7
		5 cellules E+/M+	4	7	7
		5 cellules E+/M+	2	14	15
		3 cellules E+/M+	3	23	25
		3 cellules E+/M-	5	4	3
		1 cellule E-/M+ >2 pores	3	28	26
		5 cellules E-/M+ >2 pores	4	6	4
		5 cellules E-/M+ >2 pores	2	27	28
		5 cellules E-/M+ >2 pores	4	2	1
		5 cellules E-/M+ >2 pores	4	1	1
		5 cellules E-/M+ >2 pores	3	10	11
		5 cellules E-/M+ <2 pores	2	18	15
		5 cellules E-/M+ <2 pores	0	35	42
		5 cellules E-/M+ <2 pores	2	4	3
		5 cellules E-/M+ <2 pores	1	17	14
		5 cellules E-/M+ <2 pores	0	38	42
		5 cellules E-/M+ <2 pores	3	18	16
		5 cellules E-/M+ <2 pores	5	4	3
		5 cellules E-/M+ <2 pores	0	38	42
		5 cellules E-/M+ <2 pores	5	7	6
5 cellules E-/M+ <2 pores	3	7	7		
5 cellules E-/M+ <2 pores	2	5	4		
1 microcluster	3	22	19		

**Tableau 12. Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et taux d'échec suite à l'Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération pour les pools de cellules tumorales circulantes isolées dans le prélèvement du Patient 4.**

### Patient 12

La patiente P12 est une femme âgée de 43 ans, atteinte d'un CBNPC métastatique. L'analyse de la biopsie pulmonaire a permis de mettre en évidence le remaniement du gène *ALK* dans 29 % des cellules tumorales. Le premier prélèvement CTC recueilli correspond au début du traitement par crizotinib suite à l'échec de quatre lignes thérapeutiques. Dix mois après le début du traitement, elle présente une progression isolée au niveau cérébral lors de l'examen radiologique mais poursuivra tout de même le crizotinib pendant 20 mois suite à une radiothérapie de l'encéphale *in toto*. Cette patiente présente une résistance acquise au crizotinib.

L'isolement et la caractérisation des CTC ont été réalisés sur le prélèvement tardif (16 mois crizotinib) et sur le prélèvement de résistance (20 mois crizotinib). Les résultats relatant la qualité des WGA et les taux d'échec suite à l'Access Array et au NGS sont présentés dans le **Tableau 13**.

Aucune mutation ciblée avec ce panel n'a été mise en évidence dans les 26 pools de CTC analysés.

Patient	Prélèvement	ID échantillon	Contrôle Qualité 1 (/5 PCR)	Nombre d'échec pour les PCR Access Array (/48 PCR)	Nombre d'échec pour le séquençage MiSeq (/82 positions génomiques)
P12	16 mois	Contrôle : 10 cellules CD45 <sup>+</sup>	5	18	17
		5 cellules E <sup>+</sup> /M <sup>+</sup>	1	15	13
		1 cellule E <sup>+</sup> /M <sup>+</sup>	1	40	42
		5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> >2 pores	0	11	11
		1 cellule E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> >2 pores	0	5	2
		4 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	3	24	23
		5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	3	36	37
		5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	0	7	4
		5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	4	9	7
		5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	3	8	7
	2 microclusters	1	29	29	
	21 mois	Contrôle : 10 cellules CD45 <sup>+</sup>	4	31	31
		5 cellules E <sup>+</sup> /M <sup>+</sup>	1	37	40
		5 cellules E <sup>+</sup> /M <sup>+</sup>	0	10	11
		5 cellules E <sup>+</sup> /M <sup>+</sup>	3	28	31
		5 cellules E <sup>+</sup> /M <sup>+</sup>	0	27	31
		4 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> >2 pores	0	38	42
		5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> >2 pores	4	15	16
		5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> >2 pores	0	40	42
		4 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> >2 pores	0	2	1
5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores		0	37	42	
5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	0	4	4		
1 cellule E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	0	36	42		
5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	1	39	42		
5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	0	39	42		
5 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	3	4	3		
3 cellules E <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> <2 pores	4	10	8		
2 microclusters	3	20	16		

**Tableau 13. Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et taux d'échec suite à l'Access Array suivie du séquençage haut débit de nouvelle génération pour les pools de cellules tumorales circulantes isolées dans le prélèvement du Patient 12.**

Ce panel ciblant 48 mutations fréquemment décrites dans les cancers broncho-pulmonaires n'a pas permis de mettre en évidence des mutations dans les 137 *pools* de CTC analysés chez ces six patients.

Deux hypothèses ont été envisagées afin d'expliquer ces résultats décevants :

1. La première hypothèse est que ce panel ne ciblait pas assez de mutations. Les mutations au niveau du domaine tyrosine kinase de ALK lors de la résistance au crizotinib ne représentent qu'un tiers des mécanismes de résistance. Il nous a donc paru indispensable d'augmenter le nombre d'altérations génomiques ciblées. La difficulté majeure lors du développement d'un panel de PCR multiplexes compatibles avec le WGA Ampli1, réside dans le fait que les

amorces et les amplicons ne doivent contenir aucun site MSE1. Nous avons collaboré avec Silicon Biosystems qui développait un panel Ampli1 CHP Custom Beta qui correspond à une adaptation du panel Ion AmpliSeq Cancer de ThermoFisher pour les échantillons ayant subi un WGA de type Ampli1. Ce panel cible 48 gènes et 1267 mutations *hotspots* (**Tableau 6**). Cependant, ce panel ne comprend pas l'ensemble des mutations connues de résistance aux TKI ALK et EGFR. Nous développons donc en parallèle un panel NSCLC-ALK/EGFR ciblant spécifiquement ces mutations de résistance. Le design de ce panel est réalisé avec l'équipe R&D de ThermoFisher afin de prendre en compte lors du choix des amorces la contrainte des sites MSE1 liée au WGA Ampli1 (**Tableau 7**).

2. La deuxième hypothèse est que nous ne ciblions pas les « bonnes » cellules. En effet, dans la continuité des résultats précédemment obtenus, nous avons caractérisé les CTC avec des marqueurs de l'EMT. Comme nous l'avons déjà observé, nous avons détecté peu de CTC épithéliales ou hybrides. La majorité des cellules microdisséquées ne sont pas marquées mais sont similaires aux cellules observées par FISH, avec un large noyau et des gains de copies du gène *ALK*. Afin de détecter et d'isoler des CTC Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>, nous avons donc évalué la possibilité d'ajouter le marqueur ALK dans le multi-marquage par immunofluorescence des CTC enrichies par filtration.

***b. Isolement de cellules tumorales circulantes uniques par microdissection laser et recherche de mutations connues de résistance par la technologie Ion AmpliSeq***

Notre première hypothèse pouvant expliquer ces résultats décevants reposait sur le fait que le panel développé ciblait uniquement 48 mutations. Afin d'élargir le nombre de cibles, nous avons collaboré avec Silicon Biosystems pour participer à la validation du panel Ampli1 CHP Custom Beta.

Mises au point de l'approche sur lignée cellulaire

Afin de « mettre toutes les chances de notre côté », nous avons cherché à optimiser la qualité du WGA avant de l'engager dans des expériences de PCR multiplexes ciblées et de NGS. Pour cela, nous avons évalué plusieurs paramètres et les résultats des contrôles de qualité des WGA et NGS (incluant la profondeur de lecture moyenne par cible, le pourcentage de cibles non couvertes et les pourcentages de cibles couvertes à 10X et 100X) sont récapitulés dans le **Tableau 14** :

- le gain à convertir l'ADN simple brin restant suite au WGA en ADN double brin (-/+ dsDNA) : cette étape permet, pour un échantillon avec un QC1 = 5 c'est-à-dire une qualité correcte (Pilote\_ID2 *versus* Pilote\_ID3), d'augmenter de 13,24 % le nombre de cibles couvertes à une profondeur de lecture de 100X et, pour un échantillon avec un QC1 = 2 c'est-à-dire de

mauvaise qualité (Pilote\_ID4 *versus* Pilote\_ID5), de 11,12 %. L'ajout de cette étape permet donc d'augmenter sensiblement le nombre de cibles couvertes à une profondeur de lecture de 100X (profondeur de lecture recommandée pour ce type d'analyse). Comme attendu, le pourcentage de cibles non couvertes ne varie pas.

- la conservation des WGA purifiés (conservation 1 an / pas de conservation) : cette étape n'impacte pas la suite des expériences (Pilote\_ID6 *versus* Pilote\_ID7).
- la réamplification du produit de WGA initial (-/+ ReAmp) : cette étape impacte peu le pourcentage de bases couvertes et non couvertes. Elle peut donc être réalisée pour les échantillons pour lesquels peu de matériel est disponible.

ID échantillon	Description	QC1 WGA (/5)	Nombre de lectures	Profondeur moyenne par cible	% de cibles non couvertes	% de cibles couvertes à 10X	% de cibles couvertes à 100X
Pilote_ID1	Contrôle : ADN génomique	-	351761	1099	0,32 %	99,33 %	97,13 %
Pilote_ID2	5 cellules H1975 / -dsDNA	5	327803	1222	6,35 %	87,62 %	56,18 %
Pilote_ID3	5 cellules H1975 / +dsDNA	-	404530	1489	5,40 %	91,80 %	69,42 %
Pilote_ID4	5 cellules H2228 / -dsDNA	2	420938	1700	13,33 %	82,29 %	64,73 %
Pilote_ID5	5 cellules H2228 / +dsDNA	-	426640	1708	13,02 %	82,89 %	75,85 %
Pilote_ID6	5 cellules H1975 / conservation 1 an	4	357177	1274	14,29 %	79,08 %	58,03 %
Pilote_ID7	5 cellules H1975 / pas de conservation	-	285597	1040	12,06 %	78,41 %	57,66 %
Pilote_ID8	5 cellules H1975 / -ReAmp	4	338195	1226	3,81 %	91,32 %	54,45 %
Pilote_ID9	5 cellules H1975 / +ReAmp	4	369968	1372	5,08 %	86,58 %	52,79 %

**Tableau 14. Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et du séquençage haut débit de nouvelle génération (Picard) des échantillons de lignées cellulaires séquençés sur le PGM Ion Torrent.**

Les moyennes de profondeur de lecture par cible pour le contrôle ADN génomique ainsi que pour chacun des huit échantillons WGA de lignées cellulaires sont présentées sur la *heatmap* (**Figure 25**). Seize amplicons (mentionnés en rouge) sont de façon systématique pas ou peu amplifiés dans les échantillons ayant subi un WGA. Cela est dû à la taille trop importante des fragments générés suite à la digestion MSE1 lors du WGA. Ces résultats ont été confirmés par d'autres groupes évaluant ce panel ; le design des amplicons est actuellement en cours de modification par Silicon Biosystems.

Chromosome	Position génomique	Taille amplifoon	Gène		Profondeur moyenne de lecture											
					Pilote_ID1	Pilote_ID2	Pilote_ID3	Pilote_ID4	Pilote_ID5	Pilote_ID6	Pilote_ID7	Pilote_ID8	Pilote_ID9			
chr1	43814952	43815084	132	MPL	1	ST_MPL.25666	1033	0	0	0	0	0	0	0	0	0
chr1	115252190	115252312	122	NRAS	2	ST_NRAS.932	1225	69	212	211	190	410	186	52	69	96
chr1	115256477	115256580	103	NRAS	3	ST_NRAS.2852	1552	37	67	265	378	141	154	47	14	14
chr1	115258636	115258760	124	NRAS	4	ST_NRAS.32	1112	147	219	819	1995	598	378	212	231	231
chr1	162724504	162724630	126	DDR2	5	ST_DDR2.31901	1075	4481	3873	4514	5526	468	318	3025	1680	1680
chr1	162729564	162729643	79	DDR2	6	ST_DDR2.1	1585	667	1003	3772	4418	919	1061	1064	1137	1137
chr1	162740049	162740176	127	DDR2	7	ST_DDR2.26836	1360	5673	6988	13807	14493	843	465	4163	7408	7408
chr1	162741893	162741996	103	DDR2	8	ST_DDR2.11788	1137	2531	4121	9090	5432	541	231	2476	6425	6425
chr1	162743301	162743422	121	DDR2	9	ST_DDR2.44063	1211	5604	6746	4289	3348	492	383	4365	3456	3456
chr10	43613799	43613883	84	RET	10	ST_RET.22662	1067	664	428	0	0	0	1	63	7	7
chr10	43615529	43615604	75	RET	10	ST_RET.7018	1215	430	350	0	0	0	0	71	2	2
chr10	89624165	89624289	124	PTEN	11	ST_PTEN.2357	1183	1419	1575	657	801	1938	1449	1533	2151	2151
chr10	89692799	89692917	118	PTEN	12	ST_PTEN.2563	860	76	77	28	49	4	7	73	30	30
chr10	123257981	123258101	120	FGFR2	13	ST_FGFR2.26874	1406	4444	4858	4287	3842	2464	1505	4154	9283	9283
chr10	123279416	123279539	123	FGFR2	14	ST_FGFR2.16922	904	1678	1998	1103	923	415	315	2260	2688	2688
chr10	123279606	123279714	108	FGFR2	14	ST_FGFR2.8799	1145	2681	2718	1349	1580	589	431	2926	4160	4160
chr11	108117757	108117853	96	ATM	16	ST_ATM.280	1156	72	163	463	833	0	0	100	92	92
chr11	108119745	108119833	88	ATM	17	ST_ATM.436	1160	118	323	548	990	174	147	149	163	163
chr11	108123519	108123625	106	ATM	18	ST_ATM.1710	1656	49	145	63	110	53	48	72	36	36
chr11	108155024	108155146	122	ATM	19	ST_ATM.1201	1111	114	184	165	173	108	115	123	74	74
chr11	108170420	108170501	81	ATM	20	ST_ATM.696	600	45	84	554	710	32	51	148	85	85
chr11	108172361	108172453	92	ATM	21	ST_ATM.36	1124	92	233	373	658	102	140	73	71	71
chr11	108173613	108173707	94	ATM	22	ST_ATM.2502	1366	274	458	951	1030	35	38	365	240	240
chr11	108218023	108218144	121	ATM	24	ST_ATM.4505	1754	518	892	1449	1321	223	167	688	613	613
chr11	108236128	108236223	95	ATM	25	ST_ATM.2594	1770	159	302	311	656	438	413	234	206	206
chr12	25378543	25378659	116	KRAS	26	ST_KRAS.1063	1260	72	149	259	356	84	75	100	86	86
chr12	25380260	25380364	104	KRAS	27	ST_KRAS.5065	1818	371	573	1541	1622	222	253	363	224	224
chr12	25398229	25398310	81	KRAS	28	ST_KRAS.303	771	46	107	222	480	83	96	40	30	30
chr12	112888095	112888222	127	PTPN11	29	ST_PTPN11.10106	1306	2020	2192	0	0	825	480	1803	2353	2353
chr12	112926834	112926960	126	PTPN11	30	ST_PTPN11.5131	1182	2308	2648	4093	4708	2662	1726	1852	3376	3376
chr12	121431383	121431495	112	HNF1A	31	ST_HNF1A.12456	1558	6862	6900	2	0	0	4	3478	1371	1371
chr12	121431959	121432073	114	HNF1A	31	ST_HNF1A.24537	748	3193	3177	1	0	0	0	1675	691	691
chr13	28592607	28592721	114	FLT3	36	ST_FLT3.5815	1227	5513	6197	3089	2290	0	0	3739	2167	2167
chr13	28602285	28602383	98	FLT3	37	ST_FLT3.1493	1038	167	271	899	1420	1086	1054	180	165	165
chr13	28608226	28608348	122	FLT3	38	ST_FLT3.7813	1250	468	786	661	665	691	729	459	555	555
chr13	28610075	28610193	118	FLT3	39	ST_FLT3.683	1452	2623	3496	12510	10019	0	0	1718	3203	3203
chr13	48942585	48942700	115	RB1	32	ST_RB1.2007	978	200	337	792	1067	245	166	171	275	275
chr13	48955503	48955598	95	RB1	33	ST_RB1.1933	1089	56	148	274	362	53	60	95	76	76
chr13	49033834	49033956	122	RB1	34	ST_RB1.6123	1430	671	795	276	259	48	41	71	39	39
chr13	49039144	49039240	96	RB1	35	ST_RB1.1506	1091	122	114	564	422	109	107	211	70	70
chr14	105241347	105241482	135	AKT1	40	ST_AKT1.58369	514	1	1	0	0	1	0	9	1	1
chr14	105246444	105246579	135	AKT1	41	ST_AKT1.41395	797	172	125	0	0	4	1	54	7	7
chr15	66727349	66727472	123	MAP2K1	42	ST_MAP2K1.15419	1574	2924	3834	3942	3868	4874	3892	3342	5710	5710
chr15	90631830	90631962	132	IDH2	43	ST_IDH2.17599	1332	2006	1834	0	0	0	2	2502	614	614
chr16	68835565	68835684	119	CDH1	44	ST_CDH1.4127	1131	2403	3279	4251	3420	3819	3669	3606	4662	4662
chr16	68846127	68846251	124	CDH1	45	ST_CDH1.908	1171	184	428	1225	1688	925	631	208	241	241
chr16	68847212	68847337	125	CDH1	46	ST_CDH1.28321	970	2758	2576	0	0	0	0	3393	1169	1169
chr17	7573929	7574052	123	TP53	49	ST_TP53.25608	77	225	226	0	0	0	0	168	112	112
chr17	7577014	7577142	128	TP53	50	ST_TP53.7454	1343	1893	1576	1116	1323	2513	741	901	2246	2246
chr17	7577496	7577632	136	TP53	51	ST_TP53.6519	1657	3896	4168	4514	4506	2936	1855	2620	5073	5073
chr17	7578179	7578307	128	TP53	52	ST_TP53.6703	1635	6502	7630	3	1	5004	3712	8183	6064	6064
chr17	7578347	7578484	137	TP53	52	ST_TP53.14490	1207	4762	5500	2	0	3801	2555	5366	5207	5207
chr17	7578515	7578650	135	TP53	52	ST_TP53.10475	1037	4694	4972	0	1	3557	2171	4974	4741	4741
chr17	7579348	7579483	135	TP53	53	ST_TP53.30411	633	325	359	0	0	423	273	636	203	203
chr17	7579857	7579966	109	TP53	53	ST_TP53.7398	1175	770	582	0	1	762	566	1260	483	483
chr17	37880212	37880337	125	ERBB2	47	ST_ERBB2.15839	1813	1698	1803	0	0	0	2	2412	446	446
chr17	37880965	37881085	120	ERBB2	48	ST_ERBB2.19064	1374	2623	2307	605	635	0	0	2990	652	652
chr17	37881291	37881377	86	ERBB2	48	ST_ERBB2.8708	1621	2632	2093	649	577	0	1	3313	712	712
chr17	37881434	37881539	105	ERBB2	48	ST_ERBB2.45774	1746	3089	2600	712	658	0	0	3579	788	788
chr18	48581186	48581306	120	SMAD4	54	ST_SMAD4.1644	1437	323	424	861	1011	66	61	171	146	146
chr18	48586242	48586309	67	SMAD4	55	ST_SMAD4.1025	1001	123	199	154	268	4	9	126	76	76
chr18	48593401	48593522	121	SMAD4	56	ST_SMAD4.4124	1486	140	173	147	185	105	97	187	83	83
chr18	48604660	48604788	128	SMAD4	57	ST_SMAD4.3235	1469	518	721	2038	2498	1109	960	730	800	800
chr19	1206976	1207113	137	STK11	58	ST_STK11.25064	971	0	0	0	0	1	0	0	0	0
chr19	1220374	1220504	130	STK11	59	ST_STK11.81169	614	1	1	0	0	0	0	1	0	0
chr19	1221220	1221320	100	STK11	59	ST_STK11.24430	830	2	1	0	0	0	0	0	0	0
chr19	1223013	1223137	124	STK11	59	ST_STK11.49328	325	0	0	0	0	0	0	2	0	0
chr19	3118933	3119036	103	GNA11	63	ST_GNA11.35673	1026	52	52	0	0	0	0	214	35	35
chr19	17945602	17945732	130	JAK3	60	ST_JAK3.896	1079	4113	4485	3788	3234	2303	1006	1777	2962	2962
chr19	17947985	17948070	85	JAK3	61	ST_JAK3.36060	1251	54	51	0	0	0	1	53	13	13
chr1																



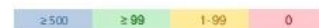
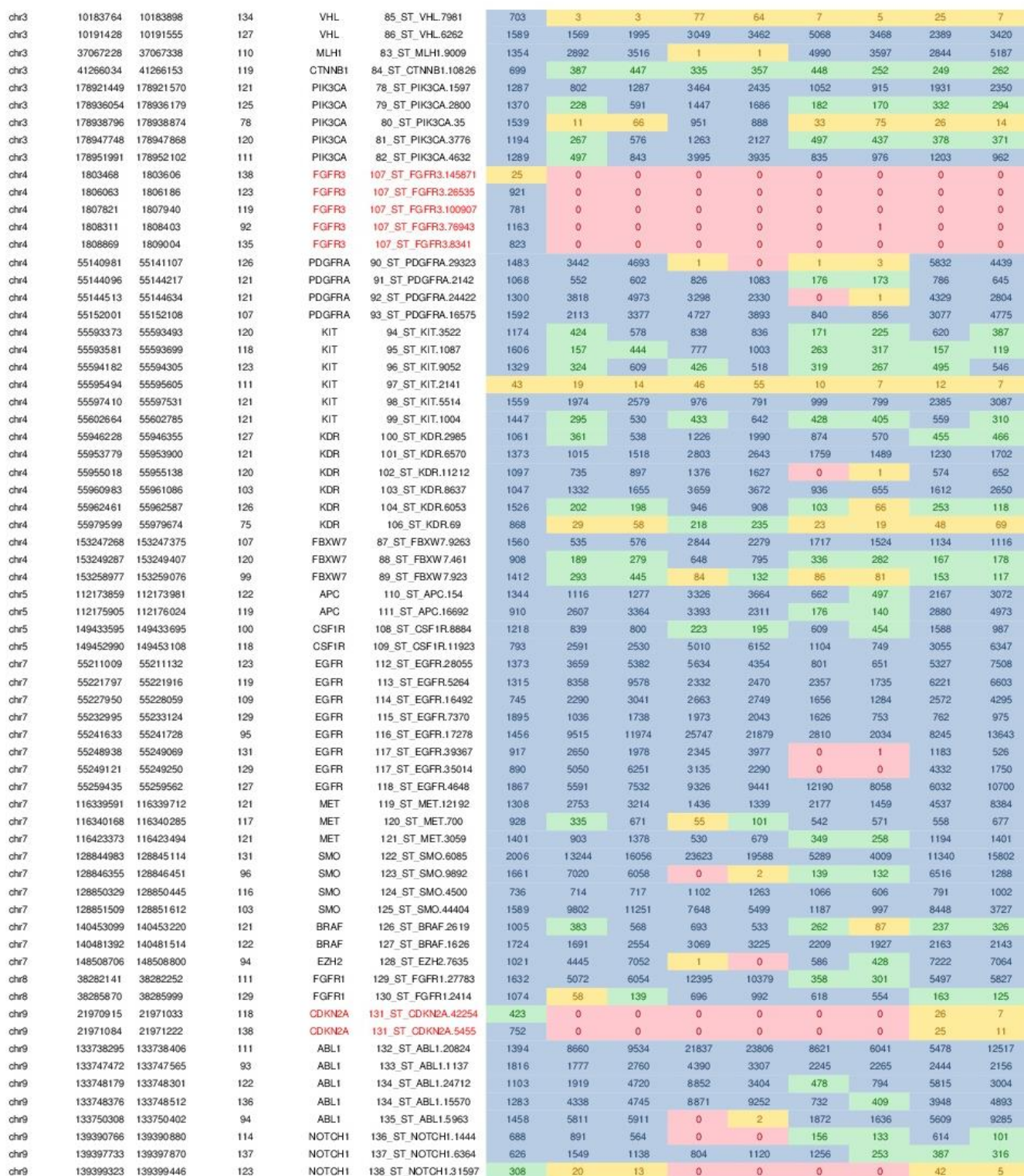


Figure 25. Heatmap présentant les moyennes de profondeur de lecture par cible pour le contrôle ADN génomique et pour chacun des huit échantillons de lignées cellulaires obtenues après séquençage haut débit de nouvelle génération avec le PGM Ion Torrent.

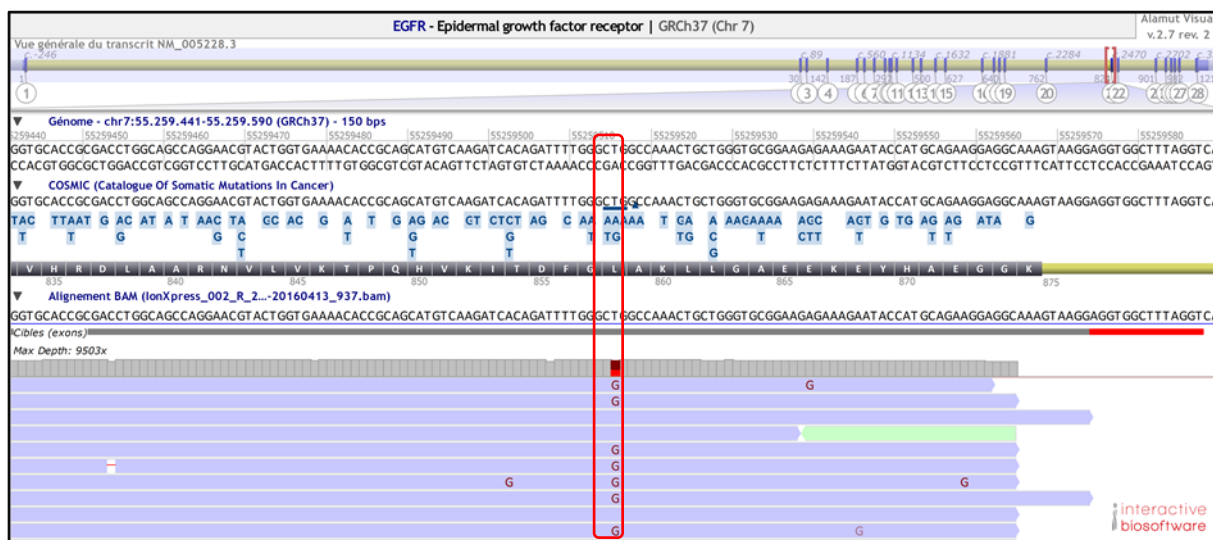


Pour les échantillons réalisés avec la lignée cellulaire NCI-H1975, les mutations ponctuelles décrites ainsi que les fréquences alléliques sont présentées dans le **Tableau 15**. Pour rappel, les mutations EGFR L858R et EGFR T790M sont décrites comme hétérozygotes et la mutation TP53 273H comme homozygote.

ID échantillon	Mutations décrites		
	EGFR L858R	EGFR T790M	TP53 R273H
Pilote_ID2	57,47 %	NA	100 %
Pilote_ID3	60,25 %	NA	100 %
Pilote_ID6	71,82 %	NA	100 %
Pilote_ID17	73,85 %	NA	100 %
Pilote_ID8	71.61 %	NA	100 %
Pilote_ID9	70,08 %	NA	100 %

**Tableau 15. Fréquences alléliques des mutations décrites pour les échantillons de la lignée NCI-H1975**

Les fréquences alléliques détectées dans les six échantillons de lignée NCI-H1975 pour les mutations EGFR L858R et TP53 273H sont similaires à celles détectées dans un échantillon d'ADN extrait à partir d'un culot de cellules (EGFR L858R ~60 % ; TP53 R273H ~100 %). Un exemple de visualisation avec le logiciel Alamut Visual version 2.7 (Interactive Biosoftware, France) des mutations EGFR L858R et TP53 R273H pour l'échantillon Pilote\_ID2 sont présentés respectivement **Figure 26** et **Figure 27**.



**Figure 26. Visualisation avec le logiciel Alamut Visual de la mutation EGFR L858R dans un échantillon de lignée cellulaire NCI-H1975 (Pilote\_ID2).**

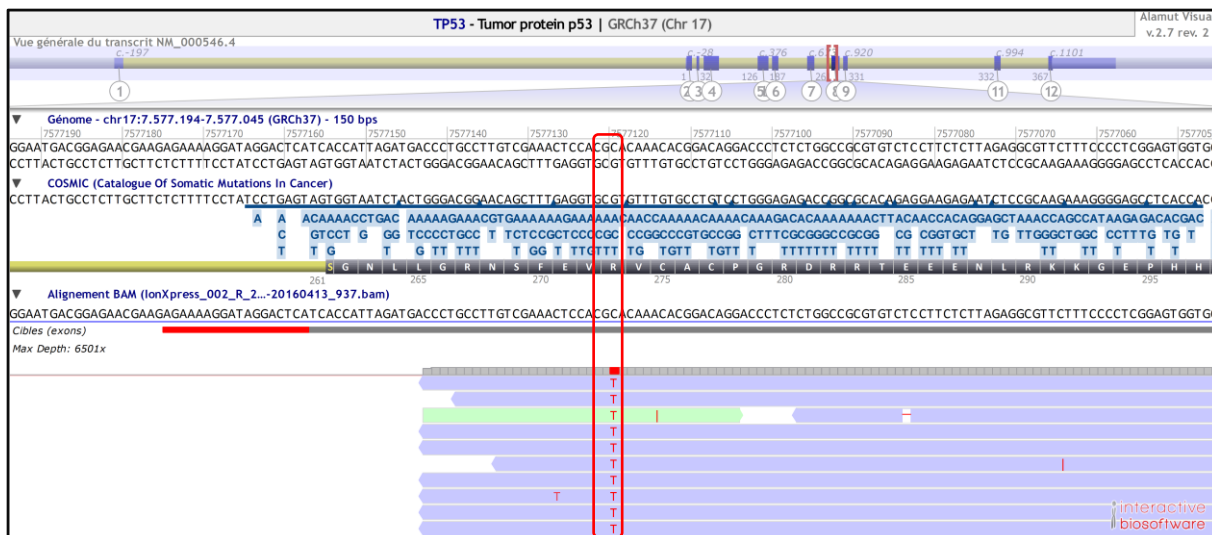


Figure 27. Visualisation avec le logiciel Alamut Visual de la mutation TP53 R273H dans un échantillon de lignée cellulaire NCI-H1975 (Pilote\_ID2).

Néanmoins, la mutation EGFR T790M n'est pas détectée avec les filtres utilisés lors de l'analyse bio-informatique. Après visualisation des séquences (Figure 28), il s'avère que la base mutée est en fin d'amplicon ce qui n'est pas optimal pour la détection de mutations. Ceci explique donc le fait que la mutation EGFR T790M ne soit pas ou peu couverte avec le panel Ampli1 CHP Custom Beta.

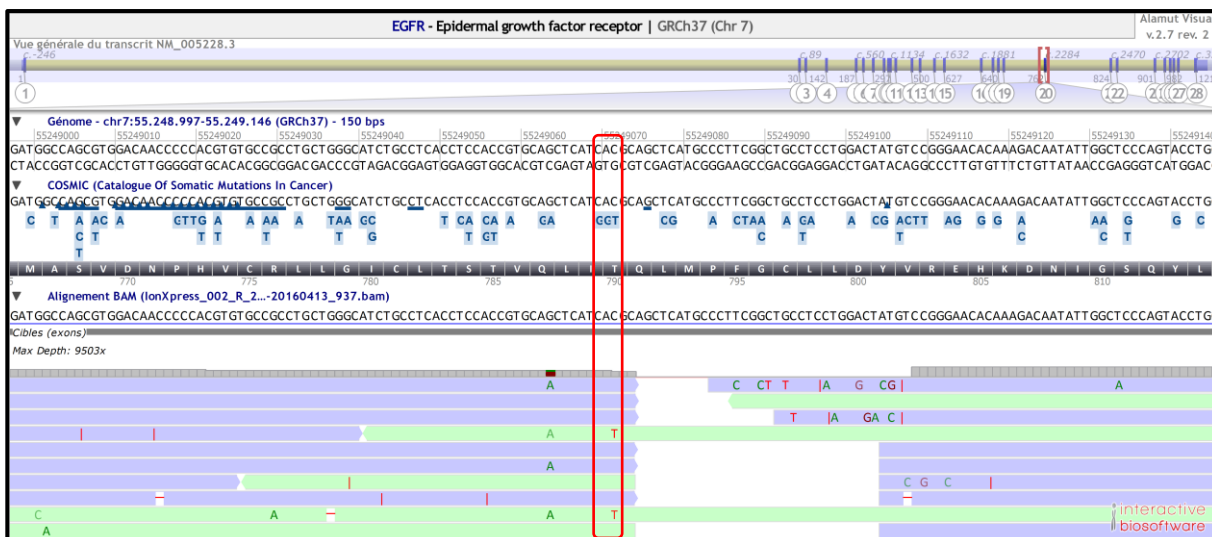


Figure 28. Visualisation avec le logiciel Alamut Visual de la mutation EGFR T790M dans un échantillon de lignée cellulaire NCI-H1975 (Pilote\_ID2).

### Recherche dans des CTC de mutations connues de résistance

Afin de répondre à notre hypothèse, les premiers échantillons engagés sont ceux qui ont été analysés avec l'approche de PCR multiplexes ciblées Access Array suivie de NGS et pour lesquels aucune mutation n'a été détectée avec le panel ciblant 48 mutations (Résultats C.1.a). Les analyses sont en cours et les résultats ne pourront par conséquent pas être présentés dans ce manuscrit.

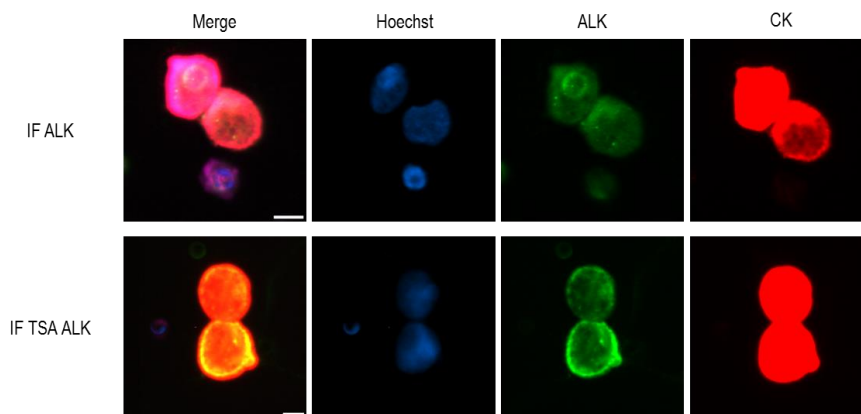
Pour deux des six patients, une biopsie à résistance est disponible ; nous réaliserons donc la même approche sur l'ADN extrait à partir de ce prélèvement tumoral afin de comparer les résultats avec ceux obtenus sur les échantillons CTC.

### ***c. Isolement de cellules tumorales circulantes uniques ALK positive par microdissection laser et amplification totale du génome***

#### Mises au point de l'approche sur lignée cellulaire

Notre deuxième hypothèse reposait sur le fait que nous ne ciblions peut être pas les « bonnes » cellules. Dans l'objectif d'améliorer la détection des CTC et de mettre en évidence des CTC Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>, nous avons mis au point l'immunofluorescence avec l'anticorps ALK utilisé lors du diagnostic par IHC. Nous avons observé lors d'un marquage simple par immunofluorescence (anticorps primaire ALK et anticorps secondaire couplé à un fluorochrome) de cellules de lignée NCI-H2228 (ALK remanié) enrichies par filtration, que l'intensité de ce marquage était très faible. Cette observation est en accord avec ce que nous avons observé dans le passé ; il est difficile de détecter certains marquages sur les filtres, dus notamment à la fixation des cellules avec du formaldéhyde. Nous avons donc comparé deux approches d'amplification du signal sur des cellules de lignées NCI-H2228 : (1) un marquage en trois étapes avec un anticorps secondaire et un anticorps tertiaire ; (2) un marquage avec le procédé TSA (*tyramide signal amplification*). Comme présenté **Figure 29**, la seconde approche permet une nette amplification du signal.

Néanmoins, aucun contrôle de qualité correct du WGA n'est obtenu après ce type de marquage. Malgré de nombreuses tentatives d'optimisation qui ont consisté à retirer un par un les réactifs du kit TSA afin d'identifier le ou les réactifs inhibant le WGA, obtenir un WGA de qualité correcte suite à ce type de marquage par immunofluorescence sur des cellules enrichies par filtration n'est pas possible.



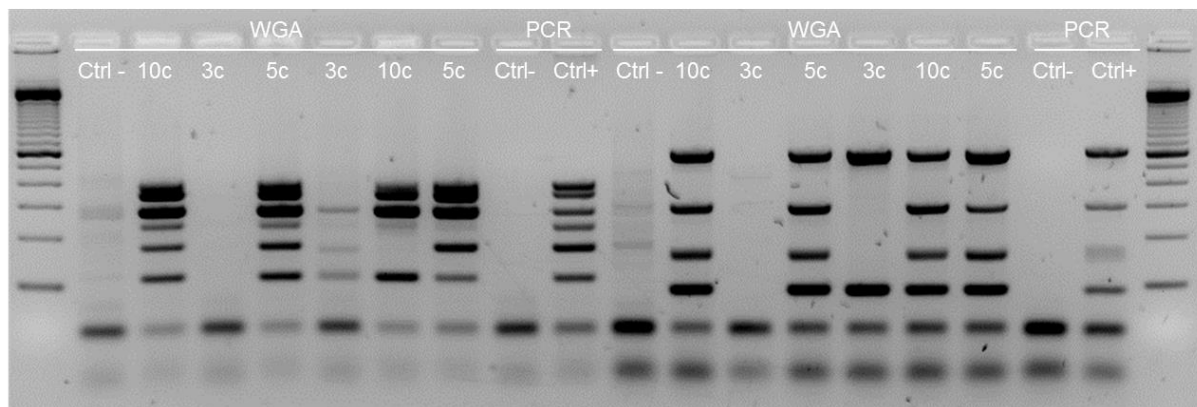
**Figure 29. Marquage par immunofluorescence avec les anticorps ALK et CK des cellules de lignées NCI-H2228 mélangées dans du sang de donneur sain et enrichies par filtration.**

La caractérisation des CTC avec le marqueur ALK n'étant pas compatible avec le WGA Ampli1 pour des cellules enrichies par filtration et isolées par microdissection laser, nous avons souhaité développer une autre approche d'isolement des CTC produisant la protéine ALK.

***d. Isolement de CTC uniques ALK positives par tri cellulaire, amplification totale du génome***

Mises au point et validation de l'approche sur lignée cellulaire

Cette seconde méthode consiste à caractériser phénotypiquement les CTC enrichies par RosetteSep puis à les isoler à l'échelle de CTC unique par tri cellulaire. Nous avons réalisé des expériences de mises au point avec la lignée cellulaire NCI-H2228. Les protocoles de RosetteSep et de marquage ALK (anticorps primaire et anticorps secondaire) sont compatibles avec le WGA. L'étape la plus critique de cette approche correspond au fait de trier et déposer précisément une cellule dans le fond d'un puits d'une plaque 96. Avec les paramètres classiques du trieur Influx (buse de 83  $\mu\text{m}$ , enveloppe de tri d'une gouttelette), aucune amplification correcte par WGA n'est reproductible ce qui par conséquent indique que les cellules ne sont pas correctement déposées dans le fond du puits. Après optimisation du tri (Matériel & Méthode E.2.b), une amplification correcte par WGA de cellules de lignée cellulaire est détectée (**Figure 28**). L'amplification par WGA est reproductible à partir de cinq cellules de lignée cellulaire triées par puits.



**Figure 30. Amplification par PCR des contrôles de qualité (QC1 et QC2) pour des cellules NCI-H2228 triées à différentes dilutions.**

Aux extrémités du gel : marqueur de taille 100 pb. La PCR multiplexe QC1 (gauche) est composée de six amplicons : *DNAH9* (401 pb), *PICK1* (358 pb), *NEK9* (288 pb), *GRIK5* (222 pb), *CADP5* (175 pb) et *LAMC1* (111 pb). L'amplicon *CADP5* contient un site MSE1 : seuls les échantillons avec une digestion partielle présenteront cet amplicon. La PCR multiplexe QC2 (droite) est composée de quatre amplicons : *CK19* (614 pb), *TP53* (301 pb), *D5S2117* (147 pb) et *KRAS* (91 pb).

#### Recherche dans des CTC de mutations connues de résistance

Les CTC de cinq patients résistants au crizotinib ont été enrichies par cette approche. Des CTC Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/ALK<sup>+</sup>/CK<sup>-</sup> ont été identifiées par FACS et un exemple est présenté **Figure 31**.

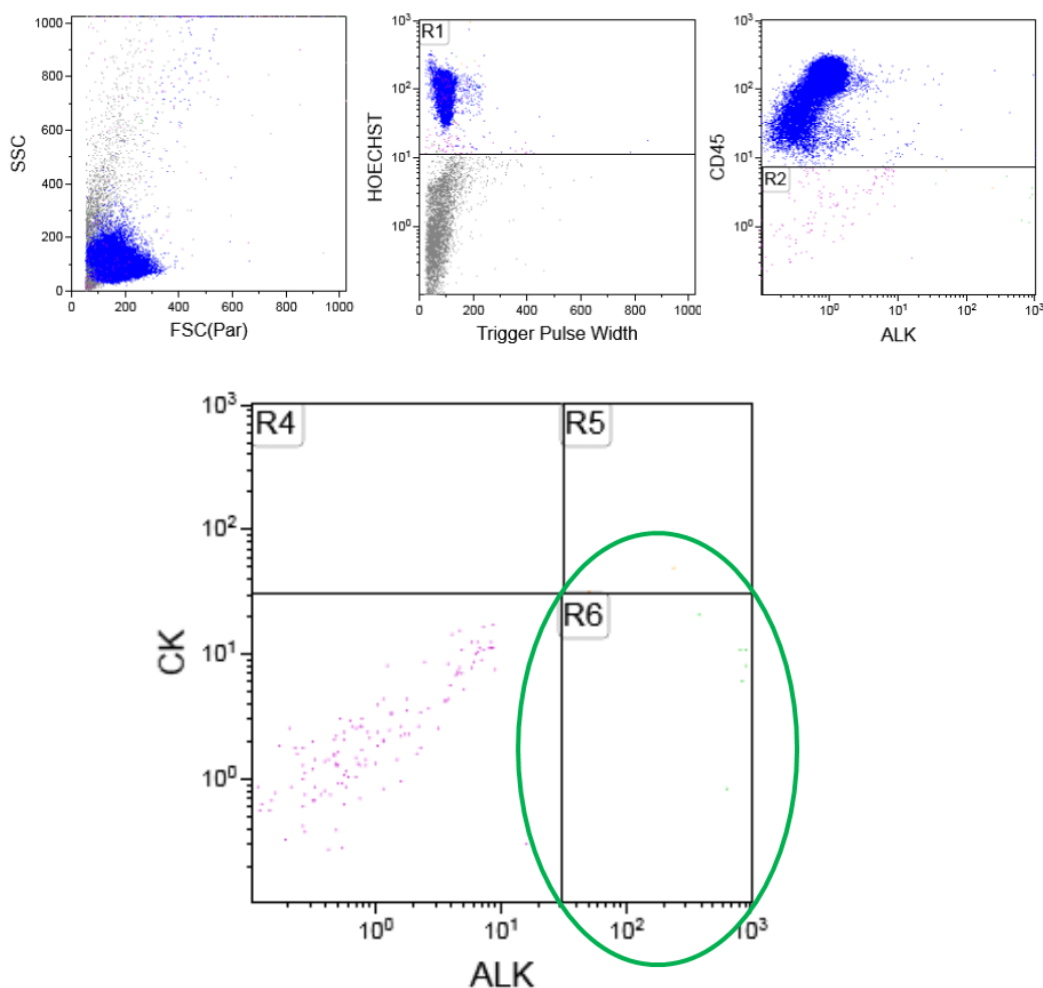


Figure 31 : Exemple de cellules tumorales circulantes Hoechst<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>/CK<sup>-</sup> isolées par tri cellulaire chez un patient atteint de cancer bronchique non à petites cellules ALK remanié

L'analyse des échantillons CTC du premier patient est en cours et les résultats ne pourront pas être présentés dans ce manuscrit.

## 2. Approche de séquençage de l'exome : recherche de nouvelles mutations de résistance

Dans le cadre du projet de Vincent Faugeroux (doctorant) visant à séquencer l'exome de CTC isolées par *pools* de cinq ou dix cellules chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique, le séquençage de l'exome de CTC à l'échelle de cellules uniques a été mis au point.

Le projet de séquençage de l'exome de CTC chez des patients ALK remanié résistants au crizotinib a été sélectionné pour être financé par la taxe d'apprentissage de Gustave Roussy 2015. Avant d'engager des échantillons de CTC isolées, nous avons dans un premier temps réalisé une expérience

de validation sur la plateforme de génomique de Gustave Roussy.

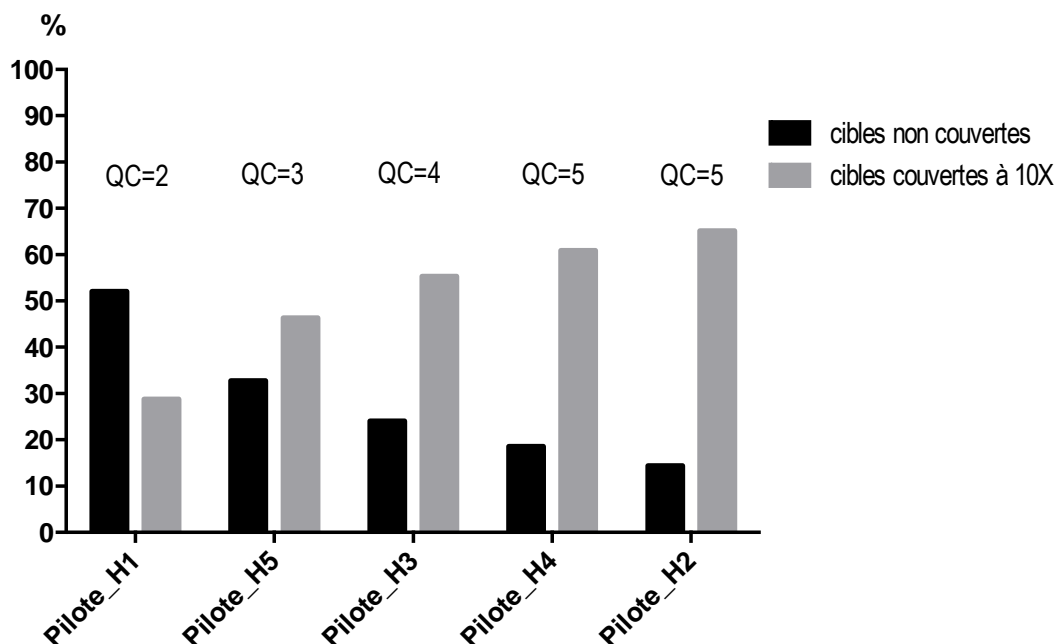
### Validation sur lignées cellulaires

Nous avons réalisé le séquençage de l'exome sur cinq échantillons de lignée cellulaire présentant des contrôles de qualité (QC1) différents. Dans le **Tableau 16**, pour chacun des échantillons les résultats des contrôles de qualité des WGA et des WES incluant la profondeur de lecture moyenne par cible et les pourcentages de cibles non couvertes et couvertes à 10X sont présentés.

ID échantillon	QC1 WGA (/5)	Nombre de lectures	Profondeur moyenne par cible	% de cibles non couvertes	% de cibles couvertes à 10X
Pilote_H1	2	34190088	91	52,07 %	28,82 %
Pilote_H5	3	28676868	58	32,73 %	46,32 %
Pilote_H3	4	34571699	67	24,05 %	55,33 %
Pilote_H4	5	35945707	66	18,57 %	60,91 %
Pilote_H2	5	33236433	62	14,38 %	65,15 %

**Tableau 16. Contrôles de qualité de l'amplification totale du génome (QC1) et du séquençage de l'exome (Picard) pour les échantillons de lignées cellulaires séquençés sur le MiSeq Illumina.**

Les résultats des pourcentages de cibles non couvertes et couvertes à une profondeur de 10X dans cinq échantillons en fonction des contrôle de qualité obtenus sont illustrés **Figure 32**.



**Figure 32 : Pourcentages de cibles non couvertes et couvertes à une profondeur de lecture de 10X pour chacun des cinq échantillons de lignée cellulaire engagés après séquençage de l'exome.**

Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus au laboratoire et concordent avec les contrôles de qualité du WGA.

#### Recherche d'altérations génomiques de résistance dans des CTC

Trois patients *ALK* remanié résistants au crizotinib ont été sélectionnés car une biopsie tumorale contributive à résistance est disponible. Le séquençage de l'exome est en cours sur 40 échantillons de CTC isolées par microdissection laser et tri cellulaire, de biopsie tumorale et d'ADN constitutionnel.



# **Discussion & Conclusion**

Dans ces travaux menés pendant mon Master 2 et mon Doctorat, nous montrons qu'il est possible d'identifier, grâce à la méthode de FA-FISH que nous avons développée, le remaniement du gène *ALK* dans des CTC enrichies par filtration ISET chez des patients atteints de CBNPC porteurs de ce remaniement dans la tumeur biopsiée. Nous avons élargi et confronté notre méthode à la détection d'un autre remaniement. Nous avons ainsi rapporté la détection du remaniement *ROS1* dans des CTC de patients atteints de CBNPC porteurs de ce remaniement. En même temps que la détection du remaniement *ALK*, nous avons observé que les CTC *ALK* remanié présentaient un réarrangement unique de type « *break-apart* » associé à un phénotype mésenchymateux. Nous avons également mis en évidence différentes sous-populations moléculaires de CTC présentant un statut anormal du gène *ALK* (remaniement et/ou gain de copies du gène). Nous avons montré, lors du suivi de ces CTC sous traitement par le TKI de première génération crizotinib, que leur évolution était variable selon ces sous-populations. Dans une cohorte élargie de patients *ALK* remanié, nous avons montré une association significative entre les nombres de CTC présentant exclusivement des gains de copies natives du gène *ALK* avant traitement et à deux mois sous crizotinib et la PFS. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation des CTC pour rechercher un biomarqueur de substitution de l'efficacité du traitement par un inhibiteur de *ALK* et repérer les patients qui ont un risque élevé de progresser rapidement. Parallèlement à ce travail, nous avons développé des outils permettant de rechercher des altérations génomiques de résistance à un TKI dans les CTC de patients *ALK* remanié isolées à l'échelle de cellule unique.

Sur la base des résultats publiés par l'équipe [Farace *et al.*, 2011] et confirmés par d'autres groupes [Hofman *et al.*, 2011 ; Krebs *et al.*, 2012] comparant les enrichissements en CTC par les approches CellSearch et ISET, nous avons sélectionné l'enrichissement par filtration ISET pour différentes raisons. Le premier élément, qui est très pragmatique, était que l'ISET est un système ouvert et flexible permettant le développement de multiples outils pour caractériser les CTC. Le second était que, comme notre équipe l'a montré en 2011, l'enrichissement des CTC par filtration permet de détecter des quantités plus importantes de CTC dans les CBNPC ce qui est à l'évidence, un avantage important pour la caractérisation moléculaire et la détection de biomarqueurs de sensibilité et de résistance aux thérapies ciblées. En s'appuyant sur les résultats obtenus par Lecharpentier *et al.*, l'ISET semblait être une approche intéressante pour explorer l'hétérogénéité phénotypique des CTC grâce à l'étude de marqueurs de l'EMT [Lecharpentier *et al.*, 2011]. Grâce à ce système, nous avons eu l'ambition de développer des approches globales qui permettraient de cumuler, pour une même cellule, plusieurs résultats (morphologie, expression de marqueurs protéiques, altérations génomiques). Celles-ci ont l'avantage d'être plus informatives, de mieux caractériser les CTC que nous analysons, mais aussi de

diminuer les risques d'erreur. Cependant, ce système de filtration présente des inconvénients importants avec lesquels nous avons dû composer lors du développement de la FA-FISH, de la méthode de microscopie semi-automatisée et de l'isolement de cellule unique pour la caractérisation moléculaire. Le premier inconvénient est que le sang doit être filtré, selon les recommandations du fournisseur de l'ISET, Rarecells, dans les quatre heures suivant le prélèvement car aucun fixateur n'est contenu dans le tube de prélèvement. Pour les analyses moléculaires très exigeantes et afin de maximiser les chances de réussite des expériences et diminuer les risques d'échec, nous avons toujours filtré le sang immédiatement après qu'il ait été prélevé. Il est clair que cette contrainte fait que la filtration ISET n'est pas exploitable et utilisable en l'état à grande échelle. Le deuxième inconvénient est que les filtres ne sont pas des supports aussi simples à manipuler que des lames de verre ; lors du développement de la FA-FISH et des protocoles combinés, nous avons dû trouver des solutions pour contourner les difficultés inhérentes à ce support (bruit de fond en fluorescence, accrochages non spécifiques des sondes dans les pores, ...). La troisième contrainte est que les filtres ne sont microscopiquement pas plats ce qui rend l'étape de l'analyse délicate et fastidieuse ; ce point a nécessité de nombreuses optimisations lors du développement de la méthode de microscopie semi-automatisée. Enfin, la technique de filtration ISET impose lors de la lyse des érythrocytes, une fixation des cellules dans un tampon contenant de la formaldéhyde. Ce fixateur n'est pas optimal pour les marquages par immunofluorescence et malgré de nombreuses tentatives d'optimisation incluant le changement du fixateur ou l'utilisation de système permettant l'amplification du signal de fluorescence, nous n'avons pas réussi à améliorer la détection de marqueurs protéiques faiblement produits tel que ALK sur les cellules enrichies par filtration. La caractérisation phénotypique des CTC enrichies par filtration ISET restant difficile, nous avons développé une seconde approche combinant un enrichissement par RosetteSep, un marquage et une détection par FACS qui est plus sensible que la méthode précédemment utilisée. Par ailleurs, dans le cadre du programme européen CANCER-ID, le laboratoire évalue un automate de filtration et d'immunomarquage des CTC en collaboration avec Siemens et plusieurs laboratoires académiques. Certains inconvénients de l'ISET comme la faible sensibilité des marquages par immunofluorescence pourront donc probablement être résolus par ce prototype pour lequel nous développons la FISH.

Afin de caractériser les CTC au niveau moléculaire, nous avons mis au point l'isolement de CTC à l'échelle de cellule unique par microdissection laser, ce qui a impliqué l'évaluation de plusieurs microdissecteurs laser, la mise en place des paramètres adéquats pour la découpe des filtres puis le développement du logiciel Alter qui permet de relocaliser précisément les CTC sélectionnées présentes sur le filtre. Nous avons également dû évaluer plusieurs systèmes d'amplification du génome et optimiser les conditions de WGA afin d'extraire correctement l'ADN des cellules enchâssées dans le

filtre. D'autre part, nous avons aussi mis au point l'isolement de CTC uniques par tri cellulaire, étape particulièrement critique de notre méthode. Nous avons observé qu'une amplification est reproductible à partir de cinq cellules par puits. Afin d'avoir un meilleur aperçu de l'hétérogénéité moléculaire, nous souhaitons améliorer cette étape de tri cellulaire pour réellement travailler à l'échelle « cellule unique ». Afin de sélectionner les échantillons qui pourront être engagés dans la suite du processus de caractérisation, nous avons évalué deux contrôles de qualité. L'analyse à l'échelle de cellule unique nécessite après WGA, des techniques de génotypage sensibles et robustes. Les approches de PCR multiplexes ciblées et de NGS ont nécessité le design d'amorces n'incluant aucun site MSE1 (contrainte liée au WGA Ampli1 de type LM-PCR). Le séquençage de l'exome a nécessité l'ajout d'une étape de digestion enzymatique des amorces universelles utilisées lors du WGA afin de diminuer les biais lors du séquençage et de l'alignement des séquences sur le génome de référence GRCh37/hg19. Après avoir développé l'ensemble des outils nécessaires pour répondre à nos objectifs, la dernière étape non négligeable a été de définir une analyse bio-informatique pour ce type d'approche sur cellules uniques évaluant les biais dus au WGA (incluant entre autre la distorsion allélique) et proposant une méthode pour mettre en évidence les mutations spécifiques aux CTC.

La technique de FA-FISH couplée à l'analyse semi-automatisée des cellules enrichies par filtration ISET, nous a permis de mettre en évidence deux biomarqueurs de sensibilité (*ALK* et *ROS1*) aux thérapies ciblées dans les CTC. Dans les tissus, des études sur de larges cohortes de patients positifs et négatifs pour le remaniement ont permis d'établir la valeur seuil du taux de remaniement à 15 % [Ou *et al.*, 2012]. Cependant, du fait de la rareté des CTC, nous avons plutôt proposé d'utiliser la valeur absolue du nombre de CTC remaniées plutôt que le pourcentage pour établir le seuil de positivité. Nous avons déterminé le seuil de positivité pour les deux biomarqueurs grâce à des cohortes de patients positifs et négatifs. Il sera néanmoins nécessaire d'affiner ce seuil en réalisant une étude statistique sur de plus larges cohortes de patients.

De façon surprenante, l'ensemble des CTC *ALK* remanié détectées ont un unique type de réarrangement « *break-apart* » contrairement à la tumeur qui présente une forte hétérogénéité des profils de réarrangement *ALK*. Pour certains patients, le remaniement « *break-apart* » détecté n'est pas retrouvé dans la biopsie tumorale analysée. La petite taille de l'échantillon biopsié n'est probablement pas représentative de l'ensemble des clones tumoraux présents dans les tumeurs. Ainsi, ces résultats suggèrent que les CTC proviennent de cellules tumorales des différents sites métastatiques. En reflétant la maladie métastatique, nous démontrons ici que les CTC pourraient être plus informatives qu'une petite biopsie de tumeur réalisée à un instant *t* de la maladie métastatique. Nous montrons aussi que ce remaniement prévaut dans le sang quel que soit son statut dans la tumeur. Cette observation

nous a amenés à émettre l'hypothèse que les CTC porteuses de ce remaniement avaient acquis des propriétés particulières et pouvaient être plus invasives.

Nous avons donc mis au point la combinaison du quadruple marquage immunofluorescent et de la FA-FISH sur filtre ISET et montré que les CTC remaniées ont de façon très homogène un phénotype mésenchymateux. L'expression de la protéine ALK dans les biopsies de tumeur de deux patients corrèle également avec l'expression de marqueurs de l'EMT. Nos résultats suggèrent que les CTC porteuses du remaniement ont acquis des propriétés migratoires et d'invasivité. Ils suggèrent aussi que l'expression de la protéine ALK aurait un rôle dans l'induction de l'EMT dans les CBNPC ; les CTC remaniées pour le gène *ALK* pourraient avoir pour origine des foyers spécifiques de l'EMT liés à l'expression de la protéine ALK. Comme cela a été décrit, la régulation de l'EMT est entre autre due au facteur de transcription TWIST1 qui inhibe l'expression de la E-cadhérine. Ce mécanisme complexe permet ainsi la progression tumorale *via* des propriétés d'invasivité des cellules [Wang *et al.*, 2011]. Dans les lymphomes anaplasiques à larges cellules, la protéine de fusion NPM-ALK induit l'expression de TWIST1 et active la voie de signalisation ALK/STAT3 [Zhang *et al.*, 2012].

De plus, les CTC *ALK* remanié sont de petite taille contrairement au concept actuellement admis par les cytopathologistes qui décrivent une CTC comme une cellule d'au moins 16  $\mu\text{m}$  [Farace *et al.*, 2011 ; Hofman *et al.*, 2011]. A l'inverse, les CTC présentant un gain de copies du gène *ALK* sont de plus grande taille ( $> 15 \mu\text{m}$ ). Les clusters communément décrits comme des amas de cellules compactes dans les CBNPC et les cancers métastatiques [Hou *et al.*, 2011 ; Hou *et al.*, 2012] ont été retrouvés en moindre proportion dans nos travaux, ce qui nous questionne. Les clusters identifiés sont peu compacts et ne présentent pas de marqueurs épithéliaux. Ils sont composés d'une ou deux cellules remaniées ce qui suggère un rôle « protecteur » pour les CTC.

Nos résultats suggèrent que les CTC présentant un remaniement unique du gène *ALK* et un phénotype mésenchymateux pourraient résulter d'un fort processus de sélection et jouer un rôle dans la progression métastatique de ces patients.

L'intérêt actuel pour identifier de potentielles cibles thérapeutiques dans l'ADN tumoral circulant pourrait placer ces résultats dans les CTC au second plan. En effet, des avancées majeures ont été réalisées concernant la détection de manière non invasive d'altérations génétiques dans l'ADN tumoral circulant [Schwarzenbach *et al.*, 2011 ; Crowley *et al.*, 2013 ; Dawson *et al.*, 2013 ; Diaz *et al.*, 2014 ; Jovelet *et al.*, 2016]. Des travaux ont notamment été rapportés concernant la détection de mutations *drivers* dans le gène *EGFR* [Bai *et al.*, 2009 ; Yung *et al.*, 2009 ; Yam *et al.*, 2012 ; Douillard *et al.*, 2014 ; Oxnard *et al.*, 2014]. Cependant, identifier les remaniements de gènes *ALK* ou *ROS1* dans l'ADN tumoral circulant grâce à des approches de PCR est complexe. Les points de cassure de ces remaniements se situent

dans de larges régions introniques dans lesquelles aucun *hotspot* évident n'a été identifié. Il est donc difficile de concevoir des amorces de PCR pour identifier les différents remaniements possibles. D'autres approches ont donc dû être développées et peu de données sont actuellement publiées. Newman *et al.* ont montré pour la première fois la détection du gène de fusion *EML4-ALK* et de deux gènes de fusion impliquant *ROS1* avec la méthode de CAPP-Seq (*cancer personalized profiling by deep sequencing*). Également, deux autres études ont ensuite rapporté la détection de ces remaniements dans l'ADN tumoral circulant [Paweletz *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016]. De plus, Wang *et al.* rapportent dans leur étude récemment publiée la localisation précise du point de cassure pour les deux gènes impliqués lors d'un remaniement *ALK*. Leur approche permet également de détecter des mutations de résistance. Ces études montrent donc la possibilité de détecter les remaniements de gènes *ALK* ou *ROS1* dans l'ADN tumoral circulant. Cependant, l'ADN tumoral circulant, étant uniquement du matériel génétique libre, ne permet pas de fournir des informations précises concernant l'hétérogénéité tumorale, qu'elle soit phénotypique ou moléculaire comme nous avons pu le décrire précédemment dans les CTC. En effet, l'analyse de CTC à l'échelle de cellule unique, et qui sont donc de réelles entités cellulaires, permet de refléter l'hétérogénéité phénotypique en étudiant notamment les caractéristiques biologiques de ces cellules afin de mieux comprendre le processus métastatique. D'autre part, cette analyse permet d'avoir un aperçu de l'hétérogénéité moléculaire des cellules tumorales et de possiblement cartographier l'évolution clonale. Comme nous l'avons décrit, certaines CTC peuvent être caractérisées par une ploïdie et une instabilité chromosomique numérique élevées, ce qui pourrait leur conférer un potentiel rôle dans les mécanismes d'échappement aux TKI.

Les travaux publiés sur les profils et les pourcentages de remaniements identifiés par FISH dans les biopsies tumorales au moment du diagnostic n'ont pas permis la mise en évidence d'un biomarqueur prédictif de la réponse aux TKI [Camidge *et al.*, 2012 ; Camidge *et al.*, 2013]. Nos résultats montrant que les nombres de CTC avant traitement dans les deux sous-populations de CTC ne sont pas corrélés avec la PFS sont en accord avec ces données. Très récemment, Yoshida *et al.* ont rapporté dans une étude rétrospective avec 35 patients *ALK* remanié traités par crizotinib que les patients présentant dans leur biopsie le variant 1 de *ALK* ont une PFS plus élevée que les patients présentant dans leur biopsie un autre variant [Yoshida *et al.*, 2016]. Ces résultats sont concordants avec les études *in vitro* montrant que les différents variants du gène *ALK* n'ont pas la même sensibilité au crizotinib [Crystal *et al.*, 2012 ; Heuckmann *et al.*, 2012].

Dans une cohorte élargie de patients *ALK* remanié, nous avons montré que l'évolution sous crizotinib du nombre de CTC présentant exclusivement des gains de copies natives du gène *ALK* pourrait être un

biomarqueur de substitution de l'efficacité thérapeutique pouvant permettre d'identifier les patients qui ont un risque élevé de progresser rapidement. Bien que ces résultats doivent être interprétés dans le contexte d'une cohorte de petite taille, nos travaux offrent une perspective intéressante sur le potentiel des CTC pour suivre les caractéristiques génétiques de la tumeur sous traitement.

Nos résultats montrant que l'augmentation du nombre de CTC hyperploïdes sous crizotinib est associée à un mauvais pronostic chez les patients *ALK* remanié suggèrent que le gain de copies natives du gène *ALK* pourrait être un évènement biologique important dans la progression tumorale et l'échappement à la thérapie ciblée crizotinib. Dans les rares études rapportant les anomalies génomiques présentes dans des biopsies de tumeur à résistance au crizotinib, environ un tiers de ces anomalies sont des mutations ponctuelles dans le domaine tyrosine kinase de *ALK* ou des gains/amplifications du gène [Choi *et al.*, 2010 ; Doebele *et al.*, 2012 ; Katayama *et al.*, 2012 ; Camidge *et al.*, 2014 ; Gainor *et al.*, 2016]. Nos résultats doivent être confirmés par d'autres équipes. Des travaux sont également nécessaires pour évaluer si ces résultats peuvent être étendus à d'autres TKI de deuxième et troisième générations.

Jusqu'à présent, l'étude de la résistance au crizotinib a été focalisée sur l'analyse d'un nombre limité de spécimens tumoraux obtenus chez des patients en situation de résistance, de modèles précliniques ou encore d'expériences *in vitro* [Choi *et al.*, 2010 ; Sasaki *et al.*, 2011 ; Katayama *et al.*, 2011 ; Doebele *et al.*, 2012 ; Katayama *et al.*, 2012 ; Gainor *et al.*, 2013 ; Shaw *et al.*, 2013 ; Toyokawa *et al.*, 2014 ; Gainor *et al.*, 2016]. Ces travaux ont mis en évidence la complexité, l'hétérogénéité biologique ainsi que la nature dynamique de la résistance aux inhibiteurs de *ALK* suggérant que celle-ci doit être abordée d'une façon réellement personnalisée. Les CTC sont une source de cellules tumorales très facilement accessibles et pouvant permettre une prise en charge personnalisée sur la base des caractéristiques moléculaires propres à la tumeur d'un patient. Pour répondre à cette question, notre stratégie a été de développer des approches basées sur l'amplification de l'ADN de cellule unique afin d'explorer l'hétérogénéité moléculaire des CTC et de détecter des clones minoritaires responsables de la résistance qui pourraient potentiellement être présents dans les prélèvements sanguins avant les symptômes de progression clinique ou encore préexister avant le traitement.

Le développement de ces approches a représenté un défi technologique non négligeable comme détaillé ci-dessus. Après avoir mis au point l'ensemble des outils, nous sommes aujourd'hui optimistes sur la possibilité d'identifier des altérations génomiques de résistance dans des CTC isolées à l'échelle de cellule unique. Nous avons mis en place deux stratégies pour rechercher les anomalies de résistance. Les analyses de CTC qui seront réalisées à l'échelle de cellule unique, par les approches de PCR multiplexes ciblées suivie de NGS ou de WES, permettront également de caractériser

phénotypiquement les CTC, notamment avec des marqueurs de l'EMT (phénotype épithélial, « hybride » ou mésenchymateux) ce qui, nous l'espérons, nous permettra d'explorer les caractéristiques biologiques de ces CTC et leur rôle dans le processus métastatique. Lorsqu'une biopsie tumorale à résistance est disponible, nous réaliserons le séquençage global de l'exome de ces CTC afin de comparer leurs profils moléculaires à celui de la biopsie tumorale (anomalies génomiques en commun et spécifiques aux CTC).

Ainsi, l'analyse génomique des CTC devrait générer de nouvelles connaissances sur la résistance aux TKI ALK, permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et contribuer à une meilleure compréhension de l'hétérogénéité tumorale des patients *ALK* remanié.

Ces travaux ouvrent des perspectives sur la personnalisation des traitements qui pourraient reposer sur l'analyse génomique non invasive des CTC. Il apporte en outre des éléments nouveaux sur les caractéristiques biologiques des CTC chez ces patients, certaines étapes du processus métastatique et la diversité génomique de ces cancers.



# **Bibliographie**

- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC *et al.* Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014; **158**: 1110-22.
- Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1795**: 37-52.
- Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, Martin SS *et al.* Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch((R)) CTC test. *Cytometry A* 2015; **87**: 137-44.
- Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K *et al.* Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 863-79.
- Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 834-46.
- Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Pelle O, Rebillard X *et al.* Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem* 2007; **53**: 537-9.
- Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Slijper M, Pelle O *et al.* Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009; **11**: R39.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 623-31.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 2014; **14**: 57-62.
- Alix-Panabieres C, Pierga JY. [Circulating tumor cells: liquid biopsy]. *Bull Cancer* 2014; **101**: 17-23.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Liquid biopsy in cancer patients: advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; **15**: 1411-7.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* 2016; **6**: 479-91.
- Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M *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* 2004; **10**: 6897-904.
- Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH *et al.* Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009; **69**: 2912-8.
- Autebert J, Coudert B, Champ J, Saias L *et al.* High purity microfluidic sorting and analysis of circulating tumor cells: towards routine mutation detection. *Lab Chip* 2015; **15**: 2090-101.
- Awad MM, Engelman JA, Shaw AT. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med* 2013; **369**: 1173.
- Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A *et al.* Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 2013; **31**: 539-44.
- Bai H, Mao L, Wang HS, Zhao J *et al.* Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 2653-9.
- Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM, Smith JA *et al.* Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res* 2010; **70**: 5706-16.

- Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 2012; **31**: 673-87.
- Benoy IH, Elst H, Van Dam P, Scharpe S *et al.* Detection of circulating tumour cells in blood by quantitative real-time RT-PCR: effect of pre-analytical time. *Clin Chem Lab Med* 2006; **44**: 1082-7.
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R *et al.* ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 863-70.
- Bidard FC, Saliba AE, Saias L, Degeorges A *et al.* [Circulating tumor cells and breast cancer: detection techniques and clinical results]. *Bull Cancer* 2009; **96**: 73-86.
- Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB *et al.* Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev* 2013; **32**: 179-88.
- Bidard FC, Weigelt B, Reis-Filho JS. Going with the flow: from circulating tumor cells to DNA. *Sci Transl Med* 2013; **5**: 207ps14.
- Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F *et al.* Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2014; **15**: 406-14.
- Bidard FC, Proudhon C, Pierga JY. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol* 2016; **10**: 418-30.
- Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 9270-4.
- Blay JYR, E.: Métastases. Journal 2015;
- Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M *et al.* Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 10356-61.
- Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S *et al.* TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38alpha/beta signalling. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 1351-61.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W *et al.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; **353**: 793-802.
- Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC *et al.* Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 5581-90.
- Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ *et al.* Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 1011-9.
- Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, Skokan M *et al.* Correlations between the percentage of tumor cells showing an anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012; **118**: 4486-94.
- Camidge DR, Skokan M, Kiatsimkul P, Helfrich B *et al.* Native and rearranged ALK copy number and rearranged cell count in non-small cell lung cancer: implications for ALK inhibitor therapy. *Cancer* 2013; **119**: 3968-75.
- Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; **11**: 473-81.
- Cann GM, Gulzar ZG, Cooper S, Li R *et al.*

- mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS One* 2012; **7**: e49144.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**: 249-57.
- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; **473**: 298-307.
- Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J *et al.* Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 2015; **75**: 892-901.
- Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2015; **331**: 1559-64.
- Charest A, Lane K, McMahon K, Park J *et al.* Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **37**: 58-71.
- Cheung KJ, Ewald AJ. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* 2016; **352**: 167-9.
- Choi PS, Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun* 2014; **5**: 3728.
- Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T *et al.* EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 2010; **363**: 1734-9.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH *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**: 3213-21.
- Costa DB, Kobayashi S, Pandya SS, Yeo WL *et al.* CSF concentration of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib. *J Clin Oncol* 2011; **29**: e443-5.
- Costa DB, Shaw AT, Ou SH, Solomon BJ *et al.* Clinical Experience With Crizotinib in Patients With Advanced ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Brain Metastases. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 1881-8.
- Crino L, Ahn MJ, De Marinis F, Groen HJ *et al.* Multicenter Phase II Study of Whole-Body and Intracranial Activity With Ceritinib in Patients With ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Chemotherapy and Crizotinib: Results From ASCEND-2. *J Clin Oncol* 2016; **34**: 2866-73.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 781-91.
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ *et al.* Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 1420-30.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; **10**: 472-84.
- Crystal AS, Shaw AT. Variants on a theme: a biomarker of crizotinib response in ALK-positive non-small cell lung cancer? *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 4479-81.
- Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, Friboulet L *et al.* Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* 2014; **346**: 1480-6.
- Czyz ZT, Klein CA. Deterministic Whole-Genome Amplification of Single Cells. *Methods Mol Biol* 2015; **1347**: 69-86.
- D'Addario G, Fruh M, Reck M, Baumann P *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*

2010; **21 Suppl 5**: v116-9.

Dagogo-Jack I, Shaw AT. Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies. *Ann Oncol* 2016; **27 Suppl 3**: iii42-iii50.

Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 4040-5.

Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; **368**: 1199-209.

de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C *et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 6302-9.

de Wit S, van Dalum G, Lenferink AT, Tibbe AG *et al.* The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells. *Sci Rep* 2015; **5**: 12270.

Deneve E, Riethdorf S, Ramos J, Nocca D *et al.* Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2013; **59**: 1384-92.

Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J *et al.* A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 2011; **31**: 427-41.

Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 579-86.

Didelot A, Kotsopoulos SK, Lupo A, Pekin D *et al.* Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin Chem* 2013; **59**: 815-23.

Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; **14**: 985-90.

Doebele RC, Lu X, Sumei C, Maxson DA *et al.* Oncogene status predicts patterns of metastatic spread in treatment-naive nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012; **118**: 4502-11.

Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG *et al.* Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 1472-82.

Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T *et al.* Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol* 2014; **9**: 1345-53.

Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW *et al.* Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 8817-22.

Drilon A, Somwar R, Wagner JP, Vellore NA *et al.* A Novel Crizotinib-Resistant Solvent-Front Mutation Responsive to Cabozantinib Therapy in a Patient with ROS1-Rearranged Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 2351-8.

Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, Snuderl M *et al.* Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 21677-82.

Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007; **369**: 1742-57.

Edelman GM, Gallin WJ, Delouee A, Cunningham BA *et al.* Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**: 4384-8.

Engelman JA, Settleman J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* 2008; **18**: 73-9.

Ewing J. *Neoplastic Diseases* 1928;

Fabbri F, Carloni S, Zoli W, Ulivi P *et al.*

- Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett* 2013; **335**: 225-31.
- Facchinetti F, Loriot Y, Cassin-Kuo MS, Mahjoubi L *et al.* Crizotinib-resistant ROS1 mutations reveal a predictive kinase inhibitor sensitivity model for ROS1- and ALK-rearranged lung cancers. *Clin Cancer Res* 2016;
- Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F *et al.* A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 2011; **105**: 847-53.
- Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W *et al.* HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat* 2010; **124**: 403-12.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 453-8.
- Fontana D, Ceccon M, Gambacorti-Passerini C, Mologni L. Activity of second-generation ALK inhibitors against crizotinib-resistant mutants in an NPM-ALK model compared to EML4-ALK. *Cancer Med* 2015; **4**: 953-65.
- Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC *et al.* The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2014; **4**: 662-73.
- Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, Chiappori AA *et al.* Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol* 2014; **15**: 1119-28.
- Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 3987-96.
- Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013; **18**: 865-75.
- Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S *et al.* ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 4273-81.
- Gainor JF, Sherman CA, Willoughby K, Logan J *et al.* Alectinib salvages CNS relapses in ALK-positive lung cancer patients previously treated with crizotinib and ceritinib. *J Thorac Oncol* 2015; **10**: 232-6.
- Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L *et al.* Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov* 2016;
- Gao H, Chakraborty G, Lee-Lim AP, Mo Q *et al.* The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. *Cell* 2012; **150**: 764-79.
- Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S *et al.* Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem* 2013; **59**: 252-60.
- Gerber DE, Minna JD. ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell* 2010; **18**: 548-51.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; **366**: 883-92.
- Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR *et al.* The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 807-17.

- Girotti MR, Gremel G, Lee R, Galvani E *et al.* Application of Sequencing, Liquid Biopsies, and Patient-Derived Xenografts for Personalized Medicine in Melanoma. *Cancer Discov* 2016; **6**: 286-99.
- Gouji T, Takashi S, Mitsuhiro T, Yukito I. Crizotinib can overcome acquired resistance to CH5424802: is amplification of the MET gene a key factor? *J Thorac Oncol* 2014; **9**: e27-8.
- Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA *et al.* Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008; **10**: R52.
- Gu TL, Deng X, Huang F, Tucker M *et al.* Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One* 2011; **6**: e15640.
- Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB *et al.* The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 2015; **520**: 353-7.
- Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov* 2014; **4**: 650-61.
- Hall A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; **28**: 5-14.
- Hallberg B, Palmer RH. The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol* 2016; **27** Suppl 3: iii4-iii15.
- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; **21**: 309-22.
- Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995; **154**: 8-20.
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ *et al.* Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 4218-24.
- Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, Peifer M *et al.* Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 4682-90.
- Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL *et al.* Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014; **20**: 897-903.
- Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E *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* 2011; **129**: 1651-60.
- Hong MK, Macintyre G, Wedge DC, Van Loo P *et al.* Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat Commun* 2015; **6**: 6605.
- Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R *et al.* Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* 2011; **178**: 989-96.
- Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R *et al.* Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 525-32.
- Hrustanovic G, Olivas V, Pazarentzos E, Tulpule A *et al.* RAS-MAPK dependence underlies a rational polytherapy strategy in EML4-ALK-positive lung cancer. *Nat Med* 2015; **21**: 1038-47.
- Huang RY, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT *et al.* An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal

state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis* 2013; **4**: e915.

Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 311-21.

Hvichia GE, Parveen Z, Wagner C, Janning M *et al.* A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer* 2016; **138**: 2894-904.

Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V *et al.* ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2012; **23**: 2907-13.

Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O *et al.* Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med* 2014; **2**: 107.

Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R *et al.* Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997; **14**: 439-49.

Iwama E, Okamoto I, Harada T, Takayama K *et al.* Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors and molecular diagnosis in ALK rearrangement-positive lung cancer. *Onco Targets Ther* 2014; **7**: 375-85.

Johnson TW, Richardson PF, Bailey S, Brooun A *et al.* Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem*

2014; **57**: 4720-44.

Jovelet C, Ileana E, Le Deley MC, Motte N *et al.* Circulating Cell-Free Tumor DNA Analysis of 50 Genes by Next-Generation Sequencing in the Prospective MOSCATO Trial. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 2960-8.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 239-52.

Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D *et al.* Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2011; **13**: R59.

Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1417-9.

Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 2013; **23**: 573-81.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; **438**: 820-7.

Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006; **66**: 11089-93.

Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, de Aguirre I *et al.* Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol* 2015; **1**: 149-57.

Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 80-5.

Katayama R, Khan TM, Benes C, Lifshits E *et al.* Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc*



*Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 7535-40.

Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M *et al.* Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 120ra17.

Katayama R, Friboulet L, Koike S, Lockerman EL *et al.* Two novel ALK mutations mediate acquired resistance to the next-generation ALK inhibitor alectinib. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 5686-96.

Katayama R, Lovly CM, Shaw AT. Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: a paradigm for precision cancer medicine. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 2227-35.

Kerr KM, Lopez-Rios F. Precision medicine in NSCLC and pathology: how does ALK fit in the pathway? *Ann Oncol* 2016; **27 Suppl 3**: iii16-iii24.

Khoo BL, Lee SC, Kumar P, Tan TZ *et al.* Short-term expansion of breast circulating cancer cells predicts response to anti-cancer therapy. *Oncotarget* 2015; **6**: 15578-93.

Kim DW, Mehra R, Tan DS, Felip E *et al.* Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 452-63.

Kim H, Jang SJ, Chung DH, Yoo SB *et al.* A comprehensive comparative analysis of the histomorphological features of ALK-rearranged lung adenocarcinoma based on driver oncogene mutations: frequent expression of epithelial-mesenchymal transition markers than other genotype. *PLoS One* 2013; **8**: e76999.

Kim HR, Kim WS, Choi YJ, Choi CM *et al.* Epithelial-mesenchymal transition leads to crizotinib resistance in H2228 lung cancer cells with EML4-ALK translocation. *Mol Oncol* 2013; **7**: 1093-102.

Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L *et*

*al.* Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 13180-5.

Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX *et al.* Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009; **139**: 1315-26.

Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K *et al.* Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 4494-9.

Kobayashi Y, Sakao Y, Ito S, Park J *et al.* Transformation to sarcomatoid carcinoma in ALK-rearranged adenocarcinoma, which developed acquired resistance to crizotinib and received subsequent chemotherapies. *J Thorac Oncol* 2013; **8**: e75-8.

Kodama T, Tsukaguchi T, Yoshida M, Kondoh O *et al.* Selective ALK inhibitor alectinib with potent antitumor activity in models of crizotinib resistance. *Cancer Lett* 2014; **351**: 215-21.

Kogita A, Togashi Y, Hayashi H, Sogabe S *et al.* Hypoxia induces resistance to ALK inhibitors in the H3122 non-small cell lung cancer cell line with an ALK rearrangement via epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol* 2014; **45**: 1430-6.

Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L *et al.* Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 1556-63.

Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L *et al.* Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2012; **7**: 306-15.

Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G *et al.* Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*

2014; **11**: 129-44.

Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC *et al.* Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006; **442**: 818-22.

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; **363**: 1693-703.

Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011; **20**: 576-90.

Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA, Doane LA *et al.* The t(2;5)(p23;q35): a recurring chromosomal abnormality in Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 1989; **3**: 866-70.

Lebret T, Mejean A. [Metastases from urologic malignancies - Report 2008 of 102e Congress of Association Francaise d'Urologie]. *Prog Urol* 2008; **18 Suppl 7**: S141-2.

Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D *et al.* Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011; **105**: 1338-41.

Leversha MA, Han J, Asgari Z, Danila DC *et al.* Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 2091-7.

Lin HK, Zheng S, Williams AJ, Balic M *et al.* Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 5011-8.

Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA *et al.* Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from

the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013; **8**: 823-59.

Lindsay CR, Le Moulec S, Billiot F, Loriot Y *et al.* Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer. *BMC Cancer* 2016; **16**: 168.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974; **34**: 997-1004.

Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A *et al.* Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 18115-20.

Liu W, Laitinen S, Khan S, Vihinen M *et al.* Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med* 2009; **15**: 559-65.

Liu Y, Liu Q, Wang T, Bian L *et al.* Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: a valuable prognostic and predictive biomarker. *BMC Cancer* 2013; **13**: 202.

Lovly CM, McDonald NT, Chen H, Ortiz-Cuaran S *et al.* Rationale for co-targeting IGF-1R and ALK in ALK fusion-positive lung cancer. *Nat Med* 2014; **20**: 1027-34.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N *et al.* Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; **153**: 865-73.

Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C *et al.* In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* 2014; **516**: 423-7.

- Magbanua MJ, Pugia M, Lee JS, Jabon M *et al.* A Novel Strategy for Detection and Enumeration of Circulating Rare Cell Populations in Metastatic Cancer Patients Using Automated Microfluidic Filtration and Multiplex Immunoassay. *PLoS One* 2015; **10**: e0141166.
- Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L *et al.* Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; **359**: 366-77.
- Maillet D, Martel-Lafay I, Arpin D, Perol M. Ineffectiveness of crizotinib on brain metastases in two cases of lung adenocarcinoma with EML4-ALK rearrangement. *J Thorac Oncol* 2013; **8**: e30-1.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704-15.
- Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 2016; **529**: 298-306.
- Massard C, Oulhen M, Le Moulec S, Auger N *et al.* Phenotypic and genetic heterogeneity of tumor tissue and circulating tumor cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a report from the PETRUS prospective study. *Oncotarget* 2016;
- Matsushime H, Wang LH, Shibuya M. Human c-ros-1 gene homologous to the v-ros sequence of UR2 sarcoma virus encodes for a transmembrane receptorlike molecule. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 3000-4.
- McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; **16**: 717-27.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S *et al.* Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 8152-62.
- Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006; **12**: 130-9.
- Mohlendick B, Bartenhagen C, Behrens B, Honisch E *et al.* A robust method to analyze copy number alterations of less than 100 kb in single cells using oligonucleotide array CGH. *PLoS One* 2013; **8**: e67031.
- Mok T, Wu YL, Lee JS, Yu CJ *et al.* Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 3196-203.
- Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ *et al.* Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005; **65**: 713-8.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG *et al.* Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; **263**: 1281-4.
- Morrow CJ, Trapani F, Metcalf RL, Bertolini G *et al.* Tumorigenic non-small-cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: a clinical case study. *Ann Oncol* 2016; **27**: 1155-60.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; **410**: 50-6.
- Murray PB, Lax I, Reshetnyak A, Ligon GF *et al.* Heparin is an activating ligand of the orphan receptor tyrosine kinase ALK. *Sci Signal* 2015; **8**: ra6.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; **450**: 1235-9.
- Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient

- coverage. *Nat Med* 2014; **20**: 548-54.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 274-84.
- Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 133-43.
- Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. *Cell* 2016; **166**: 21-45.
- Nokihara H, Hida T, Kondo M, Kim YH *et al.* Alectinib (ALC) versus crizotinib (CRZ) in ALK-inhibitor naive ALK-positive non-small cell lung cancer (ALK+ NSCLC): Primary results from the J-ALEX study. . *ASCO Meeting Abstracts* 2016; **34**: (suppl; abst 9008).
- Ntouroupi TG, Ashraf SQ, McGregor SB, Turney BW *et al.* Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope. *Br J Cancer* 2008; **99**: 789-95.
- Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, Ledaki I *et al.* Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol* 2009; **20**: 27-33.
- Oskarsson T, Battle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* 2014; **14**: 306-21.
- Ou SH, Bartlett CH, Mino-Kenudson M, Cui J *et al.* Crizotinib for the treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancer: a success story to usher in the second decade of molecular targeted therapy in oncology. *Oncologist* 2012; **17**: 1351-75.
- Ou SH, Tan J, Yen Y, Soo RA. ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; **12**: 447-56.
- Ou SH, Klempner SJ, Greenbowe JR, Azada M *et al.* Identification of a novel HIP1-ALK fusion variant in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) and discovery of ALK I1171 (I1171N/S) mutations in two ALK-rearranged NSCLC patients with resistance to Alectinib. *J Thorac Oncol* 2014; **9**: 1821-5.
- Ou SH, Ahn JS, De Petris L, Govindan R *et al.* Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study. *J Clin Oncol* 2016; **34**: 661-8.
- Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL *et al.* Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 1698-705.
- Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL *et al.* Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med* 2013; **5**: 179ra47.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. . *The Lancet* 1889; **133**: 571-573.
- Paillet E, Adam J, Barthelemy A, Oulhen M *et al.* Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 2273-81.
- Paillet E, Young R, Farace F. Cellules Tumorales Circulantes : isolement, caractérisation et intérêt en clinique *Correspondance en Onco-Théranostic* 2013; **Vol. II**: p 162-167.
- Paillet E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P *et al.* High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2015; **26**: 1408-15.
- Paillet E, Oulhen M, Billiot F, Galland A *et al.* Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells. *BMC*

- Cancer* 2016; **16**: 477.
- Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 448-56.
- Pantel K, Alix-Panabieres C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 2013; **73**: 6384-8.
- Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; **253**: 180-204.
- Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS *et al.* Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 915-22.
- Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E *et al.* Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 7004-10.
- Pietrasz D, Pecuchet N, Fabre E, Blons H *et al.* [What future for circulating tumor DNA? Current data and prospects in colorectal, non-small cell lung and pancreatic cancers]. *Bull Cancer* 2016; **103**: 55-65.
- Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F *et al.* Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med* 2014; **6**: 1371-86.
- Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H *et al.* Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One* 2010; **5**: e12517.
- Punnoose EA, Ferraldeschi R, Szafer-Glusman E, Tucker EK *et al.* PTEN loss in circulating tumour cells correlates with PTEN loss in fresh tumour tissue from castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2015; **113**: 1225-33.
- Qiu M, Wang J, Xu Y, Ding X *et al.* Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015; **24**: 206-12.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; **19**: 1423-37.
- Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U *et al.* Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; **106**:
- Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, Cayrefourcq L *et al.* Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem* 2014; **60**: 214-21.
- Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R *et al.* Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012; **30**: 777-82.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**: 105-11.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; **445**: 111-5.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A *et al.* Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007; **131**: 1190-203.
- Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, Hu Y *et al.* Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 4449-57.

- Rogers TM, Russell PA, Wright G, Wainer Z *et al.* Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015; **10**: 611-8.
- Ross K, Pailler E, Faugeroux V, Taylor M *et al.* The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; **15**: 1605-29.
- Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T *et al.* CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell* 2011; **19**: 679-90.
- Saliba AE, Saias L, Psychari E, Minc N *et al.* Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 14524-9.
- Sasaki T, Janne PA. New strategies for treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 7213-8.
- Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M *et al.* A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res* 2011; **71**: 6051-60.
- Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L *et al.* A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol* 2012; **41**: 1241-50.
- Sceneay J, Chow MT, Chen A, Halse HM *et al.* Primary tumor hypoxia recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res* 2012; **72**: 3906-11.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 426-37.
- Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K *et al.* CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol* 2013; **14**: 590-8.
- Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR *et al.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 4247-53.
- Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 1105-11.
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; **368**: 2385-94.
- Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DS *et al.* Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; **370**: 1189-97.
- Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR *et al.* Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; **371**: 1963-71.
- Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, Riely GJ *et al.* Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 234-42.
- Shen MM. Cancer: The complex seeds of metastasis. *Nature* 2015; **520**: 298-9.
- Shen Q, Wang X, Yu B, Shi S *et al.* Comparing four different ALK antibodies with manual immunohistochemistry (IHC) to screen for ALK-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2015; **90**: 492-8.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; **448**: 561-6.

- Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL *et al.* A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 19893-7.
- Solomon B, Soria JC. The continuum of care for ALK-positive NSCLC: from diagnosis to new treatment options - an overview. *Ann Oncol* 2016; **27 Suppl 3**: iii1-iii3.
- Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; **371**: 2167-77.
- Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J *et al.* Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 7430-7.
- Song A, Kim TM, Kim DW, Kim S *et al.* Molecular Changes Associated with Acquired Resistance to Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 2379-87.
- Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 611-22.
- Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I *et al.* Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 16772-9.
- Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M *et al.* Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 18392-7.
- Swennenhuis JF, Tibbe AG, Levink R, Sipkema RC *et al.* Characterization of circulating tumor cells by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry A* 2009; **75**: 520-7.
- Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nat Rev Cancer* 2015; **15**: 473-83.
- Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K *et al.* Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 6618-24.
- Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M *et al.* KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 3143-9.
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R *et al.* RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; **18**: 378-81.
- Talasz AH, Powell AA, Huber DE, Berbee JG *et al.* Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 3970-5.
- Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010; **70**: 5649-69.
- Tan CL, Lim TH, Lim T, Tan DS *et al.* Concordance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements between circulating tumor cells and tumor in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 23251-62.
- Tan SJ, Lakshmi RL, Chen P, Lim WT *et al.* Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients. *Biosens Bioelectron* 2010; **26**: 1701-5.
- Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T *et al.* Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med* 2014; **6**: 1279-93.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 442-54.
- Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.

*Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 131-42.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; **139**: 871-90.

Thiery JP, Lim CT. Tumor dissemination: an EMT affair. *Cancer Cell* 2013; **23**: 272-3.

Todenhofer T, Hennenlotter J, Feyerabend S, Aufderklamm S *et al.* Preliminary experience on the use of the Adnatest(R) system for detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Anticancer Res* 2012; **32**: 3507-13.

Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, Yoshida T *et al.* Secondary mutations at I1171 in the ALK gene confer resistance to both Crizotinib and Alectinib. *J Thorac Oncol* 2014; **9**: e86-7.

Toyokawa G, Seto T. Updated Evidence on the Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors and Strategies to Overcome Such Resistance: Clinical and Preclinical Data. *Oncol Res Treat* 2015; **38**: 291-8.

Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG *et al.* Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res* 2008; **68**: 10377-86.

Uchida J, Kato K, Kukita Y, Kumagai T *et al.* Diagnostic Accuracy of Noninvasive Genotyping of EGFR in Lung Cancer Patients by Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA. *Clin Chem* 2015; **61**: 1191-6.

Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 12396-400.

van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW *et al.* Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res* 2011; **71**: 5955-60.

Vanharanta S, Massague J. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell* 2013; **24**: 410-21.

Vernersson E, Khoo NK, Henriksson ML, Roos G *et al.* Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns* 2006; **6**: 448-61.

Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol* 2008; **61**: 570-6.

Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V *et al.* Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000; **156**: 57-63.

Wang G, Dong W, Shen H, Mu X *et al.* A comparison of Twist and E-cadherin protein expression in primary non-small-cell lung carcinoma and corresponding metastases. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011; **39**: 1028-32.

Wang Y, Tian PW, Wang WY, Wang K *et al.* Noninvasive genotyping and monitoring of anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearranged non-small cell lung cancer by capture-based next-generation sequencing. *Oncotarget* 2016;

Welch DR. Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? *Breast Dis* 2006; **26**: 3-12.

Willis AR. The spread of tumours in the human body. . London : J. & A. Churchill 1934;

Wilson FH, Johannessen CM, Piccioni F, Tamayo P *et al.* A functional landscape of resistance to ALK inhibition in lung cancer. *Cancer Cell* 2015; **27**: 397-408.

Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 16369-74.

Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J *et al.* Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001; **61**: 333-8.



- Yam I, Lam DC, Chan K, Chung-Man Ho J *et al.* EGFR array: uses in the detection of plasma EGFR mutations in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2012; **7**: 1131-40.
- Ye M, Zhang X, Li N, Zhang Y *et al.* ALK and ROS1 as targeted therapy paradigms and clinical implications to overcome crizotinib resistance. *Oncotarget* 2016; **7**: 12289-304.
- Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, Shimizu J *et al.* Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2016;
- Young R, Pailler E, Billiot F, Drusch F *et al.* Circulating tumor cells in lung cancer. *Acta Cytol* 2012; **56**: 655-60.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013; **339**: 580-4.
- Yung TK, Chan KC, Mok TS, Tong J *et al.* Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 2076-84.
- Zhang J, Wang P, Wu F, Li M *et al.* Aberrant expression of the transcriptional factor Twist1 promotes invasiveness in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cell Signal* 2012; **24**: 852-8.
- Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, Ngo J *et al.* The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med* 2013; **5**: 180ra48.
- Zhang Z, Shiratsuchi H, Palanisamy N, Nagrath S *et al.* Expanded CTCs from a Patient with ALK Positive Lung Cancer Present EML4-ALK Rearrangement along with Resistance Mutation and Enable Drug Sensitivity Testing: A Case Study. *J Thorac Oncol* 2016;
- Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 597-606.
- Zou HY, Friboulet L, Kodack DP, Engstrom LD *et al.* PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell* 2015; **28**: 70-81.

## Title

Identification of biomarkers of sensitivity and resistance to tyrosine kinase inhibitors in circulating tumor cells from non-small-cell lung cancer patients  
*Examples of ALK- and ROS1-rearrangements*

## Keywords

circulating tumor cells, non-small-cell lung cancer, biomarkers, *ALK*, *ROS1*

## Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) are a broad field of research which may provide both clinical and basic information. CTCs migrate from primitive or metastatic tumors and represent a heterogeneous population of very rare cells in the blood stream. The molecular characterization of CTCs is a technical challenge requiring highly sensitive and specific methods. Because tumor biopsies are invasive and in some cases associated with risk in non-small-cell lung cancer (NSCLC), CTCs may offer an attractive option to analyze tumor genomic alterations and detect molecular biomarkers. CTCs could provide a more comprehensive picture of the tumor content than single tumor biopsies.

The aim of my thesis was to characterize genomic abnormalities in CTCs from *ALK*-rearranged NSCLC patients and identified biomarkers of sensitivity and resistance to targeted therapies. The first part of the project consisted in the development of a fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method adapted to CTCs enriched by filtration, the FA-FISH (filter-adapted-FISH) (patent PCT/FR2011/052688). Then, we developed a method for the semi-automated microscopy of filtration enriched CTCs (Pailler, BMC Cancer, 2016). In the second part of my project, using this method, we provided the first proof-of-concept that *ALK*-rearrangement can be detected in CTCs of patients with *ALK*-rearranged NSCLC (Pailler, J Clin Oncol, 2013). We showed that CTCs from these patients harbor a unique *ALK* break-apart rearrangement, including patients presenting another form of rearrangement in the biopsy, and a mesenchymal phenotype. This suggests that these CTCs may arise from a clonal selection of tumor cells that have acquired invasive and migratory properties and possibly the potential to drive metastatic progression. Then, we characterized CTCs from patients with *ROS1*-rearranged NSCLC and reported for the first time the detection of *ROS1*-rearrangement in CTCs (Pailler, Ann Oncol, 2015). In the third part of the project, we evaluated whether CTCs with abnormal *ALK*-FISH patterns monitored under crizotinib (baseline and early sampling at 2 months) may inform on treatment benefit in a cohort of *ALK*-rearranged patients treated by crizotinib. In an extended cohort of patients, the dynamic change in the numbers of CTCs with a gain of *ALK*-native copies was associated with the progression-free survival and thus may be a surrogate biomarker for crizotinib efficacy (Pailler, submitted). These results show that the molecular analysis of CTCs performed under treatment could help to stratify patients at risk of early resistance to crizotinib. Finally, in the last part of my project, we sought to evaluate whether CTCs could be used for identifying resistance mutations to ALK inhibitors. We developed technologies to characterize, isolate and molecularly (targeted sequencing and exome sequencing) analyze CTCs at the single cell level. Experiments on cell lines allowed to validate these technical processes; Experiments on patient samples are ongoing.

In this work, we characterize genomic abnormalities present in CTCs from *ALK*-rearranged patients at different stages of the disease and identify biomarkers of sensitivity and efficacy to targeted therapies. Our results provide new perspectives on the potential of CTCs for personalizing treatments in NSCLC patients. Furthermore, our findings may offer new insights on the biological characteristics of CTCs in *ALK*-rearranged patients, their overall role in the metastatic progression and the genomic diversity of these cancers.

## Titre

Identification de biomarqueurs de sensibilité et de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules  
*Cas des remaniements ALK et ROS1*

## Mots clés

Cellules tumorales circulantes, cancer bronchique non à petites cellules, biomarqueurs, *ALK*, *ROS1*

## Résumé :

Les cellules tumorales circulantes (CTC) représentent un large champ de recherche susceptible de fournir des informations tant cliniques que fondamentales. Les CTC proviennent de tumeurs primitives ou métastatiques et représentent une population hétérogène de cellules très rares dans le flux sanguin. Leur caractérisation moléculaire est un défi technologique qui requiert des méthodes très sensibles et spécifiques. Dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), les CTC ont un véritable intérêt car les biopsies tumorales ne permettent pas toujours de réaliser les analyses moléculaires nécessaires au choix du traitement. De plus, elles ne sont probablement pas représentatives de l'hétérogénéité tumorale.

L'objectif de ma thèse a été de rechercher dans les CTC de patients atteints de CBNPC porteurs du remaniement de gène *ALK*, des anomalies génomiques connues pour être des biomarqueurs de sensibilité et de résistance aux thérapies ciblant cet oncogène, ainsi qu'à caractériser les CTC porteuses de ces anomalies. La première partie du projet a consisté au développement d'une méthode d'hybridation *in situ* de l'ADN (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) adaptée à un système d'enrichissement des CTC par filtration, la FA-FISH (*filter adapted FISH*) (brevet PCT/FR2011/052688). Nous avons ensuite développé une approche de microscopie semi-automatisée permettant la digitalisation et l'analyse de ces CTC enrichies par filtration (Pailler, BMC Cancer, 2016). Dans la seconde partie du projet, nous avons mis en œuvre cette méthode et montré pour la première fois qu'il est possible d'identifier le remaniement de gène *ALK* dans les CTC de patients porteurs de ce réarrangement dans la tumeur (Pailler, J Clin Oncol, 2013). Les CTC remaniées présentent un unique réarrangement de type *break-apart*, y compris chez des patients présentant exclusivement une autre forme de réarrangement dans la tumeur, et un phénotype mésenchymateux. Cette observation nous a amené à émettre l'hypothèse que ces CTC ont acquis des propriétés migratoires et d'invasivité, et pourraient résulter d'une forte sélection clonale. Nous avons ensuite étendu cette observation aux patients porteurs du remaniement *ROS1* et rapporté pour la première fois la détection de ce remaniement dans des CTC (Pailler, Ann Oncol, 2015). Dans la troisième partie du projet, nous avons émis l'hypothèse que certaines sous-populations de CTC anormales pour le gène *ALK*, mesurées avant et à deux mois de traitement par le crizotinib, pourraient prédire l'évolution clinique des patients traités. Dans une cohorte élargie de patients, nous avons montré que l'évolution sous crizotinib du nombre de CTC présentant exclusivement des gains de copies natives du gène *ALK* est un biomarqueur « *surrogate* » d'efficacité du traitement pouvant permettre d'identifier les patients qui ont un risque élevé de progresser rapidement (Pailler, soumis). Finalement, dans la quatrième partie du projet, nous avons recherché dans des CTC des mutations de résistance aux inhibiteurs de *ALK*. Nous avons mis au point des technologies permettant de caractériser phénotypiquement, isoler et analyser moléculairement (séquençages ciblés et d'exomes) des CTC à l'échelle de cellule unique. Les expériences sur lignées cellulaires ont permis de valider les approches et les analyses d'échantillons de patients sont en cours.

Dans ce travail, nous montrons qu'il est possible de caractériser des anomalies génomiques dans les CTC de patients porteurs du remaniement *ALK* à différentes étapes de leur maladie, et ainsi d'identifier des biomarqueurs de sensibilité et d'efficacité à une thérapie ciblée. Ce travail ouvre des perspectives sur la personnalisation des traitements qui pourraient reposer sur l'analyse génomique non invasive des CTC. Il apporte en outre des éléments nouveaux sur les caractéristiques biologiques des CTC chez ces patients, certaines étapes du processus métastatique et la diversité génomique de ces cancers.