



**HAL**  
open science

# Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de cellules tumorales circulantes dans le cancer de la prostate et le cancer bronchique non à petites cellules

Vincent Faugeroux

## ► To cite this version:

Vincent Faugeroux. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de cellules tumorales circulantes dans le cancer de la prostate et le cancer bronchique non à petites cellules. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS481 . tel-02426239v2

**HAL Id: tel-02426239**

**<https://theses.hal.science/tel-02426239v2>**

Submitted on 29 Jan 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de cellules tumorales circulantes dans le cancer de la prostate et le cancer bronchique non à petites cellules

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à Gustave Roussy

École doctorale n°582 Cancérologie : biologie – médecine – santé  
Spécialité de doctorat: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le mardi 12 décembre 2017 à 14h, par

**Vincent Faugeroux**

Sous la direction du **Docteur Françoise Farace**

## Composition du Jury :

<b>Professeur Jean-Yves Scoazec</b> Praticien Universitaire – Praticien Hospitalier, Gustave Roussy, Villejuif	Président
<b>Docteur Catherine Alix-Panabières</b> Maitre de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, LCCRH, Montpellier	Rapporteur
<b>Professeur Jean-Yves Pierga</b> Praticien Universitaire – Praticien Hospitalier, Institut Curie, Paris	Rapporteur
<b>Professeur Karim Fizazi</b> Praticien Universitaire – Praticien Hospitalier, Gustave Roussy, Villejuif	Examineur
<b>Docteur Fabien Schmidlin</b> Vice-Président Oncologie et Biomarqueurs, IPSEN, Les Ulis	Examineur
<b>Docteur Philippe Vielh</b> Directeur adjoint, Laboratoire National de Santé, Dudelange, Luxembourg	Examineur
<b>Docteur Françoise Farace</b> Directrice d'Équipe, Ingénieur de Recherche Biologiste, Gustave Roussy, Villejuif	Directrice de Thèse

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







# Remerciements

Après quatre années de travail intensif, la thèse, une aventure riche en émotions et en rebondissements, touche à sa fin. Malgré toutes les difficultés que l'on peut rencontrer pendant le doctorat, c'est une expérience inoubliable qui permet de se rendre compte de la difficulté à gérer des projets et aussi à savoir ce que l'on souhaite ou plutôt ce que l'on ne souhaite pas pour notre avenir professionnel. Parce que des projets ne se réalisent pas seul, je souhaite remercier dans ce chapitre l'ensemble des personnes qui m'ont aidé et soutenu pendant cette période et qui m'ont permis d'atteindre cet objectif.

Je commence tout d'abord par remercier ma directrice de thèse, le Docteur Françoise Farace, de m'avoir donné la chance de réaliser une thèse au sein de son équipe. Françoise je vous remercie de m'avoir donné cette opportunité et d'avoir eu le courage de prendre une personne qui avait démissionné d'une première thèse. Ensuite je vous remercie pour votre disponibilité et pour votre accompagnement tout au long de ces quatre années. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance pour mener des projets de recherche ambitieux et passionnants. Vous m'avez fait découvrir la recherche translationnelle que je ne connaissais pas. Egalement vous m'avez fait découvrir la globalité du travail de chercheur c'est-à-dire la recherche de financements, la mise en place de projets en collaboration que j'affectionne beaucoup, la participation à des projets européens, la participation à des congrès internationaux... Enfin vous m'avez énormément appris à valoriser des résultats ce qui est extrêmement important.

Je souhaite remercier le Professeur Fabrice André de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche.

J'exprime mes remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail :

Monsieur le Professeur Jean-Yves Scoazec qui a accepté 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 lourde tâche d'être Rapporteurs et de prendre le temps de considérer mon manuscrit de thèse.

Monsieur le Professeur Karim Fizazi, Monsieur le Docteur Philippe Vielh et Monsieur le Docteur Fabien Schmidlin qui ont eu la sympathie d'accepter d'être Examineurs.

Je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale d'avoir financé ma quatrième année de thèse.

Je souhaite remercier l'ensemble du comité de médecine, les médecins et les attachés de recherche clinique sans qui la recherche translationnelle n'est pas possible. Je tiens à remercier les médecins du comité de pathologie thoracique mais aussi ceux du comité d'urologie et notamment le Professeur Benjamin Besse, le Professeur Jean-Charles Soria, le Docteur David Planchard, le Docteur Laura Mezquita, le Docteur Jordi Remon-Masip, le Professeur Karim Fizazi, le Docteur Yohann Lorient, le Docteur Laurence Albigès, le Docteur Christophe Massard. Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Judith Michels pour son implication dans le projet xénogreffe. Je remercie également les médecins et tout le personnel du département de thérapie cellulaire et notamment le Docteur Valérie Lapierre, le Docteur Kamélia Alexandrova et Dominique Tramalloni.

Un très grand merci aux attachés de recherche clinique et notamment Maud et Claudio ! Vous êtes non seulement indispensables à notre travail mais en plus de ça vous êtes très réactifs, toujours prêt à aider, à arranger un problème... Vous formez une sacrée équipe ! Et Claudio je n'oublierai jamais nos conversations téléphoniques surtout quand tu me disais « t'es pas en haut-parleur ? ». D'ailleurs maintenant on va peut-être pouvoir aller le boire notre café non ?? Un grand merci également à Jaouad, Silia et Kahina, merci pour votre bonne humeur à tous et votre disponibilité au quotidien. Merci également à Guillaume, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide. C'est bon on va pouvoir reprendre nos sorties running et les séances de fractionné !!

Et bien sûr sans eux, sans leur courage il n'y aurait pas de recherche translationnelle, je souhaite remercier l'ensemble des patients qui acceptent de participer à ces projets de recherche.

La vie d'une unité c'est aussi une gestion administrative et logistique complexe. Merci à Nathalie, Stéphanie et Widad. Je remercie également Amélie et Claudine qui font beaucoup pour le labo. Merci pour votre aide au quotidien qui nous simplifie beaucoup de choses.

Je remercie l'ensemble des membres de l'unité 981 ainsi que ceux des plateformes de recherche translationnelle HCP et BMO. Céline, je te remercie pour ta participation et ta disponibilité pour les analyses du projet de séquençage d'exome de CTC dans le cancer de la prostate ! Je souhaite remercier chaleureusement Virginie d'une part pour ton dynamisme, ta rigueur mais également pour ta bonne humeur au quotidien, pour nos discussions boulot ou pas d'ailleurs... Merci à Adeline aussi pour nos discussions très constructives et d'ailleurs souvent tous les trois avec Virginie. Merci à l'ensemble du module BMO et plus particulièrement à Mélanie, Aurélie, Clélia et Héléne. Je souhaite également

remercier le Docteur Philippe Vielh et le Professeur Jean-Yves Scoazec pour nos collaborations qui m'ont appris beaucoup sur l'histologie des cancers bronchiques non à petites cellules.

Merci à Philippe et Yann avec qui nous avons mis au point le tri des CTC. Merci pour votre disponibilité. Je souhaite remercier également le Docteur Patricia Kannouche pour notre collaboration, merci de m'avoir appris énormément de choses sur le stress réplicatif des cellules, merci pour vos discussions scientifiques passionnantes. Je souhaite remercier l'ensemble des personnes de votre équipe et notamment Caro pour ta gentillesse et pour m'avoir formé au western blot notamment, merci à Emma aussi, pas Emma de notre équipe, son tour viendra plus tard !

Je souhaite maintenant remercier l'ensemble des personnes et entreprises extérieures avec lesquelles j'ai travaillé.

Je pense notamment à Ipsen. Je vous remercie Sylvia et Valérie pour le projet que l'on a mené ensemble, merci pour votre bonne humeur, merci pour votre sens pragmatique. Je vous remercie pour toutes les discussions qui ont permis de faire aboutir le projet. Merci également à Sébastien pour ta participation aux analyses bio-informatiques. Je pense également à Integrigen et plus particulièrement à Charles, merci Charles pour tout ce que l'on a réussi à faire ensemble. Notre étroite collaboration, les heures passées à discuter et à chercher des solutions nous ont permis de réussir ! Je souhaite aussi remercier XenTech pour tout le travail effectué chez la souris. Merci pour votre disponibilité et votre sympathie. Je tiens particulièrement à te remercier Olivier, merci pour ton aide précieuse, d'être joignable facilement pour organiser des implantations au dernier moment...

Merci Soufiane pour ta disponibilité, ta réactivité et pour ta sympathie. Tu as contribué au développement de nos modèles de xénogreffes. Promis je ne te ferai pas voir les tumeurs pour éviter que tu te grattes toute la journée ensuite !!

Merci aux membres d'hier et aujourd'hui de l'équipe « CTC ». Merci beaucoup à toi Fanny, pour tout le travail que l'on a effectué ensemble et notamment nos longues soirées à faire de la microdissection. Merci pour toutes ces discussions que l'on a eu tous les deux. Anne Laure, merci à toi on a bien rigolé avec les œufs parfois !! Merci à toi « PQ » aller Pauline pour ta bonne humeur au quotidien ton sérieux dans le travail. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ton master. Merci à toi Cyril pour notre travail en commun mais également pour ta sympathie ! Maintenant je vais attaquer la partie de mes collègues et amies avec qui j'ai passé le plus de mon temps au labo. Je vais être bref. Merci à toi Marianne pour tout ce que tu m'as appris et merci pour toutes ces parties de rigolade surtout à des heures tardives ou la fatigue se faisait ressentir... Je ne parlerai pas d'anecdotes et histoires drôles à ton sujet !! J'arrive maintenant à Emma ma collègue de thèse devenue post-doc.... Merci à toi pour ces quatre années

passées ensemble. Sans toi la thèse je ne l'aurais pas vécu de la même façon. On a traversé beaucoup de moments de galère ensemble, des moments de joie mais toujours soudés et très proches et c'est comme cela et grâce à cela que l'on a avancé. Tu m'as appris énormément de choses et notre complémentarité et notre détermination nous ont fait avancer ensemble. Je ne vais pas tout raconter ici sinon ça serait trop long... Merci pour ton implication énorme dans mon travail, merci pour ton soutien au quotidien, pour ton aide pour tout jusqu'à la fin du manuscrit. T'es une personne exceptionnelle !!

En dehors du labo et du travail je souhaite remercier mes amis et notamment mes amis depuis le collège !! Merci Vivi et Florent pour votre soutien, je reviens rapidement dans le Poitou vous rendre visite ! Merci aux amis du lycée et notamment Will et Anaïs. Je tiens également à remercier Sébastien et Sandra, et oui on va arroser ça après et il faudra plus d'une bouteille !! On va pouvoir retourner à la chasse dès le week-end prochain histoire de passer un bon moment. Merci aux amis de la région parisienne notamment Georges et Steph anciens voisin du 43. Merci tous les voisins actuels du 43 et plus particulièrement à Constance et Romain dit « Mitoune », une histoire de fin de soirée que je ne raconterai pas et il y en a eu bien d'autres. Un petit clin d'œil à nos derniers arrivants au 43 Alexia et Jordan enfin surtout toi Jordan et tes qualités au Beer Pong, ne lâches rien c'est en forgeant que l'on devient forgeron !!! Bon je fini et j'arrive à l'apéro ! Romain je ne vais pas mettre toute ta question « tu bois un coup ou tu .... » chacun imaginera ce qu'il voudra.

Merci à mes amis Aurore et Greg, Mohamed, on va reprendre nos sorties running demain peut-être si vous êtes motivés ! Mohamed on va enfin pouvoir retourner faire nos séances de natation intensives !  
Merci à tous ceux que je n'ai pas cité ici.

Enfin je souhaite dire un grand merci à ma famille de m'avoir soutenu tout au long de ces longues études ! Merci à mes parents d'avoir toujours été là. Merci à ma sœur Carole, mon beau-frère Romain et mon neveu Mathéo, ça fait du bien de vous voir quand je redescends, merci pour votre soutien !! Je souhaite également remercier mes tantes, oncles et cousin, cousine et en particulier Jérôme et Virginie !!

Une histoire se termine et il va maintenant falloir en commencer une nouvelle !



# Sommaire

<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>19</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>22</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>24</b>
<b>PREFACE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>28</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>31</b>
<b>I. Le cancer bronchique non à petites cellules .....</b>	<b>31</b>
1) Incidence et détection .....	31
2) Classifications .....	31
a. <i>Histologique</i> .....	31
b. <i>Moléculaire</i> .....	33
3) Prise en charge thérapeutique .....	39
a. <i>La prise en charge des carcinomes squameux</i> .....	41
b. <i>La prise en charge des adénocarcinomes</i> .....	43
<b>II. Le cancer de la prostate .....</b>	<b>48</b>
1) Incidence et détection .....	48
2) Classifications .....	49
a. <i>Histologique</i> .....	49
b. <i>Moléculaire</i> .....	55
3) Prise en charge thérapeutique .....	58
<b>III. Le processus métastatique .....</b>	<b>62</b>
1) Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le processus métastatique .....	63
2) Les étapes du processus métastatique .....	68
a. <i>Prolifération et invasion</i> .....	68
b. <i>Intravasation et circulation sanguine</i> .....	71
c. <i>Extravasation et développement de métastases</i> .....	72
3) La niche pré-métastatique et la dormance tumorale .....	73
4) Les cellules souches cancéreuses.....	75
<b>IV. Les cellules tumorales circulantes .....</b>	<b>79</b>
1) Les enjeux de la recherche sur les cellules tumorales circulantes .....	79



2) Les méthodes d'enrichissement et de détection des cellules tumorales circulantes .....	80
a. Les méthodes d'enrichissement.....	80
i. Basées sur les propriétés biologiques.....	80
ii. Basées sur les propriétés physiques.....	82
iii. Basées sur les propriétés biologiques et physiques.....	83
b. Les méthodes de détection .....	84
3) Caractérisation moléculaire des CTC.....	84
a. Des fractions enrichies en CTC.....	84
b. Des CTC à l'échelle de cellule unique.....	86
4) Caractérisation fonctionnelle des CTC .....	89
a. Étude des facteurs sécrétés par les CTC.....	89
b. Culture de CTC <i>in vitro</i> .....	89
c. Développement de modèles de xénogreffes <i>in vivo</i> .....	90
5) Intérêt clinique des CTC.....	92
<b>REVUE 1. Clinical utility of circulating tumor cells in ALK-positive non-small-cell lung cancer. <i>Frontiers in Oncology</i>, 2014;4:281 .....</b>	<b>95</b>
<b>REVUE 2. The potential diagnostic power of circulating tumor cells for non-small-cell lung cancer. <i>Expert Review of Molecular Diagnostic</i>, 2015;15(12):1605-29.....</b>	<b>95</b>
<b>REVUE 3. Routine clinical use of circulating tumor cells for diagnosis of mutations and chromosomal rearrangements in non-small cell lung cancer – ready for prime-time? <i>Translational Lung Cancer Research</i>, 2017;6(4):444-453 .....</b>	<b>95</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>136</b>
<b>I. Prélèvements sanguins et cytophèreses pour l'étude des cellules tumorales circulantes chez l'Homme.....</b>	<b>136</b>
<b>II. Méthodes d'enrichissement en cellules tumorales circulantes .....</b>	<b>136</b>
1) La technique de filtration ISET .....	136
2) La méthode de sélection positive CellSearch.....	137
3) La technique de sélection négative RosetteSep .....	137
<b>III. Implantation de CTC <i>in vivo</i> et établissement de modèles de xénogreffes chez la souris .....</b>	<b>138</b>
<b>IV. Établissement de lignées cellulaires à partir des tumeurs des modèles de xénogreffes établis</b>	<b>140</b>

<b>V. Caractérisation par immunohistochimie des biopsies, des modèles de xénogreffes établis et des lignées cellulaires établies.....</b>	<b>141</b>
<b>VI. Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux des lignées cellulaires établies</b>	<b>143</b>
1) Détection de l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase .....	143
2) Caractérisation phénotypique avec des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse et des cellules souches .....	143
<b>VII. Tests pharmacologiques sur les CDX et les lignées cellulaires établis .....</b>	<b>145</b>
1) <i>In vivo</i> .....	145
2) <i>In vitro</i> .....	146
<b>VIII. Caractérisation du stress réplicatif dans les lignées cellulaires établies .....</b>	<b>148</b>
1) Mise en évidence des fibres d'ADN par immunofluorescence pour l'étude des fourches de réplication par la technique de <i>DNA fibre (DNA spreading)</i> .....	148
2) Quantification des cassures double brin de l'ADN par immunofluorescence .....	149
3) Mise en évidence des voies de signalisation et de réparation des cassures de l'ADN par la technique de <i>western blot</i> .....	150
<b>IX. Détection, isolement et caractérisation de cellules tumorales circulantes uniques ....</b>	<b>152</b>
1) Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET et isolement de cellules uniques par microdissection laser .....	152
2) Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par RosetteSep et isolement de cellules uniques par tri cellulaire .....	152
3) Détection des cellules tumorales circulantes épithéliales par CellSearch et isolement de cellules uniques par le <i>puncher</i> .....	152
<b>X. Caractérisation moléculaire des biopsies, des CTC, des CDX et des lignées cellulaires établis.....</b>	<b>153</b>
1) Extractions de l'ADN et de l'ARN du sang total, des biopsies, des CDX et des lignées cellulaires .....	153
a. <i>Réalisation de copeaux de tissus fixés et inclus en paraffine</i> .....	153
b. <i>Extraction de l'ADN et de l'ARN des biopsies et des modèles de xénogreffes établis</i> ....	154
2) Extraction de l'ADN des lignées cellulaires établies .....	154
3) Extraction de l'ADN constitutionnel à partir de sang total.....	154
4) Préparation des échantillons de CTC isolées.....	154
a. <i>Amplification totale du génome</i> .....	154
b. <i>Contrôles de qualité</i> .....	154
c. <i>Conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin</i> .....	155

d. Purification des échantillons de WGA .....	155
5) Approche de PCR multiplexes ciblées et séquençage à haut débit de nouvelle génération (technologie Ion Torrent suites).....	156
a. Dosage des échantillons .....	156
b. Séquençage haut débit par la technologie Ion Torrent suites .....	156
6) Approche de séquençage de l'exome .....	159
7) Analyses bio-informatiques .....	159
<b>RESULTATS .....</b>	<b>160</b>
<b>I. Étude de l'influence des sous-groupes moléculaires de CBNPC sur l'expression de la vimentine par les CTC et sur leur valeur pronostique .....</b>	<b>160</b>
Article 1. A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups. <i>Ann Oncol.</i> 2017 Jul 1;28(7):1523-1531.....	160
<b>II. Développement d'une méthode de microscopie semi-automatisée pour l'analyse phénotypique et moléculaire de CTC enrichies par filtration.....</b>	<b>178</b>
Article 2. Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells <i>BMC Cancer</i> , 2016 Jul 14;16(1):477.....	178
<b>III. Analyse du contenu mutationnel des CTC dans les mCRPC par séquençage de l'exome .....</b>	<b>199</b>
Article 3. Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Reveals Undiagnosed Genomic Aberrations in Metastatic Prostate Cancer. <i>Manuscrit soumis.</i> .....	199
<b>IV. Établissement et caractérisation de modèles de xénogreffes dérivées de CTC dans le CBNPC et le mCRPC.....</b>	<b>255</b>
1) Établissement et caractérisation de modèles de xénogreffes dérivées de CTC dans le CBNPC .....	255
a. Établissement de CDX de CBNPC.....	255
i. Caractéristiques de l'ensemble des patients inclus dans l'étude.....	255
ii. Caractéristiques des patients à l'origine des CDX et développement des CDX.....	259
b. Établissement et caractérisation phénotypique des lignées cellulaires <i>in vitro</i> par cytométrie de flux .....	261
c. Caractérisation phénotypique par immunohistochimie des biopsies tumorales, CDX et lignées cellulaires.....	264
d. Caractérisation moléculaire par séquençage ciblé et séquençage de l'exome des biopsies tumorales, CTC uniques, CDX et lignées cellulaires.....	268
i. Isolement de CTC unique.....	269

ii.	Séquençage ciblé.....	275
iii.	Séquençage de l'exome.....	277
e.	Analyse du stress réplcatif de la lignée cellulaire GR-CDXL1 .....	302
f.	Tests pharmacologiques .....	305
i.	In vitro .....	306
ii.	In vivo.....	306
2)	Établissement et caractérisation de xénogreffes dérivées de CTC dans le cancer de la prostate.....	307
a.	Établissement de CDX.....	307
i.	Caractéristiques de l'ensemble des patients inclus dans l'étude.....	307
ii.	Caractéristiques du patient à l'origine du CDX et développement du CDX.....	309
b.	Établissement de la lignée cellulaire in vitro.....	310
c.	Caractérisation phénotypique du modèle GR-CDXP1.....	311
3)	Caractérisation moléculaire par séquençage ciblé et séquençage de l'exome des biopsies tumorales, CTC uniques, CDX et lignée cellulaire .....	314
a.	Isolement de CTC unique.....	315
b.	Séquençage ciblé.....	316
c.	Séquençage de l'exome.....	317
	<b>DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....</b>	<b>324</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>330</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>346</b>
	<b>CHAPITRE DE LIVRE 1. Detection and Characterization of gene rearrangements in Circulating Tumor Cells. Adv Exp Med Biol. 2017;994:169-179 .....</b>	<b>346</b>
	<b>CHAPITRE DE LIVRE 2. Filter-Adaptated-Fluorescent In Situ Hybridization (FA-FISH) for Filtration-Enriched Circulating Tumor Cells. Methods Mol Biol. 2017;1634:133-141. ...</b>	<b>346</b>

# Liste des publications et communications

## Articles scientifiques

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.

Lindsay CR, Faugeroux V, Michiels S, Pailler E, Facchinetti F, Ou D, Bluthgen MV, Pannet C, Ngo-Camus M, Bescher G, Caramella C, Billiot F, Remon J, Planchard D, Soria JC, Besse B, Farace F. *A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups*. **Ann Oncol**. 2017 Jul 1;28(7):1523-1531.

Faugeroux V, Lefebvre C, Pailler E, Pierron V, Marcaillou C, Tourlet S, Billiot F, Dogan S, Oulhen M, Vielh P, Rameau P, NgoCamus M, Massard C, Laplace-Builhé C, Tibbe A, Taylor M, Soria JC, Fizazi K, Lorient Y, Julien S, Farace F. *Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Reveals Undiagnosed Genomic Aberrations in Metastatic Prostate Cancer*. **Soumis**.

## Revue générale

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.

Pailler E, Faugeroux V, Oulhen M, Catelain C, Farace F. *Routine clinical use of circulating tumor cells for diagnosis of mutations and chromosomal rearrangements in non-small cell lung cancer-ready for prime-time?* **Transl Lung Cancer Res**. 2017 Aug; 6(4):444-453.

## **Chapitres de livres**

Catelain C, Pailler E\*, Oulhen M, Faugeroux V, Pommier AL, Farace F. *Detection and Characterization of gene rearrangements in Circulating Tumor Cells*. **Adv Exp Med Biol**. 2017;994:169-179.

Oulhen M\*, Pailler E\*, Faugeroux V, Farace F. *Filter-Adaptated-Fluorescent In Situ Hybridization (FA-FISH) for Filtration-Enriched Circulating Tumor Cells*. **Methods Mol Biol**. 2017;1634:133-141.

## **Communications**

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

✕ Poster. *Whole exome sequencing of circulating tumor cells into metastatic castration resistant prostate cancer patients*.

Faugeroux V, Massard C, Lorient Y, Pailler E, Lefebvre C, Dogan S, Ngo-Camus M, Marcaillou C, Billiot F, Rameau P, Fizazi K, Pierron V, Julien S, Farace F.

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

✕ Présentation orale. *Establishment and characterization of circulating tumor cell-derived xenografts in non-small cell lung cancer*.

Faugeroux V, Deas O, Michels J, Judde JG, Cairo S, Vielh P, Marty V, Billiot F, NgoCamus M, Besse B, Kannouche P, Farace F.

✕ Poster. *Whole-exome sequencing of single circulating tumor cells according to epithelial-mesenchymal marker expression in metastatic prostate cancer*.

Faugeroux V, Lefebvre C, Pailler E, Pierron V, Billiot F, Marcaillou C, Vielh P, Dogan S, Rameau P, Ngo-Camus M, Massard C, Soria JC, Fizazi K, Lorient Y, Julien S, Farace F.

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

✕ Poster. *Establishment and characterization of circulating tumor cell-derived xenografts in non-small cell lung cancer*.

Faugeroux V, Deas O, Michels J, Judde JG, Cairo S, Vielh P, Marty V, Billiot F, NgoCamus M, Besse B, Kannouche P, Farace F.

✕ Poster. *Whole-exome sequencing of single circulating tumor cells according to epithelial-mesenchymal marker expression in metastatic prostate cancer.*

Faugeroux V, Lefebvre C, Pailler E, Pierron V, Billiot F, Marcaillou C, Vielh P, Dogan S, Rameau P, Ngo-Camus M, Massard C, Soria JC, Fizazi K, Lorient Y, Julien S, Farace F.

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

✕ Poster. *Establishment and characterization of circulating tumor cell-derived xenografts in non-small cell lung cancer.*

Faugeroux V, Deas O, Michels J, Judde JG, Cairo S, Vielh P, Marty V, Billiot F, NgoCamus M, Besse B, Kannouche P, Farace F.

#### **ASCO GU (American Society of Clinical Oncology Genito-Urinar) 2016, Chicago**

✕ Poster. Merit Award. *Whole exome sequencing of single circulating tumor cells is a useful tool for studying the inpatient genetic heterogeneity in metastatic prostate cancer.*

Faugeroux V, Lefebvre C, Pailler E, Pierron V, Marcaillou C, Tourlet S, Billiot F, Dogan S, Oulhen M, Vielh P, Rameau P, NgoCamus M, Massard C, Laplace-Builhé C, Tibbe A, Taylor M, Soria JC, Fizazi K, Lorient Y, Julien S, Farace F.

#### **ACTC (3<sup>rd</sup> Advances in Circulating Tumour Cells) 2017, Rhodes**

✕ Présentation orale. *Tumor-initiating cell characteristics of non-small cell lung cancer circulating tumor cells inferred from CTC-Derived Xenografts.*

Faugeroux V, Deas O, Catelain C, Michels J, Pailler E, Queffelec P, Rozié A, Lucibello F, Judde JG, Cairo S, Scoazec JY, Marty V, Billiot F, NgoCamus M, Nicotra C, Soria JC, Mezquita L, Planchard D, Besse B, Kannouche P, and Farace F.

✕ Poster. *Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Reveals Undiagnosed Genomic Aberrations in Metastatic Prostate Cancer.*

Faugeroux V, Lefebvre C, Pailler E, Pierron V, Marcaillou C, Tourlet S, Billiot F, Dogan S, Oulhen M, Vielh P, Rameau P, NgoCamus M, Massard C, Laplace-Builhé C, Tibbe A, Taylor M, Soria JC, Fizazi K, Lorient Y, Julien S, Farace F.

✕ Poster. *Establishment and characterization of a circulating tumor cell-derived xenograft in prostate cancer.*

Faugeroux V, Deas O, Catelain C, Paillet E, Andree K, Lucibello F, Alexandrova K, Judde JG, Stoecklein N, Scoazec JY, Manaresi N, Marty V, Tramalloni D, NgoCamus M, Nicotra C, Terstappen LWMM, Lapierre V, Fizazi K, Lorient Y, Farace F.



# Liste des figures

Figure 1 : Origine histologique et cellulaire des adénocarcinomes et carcinomes squameux. ....	32
Figure 2 : Anomalies génomiques (mutations/délétions) de sensibilité et de résistance aux inhibiteurs de première génération d'EGFR. ....	36
Figure 3 : Anomalies génomiques de résistance aux inhibiteurs de ALK de première génération (crizotinib) et de deuxième génération (ceritinib et alectinib). ....	37
Figure 4 : Schéma de diagnostic et d'aide à la prise en charge personnalisée des CBNPC.....	40
Figure 5 : Schéma de prise en charge thérapeutique des carcinomes squameux en première et deuxième ligne de traitement. ....	42
Figure 6 : Schéma de prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes <i>ALK</i> et <i>EGFR</i> sauvages en première et deuxième ligne de traitement. ....	44
Figure 7 : Schéma de prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes <i>EGFR</i> muté en première et deuxième ligne de traitement. ....	46
Figure 8 : Schéma de prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes <i>ALK</i> remanié en première et deuxième ligne de traitement. ....	47
Figure 9 : Classification TNM pour le cancer de la prostate.....	50
Figure 10 : Schéma histologique des cancers de la prostate et correspondance avec le score de Gleason modifié par l'ISUP en 2015. ....	52
Figure 11 : Classification histologique de l'OMS des tumeurs de la prostate. ....	54
Figure 12 : Classification moléculaire des tumeurs primaire de cancer de la prostate. ....	56
Figure 13 : Fréquence et types d'anomalies récurrentes de tumeurs primaires de cancer de la prostate. ....	56
Figure 14 : Représentation, fréquence et implication des anomalies génomiques dans les mCRPC. ...	57
Figure 15 : Implication de la transition épithélio-mésenchymateuse et de la transition mésenchymo-épithéliale au cours du processus métastatique.....	64
Figure 16 : Rôle du microenvironnement tumoral dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. ....	65
Figure 17 : Mécanismes de résistance thérapeutique induits par la transition épithélio-mésenchymateuse.....	67
Figure 18 : Rôles des cellules stromales dans la croissance de la tumeur primaire l'invasion et la néo-angiogenèse. ....	69
Figure 19 : Les étapes clés du processus métastatique. ....	71

Figure 20 : Étapes de la formation de la niche pré-métastatique et ses acteurs moléculaires et cellulaires.....	74
Figure 21 : Hétérogénéité tumorale, deux modèles : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique. ....	76
Figure 22 : L'origine multifactorielle des cellules souches cancéreuses. ....	77
Figure 23 : Méthodes d'enrichissement des cellules tumorales circulantes. ....	81
Figure 24 : Plan de plaque 96 puits pour les tests pharmacologiques <i>in vitro</i> .....	146
Figure 25 : Représentation schématique de la technique de <i>DNA fibre</i> ou <i>DNA spreading</i> .....	149
Figure 26 : Purification des échantillons de WGA par la technique d'immobilisation réversible de l'ADN sur phase solide.....	156
Figure 27 : Préparation des bibliothèques pour le séquençage à haut débit de nouvelle génération avec le PGM Ion Torrent. ....	158
Figure 28 : Nombre de CTC détectées par le CellSearch en fonction du statut moléculaire des tumeurs des 58 patients.....	258
Figure 29 : Nombre de CTC détectées par le CellSearch dans le sang et dans les produits de cytophérèse. ....	259
Figure 30 : Courbes de croissance des quatre modèles de CDX de CBNPC .....	261
Figure 31 : Images des trois lignées cellulaires établies <i>in vitro</i> à partir des CDX GR-CDXL1, GR-CDXL3 et GR-CDXL4. ....	262
Figure 32 : Expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux par les trois lignées cellulaires dérivées de CDX.....	263
Figure 33 : Expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses par cytométrie de flux des trois lignées cellulaires dérivées de CDX.....	264
Figure 34 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL1.....	265
Figure 35 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL2.....	266
Figure 36 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL3.....	267
Figure 37 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL4.....	268
Figure 38 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL1. ....	272
Figure 39 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL2. ....	273
Figure 40 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL3. ....	274
Figure 41 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL4. ....	275
Figure 42 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL1. ....	278
Figure 43 : Profil des anomalies du nombre de copies de la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL1. ....	284

Figure 44 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL2. ....	286
Figure 45 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL3 .....	292
Figure 46 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL4. ....	297
Figure 47 : Longueur des fourches de réplication des lignées cellulaires A549,NCI-H1975 et GR-CDXL1, .....	303
Figure 48 : Classification des lignées cellulaires en fonction du nombre de CDB. ....	304
Figure 49 : Western blot de protéines des <i>checkpoints</i> du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. ....	305
Figure 50 : Tests pharmacologiques sur les lignées cellulaires GR-CDXL1 et A549. ....	306
Figure 51 : Nombre de CTC détectées par le CellSearch chez les 17 patients prélevés pour une xéno greffe de CTC à partir de prélèvements sanguins. ....	308
Figure 52 : Comparaison du nombre de CTC détectées par le CellSearch dans le sang et dans les produits de cytophèrese chez les sept patients.....	309
Figure 53 : Courbes de croissance du modèle GR-CDXP1 .....	310
Figure 54 : Images de la lignée cellulaire GR-CDXP1 .....	311
Figure 55 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXP1. ....	313
Figure 56 : Expression des marqueurs épithéliaux, mésenchymateux et de cellules souches cancéreuses par la lignée cellulaire GR-CDXP1.....	314
Figure 57 : Stratégies d'isolement des CTC par cytométrie de flux et caractérisation phénotypique des CTC isolées. ....	315
Figure 58 : Nombre de variants partagés entre les résections, biopsies tumorales, CTC et/ou le CDX. ....	319
Figure 59 : Origine des variants présent dans le CDX .....	322

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Gènes porteurs d'anomalies importantes dans les CBNPC, fréquence des anomalies dans les tumeurs et traitements associés .....	34
Tableau 2 : Correspondance entre la classification TNM et la classification des cancers bronchiques.	39
Tableau 3 : Score de Gleason modifié selon l'ISUP en 2004.....	51
Tableau 4 : Nouvelle classification des cancers prostatiques selon la conférence de consensus de 2014 de l'ISUP.....	53
Tableau 5 : Stratégies thérapeutiques du cancer de la prostate en fonction du stade de la maladie. ....	59
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés pour les IHC et conditions de marquage.....	142
Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés pour les marquages en cytométrie de flux et conditions de marquage.....	144
Tableau 8 : Planning prévisionnel des tests pharmacologiques pour les modèles CDX poumon. ....	146
Tableau 9 : Concentrations de drogues utilisées pour les tests pharmacologiques sur les lignées cellulaires.....	147
Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés pour la technique de <i>DNA spreading</i> et conditions de marquage.....	149
Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés pour la quantification des cassures doubles brin de l'ADN et conditions de marquage.....	150
Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés pour les <i>western blots</i> et conditions de marquage.....	151
Tableau 13 : Pourcentage de cellules tumorales et nombre de copeaux réalisés pour les biopsies de patients dont les prélèvements ont permis l'établissement de CDX.....	153
Tableau 14. Liste des gènes de la PCR multiplexe pour les contrôles de qualité (QC2). ....	155
Tableau 15 : Listes des gènes ciblés par le panel Ampli1 CHPCustom Beta développé par Silicon Biosystems.....	157
Tableau 16 : Statut moléculaire des tumeurs des patients et nombre de CTC implantées à partir des 58 prélèvements sanguins .....	258
Tableau 17 : Statut moléculaire des tumeurs des patients et nombre de CTC implantées à partir des neuf produits de cytophérèse.....	258
Tableau 18 : Caractéristiques clinico-biologiques des quatre patients à partir desquels les CDX ont été établis.....	259
Tableau 19 : Caractéristiques phénotypiques des CTC individuelles isolées et amplifiées et nombre de CTC avec un WGA de bonne qualité pour chacun des quatre patients .....	270

Tableau 20 : Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome et du séquençage haut débit de nouvelle génération des échantillons du modèle GR-CDXL3.....	276
Tableau 21 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL1.....	284
Tableau 22 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL2.....	291
Tableau 23 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL3.....	295
Tableau 24 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL4.....	301
Tableau 25 : Estimation du nombre de CTC implantées sur la base du compte Cellsearch chez les 17 patients prélevés pour une xénogreffe de CTC à partir de prélèvements sanguins. ....	308
Tableau 26 : Nombre de CTC présentes dans le sang, la cytophèrese et implantées pour les sept patients ayant subi une cytophèrese.....	309
Tableau 27 : Caractéristiques clinico-biologiques du patient ayant permis l'établissement du CDX de cancer la prostate métastatique et résistant à la castration .....	309
Tableau 28 : Contrôle de qualité du séquençage ciblé haut débit de nouvelle génération des échantillons du modèle GR-CDXP1.....	316
Tableau 29 : Contrôle de qualité du WES des échantillons du modèle GR-CDXP1. ....	317
Tableau 30 : Liste des variants partagés entre les résections/biopsies, les CTC et/ou le CDX. ....	321
Tableau 31 : Liste des dix variants partagés par le CDX et les CTC et non détectés dans les résections et biopsies.....	322

# Liste des abréviations

ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNtc ou ctDNA	ADN circulant
AF	alexa fluor
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ALT1	<i>glutamic--pyruvic transaminase</i>
ANGPTL4	<i>angiopoietin-like 4</i>
APC	<i>allophycocyanin</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AR-V7	<i>androgen receptor splice variant 7</i>
ATM	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
ATM	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
AXL	<i>AXL receptor tyrosine kinase</i>
BAM	<i>binary alignment/map</i>
BMP4	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
BMP7	<i>bone morphogenetic protein 7</i>
BRAF	<i>BRAF proto-oncogene</i>
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA1, DNA repair associated</i>
CAF	<i>cancer associated fibroblasts</i>
CBNPC	cancers bronchiques non à petites cellules
CBPC	cancers bronchiques à petites cellules
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CD45	<i>protein tyrosine phosphatase receptor type C, PTPRC</i>
CDDP	cisplatine
CDX	<i>CTC-derived xenograft</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
CK	cytokératines
CldU	chlorodesoxyuridine
CNA	<i>copy-number aberration</i>
CNV	<i>copy number variation</i>
COSMIC	<i>catalogue for somatic mutations in cancer</i>
CRO	<i>contract research organization</i>
CSC	cellules souches cancéreuses
CTC	cellules tumorales circulantes
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DEAB	diethylaminobenzaldehyde
DEP-FFF	<i>dielectrophoretic field-flow fractionation</i>
DFF	<i>dean flow fractionation</i>
DFS	<i>disease-free survival</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde

dNTP	désoxyribonucléotide
DTC	<i>disseminated tumor cells</i>
ECL	électrochimiluminescence
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELF3/ELF5	<i>E74-like factor 3/5</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
EPISPOT	<i>EPithelial ImmunoSPOT</i>
ERG	<i>ETS transcription factor</i>
ESMO	<i>european society for medical oncology</i>
ETV1	<i>ETS variant 1</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>
Fli1	<i>Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor</i>
FOXA1	<i>forkhead box A1</i>
GII	<i>genome integrity index</i>
GRHL2	<i>grainy head-like protein 2 homolog</i>
HBSS	<i>hank's balanced salt solution</i>
HER2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
HRAS	<i>HRas proto-oncogene, GTPase</i>
IC50	concentration inhibitrice médiane
IDH1	<i>isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1</i>
IdU	<i>iododesoxyuridine</i>
IHC	immunohistochimie
INDEL	insertion/délétions
IRM	imagerie par résonance magnétique
ISET	<i>isolation by size of tumor cells</i>
ISUP	<i>international society of urological pathology</i>
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
KIT	<i>KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
KMT2C	<i>lysine methyltransferase 2C</i>
KMT2D	<i>lysine methyltransferase 2D</i>
KRAS	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
LMD	microdissection laser
mCRPC	<i>metastatic castration resistant prostate cancer</i>
MDSC	<i>myeloïd-derived suppressor cells</i>
MEC	matrice extracellulaire
<i>MET</i>	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
mg	milligramme
MIC	<i>metastasis initiating cells</i>
MIC1	<i>mucin 1</i>
MLH1	<i>mutL homolog 1</i>
MMP	matrice extracellulaire
MSH2	<i>mutS homolog 2</i>

MT1-MMP	<i>membrane-type matrix metalloproteinase 1</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NK	<i>natural killer</i>
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
NSG	<i>NOD scid gamma</i>
OMS	<i>organisation mondiale de la santé</i>
ORR	<i>objective 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>
PDL-1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PDX	<i>patient-derived xenograft</i>
PFA	<i>phosphate buffered saline-paraformaldehyde</i>
PFS	<i>progression free survival</i>
PGM	<i>personal genome machine</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PMN	<i>pre-metastatic niche</i>
PS	<i>performance status</i>
PSA	<i>prostate specific antigen</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
QC	<i>contrôle de qualité</i>
RBW	<i>relative body weight</i>
rpm	<i>rotations par minute</i>
ROS1	<i>ROS proto-oncogene 1</i>
R-spondin	<i>R-spondin 1</i>
RT-qPCR	<i>reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction</i>
Snail	<i>snail family transcriptional repressor 1</i>
SNV	<i>single nucleotide variation</i>
SOX2	<i>SRY-box2</i>
SPOP	<i>speckle type BTB/POZ protein</i>
SPRI	<i>solid-phase reversible immobilization</i>
SVF	<i>sérum de veau foetal</i>
TA	<i>température ambiante</i>
TAM	<i>tumor associated macrophages</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCF3	<i>transcription factor 3</i>
TEM ou EMT	<i>transition épithélio-mésenchymateuse ou epithelial-mesenchymal transition</i>
TGD	<i>tumor growth delays</i>
TGDI	<i>tumor growth delay index</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor β)</i>
TIC	<i>tumor initiating cells</i>
TKI	<i>tyrosine kinase inhibitor</i>
TME	<i>transition mésenchymo-épithéliale</i>
TMPRSS2	<i>transmembrane protease, serine 2</i>
TNM	<i>tumor node metastasis</i>



TSP-1	<i>thrombospondin 1</i>
TTF1	<i>thyroid transcription factor 1</i>
TTP53	<i>tumor protein p53</i>
Twist	<i>twist family bHLH transcription factor</i>
uPA	<i>plasminogen</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WES	<i>whole exome sequencing</i>
WGA	<i>whole genome amplification</i>
WGS	<i>whole genome sequencing</i>
WHO	<i>world health organization</i>
ZBTB16	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>
ZEB	<i>zinc finger E-box binding homeobox</i>

# Préface et 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 requiert 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 apparait comme un outil unique pour étudier l'hétérogénéité tumorale. Récemment, le développement de modèles *in vivo* et *in vitro* montre le potentiel tumorigénique de certaines CTC dans le cancer du sein, le cancer bronchique à petites cellules (CBPC), le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), le mélanome, le cancer de la prostate et le cancer du côlon. De plus, les modèles développés dans le CBPC miment la réponse aux thérapies observée chez les patients dont ils sont issus. Ces modèles pourraient permettre de comprendre les caractéristiques des CTC possédant un potentiel de cellules initiatrices de tumeur, leurs mécanismes de résistance aux traitements et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et stratégies de traitement.

Dans les cancers broncho-pulmonaires, notamment dans la famille histologique des 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. Dans le cancer de la prostate, les patients développent dans de nombreux cas des métastases osseuses. Les biopsies osseuses sont

souvent pauvres en matériel tumoral et de mauvaise qualité, ne permettant pas la réalisation d'analyses moléculaires.

J'ai initié en 2013 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 prédicteurs et nouvelles stratégies moléculaires en thérapeutique anticancéreuse » dirigée par le Professeur Fabrice André, et d'autre part une activité de plateforme translationnelle dans l'unité CNRS UMS3655-INSERM US23 AMMICA dirigée par le Professeur Jean-Yves Scoazec.

Les objectifs de mon projet de thèse étaient d'une part de caractériser par séquençage de l'exome (*whole exome sequencing*, WES) les CTC à l'échelle de cellule unique de patients atteints de cancers de la prostate métastatiques et d'autre part d'établir et caractériser des modèles de xénogreffes dérivés de CTC (*CTC-derived xenograft*, CDX) chez des patients atteints de CBNPC ou de patients atteints de cancers de la prostate.

En parallèle de ce travail, nous avons également souhaité évaluer l'influence des sous-groupes moléculaires présents dans les CBNPC sur certaines caractéristiques phénotypiques des CTC, plus précisément sur l'expression de la vimentine comme marqueur de la TEM. Les CTC ont été dénombrées par le CellSearch, approche robuste, simple et reproductible mais qui ne permet de distinguer que deux types de CTC, les CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup>/vimentine<sup>-</sup> et les CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup>/vimentine<sup>+</sup>. Notre hypothèse est d'évaluer dans quelle mesure l'expression de ce marqueur par des CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup> pourrait refléter l'évolution vers un phénotype plus agressif associé à une évolution clinique plus défavorable.

Pour répondre au premier objectif de ma thèse, nous avons développé une méthode expérimentale globale incluant trois approches technologiques permettant d'enrichir et d'isoler des CTC individuelles de différents phénotypes (épithélial, épithélio-mésenchymateux et mésenchymateux), d'amplifier la totalité du génome (*whole genome amplification*, WGA) et de séquencer l'exome. A ce jour, aucune étude de caractérisation moléculaire de CTC n'a pris en compte l'hétérogénéité phénotypique des CTC. Dans l'ensemble des études publiées, uniquement les CTC épithéliales EpCAM positives ont été analysées. En comparant les résultats d'exome de CTC présentant des caractéristiques phénotypiques différentes et récapitulant ainsi l'hétérogénéité phénotypique des CTC, nous avons voulu savoir si ces cellules présentaient des mutations communes avec les biopsies tumorales des patients. Également, nous avons développé une méthode d'analyse bio-informatique afin d'évaluer si des mutations peuvent être uniquement détectées dans les CTC et non dans les biopsies tumorales. Nous avons également

voulu savoir si, sur la base des mutations détectées dans chacun des échantillons de CTC, les CTC de différents phénotypes pourraient avoir une origine commune en réalisant une classification hiérarchique. Pour répondre au second objectif de ma thèse, nous avons réalisé l'implantation de CTC issues de prélèvements sanguins ou de produits de cytophérèse de patients atteints de CBNPC et de patients atteints de cancer de la prostate chez des souris immunodéprimées. Nous avons réussi à établir quatre modèles de CDX de CBNPC et un modèle de CDX de cancer de la prostate. Trois lignées cellulaires issues de CDX de CBNPC et une lignée cellulaire issues de CDX de prostate ont aussi été établies. Afin de valider l'intérêt de ces modèles, nous avons souhaité savoir si les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des biopsies tumorales des patients sont conservées dans les CTC isolées au moment de la xénogreffe, les CDX et les lignées cellulaires. Pour cela, nous avons réalisé leur caractérisation phénotypique par immunohistochimie en fonction de l'origine et de l'histologie du cancer et par cytométrie en flux pour les lignées cellulaires. La caractérisation moléculaire a été réalisée par séquençage de l'exome et nous a permis de valider nos modèles d'un point de vue du profil mutationnel. Enfin, nous avons souhaité savoir si les réponses aux drogues de ces lignées cellulaires et CDX sont comparables à celles observées chez les patients donc nous avons entrepris la réalisation de tests pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*.

L'ensemble des résultats sont présentés dans ce manuscrit.

# Introduction

## I. Le cancer bronchique non à petites cellules

Le cancer du poumon est la plus grande cause de mortalité par cancer dans le monde [Jemal A. *et al.*, CA Cancer J Clin, 2011]. Ce cancer est classé en deux grandes familles histologiques, les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) qui représentent respectivement environ 15 % et 85 % des cancers pulmonaires. Ce manuscrit sera exclusivement consacré aux CBNPC.

### 1) Incidence et détection

La majorité des cancers bronchiques sont diagnostiqués chez des patients âgés de 65 ans et plus, et le principal facteur de risque reste le tabac. Cependant d'autres facteurs comme l'exposition à l'amiante, aux hydrocarbures aromatiques polycycliques sont également considérés à risque. Des estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) annoncent le décès de 1,37 millions de personnes atteints de cancer pulmonaire par an dans le monde, 71 % de ces décès étant liés à la consommation de tabac. Cependant, 29 % des décès par cancer du poumon surviennent chez des patients n'ayant jamais consommé de tabac [Jemal A. *et al.*, CA Cancer J Clin, 2011].

Le diagnostic est posé, sur la base de la classification WHO (*world health organization*) de 2015, par l'analyse anatomopathologique de la tumeur réséquée chirurgicalement et par l'analyse de biopsies tumorales quand les patients ne sont pas opérables ce qui représentent la majorité des cas.

### 2) Classifications

Les CBNPC sont un groupe de tumeur présentant une grande hétérogénéité histologique et moléculaire.

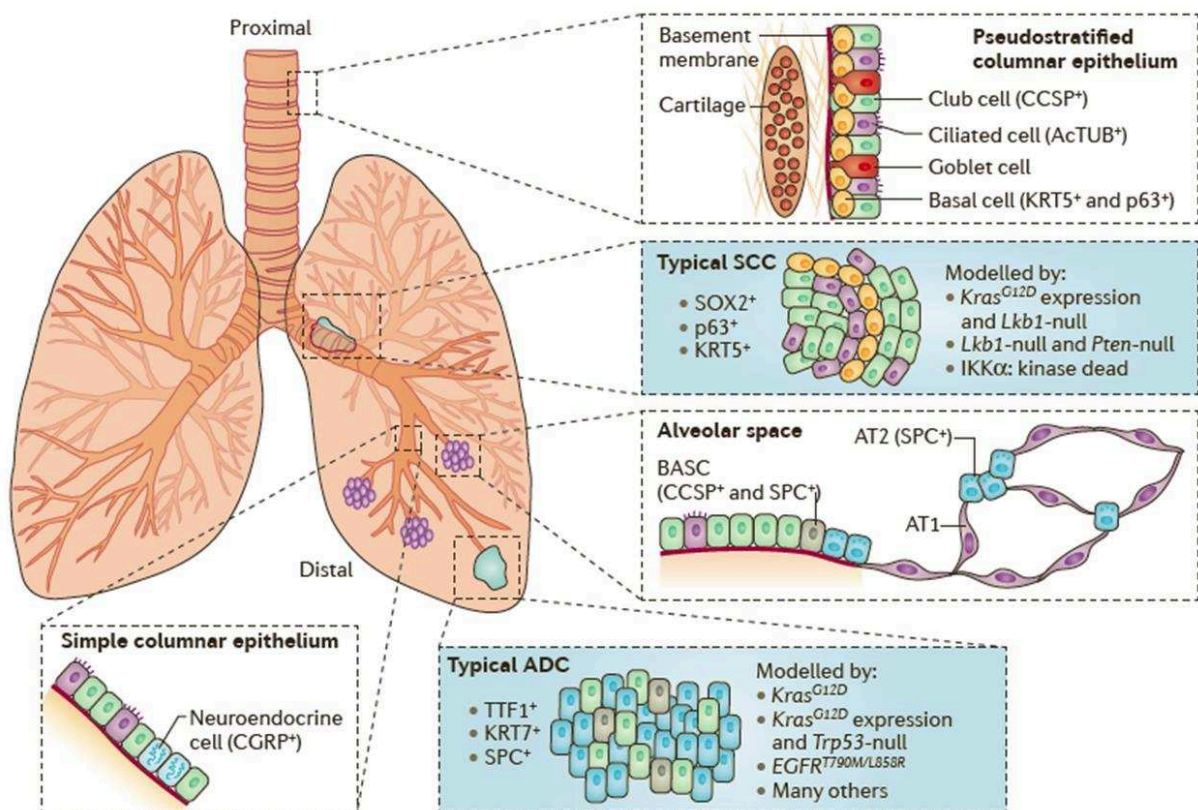
#### a. Histologique

D'un point de vue histologique, les CBNPC sont subdivisés en adénocarcinomes, carcinomes squameux, carcinomes à grande cellules, carcinomes neuroendocrines à grandes cellules, carcinomes adéno-squameux, carcinomes sarcomatoïdes et carcinomes de type glande salivaire [Davidson M. R. *et al.*, J Thorac Dis, 2013]. Les deux formes histologiques prédominantes sont les adénocarcinomes et les carcinomes squameux représentant respectivement 50 % et 40 % des CBNPC.

Les adénocarcinomes sont globalement issus des voies respiratoires distales et présentent une histologie de type glandulaire. Les adénocarcinomes expriment généralement les marqueurs comme le

facteur 1 de transcription thyroïdien (TTF1, *thyroid transcription factor 1*) ou la cytokératine 7 (**Figure 1**) [Davidson M. R. *et al.*, J Thorac Dis, 2013 ; Langer C. J. *et al.*, J Clin Oncol, 2010].

En revanche les carcinomes squameux sont quant à eux originaires des voies aériennes proximales et peuvent être plus facilement associés à la consommation de tabac ainsi qu'aux inflammations chroniques que les adénocarcinomes. Les carcinomes squameux sont caractérisés par l'expression des cytokératines 5 et 6, de p63 et peuvent également exprimer le facteur de transcription SOX2 (*SRY-box2*) (**Figure 1**) [Davidson M. R. *et al.*, J Thorac Dis, 2013 ; Langer C. J. *et al.*, J Clin Oncol, 2010].



**Figure 1 : Origine histologique et cellulaire des adénocarcinomes et carcinomes squameux.**

Les carcinomes squameux sont originaires des voies respiratoires proximales. Les cellules à l'origine de cette forme histologique de cancer sont les cellules basales de l'épithélium de la trachée qui expriment les protéines p63, cytokératine 5 et SOX2. Les adénocarcinomes proviennent des voies respiratoires distales. Les cellules à l'origine des adénocarcinomes sont les cellules bronchiales progénitrices et les cellules souches bronchioalvéolaires. Les adénocarcinomes expriment généralement les marqueurs TTF1, cytokératine 7 et la protéine C surfactant.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Cancer [Chen Z. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2014], copyright 2014.

Histologiquement, les carcinomes à grandes cellules diffèrent des adénocarcinomes qui sont glandulaires et des carcinomes squameux mais ils peuvent exprimer des marqueurs d'adénocarcinomes ou de carcinomes squameux. Les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules diffèrent quant à eux des CBPC du fait de la taille des cellules mais ils expriment au moins un marqueur de CBPC tels que la chromogranine, la synaptophysine ou le CD56 [Davidson M. R. *et al.*, J Thorac Dis, 2013].

### **b. Moléculaire**

Les CBNPC peuvent aussi être classés en fonction des anomalies génétiques détectées dans les biopsies au moment du diagnostic ou lors de la progression de la maladie lorsque cette dernière progresse et échappe au traitement. Les avancées technologiques ont permis le séquençage en masse de biopsies tumorales et ainsi l'identification d'anomalies moléculaires clés dans la progression de la maladie qui peuvent être des remaniements chromosomiques, des variations du nombre de copies de gènes ou de chromosomes entiers, des insertions ou délétions (INDEL) ou bien des mutations (SNV, variant somatique de nucléotide unique).

Dans les CBNPC, de nombreuses anomalies génétiques dans des gènes appelés oncogènes « *drivers* » ont été décrites pour leurs rôles essentielles dans la cancérogenèse et sont détectées dans des gènes codant pour des récepteurs à activité tyrosine kinase, des protéines clés de voies de signalisation cellulaire, des facteurs épigénétiques, des facteurs de transcription, des supprimeurs de tumeurs (**Tableau 1**). Pour certaines de ces altérations génomiques, des inhibiteurs de kinase (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) spécifiques ont été développés et sont utilisés en clinique et approuvés comme traitement de référence. C'est le cas des TKI ciblant les mutations dans le gène *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) ou les remaniements des gènes *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) ou *ROS1* (*ROS proto-oncogene 1*).

Les anomalies génomiques du gène *EGFR* (**Figure 2**), telles que la délétion de l'exon 19 ou la mutation L858R dans l'exon 21 sont les anomalies les plus fréquentes et sont dans la plupart des cas détectées chez des patients non ou peu fumeurs (< 15 paquets années) et dont l'histologie de la tumeur est majoritairement de type adénocarcinome. Ces anomalies sont détectées dans environ 10 % des patients atteints de CBNPC [Dogan S. *et al.*, Clin Cancer Res, 2012 ; Rosell R. *et al.*, N Engl J Med, 2009].

Gene	Status (M, C or F)*	Frequency (%)		Available GEMMs	Currently available targeted therapies	Selected potential targeted therapies
		ADC	SCC			
<b>Receptor tyrosine kinases</b>						
<i>EGFR</i>	M or C	10 (M)	2-3	L858R, Del19, T790M and Ins20	Erlotinib, gefitinib and afatinib	AZD9291, CO-1686 and HM61713
<i>FGFR1</i>	C	N/A	20	N/A	N/A	Dovitinib, ponatinib, AZD4547 and BGJ398
<i>FGFR2</i>	M or C	3 (M)	3	N/A	N/A	Dovitinib, ponatinib, AZD4547 and BGJ398
<i>ALK</i>	F	3-5	<1	ALK fusion, L1196M and F1174L	Crizotinib and ceritinib	AP26113, alectinib, ganetespib and PF-06463922
<i>MET</i>	C	2-4	N/A	Overexpression	Crizotinib	Tivantinib, cabozantinib, INC280 and onartuzumab
<i>ROS1</i>	F	1-2	N/A	N/A	Crizotinib	PF-06463922
<i>NTRK1</i>	F	1-2	N/A	N/A	N/A	Crizotinib and lestaartinib
<i>RET</i>	F	1	N/A	N/A	N/A	Carbozantinib and vandetanib
<i>HER2</i>	M or C	2-4 (M)	N/A	HER2-YVMA insertion	N/A	Neratinib, afatinib, lapatinib and trastuzumab
<i>DDR2</i>	M	N/A	2-3	N/A	N/A	Dasatinib
<i>PDGFRA</i>	M	6-7	4	N/A	N/A	Sunitinib
<b>Signalling</b>						
<i>KRAS</i>	M	15-25	1-2	G12D, G12C and G12V	N/A	Selumetinib plus docetaxel combination
<i>NF1</i>	M	12	10	Null	N/A	
<i>BRAF</i>	M	1-6	4-5	V600E	N/A	Vemurafenib, dabrafenib and trametinib
<i>PIK3CA</i>	M	5	15	p110α	N/A	BEZ235, BKM120 and GDC0941
<i>MEK1</i>	M	1	N/A	N/A	N/A	Selumetinib and trametinib
<i>NOTCH1</i>	M	8	1	Conditional null	N/A	N/A
<b>Epigenetic factors</b>						
<i>MLL2</i>	M	9	20	N/A	N/A	N/A
<i>EZH2</i>	M	2	2	N/A	N/A	N/A
<i>TET2</i>	M	3	2	N/A	N/A	N/A
<i>DNMT3A</i>	M	4	1	N/A	N/A	N/A
<b>Transcription factors</b>						
<i>SOX2</i>	C	6	65	Overexpression	N/A	N/A
<i>MYC</i>	C	25	N/A	Overexpression	N/A	N/A
<b>Proteolysis</b>						
<i>KEAP1</i>	M	17	12	N/A	N/A	N/A
<b>Cell cycle</b>						
<i>CDKN2A</i>	M	7	15	Null	N/A	N/A
<b>Ligand</b>						
<i>NRG1</i>	F	<1	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Tumour suppressor</b>						
<i>TP53</i>	M	52	79	Conditional null and R172H	N/A	N/A
<i>LKB1</i>	M	9	2	Conditional null	N/A	N/A
<i>PTEN</i>	M	2	8	Conditional null	N/A	BEZ235, BKM120 and GDC0941

**Tableau 1 : Gènes porteurs d'anomalies importantes dans les CBNPC, fréquence des anomalies dans les tumeurs et traitements associés.**

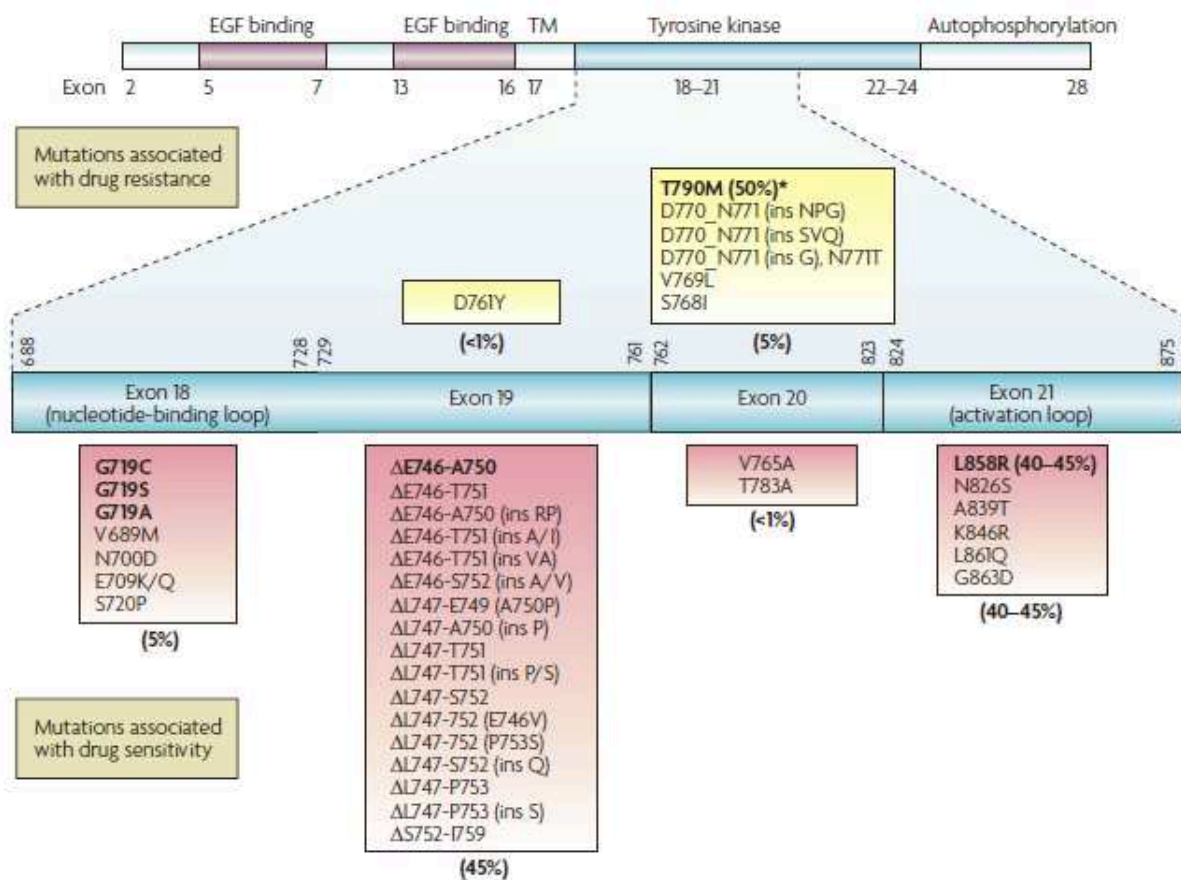
ADC, adénocarcinome; *ALK*, anaplastique lymphoma kinase; *CDKN2A*, cyclin-dépendant kinase inhibiteur 2A (which encode INK4A and ARF); *DDR2*, discoidin domain-containing receptor 2; Del19, *EGFR* exon 19 deletion; *DNMT3A*, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3α; *EGFR*, épidermal growth factor receptor; *EZH2*, enhancer of zeste homologue 2; *FGFR1*, fibroblast growth factor receptor 1; GEMM, génétiquement ingénieré modèle; Ins20, *EGFR* exon 20 insertion; *KEAP1*, kelch-like ECH-associated protein 1; *LKB1*, liver kinase B1; *MLL2*, mixed-lineage leukaemia 2; N/A, not available; *NF1*, neurofibromin 1; *NRG1*, neuregulin 1; *NTRK1*, neurotrophique tyrosine kinase, récepteur, type 1; *PDGFRA*, platelet-derived growth factor receptor-α; *PIK3CA*, PI3K catalytic subunit-α; SCC, squamous cell carcinoma; *SOX2*, SRY-box 2; *TET2*, TET methylcytosine dioxygénase 2. \*Status refers to mechanisms by which each gene is altered in tumours — mutation (M), copy number gain (C) or fusion (F).

Tableau reproduit avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Cancer, [Chen Z. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2014], copyright 2014.



Les TKI ciblant ces anomalies activatrices d'*EGFR* sont les inhibiteurs de première génération comme l'erlotinib et le gefitinib ou bien l'inhibiteur de seconde génération l'afatinib. Les deux TKI de première génération ont montré leur efficacité en clinique chez des patients porteurs d'anomalies activatrices d'*EGFR* en comparaison à la chimiothérapie dans plusieurs études [Lynch T. J. *et al.*, N Engl J Med, 2004 ; Mok T. S. *et al.*, N Engl J Med, 2009 ; Paez J. G. *et al.*, Science, 2004 ; Pao W. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2004]. Dans une étude randomisée incluant 174 patients de 2012, Rosell *et al.* ont montré que la survie sans progression (PFS, *progression free survival*) des patients *EGFR* mutés (mutation L858R ou délétion dans l'exon 19) était de 9,7 mois pour les patients traités par erlotinib *versus* 5,2 mois pour les patients traités par chimiothérapie [Rosell R. *et al.*, Lancet Oncol, 2012]. Cependant malgré la bonne réponse de ces patients à ces traitements, des mécanismes de résistance surviennent après une médiane de 9 à 13 mois de traitements [Mok T. S. *et al.*, N Engl J Med, 2009 ; Rosell R. *et al.*, Lancet Oncol, 2012 ; Sequist L. V. *et al.*, J Clin Oncol, 2013]. Dans environ 60 % des cas, le mécanisme de résistance aux TKI de première et seconde génération est lié à l'apparition de la mutation de résistance T790M dans l'exon 20 du gène *EGFR* et ce, quelle que soit l'inhibiteur de première (erlotinib, gefitinib) ou de seconde génération (afatinib) utilisé [Oxnard G. R. *et al.*, Clin Cancer Res, 2011 ; Sequist L. V. *et al.*, Sci Transl Med, 2011 ; Yu H. A. *et al.*, Clin Cancer Res, 2013]. En revanche la mutation de résistance T790M est plus fréquemment détectée chez les patients porteurs d'une délétion dans l'exon 19 que chez les patients avec une mutation L858R (exon 21), respectivement 73 % *versus* 58 % [Jenkins S. *et al.*, J Thorac Oncol, 2017]. Un inhibiteur de troisième génération l'osimertinib, ciblant à la fois les anomalies activatrices du gène *EGFR* et la mutation de résistance T790M, a été approuvé chez les patients présentant la mutation T790M pour lesquels la maladie a progressé après avoir reçu un TKI de première ou de deuxième génération [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016]. L'osimertinib en comparaison à la chimiothérapie a montré une PFS plus longue, 10,1 mois *versus* 4,4 mois respectivement, chez des patients T790M mutés après progression à une première ligne de traitement par inhibiteur de première ou seconde génération [Mok T. S. *et al.*, N Engl J Med, 2017]. Malgré une PFS plus longue avec cette molécule qu'avec la chimiothérapie, des mécanismes de résistance surviennent chez ces patients. En 2015, le groupe de Geoffrey R Oxnard a étudié l'apparition de mutations de résistance, dans l'ADN tumoral circulant (ctDNA), à l'osimertinib chez des patients porteurs de la mutation T790M [Thress K. S. *et al.*, Nat Med, 2015]. Cette étude a montré l'apparition de la mutation de résistance C797S dans l'exon 20 du gène *EGFR* chez six patients sur 15 initialement traités par osimertinib en seconde ligne de traitement. Le groupe de Pasi A Jänne a récemment montré que l'osimertinib en première ligne de traitement chez des patients *EGFR* mutés permettait d'obtenir une PFS médiane de 22,1 mois chez 38 patients [Ramalingam, SS *et al.*, J Clin Oncol 2017]. Au moment de la résistance au traitement, l'ADN tumoral circulant de ces patients a été

étudié pour élucider les mécanismes de résistance. Dix-neuf patients ne présentaient pas d'ADN tumoral circulant. Pour les 19 autres patients, neuf anomalies de résistance ont été identifiées notamment deux cas avec la mutation C797S, un cas présentant une amplification de *MET*, un cas d'amplification des gènes *EGFR* et *KRAS*, une mutation de *MEK1*, une mutation de *KRAS*, une mutation de *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), une mutation de *JAK2* (*janus kinase 2*) et une insertion dans *HER2* (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*). En revanche la mutation T790M n'a été détectée chez aucun patient.



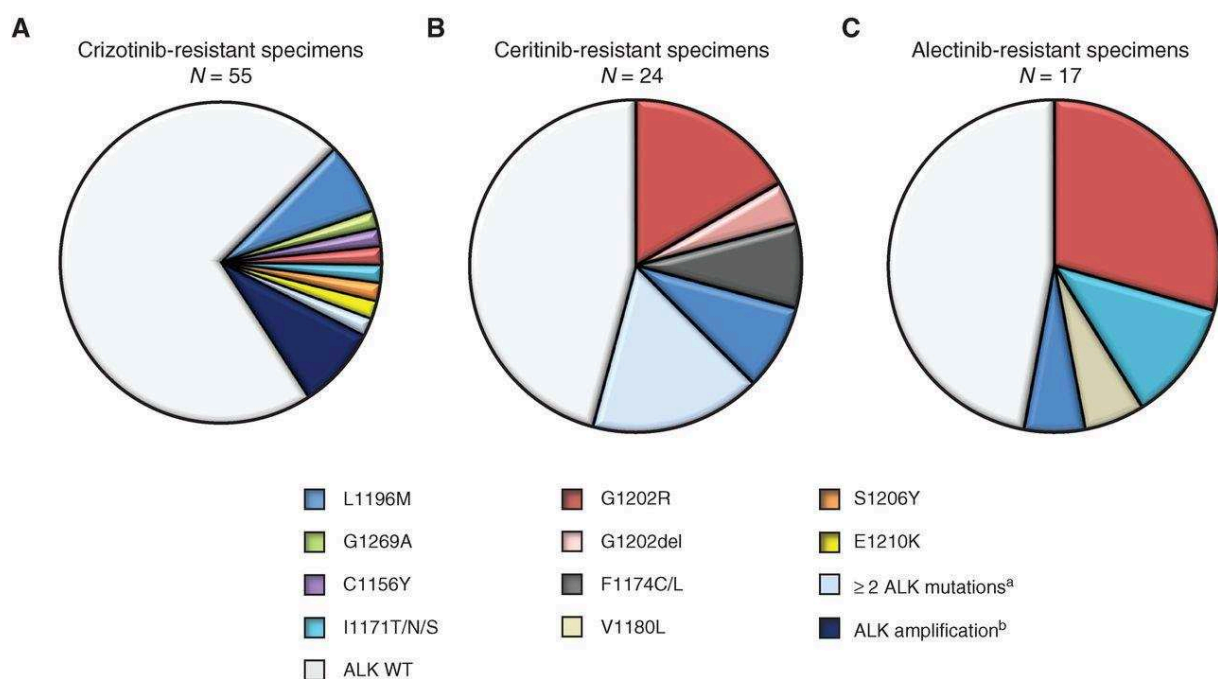
**Figure 2 : Anomalies génomiques (mutations/délétions) de sensibilité et de résistance aux inhibiteurs de première génération d'EGFR.**

Distribution et fréquence des mutations connues dans les exons 18 à 21 du domaine tyrosine kinase du gène *EGFR* et répartition selon la sensibilité ou la résistance aux inhibiteurs de première génération d'EGFR, erlotinib et gefitinib.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Cancer [Sharma S. V. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2007], copyright 2007.

Les remaniements des gènes *ALK* et *ROS1* représentent respectivement 3 % à 7 % et 1 % à 2 % des cas de patients atteints de CBNPC. Les patients porteurs de ces anomalies sont majoritairement des

patients non ou peu fumeurs (< 15 paquets années) avec une tumeur de type histologique d'adénocarcinome. Deux études de phase 3, l'une publiée en 2013 et l'autre en 2014, ont montré la supériorité du crizotinib par rapport à la chimiothérapie en termes de PFS, 7,7 mois pour le crizotinib versus 3 mois pour la chimiothérapie en seconde ligne de traitement pour la première étude et 10,9 *versus* 7 mois en première ligne thérapeutique pour la deuxième, chez des patients porteurs du remaniement *ALK* [Shaw A. T. *et al.*, N Engl J Med, 2013 ; Solomon B. J. *et al.*, N Engl J Med, 2014]. Ces deux études ont permis l'amendement du crizotinib comme molécule recommandée en deuxième ligne dans un premier temps puis finalement en première ligne thérapeutique chez les patients porteurs du remaniement *ALK* (*ALK* remanié). Les patients porteurs de remaniement *ROS1* sont également sensibles au crizotinib et sont traités de la même façon que les patients *ALK* remanié. Cependant, malgré une efficacité du crizotinib supérieure à celle de la chimiothérapie, des mécanismes de résistance se développent et apparaissent globalement après un an de traitement par crizotinib.



**Figure 3 : Anomalies génomiques de résistance aux inhibiteurs de ALK de première génération (crizotinib) et de deuxième génération (ceritinib et alectinib).**

A) Distribution des mutations de résistance au crizotinib. B) Distribution des anomalies (mutations/délétions) de résistance au ceritinib. C) Distribution des anomalies (mutations/amplification) de résistance à l'alectinib.

Figure reproduite avec l'autorisation de American Association for Cancer Research, Cancer Discovery [Gainor J. F. *et al.*, Cancer Discov, 2016], copyright 2016.

Les mécanismes de résistance au crizotinib impliquent dans 30 % des cas des mutations du gène *ALK* (L1196M, G1269A, C1156Y, I1171T/N/S, ...) et dans 70 % des cas des voies alternes dans des oncogènes comme *EGFR* ou *KIT*, ou encore des modifications épigénétiques comme la transition épithélio-mésenchymateuse [Gainor J. F. *et al.*, *Cancer Discov*, 2016] (**Figure 3**). Des inhibiteurs de seconde génération, le ceritinib et l'alectinib, ciblant les mutations de résistance au crizotinib, ont été développés. Le ceritinib a notamment montré son efficacité chez des patients *ALK* remaniés après une première ligne de traitement par le crizotinib. L'étude initiale montre un taux de réponse objective (ORR, *objective response rate*) de 56 % et une médiane de PFS de 6,9 mois [Shaw A. T. *et al.*, *N Engl J Med*, 2014]. Ces réponses sont observées à la fois chez des patients présentant une mutation de résistance au crizotinib [Friboulet L. *et al.*, *Cancer Discov*, 2014] et chez les patients ne présentant pas de mutations de résistance ce qui montre une efficacité thérapeutique supérieure du crizotinib [Shaw A. T. *et al.*, *N Engl J Med*, 2014]. Cependant de nouvelles mutations de résistance G1202R, G12102del, F1174C/L et V1180L au ceritinib émergent (**Figure 3**). Récemment une étude a comparé le crizotinib à l'alectinib, un autre inhibiteur de seconde génération, en première ligne thérapeutique chez des patients *ALK* remanié [Peters S. *et al.*, *N Engl J Med*, 2017]. Dans cette étude, après 12 mois de traitement le taux de survie sans signe évolutif de la maladie était de 68,4% pour l'alectinib versus 48,7 % pour le crizotinib. Il apparaît que l'alectinib pénètre mieux au niveau du système nerveux central que le crizotinib. Dans cette même étude, la survenue de progression au niveau cérébral était de 12 % pour l'alectinib versus 45 % pour le crizotinib. Quand la maladie évolue sous TKI de première et de deuxième générations, les patients peuvent bénéficier d'un TKI de troisième génération qui est le lorlatinib. L'efficacité de cette molécule a été démontrée sur plusieurs mutations de résistance comme par exemple la mutation G1202R [Gainor J. F. *et al.*, *Cancer Discov*, 2016 ; Zou H. Y. *et al.*, *Cancer Cell*, 2015] pour laquelle les inhibiteurs de première et deuxième générations ne sont pas efficaces. Un dernier inhibiteur de *ALK*, le brigatinib, a été évalué dans une étude récente [Kim D. W. *et al.*, *J Clin Oncol*, 2017] chez des patients *ALK* remanié en résistance au crizotinib et qui pouvaient également avoir reçu de la chimiothérapie au préalable. Dans cette étude, les patients ont été traités par une dose journalière de 80 milligrammes (mg, bras A) ou 180 mg (bras B) de brigatinib. Après 8 mois de suivi, l'ORR était de 45 % et 54 % respectivement pour le bras A et B. La PFS était de 9,2 et 12,9 mois respectivement pour le bras A et B (encore des patients sous traitement à la fin de l'étude pour le bras B). Les auteurs se sont ensuite intéressés aux patients métastatiques au niveau cérébral avant le traitement et ils ont constaté que l'ORR était de 42 % et 67 % respectivement pour le bras A et pour le bras B. Globalement cette étude montre l'efficacité importante du brigatinib chez des patients en progression sous crizotinib et une meilleure efficacité du traitement à une dose journalière de 180 mg.

Environ 2 % des patients atteints de CBNPC sont porteurs d'une mutation dans le gène *BRAF* et environ la moitié présentent la mutation V600E. Ces patients peuvent bénéficier de l'inhibiteur dabrafenib spécifique à cette mutation en association avec l'inhibiteur de MEK, trametinib. Cette association montre un taux de réponse de 63,2 % et une PFS de 9,7 mois chez des patients *BRAF* porteurs de la mutation V600E après au moins une première ligne de traitement par chimiothérapie et avec maximum trois lignes de traitement systémique (excluant les inhibiteurs de *BRAF* ou de *MEK*) [Planchard D. *et al.*, Lancet Oncol, 2016].

Chez des patients sélectionnés porteurs d'anomalies génétiques de sensibilité, les TKI montrent une bonne efficacité et des PFS augmentées en comparaison avec la chimiothérapie. Cependant, la survenue inévitable de mécanismes de résistance chez ces patients nécessite le développement de nouveaux inhibiteurs ciblant ces anomalies de résistance. Bien que de nombreuses anomalies génétiques aient été découvertes dans les CBNPC, beaucoup d'entre elles ne sont actuellement pas ciblées par des agents thérapeutiques.

### 3) Prise en charge thérapeutique

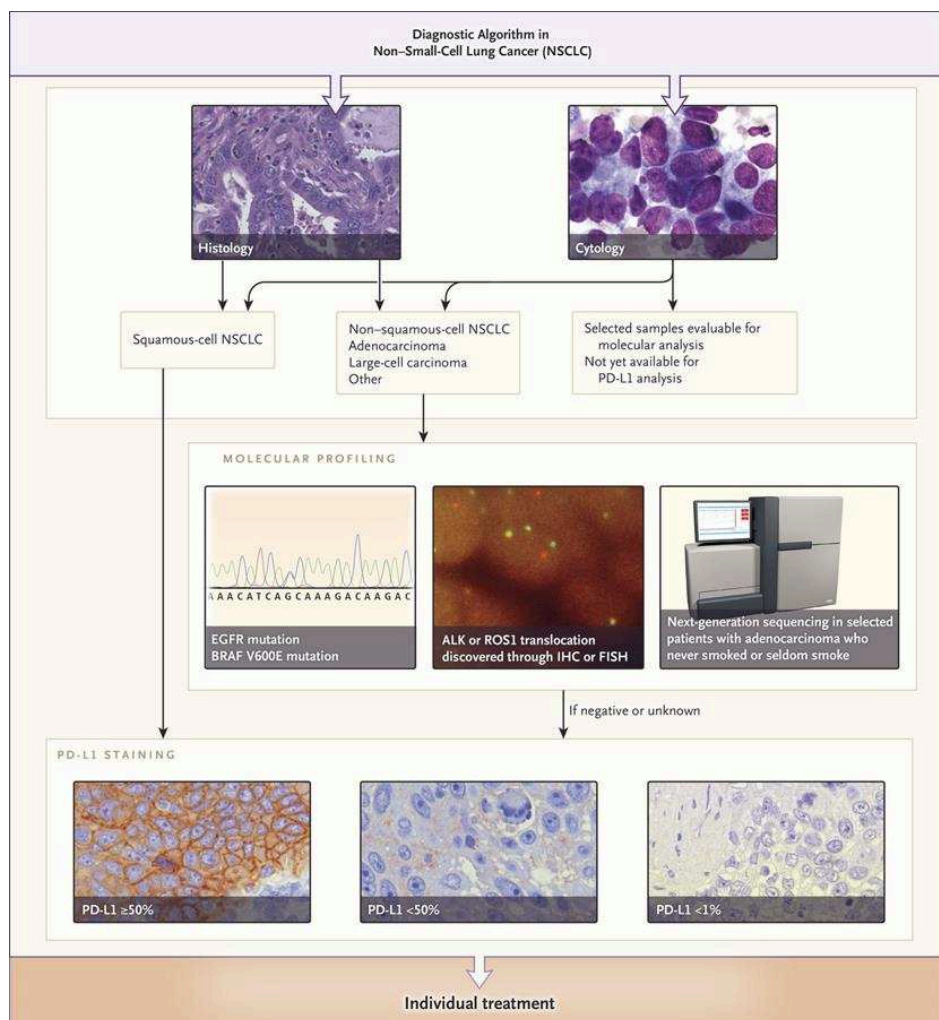
La prise en charge des patients atteints de CBNPC dépend du stade de la maladie au moment du diagnostic (classification TNM, *tumor node metastasis*) et également de la classification histologique et moléculaire de la tumeur. La chirurgie est la première ligne thérapeutique chez les patients présentant une tumeur de stade I à IIIA (**Tableau 2**) et ces patients reçoivent également un traitement par chimiothérapie.

T/M	Label	N0	N1	N2	N3
T1	T1a $\leq 1$	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b >1-2	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c >2-3	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a <i>Cent, Yisc Pl</i>	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a >3-4	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b >4-5	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 >5-7	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Inv</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Satell</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 >7	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Inv</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Ipsi Nod</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a <i>Contr Nod</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a <i>Pl Dissem</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b <i>Single</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c <i>Multi</i>	IVB	IVB	IVB	IVB

**Tableau 2 : Correspondance entre la classification TNM et la classification des cancers bronchiques.**

Tableau reproduit avec l'autorisation de Elsevier, Chest, [Detterbeck F. C. *et al.*, Chest, 2017], copyright 2017.

Pour les patients diagnostiqués à un stade IIIb ou au-delà, la chirurgie n'est pas recommandée. Comme décrit dans la section Introduction I-2)a., les tumeurs sont ensuite classées selon leur type histologique en deux grandes catégories majoritaires : les carcinomes squameux et les adénocarcinomes. Ensuite, une caractérisation moléculaire est faite pour l'ensemble des adénocarcinomes dès lors que du matériel tumoral est disponible et pour les patients atteints de carcinomes squameux peu ou non-fumeurs (< 15 paquets année) [Rekhtman N. *et al.*, Clin Cancer Res, 2012]. Si les résultats de la recherche de mutations ne permettent pas l'orientation du patient vers un traitement ciblé, l'expression de PDL-1 (*programmed cell death 1 ligand 1*) est analysée par immunohistochimie (IHC) (**Figure 4**).



**Figure 4 : Schéma de diagnostic et d'aide à la prise en charge personnalisée des CBNPC.**

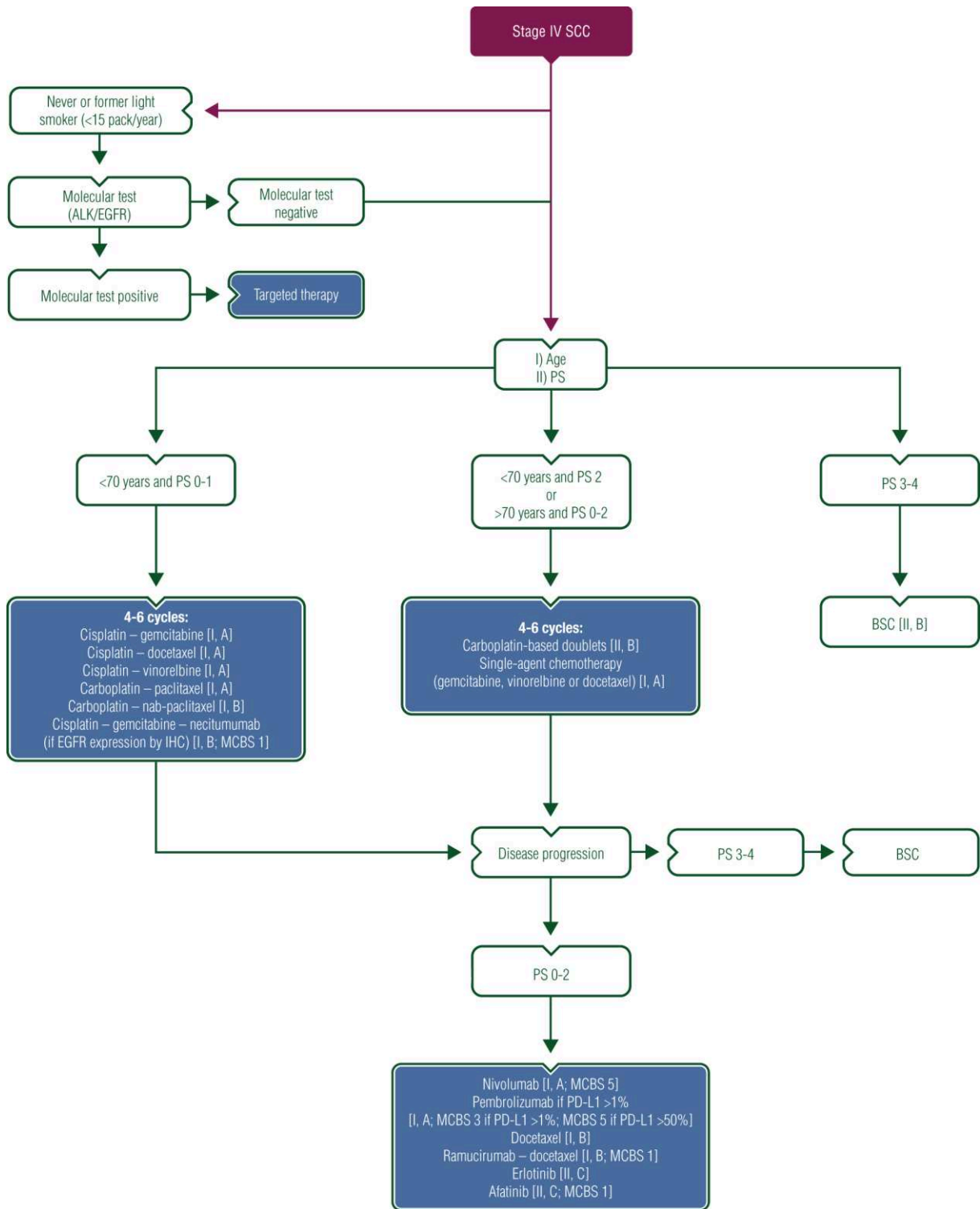
La partie supérieure montre la classification histologique des CBNPC. La partie intermédiaire montre la classification moléculaire des adénocarcinomes et la recherche d'anomalies dans les gènes *ALK*, *EGFR* et *BRAF*. La partie inférieure montre la caractérisation par IHC de l'expression de PD-L1 en vue de choisir le meilleur traitement.

Figure reproduite avec l'autorisation de Massachusetts Medical Society, New England Journal of Medicine, [Reck M. *et al.*, N Engl J Med, 2017], copyright 2017.

### a. La prise en charge des carcinomes squameux

Pour les patients non ou peu fumeurs (< 15 paquets année) atteints d'un carcinome squameux il est recommandé de réaliser des analyses moléculaires par séquençage pour détecter une anomalie moléculaire pouvant être ciblée par un TKI [Rekhtman N. *et al.*, Clin Cancer Res, 2012]. Si les résultats de ces analyses montrent une mutation dans le gène *EGFR* ou un remaniement du gène *ALK*, les patients sont traités comme les patients atteints d'un adénocarcinome avec la même anomalie moléculaire (**Figure 5**) (Introduction I-3)b.). Pour les autres patients atteints de carcinome squameux (les patients peu ou pas fumeurs sans anomalies moléculaires dans les gènes *ALK* ou *EGFR* ainsi que les patients fumeurs) les recommandations sont de réaliser une première ligne par chimiothérapie de type cisplatine-gemcitabine ou cisplatine-docetaxel ou cisplatine-vinorelbine ou carboplatine-paclitaxel. Si une expression d'EGFR est détectée par IHC, la recommandation est d'associer cisplatine, gemcitabine et necitumumab. Pour les patients de plus de 70 ans ou de moins de 70 ans mais avec un statut de performance (PS, *performance status*) de 2, la recommandation est de faire soit un doublet de chimiothérapie à base de carboplatine ou une chimiothérapie avec un des agents suivants gemcitabine, vinorelbine, docetaxel [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016]. Après progression de la maladie les recommandations pour la deuxième ligne de traitement sont les suivantes : une immunothérapie de type nivolumab (quel que soit le statut PD-L1 de la tumeur en IHC) ou pembrolizumab (si plus de 1 % des cellules tumorales sont PD-L1 positives en IHC, avec une plus grande efficacité si plus de 50 % des cellules tumorales sont PD-L1 positives), ou docetaxel, ou ramucirumab-docetaxel, ou erlotinib, ou afatinib [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016] (**Figure 5**).





**Figure 5 : Schéma de prise en charge thérapeutique des carcinomes squameux en première et deuxième ligne de traitement.**

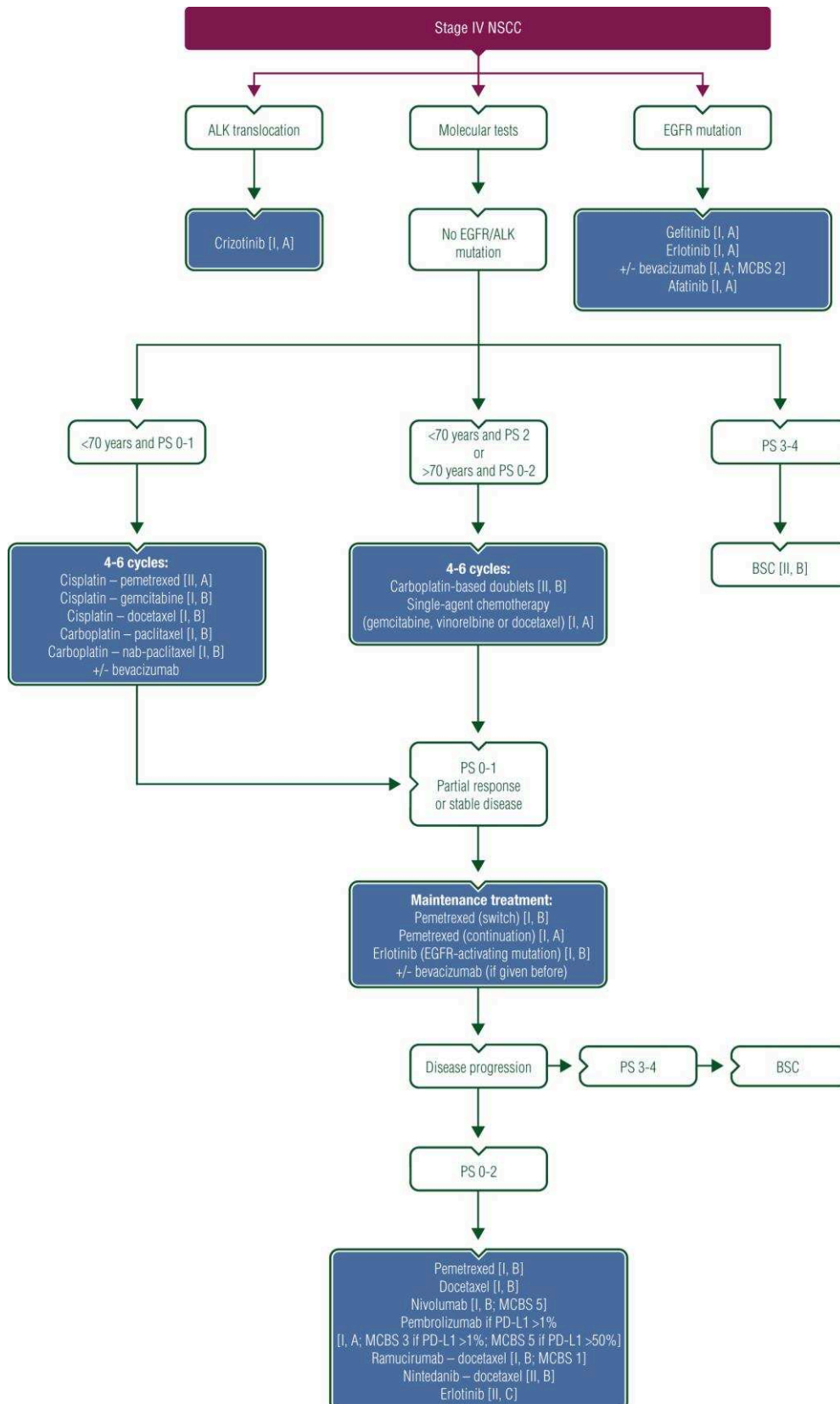
Figure reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press, Annals of Oncology, [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016], copyright 2016.



### **b. La prise en charge des adénocarcinomes**

Pour les patients atteints d'un adénocarcinome, il est recommandé de réaliser des analyses moléculaires par séquençage pour détecter une anomalie moléculaire pouvant être ciblée par un TKI (**Figure 4**) [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016 ; Reck M. *et al.*, N Engl J Med, 2017].

Si les analyses moléculaires ne montrent pas de remaniement du gène *ALK* ou d'anomalies activatrices du gène *EGFR*, la recommandation pour la première ligne de traitement est soit l'association de chimiothérapie à base de cisplatine avec un des agents suivants : pemetrexed, gemcitabine, docetaxel ; soit à base de carboplatine associé au paclitaxel plus ou moins bevacizumab ; soit en une unique chimiothérapie : gemcitabine, vinorelbine ou docetaxel (**Figure 6**). Lors de la progression de la maladie, les recommandations pour la deuxième ligne thérapeutique sont les suivantes : soit une deuxième par pemetrexed, ou nivolumab (quel que soit le statut PD-L1 de la tumeur en IHC), ou pembrolizumab (si plus de 1% des cellules tumorales sont PD-L1 positives en IHC et avec une plus grande efficacité si plus de 50% des cellules tumorales sont PD-L1 positives), ou ramucirumab et docetaxel, ou nintedanib et docetaxel, ou erlotinib (pour les patients *EGFR* sauvage ou inconnu avec des effets secondaires indésirables à la chimiothérapie ou chez les patients réfractaires à la chimiothérapie dès les premiers cycles) [Ciuleanu T. *et al.*, Lancet Oncol, 2012], (**Figure 6**) [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016].

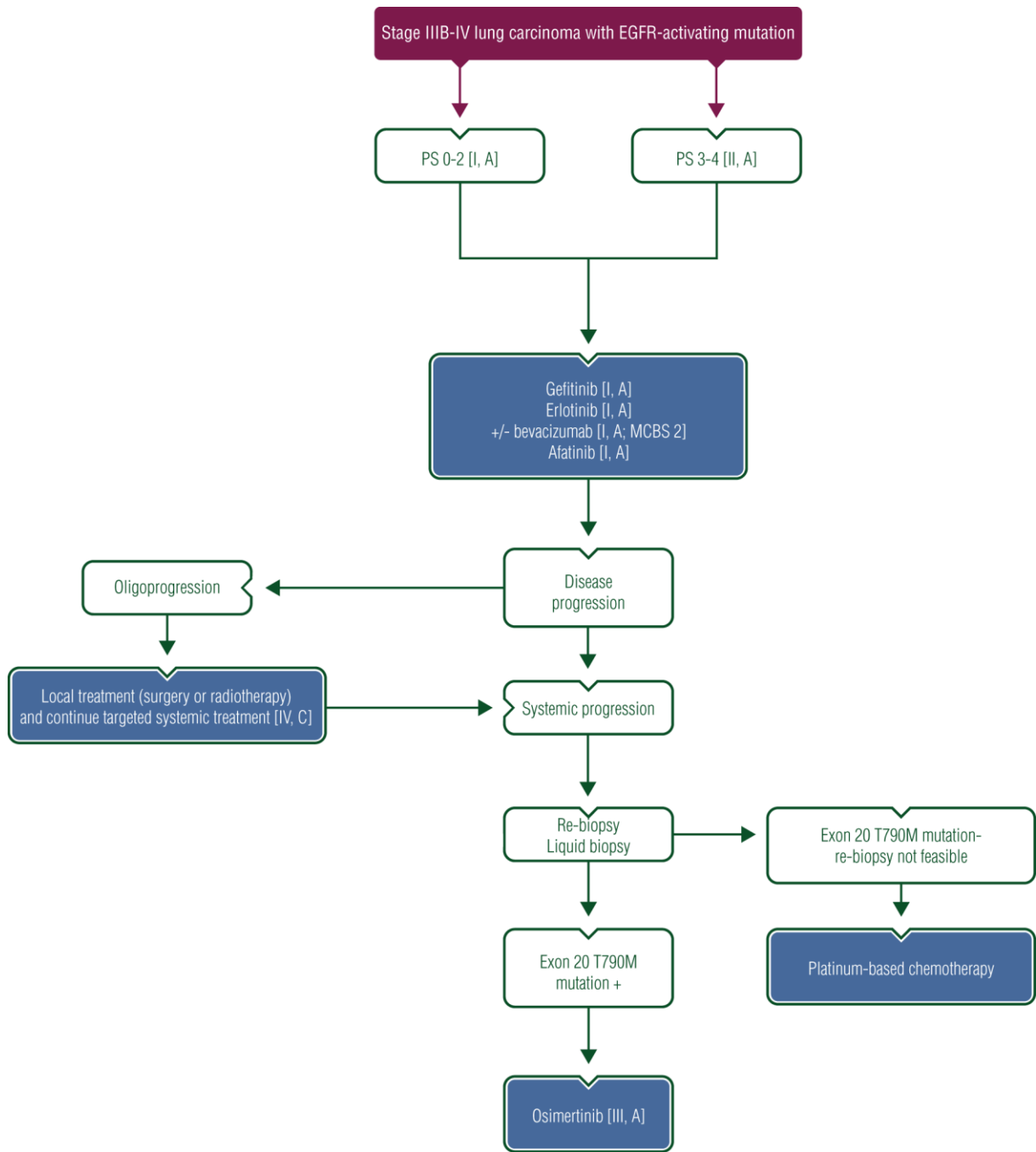


**Figure 6 : Schéma de prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes *ALK* et *EGFR* sauvages en première et deuxième ligne de traitement.**

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

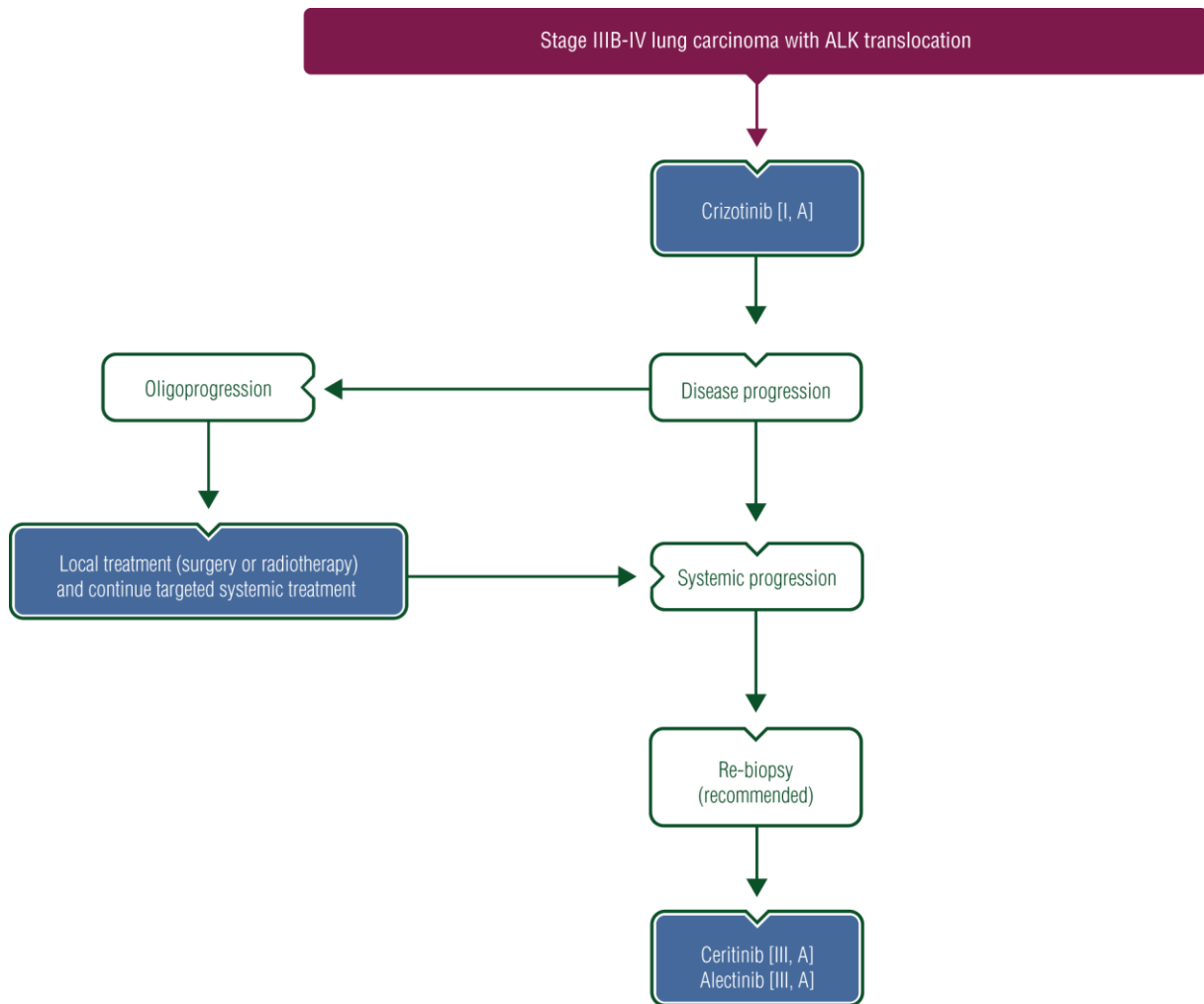
Lorsque les analyses moléculaires révèlent une mutation activatrice dans le gène *EGFR* (**Figure 2**), les recommandations sont de réaliser une première ligne thérapeutique par l'un des deux TKI de première génération, erlotinib ou gefitinib, ou bien par l'afatinib (TKI de deuxième génération). En cas de progression localisée, les patients poursuivent leur TKI et reçoivent un traitement local par chirurgie ou bien par radiothérapie. Lors de la progression systémique de la maladie, il est recommandé de re-biopsier le patient ou de réaliser une prise de sang afin de rechercher la mutation de résistance T790M par séquençage. Si ces analyses ne sont pas possibles ou que la mutation T790M n'est pas détectée, la recommandation pour la deuxième ligne thérapeutique est une chimiothérapie à base de platine. En revanche si la mutation T790M est détectée dans la biopsie tumorale ou dans l'ADN tumoral circulant, la recommandation est de réaliser une seconde ligne par l'inhibiteur de troisième génération osimertinib (**Figure 7**) [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016].

Lorsque les analyses moléculaires montrent un remaniement du gène *ALK*, la recommandation est de réaliser une première ligne thérapeutique par crizotinib. En cas de progression localisée, les patients continuent leur TKI et reçoivent un traitement local par chirurgie ou bien par radiothérapie. Lors de la progression systémique de la maladie, il est recommandé de re-biopsier le patient à la recherche de mutation de résistance au crizotinib (**Figure 3**) par séquençage. Quels que soient les résultats du séquençage lors de cette biopsie lors de la progression de la maladie, la recommandation est de réaliser une deuxième ligne thérapeutique par un TKI de deuxième génération par ceritinib ou alectinib (**Figure 8**) [Novello S. *et al.*, Ann Oncol, 2016].



**Figure 7 : Schéma de prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes *EGFR* muté en première et deuxième ligne de traitement.**

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



**Figure 8 : Schéma de prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes *ALK* remanié en première et deuxième ligne de traitement.**

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

## II. Le cancer de la prostate

### 1) Incidence et détection

Le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la cinquième cause de décès par cancer chez l'homme dans le monde avec 1,1 million de nouveaux cas et 307 500 décès en 2012 dans le monde entier [Torre L. A. *et al.*, CA Cancer J Clin, 2015]. Il est le cancer le plus fréquent chez l'homme dans les pays les plus développés. Environ deux tiers de tous les cas de cancers de la prostate surviennent dans seulement 17 % de la population mondiale d'hommes. En Europe, l'incidence de diagnostic des nouveaux cas de cancers de la prostate continue d'augmenter [Center M. M. *et al.*, Eur Urol, 2012]. Cependant, le taux de mortalité par cancer de la prostate a diminué dans la majorité des pays les plus développés du fait de l'amélioration des traitements et d'une détection plus précoce bien que la contribution du dosage de l'antigène spécifique prostatique (PSA, *prostate specific antigen*) soit toujours débattue [Center M. M. *et al.*, Eur Urol, 2012]. L'utilisation du dosage du PSA pour le dépistage de cancer de la prostate chez des hommes principalement âgés de 55 à 69 ans a été évaluée dans des essais et montre qu'après un suivi de 13 ans, la mortalité par cancer de la prostate est plus importante chez le groupe contrôle des patients sans dosage du PSA. Le ratio du nombre de décès chez les patients ayant réalisés le dosage sur le nombre de décès des patients n'ayant pas réalisé de dosage est égal à 0,79 et montre l'intérêt du dosage du PSA [Schroder F. H. *et al.*, Lancet, 2014].

Les facteurs de risques liés au développement du cancer de la prostate sont l'âge, l'ethnicité, les antécédents familiaux, la concentration de PSA et le rapport de PSA libre sur le PSA total. Le toucher rectal est l'examen clinique qui oriente les examens plus approfondis comme la réalisation de biopsies. La concentration de PSA total est normalement inférieure à 4 ng/mL. Entre 4 et 10 ng/mL le taux de PSA est considéré comme intermédiaire et à plus de 10 ng/mL, le taux est considéré comme élevé. Le PSA dans le sérum est majoritairement lié à des protéines ; le PSA libre ne l'est pas et cette forme de PSA est diminuée en cas de cancer de la prostate. Le taux de PSA libre sur le PSA total peut permettre d'améliorer l'interprétation du PSA total lorsque la valeur obtenue est intermédiaire (entre 4 et 10 ng/mL). Lorsque ce ratio est supérieur à 15 %, il peut être suspecté un adénome bénin de la prostate alors que si ce taux est inférieur à 15 %, il est nécessaire de faire des examens complémentaires tels qu'un toucher rectal et des biopsies prostatiques. Cependant malgré ces indicateurs il est possible de détecter des niveaux de PSA élevés chez des individus présentant des adénomes de la prostate ou des infections de cette glande en absence de cancer de la prostate. À l'inverse, il est possible de constater des cancers de la prostate chez des patients présentant des niveaux de PSA dans les valeurs normales (< 4 ng/mL). Des données montrent que jusqu'à 30 % des patients avec un PSA inférieur ou égal à

4 ng/mL peuvent présenter un cancer de la prostate. Cependant le pourcentage de cancer de haut grade (9,6 %) est beaucoup moins important chez ces patients que ceux avec une concentration de PSA supérieure à 6 ng/mL (2 %) [Thompson I. M. *et al.*, J Natl Cancer Inst, 2006]. Lors d'un résultat de PSA élevé, il est recommandé de refaire un nouveau dosage de PSA et de ne pas réaliser de biopsies prostatiques dès les premiers résultats [Parker C. *et al.*, Ann Oncol, 2015]. Ensuite, la réalisation de biopsies doit être prise en accord avec les résultats de l'examen clinique par le toucher rectal, l'ethnicité du patient, son âge, sa comorbidité, la concentration de PSA et du taux de PSA libre sur le PSA total [Parker C. *et al.*, Ann Oncol, 2015]. Les biopsies prostatiques sont réalisées sous contrôle échographique transrectale guidée par ultrasons et 10 à 12 prélèvements minimums doivent être réalisés. Dans le cas de biopsies répétées, il est recommandé de réaliser une imagerie par résonance magnétique (IRM) et de réaliser les biopsies sous contrôle échographique en associant les images de l'échographie et de l'IRM afin que le geste soit plus précis, c'est la technique de fusion d'image d'échographie et d'IRM. Une autre technique est de réaliser les biopsies sous contrôle échographique après avoir associé les images d'une IRM endorectale guidée par ultrasons de la prostate. Ceci permet l'obtention de clichés très précis du contour de la prostate et de pouvoir détecter d'éventuels envahissements tumoraux au-delà de la prostate ce qui va changer la prise en charge des patients [Parker C. *et al.*, Ann Oncol, 2015]. Les biopsies sont ensuite analysées par un anatomo-pathologiste en vue de déterminer le score de Gleason de chacune des 10 à 12 biopsies réalisées. Le score de Gleason le plus élevé est celui qui est retenu.

## 2) Classifications

### a. Histologique

Les cancers de la prostate sont classés en tumeurs de bas risque, de risque intermédiaire ou de haut risque. Cette classification est basée sur le score de Gleason de la tumeur, le niveau de PSA et le stade clinique (classification TNM) (**Figure 9**) et sert de guide pour le pronostic de la maladie et pour la stratégie thérapeutique [Parker C. *et al.*, Ann Oncol, 2015].

Primary tumor (T)	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
T1	Clinically inapparent tumor neither palpable nor visible by imaging
T1a	Tumor incidental histologic finding in 5% or less of tissue resected
T1b	Tumor incidental histologic finding in more than 5% of tissue resected
T1c	Tumor identified by needle biopsy (e.g., because of elevated PSA)
T2	Tumor confined within prostate
T2a	Tumor involves one-half of one lobe or less
T2b	Tumor involves more than one-half of one lobe but not both lobes
T2c	Tumor involves both lobes
T3	Tumor extends through the prostate capsule
T3a	Extracapsular extension (unilateral or bilateral)
T3b	Tumor invade seminal vesicle(s)
T4	Tumor is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles, such as external sphincter, rectum, bladder, levator muscles, and/or pelvic wall
Regional lymph nodes (N)	
NX	Regional lymph nodes were not assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in regional node(s)
Distant Metastasis (M)	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
M1a	Non-regional lymph node(s)
M1b	Bone(s)
M1c	Other site(s) with or without bone disease
PSA, prostate-specific antigen.	

**Figure 9 : Classification TNM pour le cancer de la prostate.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press, *Annals of Oncology*, [Parker C. *et al.*, *Ann Oncol*, 2015], copyright 2015.

Le score de Gleason a été créé par Donald F. Gleason en 1966 et repose sur l'architecture des cellules tumorales. Ce score a été modifié plusieurs fois et plus récemment en 2005 et 2014 par la société internationale de pathologies urologiques (ISUP, *international society of urological pathology*) [Epstein J. I. *et al.*, *Am J Surg Pathol*, 2005]. Pour établir ce score, les scores de deux zones représentatives de la tumeur sont additionnés. Le score de chacune des zones peut aller de 1 à 5 en fonction de l'organisation des cellules tumorales (**Tableau 3**).



---

**Pattern 1:**

Circumscribed nodule of closely packed but separate, uniform, rounded to oval, medium-sized acini (larger glands than pattern 3)

**Pattern 2:**

Like pattern 1, fairly circumscribed, yet at the edge of the tumor nodule there may be minimal infiltration

Glands are more loosely arranged and not quite as uniform as Gleason pattern 1

**Pattern 3:**

Discrete glandular units

Typically smaller glands than seen in Gleason pattern 1 or 2

Infiltrates in and amongst nonneoplastic prostate acini

Marked variation in size and shape

Smoothly circumscribed small cribriform nodules of tumor

**Pattern 4:**

Fused microacinar glands

Ill-defined glands with poorly formed glandular lumina

Large cribriform glands

Cribriform glands with an irregular border

Hypernephromatoid

**Pattern 5:**

Essentially no glandular differentiation, composed of solid sheets, cords, or single cells

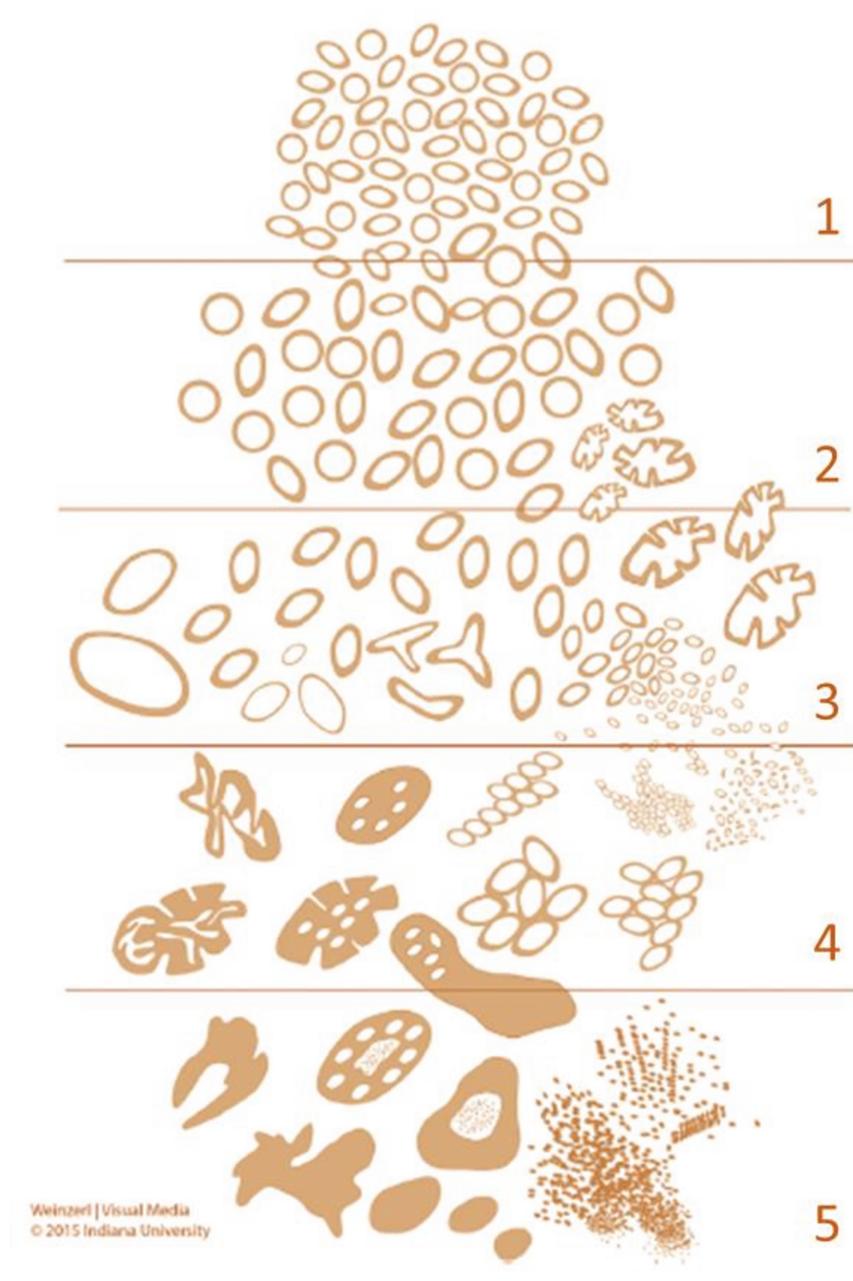
Comedocarcinoma with central necrosis surrounded by papillary, cribriform, or solid masses

---

**Tableau 3 : Score de Gleason modifié selon l'ISUP en 2004.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Wolters Kluwer Health, The American Journal of Surgical Pathology, [Epstein J. I. et al., Am J Surg Pathol, 2005], copyright 2005.

Un score de 1 correspond au score le plus bas et à l'agressivité la plus faible. Les cellules forment alors des glandes proches mais séparées, rondes à ovales. En présence d'un score de 5, il n'y a pas d'organisation glandulaire. Les cellules peuvent former des cordons ou bien être isolées. Ce score correspond à des cellules indifférenciées avec une agressivité augmentée. Le score de Gleason a évolué depuis son établissement entre 1966 par Gleason lui-même et la dernière mise à jour de ce score a été réalisée en 2015 par l'ISUP (**Figure 10**).



**Figure 10 : Schéma histologique des cancers de la prostate et correspondance avec le score de Gleason modifié par l'ISUP en 2015.**

Figure adaptée avec l'autorisation de Elsevier, European Urology, [Humphrey P. A. *et al.*, Eur Urol, 2016], copyright 2016.

Ensuite les scores des deux zones sont additionnés et le score obtenu oscille entre 2 à 10, où un score de 2 témoigne d'une tumeur différenciée et 10 d'une tumeur indifférenciée et agressive. Cependant, le diagnostic de tumeurs avec un score de Gleason de 2 à 6 est relativement faible. Afin de faire évoluer la classification des tumeurs de prostate, des conférences de consensus sont organisées. Celle de 2014 a donné lieu au développement d'une nouvelle classification dans laquelle les tumeurs sont classées selon 5 groupes [Humphrey P. A. *et al.*, Eur Urol, 2016] (**Tableau 4**).

---

Grade Group 1 (Gleason score $\leq 6$ ) – Only individual discrete well-formed glands
Grade Group 2 (Gleason score $3 + 4 = 7$ ) – Predominantly well-formed glands with lesser component of poorly- formed/fused/cribriform glands
Grade Group 3 (Gleason score $4 + 3 = 7$ ) – Predominantly poorly-formed/fused/cribriform glands with lesser component of well-formed glands†
Grade Group 4 (Gleason score $4 + 4 = 8$ ; $3 + 5 = 8$ ; $5 + 3 = 8$ ) Only poorly-formed/fused/cribriform glands <i>or</i> Predominantly well-formed glands and lesser component lacking glands†† <i>or</i> Predominantly lacking glands and lesser component of well-formed glands††
Grade Group 5 (Gleason scores 9-10) – Lacks gland formation (or with necrosis) with or w/o poorly formed/fused/cribriform glands†

---

†For cases with  $> 95\%$  poorly-formed/fused/cribriform glands or lack of glands on a core or at RP, the component of  $< 5\%$  well-formed glands is not factored into the grade.

††Poorly-formed/fused/cribriform glands can be a more minor component.

---

**Tableau 4 : Nouvelle classification des cancers prostatiques selon la conférence de consensus de 2014 de l'ISUP.**

Tableau adapté avec l'autorisation de Elsevier, European Urology, [Humphrey P. A. *et al.*, Eur Urol, 2016], copyright 2016.

Le groupe 1 comprend tous les patients avec un score de Gleason de 2 à 6. Les tumeurs sont dans ce cas caractérisées par la présence de quelques glandes bien formées et différenciées. Ces scores de Gleason ont été regroupés puisque les patients présentant des scores de Gleason de 1 à 5 étaient très rares et la classification des patients commençait donc réellement à un score de 6. Le groupe 2 correspond à un score de Gleason de 7 décomposé en  $3 + 4$  et caractérisé majoritairement par la présence de glandes bien formées et d'une composante faible de glandes moins bien formées, fusionnées et cribriformes. Le groupe 3 correspond également à un score de 7 mais cette fois ci décomposé en  $4 + 3$  c'est-à-dire que la tumeur est majoritairement composée de glandes peu formées, fusionnées et cribriformes et d'une composante minoritaire de glandes bien formées. Le groupe 4 comprend les tumeurs avec un score de Gleason de 8. Ces tumeurs sont soit constituées uniquement de glandes peu formées, fusionnées et cribriformes, soit constituées majoritairement de glandes bien formées et d'une composante minoritaire sans glandes ou soit caractérisées majoritairement par une absence de glandes et d'un composante minoritaire de glandes bien formées. Enfin le groupe 5, qui correspond à des scores de Gleason de 9 et 10, constitue les tumeurs présentant majoritairement une absence de glandes ou bien des glandes nécrotiques et peut également contenir des glandes peu formées, fusionnées et cribriformes. La classification histologique de tumeurs prostatiques est grande (**Figure 11**) et témoigne d'une grande hétérogénéité dans ce cancer.



Cependant, 90 % à 95 % des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes acinaires. Pour simplifier la classification, il est possible de considérer deux groupes histologiques : les adénocarcinomes acinaires et les adénocarcinomes non acinaires qui représente 5 % à 10 % des cancers de la prostate [Humphrey P. A. *et al.*, Eur Urol, 2016].

<b>Epithelial tumours</b>		Acute myeloid leukaemia	9861/3
<i>Glandular neoplasms</i>		B lymphoblastic leukaemia/lymphoma	9811/3
Acinar adenocarcinoma	8140/3		
Atrophic		<b>Miscellaneous tumours</b>	
Pseudohyperplastic		Cystadenoma	8440/0
Microcystic		Nephroblastoma	8960/3
Foamy gland		Rhabdoid tumour	8963/3
Mucinous (colloid)	8480/3	Germ cell tumours	
Signet ring-like cell	8490/3	Clear cell adenocarcinoma	8310/3
Pleomorphic giant cell		Melanoma	8720/3
Sarcomatoid	8572/3	Paraganglioma	8693/1
Prostatic intraepithelial neoplasia,		Neuroblastoma	9500/3
high-grade	8148/2		
Intraductal carcinoma	8500/2	<b>Metastatic tumours</b>	
Ductal adenocarcinoma	8500/3		
Cribriform	8201/3	<i>Tumours of the seminal vesicles</i>	
Papillary	8260/3		
Solid	8230/3	<b>Epithelial tumours</b>	
Urothelial carcinoma	8120/3	Adenocarcinoma	8140/3
<i>Squamous neoplasms</i>		Squamous cell carcinoma	8070/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3		
Squamous cell carcinoma	8070/3	<b>Mixed epithelial and stromal tumours</b>	
Basal cell carcinoma	8147/3	Cystadenoma	8440/0
<b>Neuroendocrine tumours</b>		<b>Mesenchymal tumours</b>	
Adenocarcinoma with neuroendocrine		Leiomyoma	8890/0
differentiation	8574/3	Schwannoma	9560/0
Well-differentiated neuroendocrine tumour	8240/3	Mammary-type myofibroblastoma	8825/0
Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3	Gastrointestinal stromal tumour, NOS	8936/1
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Leiomyosarcoma	8890/3
		Angiosarcoma	9120/3
<b>Mesenchymal tumours</b>		Liposarcoma	8850/3
Stromal tumour of uncertain malignant potential	8935/1	Solitary fibrous tumour	8815/1
Stromal sarcoma	8935/3	Haemangiopericytoma	9150/1
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyosarcoma	8900/3	<b>Miscellaneous tumours</b>	
Leiomyoma	8890/0	Choriocarcinoma	9100/3
Angiosarcoma	9120/3	Seminoma	9061/3
Synovial sarcoma	9040/3	Well-differentiated neuroendocrine tumour /	
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1	carcinoid tumour	8240/3
Osteosarcoma	9180/3	Lymphomas	
Undifferentiated pleomorphic sarcoma	8802/3	Ewing sarcoma	9364/3
Solitary fibrous tumour	8815/1		
Solitary fibrous tumour, malignant	8815/3	<b>Metastatic tumours</b>	
Haemangioma	9120/0		
Granular cell tumour	9580/0		
<b>Haematolymphoid tumours</b>			
Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3		
Chronic lymphocytic leukaemia /			
small lymphocytic lymphoma	9823/3		
Follicular lymphoma	9690/3		
Mantle cell lymphoma	9673/3		

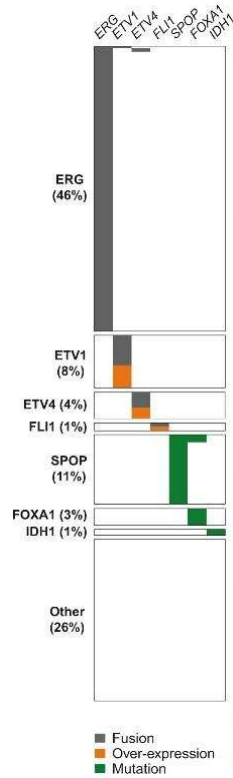
The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions.

**Figure 11 : Classification histologique de l'OMS des tumeurs de la prostate.**

Figure adaptée avec l'autorisation de Elsevier, European Urology, [Humphrey P. A. *et al.*, Eur Urol, 2016], copyright 2016.

## b. Moléculaire

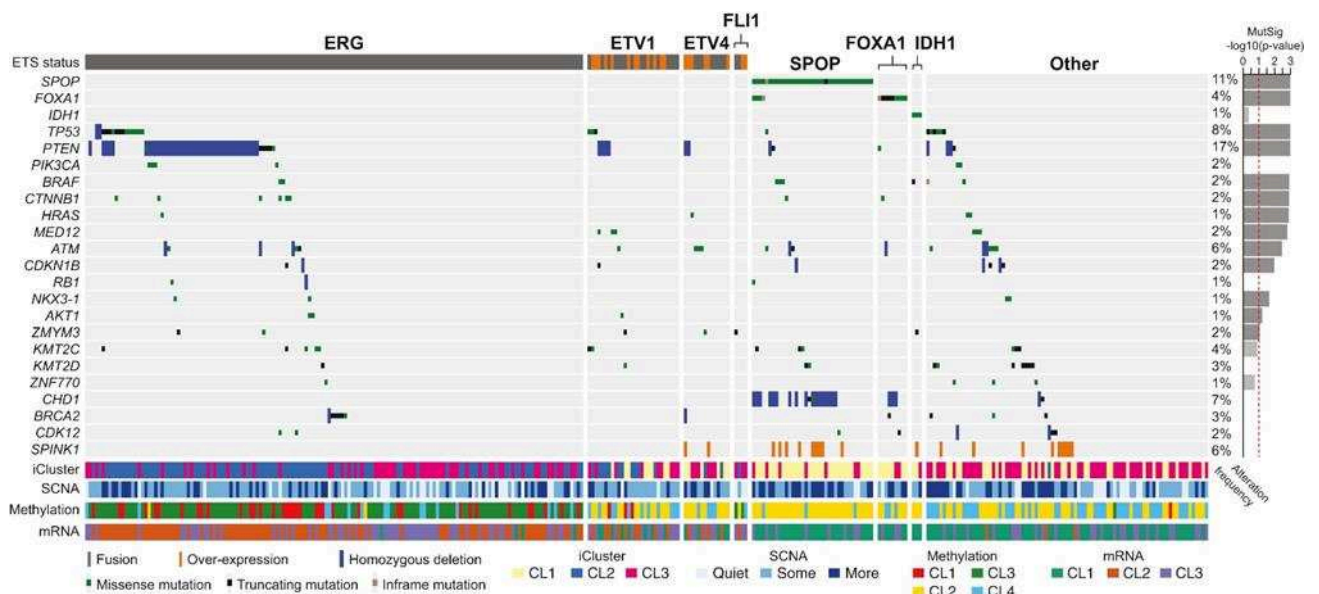
Le développement des technologies de séquençage a permis d'accroître les connaissances sur les anomalies génomiques du cancer de la prostate. Peu d'anomalies génétiques sont retrouvées de façon récurrente. Cependant, certaines altérations génomiques sont plus fréquemment retrouvées dans des gènes impliqués dans des voies de signalisation telles que PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), AKT, dans la régulation du cycle cellulaire ou le statut de la chromatine. Les anomalies récurrentes dans le cancer de la prostate sont majoritairement des mutations ou fusions de gènes de la voie des androgènes [Barbieri C. E. *et al.*, Eur Urol, 2013]. La classification moléculaire des cancers de la prostate peut être réalisée dans un premier temps en considérant deux groupes : les tumeurs primaires localisées de la prostate et les cancers de la prostate métastatiques et résistants à la castration. Dans ces deux groupes les altérations génomiques les plus communes sont les gènes de fusion comme par exemple *TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2)-ERG (ETS transcription factor)* qui est présent dans environ 50 % de l'ensemble des cancers de la prostate [Cancer Genome Atlas Research Network, Cell, 2015 ; Humphrey P. A. *et al.*, Eur Urol, 2016]. Les cancers de la prostate localisés peuvent être majoritairement classés selon sept sous types moléculaires comprenant les gènes de fusion impliquant *ERG* (46 %), *ETV1 (ETS variant 1)* (8 %), *ETV4* (4 %), *Fli1* (1 %) et les mutations dans les gènes *SPOP (speckle type BTB/POZ protein)* (11 %), *FOXA1 (forkhead box A1)* (3 %) et *IDH1 (isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1)* (1 %) (**Figure 12**). Ces anomalies moléculaires permettant d'établir les sept sous types moléculaires de cancer de la prostate sont mutuellement exclusives.



**Figure 12 : Classification moléculaire des tumeurs primaire de cancer de la prostate.**

Figure adaptée avec l'autorisation de Elsevier, Cell, [Cancer Genome Atlas Research Network, Cell, 2015], copyright 2015.

Au sein de ces sept sous-groupes, des anomalies moléculaires récurrentes sont détectées. Il s'agit majoritairement de mutations et de délétion (**Figure 13**).

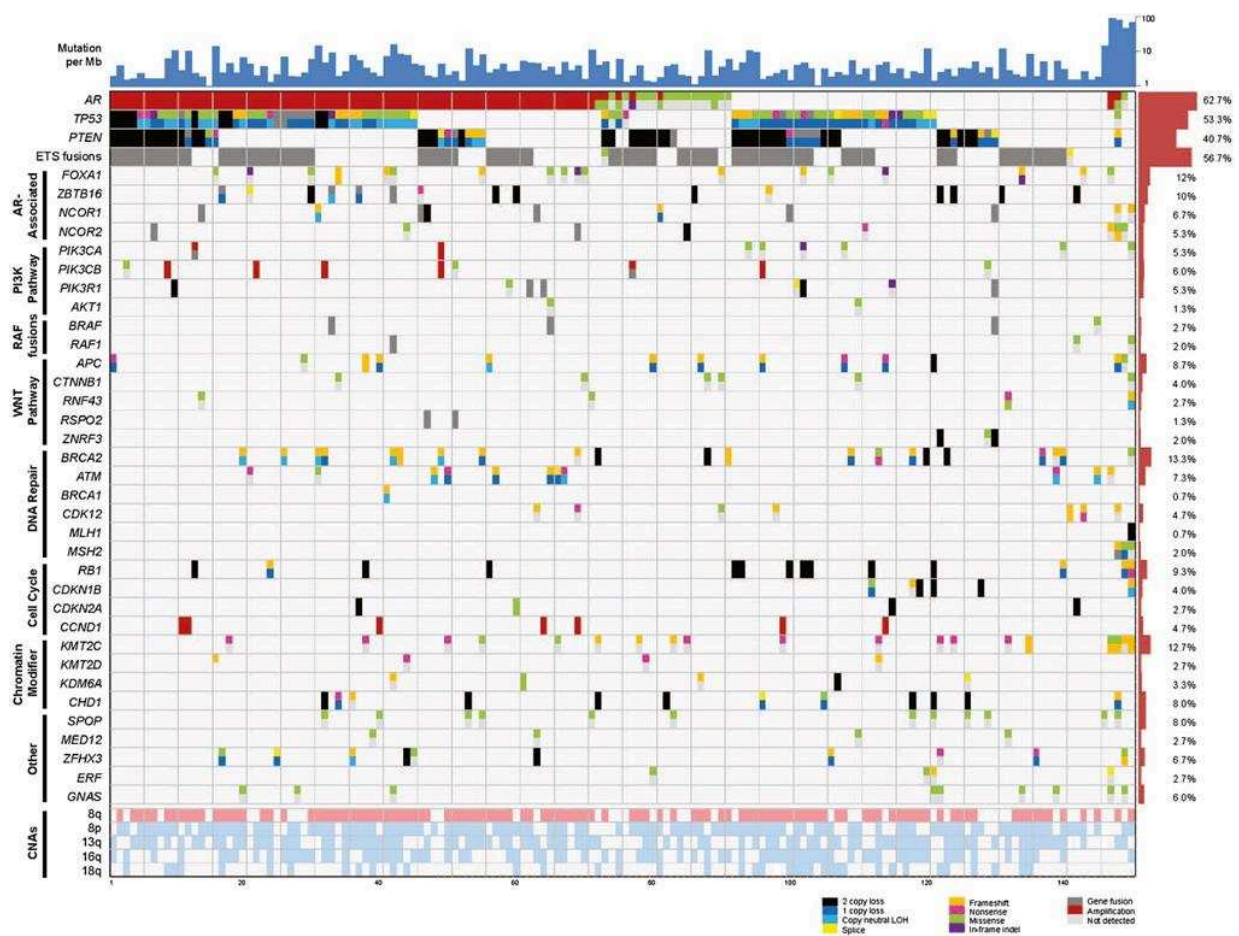


**Figure 13 : Fréquence et types d'anomalies récurrentes de tumeurs primaires de cancer de la prostate.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Elsevier, Cell, [Robinson D. *et al.*, Cell, 2015], copyright 2015.

Les gènes les plus fréquemment mutés dans les tumeurs primaires sont *SPOP*, *TP53* (*tumor protein 53*), *FOXA1*, *PTEN*. D'autres mutations sont retrouvées à des fréquences plus faibles dans *BRAF*, *HRAS*, *AKT*, dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN comme *ATM*, des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le remodelage de la chromatine comme *KMT2C*, *KMT2D* [Cancer Genome Atlas Research Network, Cell, 2015].

Les tumeurs primaires de cancers de la prostate présentent une charge mutationnelle moins élevée que les cancers de la prostate métastatiques et résistants à la castration, 0,94 mutations par mégabase *versus* 4,4 mutations par mégabase respectivement [Cancer Genome Atlas Research Network, Cell, 2015 ; Robinson D. *et al.*, Cell, 2015]. Robinson *et al.* rapportent une étude portant sur le séquençage d'exome et de transcriptome de biopsies tumorales d'une cohorte de 150 patients atteints de cancers de la prostate métastatiques et résistants à la castration (mCRPC, *metastatic castration resistant prostate cancer*) [Robinson D. *et al.*, Cell, 2015]. Les résultats ont permis aux auteurs d'établir une représentation des aberrations génomiques des mCRPC (**Figure 14**).



**Figure 14 : Représentation, fréquence et implication des anomalies génomiques dans les mCRPC.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Elsevier, Cell, [Cancer Genome Atlas Research Network, Cell, 2015], copyright 2015.



En comparaison aux cancers localisés de la prostate, les cancers métastatiques de la prostate et résistants à la castration présentent une augmentation des anomalies génétiques dans les gènes impliqués dans la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes ainsi que dans le gène *TP53*. De plus, cette étude a permis d'identifier de nouvelles altérations génomiques dans les gènes *R-spondin*, *β--caténine*, *ZBTB16* (*zinc finger and BTB domain containing 16*) qui sont impliqués dans la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes. Les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN comme *BRCA1*, *BRCA2* et *ATM* sont également plus fréquemment mutés dans les mCRPC que dans les tumeurs prostatiques primaires. Enfin, des mutations dans les gènes *MLH1* et *MSH2* impliqués dans les voies de réparation de l'ADN ont été détectées chez trois patients parmi quatre présentant une charge mutationnelle élevée aux alentours de 50 mutations par mégabase. Les mutations de ces deux gènes de la réparation pourraient être responsables du fait que ces trois patients présentent une charge mutationnelle très élevée [Robinson D. *et al.*, *Cell*, 2015]. L'ensemble de ces études récentes de séquençage de l'ADN et de l'ARN à haut débit ont permis d'établir les premières classifications moléculaires du cancer de la prostate, de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'oncogenèse de ce cancer ainsi que la découverte de cibles thérapeutiques potentielles. Cependant, ces classifications ne sont actuellement pas utilisées cliniquement en routine mais cela pourrait le devenir dans le futur et être intégrées par l'OMS [Humphrey P. A. *et al.*, *Eur Urol*, 2016].

### 3) Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer de la prostate dépend du stade clinique de la maladie au moment du diagnostic. La prise en charge thérapeutique varie si la maladie est localisée à la prostate au moment du diagnostic ou si la maladie est d'emblée métastatique. Pour les patients avec une tumeur de la prostate localisée, les traitements varient en fonction de la classification de la tumeur en bas risque, risque intermédiaire et haut risque (**Tableau 5**).

Selon le guide des pratiques cliniques paru en 2015 [Parker C. *et al.*, *Ann Oncol*, 2015], il n'y a pas de consensus concernant l'attitude thérapeutique optimale à suivre. Les patients doivent avoir conscience des avantages et inconvénients de chaque possibilité thérapeutique et doivent être conseillés par les cliniciens sur les effets secondaires des traitements du cancer de la prostate notamment les troubles au niveau sexuel, l'infertilité ainsi que les troubles urinaires et intestinaux. Pour les patients avec une tumeur localisée de risque bas ou intermédiaire pour lesquels un traitement curatif n'est pas préconisé ou bien pas souhaité par le patient lui-même, il est possible d'attendre la progression de la maladie en réalisant un suivi régulier. Cette surveillance active est réalisée par un dosage du PSA, des biopsies répétées de la prostate afin de pouvoir réaliser un traitement curatif en cas de progression [Suardi N. *et*



*al.*, Cancer, 2008]. Les traitements curatifs consistent soit à la prostatectomie totale, soit à la radiothérapie externe ou soit à la curiethérapie (ou brachythérapie). Ces thérapies peuvent être employées en monothérapie chez les patients avec une tumeur localisée de risque bas ou intermédiaire. En revanche pour les tumeurs localisées ou les maladies localement avancées, il est recommandé de réaliser une hormonothérapie néoadjuvante puis une radiothérapie et enfin une hormonothérapie adjuvante ou bien une prostatectomie radicale associée à une lymphadénectomie pelvienne. Dans le cas où le patient est métastatique d'emblée avec une maladie androgéno-dépendante, il est recommandé de faire une première ligne thérapeutique par une thérapie de privation des androgènes. Des études cliniques de phase 3 montrent l'intérêt d'ajouter le docétaxel au traitement hormonal [Gravis G. *et al.*, Lancet Oncol, 2013 ; James N. D. *et al.*, ASCO Annual Meeting, 2015 ; Sweeney C. *et al.*, ASCO Annual Meeting 2014].

Localised disease	
Low risk	Active surveillance Brachytherapy Radical prostatectomy Radical radiotherapy
Intermediate risk	Active surveillance Brachytherapy Radical prostatectomy Radical radiotherapy ± neoadjuvant ADT
High risk	Neoadjuvant ADT + radical radiotherapy + adjuvant ADT Radical prostatectomy + pelvic lymphadenectomy
Locally advanced disease	
	Neoadjuvant ADT + radical radiotherapy + adjuvant ADT Radical prostatectomy + pelvic lymphadenectomy
Metastatic disease	
Hormone-naïve	ADT
Castration-resistant (first line)	Abiraterone Docetaxel Enzalutamide Radium-223 Sipuleucel-T
Second line (post-docetaxel)	Abiraterone Cabazitaxel Enzalutamide Radium-223
Options listed in alphabetical order. ADT, androgen deprivation therapy.	

**Tableau 5 : Stratégies thérapeutiques du cancer de la prostate en fonction du stade de la maladie.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press, Annals of Oncology, [Parker C. *et al.*, Ann Oncol, 2015], copyright 2015.

L'étude Stampede est une étude randomisée incluant 2962 patients avec pour but de mesurer l'OS (*overall survival*) dans les quatre bras de l'étude : hormonothérapie seule, hormonothérapie plus acide zolédronique, hormonothérapie plus docétaxel et hormonothérapie plus acide zolédronique plus docétaxel [James N. D. *et al.*, Lancet, 2016]. L'étude a montré que l'OS médiane était de 71 mois pour l'hormonothérapie seule, 81 mois pour le bras hormonothérapie plus docétaxel, 76 mois pour le bras hormonothérapie plus acide zolédronique plus docétaxel. Au vu des résultats et de l'augmentation de l'OS médiane en ajoutant le docétaxel à l'hormonothérapie, il est recommandé de suivre les résultats de cette étude lorsque les patients peuvent supporter le docétaxel avec l'hormonothérapie. Les résultats de cette étude bien que non publiés avaient déjà été adoptés dans le guide de pratique clinique de l'ESMO (*european society for medical oncology*) publié par Parker *et al.* en 2015. Lorsque la maladie évolue après hormonothérapie ou hormonothérapie plus docétaxel, la tumeur a acquis des mécanismes de résistance à la castration et devient indépendante des androgènes, le terme de cancers de la prostate métastatiques résistants à la castration est alors utilisé. Les options thérapeutiques de premières lignes chez des patients atteints de mCRPC sont les suivantes : acétate d'abiratérone qui est un inhibiteur de la biosynthèse des androgènes, docétaxel, enzalutamide qui est un inhibiteur du récepteur aux androgènes, radium-223, Sipuleucel-T (**Tableau 5**). L'abiratérone a montré son efficacité dans étude clinique de phase 3 (COU-AA-302) dans laquelle les 1088 patients naïfs de toute chimiothérapie ont été traités soit par abiratérone plus prednisone ou placebo plus prednisone. L'OS médiane était de 34,7 mois pour le groupe abiraterone plus prednisone *versus* 30,3 mois dans le groupe placebo plus prednisone [Ryan C. J. *et al.*, Lancet Oncol, 2015]. Cette étude a permis de montrer l'efficacité de l'abiratérone chez des patients naïfs de traitements par chimiothérapie. L'enzalutamide qui est un inhibiteur du récepteur aux androgènes a été testé dans une étude de phase 3, PREVAIL, incluant 1717 patients chimio naïfs traités soit par enzalutamide soit par un placebo. Le taux de PFS radiographique à 12 mois était de 65 % pour le groupe traité par enzalutamide *versus* 14 % pour le groupe placebo [Beer T. M. *et al.*, N Engl J Med, 2014]. Dans cet essai, l'enzalutamide permettait notamment de retarder le début d'une chimiothérapie, d'augmenter le temps de progression du niveau de PSA en comparaison au placebo. L'efficacité du Sipuleucel-T a été testée en le comparant à un placebo et a permis d'augmenter l'OS mais n'avait pas d'effet sur la PFS [Kantoff P. W. *et al.*, N Engl J Med, 2010]. Du fait de ces résultats et de l'aspect contraignant de la mise en place du traitement et de son coût, son utilisation reste limitée [Parker C. *et al.*, Ann Oncol, 2015]. Le radium-223, un inhibiteur d'ostéoclastes, a été testé en comparaison à un placebo incluant 921 patients présentant des symptômes au niveau osseux. Le radium-223 a permis d'augmenter l'OS en comparaison au placebo 14,9 mois *versus* 11,3 mois. Une dernière option est le docetaxel qui a été testé dans une étude incluant 1006 patients et comparant le docetaxel avec la mitoxantrone. La survie médiane était de

16,5 mois dans le groupe contrôle *versus* 18,9 mois pour le groupe traités par docetaxel [Tannock I. F. *et al.*, *N Engl J Med*, 2004]. En accord avec les résultats obtenus, l'abiraterone et l'enzalutamide sont recommandés chez des patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie. Le radium-223 est indiqué chez les patients avec des symptômes au niveau osseux. Le docétaxel est indiqué pour l'ensemble des patients présentant un mCRPC en bon état général. Cependant lorsque la maladie progresse chez les patients atteints de mCRPC après une des premières lignes citées ci-dessus, le choix de la deuxième ligne thérapeutique est plus complexe car l'ordre optimal du choix des traitements n'est à ce jour pas déterminé. Des études ont testés l'efficacité du cabazitaxel, de l'abiraterone et de l'enzalutamide chez des patients ayant déjà reçu du docétaxel [de Bono J. S. *et al.*, *N Engl J Med*, 2011 ; de Bono J. S. *et al.*, *Lancet*, 2010 ; Scher H. I. *et al.*, *N Engl J Med*, 2012]. L'étude TROPIC, incluant 755 patients a montré la supériorité du cabazitaxel en comparaison à la mitoxantrone chez des patients atteints de mCRPC après traitement par le docétaxel. La survie médiane était 15,1 mois dans le groupe docétaxel *versus* 12,7 mois dans le bras contrôle et la PFS était de 2,8 mois *versus* 1,4 mois respectivement dans le groupe cabazitaxel et dans le groupe contrôle [de Bono J. S. *et al.*, *Lancet*, 2010]. L'étude incluant 1195 patients ayant déjà reçu du docétaxel et comparant l'abiraterone à un placebo a montré que la PFS (5,6 mois *versus* 3,6 mois) et l'OS (14,8 mois *versus* 10,9 mois) étaient augmentées chez les patients ayant reçu l'abiraterone par rapport à ceux ayant reçu le placebo [de Bono J. S. *et al.*, *N Engl J Med*, 2011]. Enfin l'étude comparant l'enzalutamide à un placebo chez des patients atteints de mCRPC ayant reçu du docétaxel a montré la supériorité de l'enzalutamide par rapport au placebo en termes d'OS médiane, respectivement 18,4 mois pour l'enzalutamide *versus* 13,6 mois dans le groupe contrôle. Les résultats de ces trois études ont donc permis la recommandation de ces trois molécules chez des patients ayant reçu du docetaxel au préalable [Parker C. *et al.*, *Ann Oncol*, 2015].

L'étude de phase 3, LatITUDE, publiée dans *New England Journal of Medicine* en 2017 a évalué le bénéfice clinique de l'abiraterone dès le diagnostic chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique sensible à la castration [Fizazi K. *et al.*, *N Engl J Med*, 2017]. Les 1199 patients inclus dans cette étude ont été traités soit par abiraterone plus par une privation androgénique plus prednisone soit par deux placebo plus par une privation androgénique plus prednisone. Après 30,4 mois de suivi l'OS médiane était supérieure pour le groupe traité par abiraterone, pas atteinte, comparé au groupe contrôle, 34,7 mois. La PFS radiographique était de 33 mois pour le groupe traité par abiraterone *versus* 14,8 mois pour le groupe contrôle. Ces données récentes pourraient donc changer rapidement la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer de la prostate hormono-sensibles métastatiques au diagnostic de la maladie et permettre de retarder l'émergence de la résistance à la castration ainsi que le recours à la chimiothérapie.

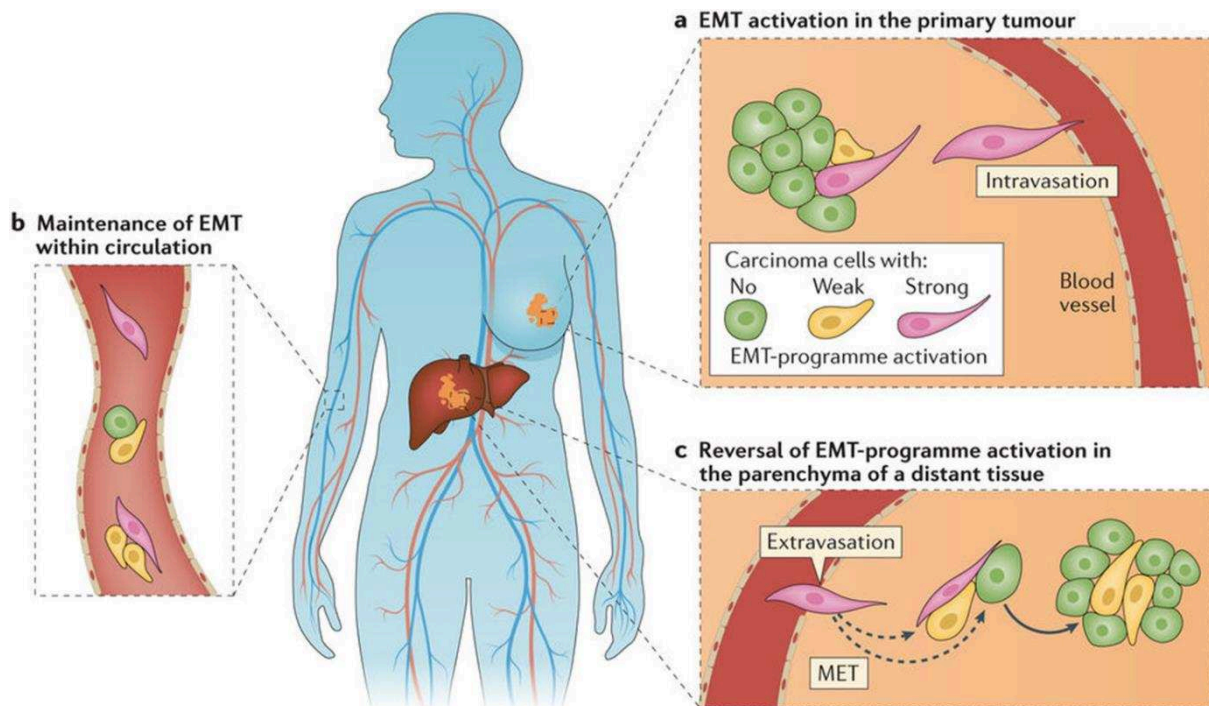
### III. Le processus métastatique

Chez les patients atteints de cancer, les décès liés au cancer lui-même sont majoritairement engendrés par la survenue de métastases, de leur croissance et de leur capacité à échapper au traitement. Malgré ce constat, le processus métastatique est très inefficace. En effet des études montrent que seulement 0,01 % des CTC auraient la capacité de se développer dans un organe différent de celui d'origine [Chambers A. F. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2002]. Il a été montré que seulement 50 % des patientes atteintes de cancer du sein avec la présence de cellules tumorales disséminées (DTC, *disseminated tumor cells*) dans la moelle osseuse développent des métastases [Braun S. *et al.*, N Engl J Med, 2005]. Cette étude clinique conforte des résultats expérimentaux antérieurs sur l'injection orthotopique ou ectopique (sous cutanée dans de nombreux cas) de lignées cellulaires tumorales murines ou humaines dans des modèles murins [Cameron M. D. *et al.*, Cancer Res, 2000 ; Luzzi K. J. *et al.*, Am J Pathol, 1998]. Luzzi *et al.* ont montré, que 87% des cellules de mélanome murine B16F1 injectées par voie intraveineuse étaient retrouvées dans le foie des animaux 90 minutes après l'injection [Luzzi K. J. *et al.*, Am J Pathol, 1998]. Les 13 % de cellules restantes n'étaient pas localisables ou déjà mortes. Trois jours après l'injection, 83 % des cellules injectées ayant extravasées dans le parenchyme hépatique étaient toujours présentes mais seulement 2 % des cellules injectées avaient formées des micro-métastases. De plus, seulement une partie de ces micro-métastases se sont développées et ont été létales pour les animaux. Les auteurs estimaient ainsi que seulement 0,02 % des cellules avaient cette capacité de cellules initiateuses de tumeur (TIC, *tumor initiating cells*) [Luzzi K. J. *et al.*, Am J Pathol, 1998]. Cameron *et al.* sont arrivés aux mêmes conclusion en injectant des cellules murines de mélanome B16F10 et en étudiant leur capacité à développer des métastases pulmonaires [Cameron M. D. *et al.*, Cancer Res, 2000]. Bien que ne reflétant pas la réalité du processus métastatique chez les patients, ces études démontrent que les étapes de circulation dans le sang, d'adhérence aux vaisseaux au sein d'un nouvel organe ainsi que l'extravasation sont des étapes efficaces alors que les étapes d'initiation de micro-métastases et de développement de ces dernières sont plus inefficaces. Cette inefficacité des étapes tardives du processus métastatique montrent la rareté des cellules initiateuses de métastases (MIC, *metastasis initiating cells*) [Massague J. *et al.*, Nature, 2016]. La survenue de métastases est un phénomène qui peut être long du fait de l'exigence du processus et de l'ensemble des propriétés requises par les cellules pour la formation de métastases. La survenue de récurrence chez des patients ayant eu un cancer et étant en rémission illustre bien le temps que prend ce processus ainsi que le phénomène de dormance des cellules tumorales.

## 1) Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le processus métastatique

La progression d'un cancer au stade métastatique implique plusieurs processus biologiques dont la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) initialement étudiée dans la morphogénèse embryonnaire. Lors du processus de TEM, les cellules épithéliales vont perdre leur cohésion et moduler leur polarité en modifiant leur cytosquelette. Elles vont devenir mobiles et acquérir des propriétés de cellules mésenchymateuses. Ce processus est contrôlé par des signaux émis par les cellules du microenvironnement et est dirigé par des facteurs de transcription comme Snail (*snail family transcriptional repressor 1*), Twist (*twist family bHLH transcription factor*) et Zeb (*zinc finger E-box binding homeobox*) [Morel A. P. *et al.*, PLoS Genet, 2012 ; Puisieux A. *et al.*, Nat Cell Biol, 2014]. Ces facteurs entraînent une modification de l'état de condensation de l'ADN (méthylation), des modifications post-traductionnelles et des changements d'expression génique. L'implication de la TEM dans le processus métastatique a été longtemps controversée dans la mesure où des études ont montré que la survenue de métastases ne requérait pas obligatoirement la TEM mais que cette transition favorisait la résistance aux chimiothérapies [Fischer K. R. *et al.*, Nature, 2015 ; Zheng X. *et al.*, Nature, 2015]. Cette résistance aux chimiothérapies peut notamment s'expliquer par le fait que l'expression de facteurs de transcription associés à la TEM inhibe les voies des suppresseurs de tumeurs comme p53 et Rb [Ansieau S. *et al.*, Cancer Cell, 2008 ; Morel A. P. *et al.*, PLoS Genet, 2012 ; Valsesia-Wittmann S. *et al.*, Cancer Cell, 2004]. Malgré les débats sur l'implication de la TEM dans le processus métastatique, la surexpression de facteurs de transcription associés à la TEM a pu être observée au niveau de zones d'invasion dans le cancer colorectal et était associé à une diminution de la survie [Spaderna S. *et al.*, Gastroenterology, 2006]. Yu *et al.* ont également montré l'expression de facteurs de transcription de la TEM dans des cellules tumorales circulantes (CTC) de patientes atteintes de cancer du sein [Yu H. A. *et al.*, Clin Cancer Res, 2013]. L'expression du facteur de transcription Twist-1 favorise la formation d'invadopodes, qui sont des structures spécialisées dans l'invasion et provenant du réarrangement du cytosquelette d'actine, au niveau desquels se trouve en grande quantité une métalloprotéinase de la matrice extracellulaire (MMP), la MT1-MMP (*membrane-type matrix metalloproteinase 1*), essentielle à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et à l'invasion des tissus par les cellules tumorales [Eckert M. A. *et al.*, Cancer Cell, 2011]. La TEM est associée à l'acquisition de propriétés de cellules souches cancéreuses (CSC) [Mani S. A. *et al.*, Cell, 2008]. Les caractéristiques de CSC et leur importance dans le processus métastatique sont présentées dans la section Introduction III-4). Ce processus de TEM est important dans les stades précoces du processus métastatique en permettant aux cellules cancéreuses d'intravaser dans les vaisseaux sanguins. Cependant l'importance de la TEM

dans la progression elle-même du cancer et son impact sur la survie des patients n'est pas encore complètement compris. La transition inverse, transition mésenchymo-épithéliale (TME) serait nécessaire pour l'extravasation des CTC et le développement de métastases dans un organe secondaire [De Craene B. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2013], comme décrit dans la section Introduction III-1)c. Globalement la TEM ainsi que la transition réverse sont des processus dynamiques et réversibles (**Figure 15**) qui reflètent la plasticité cellulaire des cellules tumorales [Nieto M. A. *et al.*, Cell, 2016].

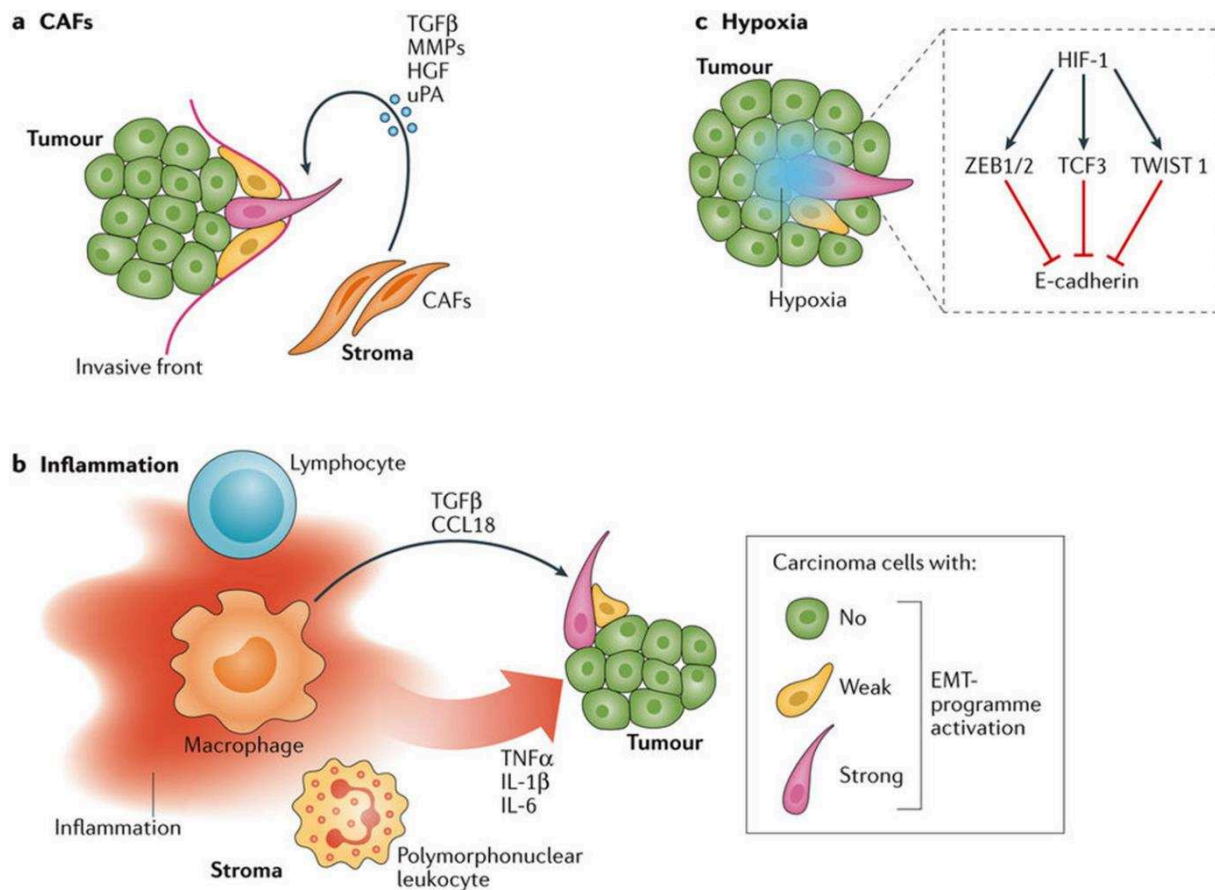


**Figure 15: Implication de la transition épithélio-mésenchymateuse et de la transition mésenchymo-épithéliale au cours du processus métastatique.**

a) Au sein de la tumeur primaire, la TEM est activée et permet aux cellules tumorales d'envahir les tissus environnants et d'entrer dans la circulation sanguine. b) Dans la circulation sanguine, les CTC peuvent avoir une activation variable du programme de la TEM. c) Lors de la colonisation d'un nouvel organe les cellules tumorales inverse ce processus par la TME.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Clinical Oncology, [Shibue T. *et al.*, Nat Rev Clin Oncol, 2017], copyright 2017.

L'importance de ces deux transitions inverses pour le développement de métastases nécessite que les cellules tumorales soient dotées d'une grande plasticité et soit capables de changer rapidement de phénotype au cours du processus métastatique. Ces changements rapides de phénotype n'impliquent pas uniquement la plasticité des cellules tumorales mais également le rôle du microenvironnement (**Figure 16**).



**Figure 16 : Rôle du microenvironnement tumoral dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse.**

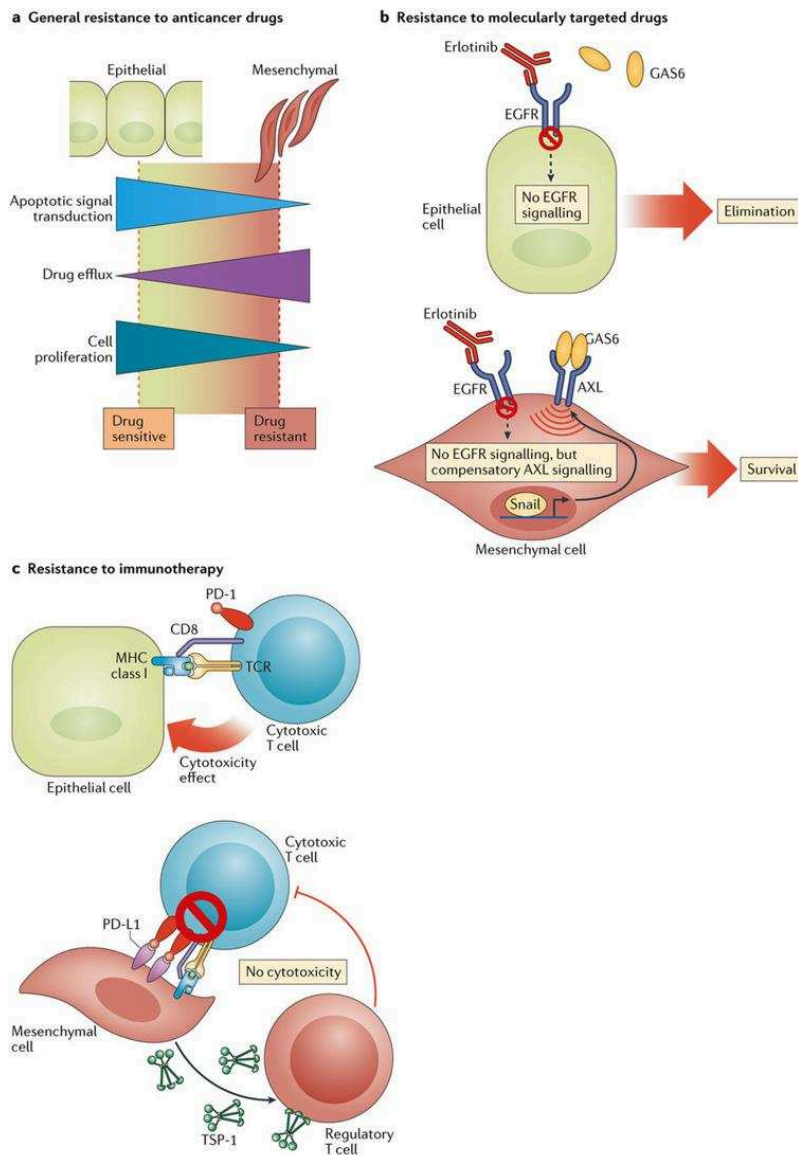
a) Les fibroblastes associés au cancer sont souvent observés au niveau du front invasif des tumeurs et ils sécrètent des facteurs pro-EMT pour les cellules tumorales. b) L'inflammation présente au niveau des tumeurs entraîne une sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules immunitaires induisant la TEM des cellules tumorales. c) L'hypoxie générée au centre de la tumeur va induire l'expression de HIF-1 favorisant l'expression de facteurs de transcription tels que ZEB1/2, TCF3 et TWIST1 qui sont majeurs dans le déclenchement de l'EMT.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Clinical Oncology, [Shibue T. *et al.*, Nat Rev Clin Oncol, 2017], copyright 2017.

Des études sur les fibroblastes associés au cancer (CAF, *cancer associated fibroblasts*) montrent leur rôle important dans la progression tumorale. Ils sont retrouvés de manière abondante dans les carcinomes de haut grade ainsi que dans les zones d'inflammation [Kalluri R. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2006 ; Mueller M. M. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2004 ; Ohlund D. *et al.*, J Exp Med, 2014]. Deux études ont montré que l'injection, *in vivo* chez des souris immunodéprimées, de cellules issues d'hyperplasie bénigne de prostate avec des CAF obtenus à partir d'une tumeur maligne de prostate permettait le développement d'une tumeur chez la souris alors que l'injection des cellules d'hyperplasie bénigne de

prostate avec des fibroblastes, du même patient que précédemment, prélevés dans une zone non tumorale ne permettait pas le développement tumoral chez les souris [Hayward S. W. *et al.*, *Cancer Res*, 2001 ; Olumi A. F. *et al.*, *Cancer Res*, 1999]. De plus, ces deux études montraient que les cellules hyperplasiques ayant donné naissance aux tumeurs *in vivo* avaient une expression réduite de E-cadhérine et une acquisition de marqueurs mésenchymateux soutenant le rôle des CAF dans la promotion de la TEM et dans l'augmentation du potentiel tumorigénique. L'importance de l'inflammation et le rôle des cytokines pro-inflammatoires dans l'activation de la TEM a également été montré dans les cancers du sein et du colon [Li Y. *et al.*, *Mol Cancer*, 2012 ; Sullivan N. J. *et al.*, *Oncogene*, 2009]. La sécrétion de chimiokines par les macrophages associés aux tumeurs (TAM, *tumor associated macrophages*) favorise la TEM de la lignée cellulaire de cancer du sein MCF7 [Su S. *et al.*, *Cancer Cell*, 2014]. D'un point de vue clinique, il a été rapporté que l'abondance de TAM était un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du poumon, du sein, de la prostate et de l'ovaire [Noy R. *et al.*, *Immunity*, 2014]. Enfin il a été montré dans le cancer du rein que l'activation constitutive de HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) induisait la répression de la E-cadhérine en activant l'expression des facteurs de transcription pro-EMT ZEB1/2 (*zinc finger E-box binding homeobox*), TCF3 (*transcription factor 3*) et TWIST1. L'expression de facteurs de la TEM et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux favorise la résistance aux thérapies par plusieurs mécanismes (**Figure 17**).





**Figure 17 : Mécanismes de résistance thérapeutique induits par la transition épithélio-mésenchymateuse**

a) L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux favorise la résistance aux chimiothérapies par la régulation négatives des voies de signalisation pro-apoptotiques, l'augmentation d'expression des transporteurs ABC responsables de l'efflux des drogues et par le ralentissement de leur prolifération. b) La résistance aux thérapies ciblées, comme les inhibiteurs de EGFR, peut en partie s'expliquer dans les cellules mésenchymateuses par la mise en place d'une voie de signalisation alterne à EGFR impliquant la signalisation par le récepteur AXL. c) La résistance aux immunothérapies dans les cellules mésenchymateuses s'expliquerait par l'augmentation d'expression de PD-L1 et de sa liaison à son récepteur PD-1 sur les lymphocytes T cytotoxiques diminuant ainsi leur fonction. Cette liaison PD-L1/PD-1 favorise la sécrétion de thrombospondine 1 (TSP-1) par les cellules tumorales et engendre l'immunosuppression des lymphocytes T cytotoxiques par les lymphocytes T régulateurs.

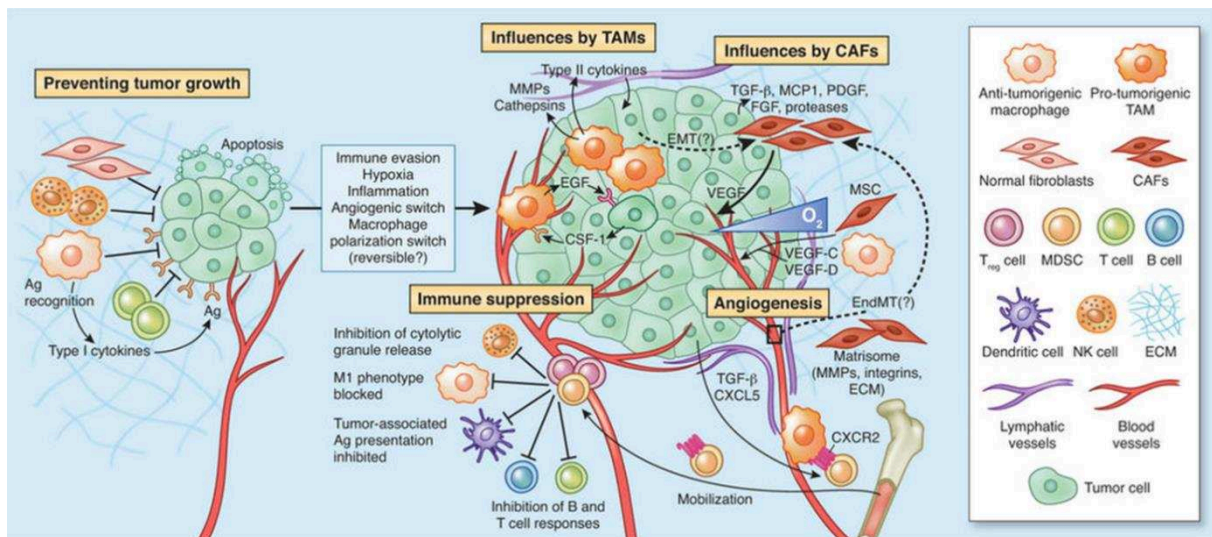
Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Clinical Oncology, [Shibue T. *et al.*, Nat Rev Clin Oncol, 2017], copyright 2017.

Lors de traitements par chimiothérapie, les cellules tumorales peuvent acquérir un phénotype mésenchymateux favorisant la régulation négative des voies de signalisation pro-apoptotique [Wu D. W. *et al.*, *Oncogene*, 2015 ; Wu W. S. *et al.*, *Cell*, 2005], ou au contraire la surexpression des voies anti-apoptotiques [Escriva M. *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2008 ; Vega S. *et al.*, *Genes Dev*, 2004] ou des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) responsables de l'efflux des drogues [Saxena M. *et al.*, *Cell Death Dis*, 2011]. La TEM peut également induire la résistance aux thérapies ciblées, inhibiteurs d'EGFR ou de PI3K, par l'expression du récepteur AXL comme voie alterne dans les CBNPC [Sequist L. V. *et al.*, *Sci Transl Med*, 2011 ; Zhang Z. *et al.*, *Nat Genet*, 2012]. Byers LA. *et al.* ont pu mettre en évidence une signature basée sur l'expression de 76 gènes de l'EMT concordante et prédictive de la résistance à ces inhibiteurs de tyrosine kinase [Byers L. A. *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2013]. L'expression de Snail et de ZEB1 peut contribuer à la sécrétion de thrombospondine 1 favorisant ainsi l'immunosuppression des lymphocytes T cytotoxiques par les lymphocytes T régulateurs [Chen Z. *et al.*, *Nat Rev Cancer*, 2014 ; Kudo-Saito C. *et al.*, *Cancer Cell*, 2009].

## 2) Les étapes du processus métastatique

### a. Prolifération et invasion

Les premières étapes du processus métastatique requièrent dans un premier temps une prolifération des cellules tumorales au sein de la tumeur primaire. La croissance tumorale s'accompagne de l'activation du programme de la TEM impliquant la perte d'expression de protéines impliquées dans les jonctions cellules-cellules que sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions gap, et la réorganisation du cytosquelette et la perte de polarité des cellules tumorales. Ces remaniements entraînent le détachement des cellules tumorales du tissu épithélial et de la membrane basale qui les soutenaient [Shibue T. *et al.*, *Nat Rev Clin Oncol*, 2017]. La TEM permet aux cellules tumorales d'acquérir des capacités de migration et d'invasion notamment par la sécrétion de métalloprotéases telles que les MMP, la cathepsine K, l'activateur du plasminogène (uPA). Ces protéines vont intervenir dans la dégradation de la MEC et l'invasion du tissu sain environnant. Elles vont ainsi permettre la libération des facteurs de croissance présents dans la MEC dont les cellules tumorales vont bénéficier afin de proliférer. La tumeur primaire n'est pas composée uniquement de cellules tumorales mais également de cellules stromales incluant des fibroblastes, des cellules endothéliales, des adipocytes et des cellules du système immunitaire, l'ensemble des cellules stromales et tumorales étant soutenues par la MEC (**Figure 18**).

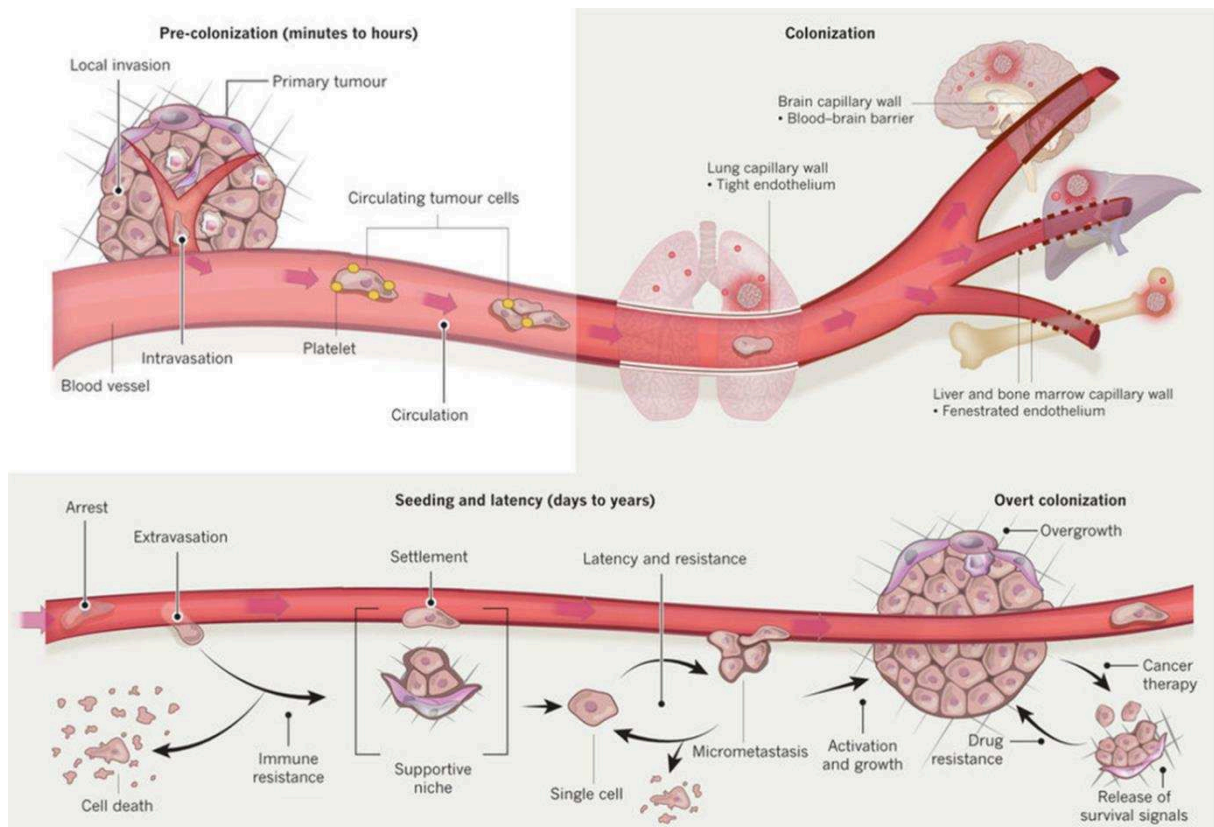


**Figure 18 : Rôles des cellules stromales dans la croissance de la tumeur primaire l'invasion et la néo-angiogenèse.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Medicine, [Quail D. F. *et al.*, Nat Med, 2013], copyright 2013.

Cette matrice et les cellules stromales forment le microenvironnement tumoral. La progression tumorale ne résulte pas uniquement de la prolifération et de l'invasion des cellules tumorales mais d'un « dialogue » entre les cellules tumorales et les cellules stromales orchestré par les facteurs de la MEC. Les fibroblastes sont des cellules peu présentes dans la matrice extracellulaire des tissus sains normaux alors qu'ils représentent la majorité des cellules stromales dans le microenvironnement tumoral [Ronnov-Jessen L. *et al.*, Physiol Rev, 1996]. Les fibroblastes sont non seulement plus nombreux dans le tissu tumoral, mais leur fonction est aussi modifiée. Le dialogue entre les cellules tumorales et les fibroblastes conduit à la sécrétion de facteurs de croissance comme le TGFβ (*transforming growth factor β*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le FGF (*fibroblast growth factor*) par les cellules tumorales qui vont permettre l'activation des fibroblastes. On parle alors de CAF [Kalluri R. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2006 ; Marsh T. *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2013]. Les CAF vont avoir un rôle pro-tumoral alors que les fibroblastes non activés ont un rôle supresseurs de métastases [Dumont N. *et al.*, Neoplasia, 2013]. Les CAF vont en retour modifier leur phénotype, acquérir des caractéristiques mésenchymateuses et produire des facteurs de croissance et des facteurs pro-inflammatoires bénéficiant aux cellules tumorales pour leur prolifération, le processus d'invasion ainsi que pour l'angiogenèse [Erez N. *et al.*, Cancer Cell, 2010 ; Fukumura D. *et al.*, Cell, 1998]. Les macrophages associés aux tumeurs peuvent également avoir un rôle facilitateur de la croissance tumorale [Qian B. Z. *et al.*, Cell, 2010] en favorisant la migration et l'invasion des cellules tumorales [Condeelis J. *et al.*, Cell, 2006]. Les TAM représentent une source majeure de protéases favorisant

l'invasion et la résistance aux traitements [Gocheva V. *et al.*, Genes Dev, 2010 ; Joyce J. A. *et al.*, Cancer Cell, 2004 ; Shree T. *et al.*, Genes Dev, 2011]. Des cellules myéloïdes suppressives (MDSC, *myeloïd-derived suppressor cells*) sont présentes au sein des tumeurs au sein desquelles elles favorisent l'angiogenèse [Talmadge J. E. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2013]. En inhibant les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes [Gabrilovich D. I. *et al.*, Nat Rev Immunol, 2012], l'activation des cellules T [Gabrilovich D. I. *et al.*, J Immunol, 2001 ; Mazzoni A. *et al.*, J Immunol, 2002] et la cytotoxicité induite par les cellules *natural killer* (NK) [Liu C. *et al.*, Blood, 2007], les MDSC ont aussi un rôle dans l'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire. De plus, la croissance tumorale génère un processus inflammatoire consistant en la prolifération des cellules immunitaires productrices de cytokines qui vont favoriser l'angiogenèse et *in fine* la prolifération tumorale. En grossissant, la tumeur va devenir hypoxique en son centre et sécréter des facteurs pro-angiogéniques comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). L'ensemble des facteurs pro-angiogéniques produits par les cellules tumorales elles-mêmes ainsi que par les cellules du microenvironnement tumoral vont former un gradient décroissant du centre de la tumeur jusqu'à la périphérie. Ce gradient de concentration de facteurs pro-angiogéniques vers les vaisseaux sanguins les plus proches va attirer les cellules endothéliales vers le centre de la tumeur et permettre le développement d'un réseau vasculaire tortueux et poreux au sein de la tumeur [Folkman J., N Engl J Med, 1971]. C'est le processus d'angiogenèse tumorale ou néo-angiogenèse. Les vaisseaux nouvellement formés sont imparfaits et leur architecture est lâche et anarchique. Ils présentent une membrane basale fragmentée et donc une perméabilité importante permettant l'intravasation des cellules tumorales dans ces néo-vaisseaux et ainsi que la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine (**Figure 19**).



**Figure 19 : Les étapes clés du processus métastatique.**

Ce processus comprend la prolifération tumorale ainsi que l'invasion locale des tissus environnants. Les néo-vaisseaux générés permettent l'apport des nutriments et d'oxygène à la tumeur et également l'intravasation des cellules cancéreuses dans ces vaisseaux. Les cellules tumorales vont ensuite circuler dans la circulation sanguine soit sous forme de cellules isolées soit sous forme de clusters. Elles peuvent également être associées à des plaquettes, des fibroblastes afin de diminuer les contraintes physiques liées à la circulation sanguine et échapper à la surveillance du système immunitaire. Les CTC se fixent ensuite à la paroi d'un vaisseau au sein d'un nouvel organe soit du fait de contraintes anatomiques en se retrouvant bloquées dans un capillaire, soit du fait d'un tropisme de cellules tumorales pour un organe spécifique. Les cellules tumorales vont ensuite sortir du vaisseau sanguin et coloniser le nouvel organe. Le développement de métastases peut être long (dormance tumorale) et nécessite des facteurs favorisant la croissance tumorale.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature, [Massague J. *et al.*, Nature, 2016], copyright 2016.

### **b. Intravasation et circulation sanguine**

Une fois dans la circulation sanguine les CTC vont subir les contraintes physiques et biologiques de la circulation sanguine à savoir les chocs, les forces de stress, le pH, les risques d'élimination par le système immunitaire. Durant cette période de transit, les CTC ont une demi-vie très courte de l'ordre de quelques heures [Meng S. *et al.*, Clin Cancer Res, 2004] ce qui suggère que ces cellules doivent avoir la capacité d'adhérer à la paroi d'un vaisseau sanguin et d'extravaser très rapidement pour échapper à

la mort cellulaire. Les CTC peuvent circuler soit en forme de cellules isolées ou soit sous forme de groupe de cellules appelés *clusters*. Ces derniers auraient des capacités de MIC plus élevées que les CTC isolées du fait d'une meilleure résistance à l'apoptose, aux contraintes physiques et à la surveillance immunitaire [Aceto N. *et al.*, Cell, 2014 ; Aceto N. *et al.*, Trends Cancer, 2015]. Pour survivre dans la circulation sanguine les CTC doivent être capable de surmonter le phénomène d'anoïkis, qui est une forme d'apoptose déclenchée lorsque les cellules se détachent de la membrane basale et s'individualisent. Afin de surmonter ces obstacles, les cellules tumorales peuvent se protéger en s'associant avec des plaquettes, des fibroblastes ou des neutrophiles [Lambert A. W. *et al.*, Cell, 2017]. L'association de plaquettes à la surface des CTC favorise leur survie et augmente leur chance de former des métastases [Gay L. J. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2011 ; Labelle M. *et al.*, Cancer Cell, 2011]. Cette association bénéfique aux cellules tumorales peut s'expliquer par le fait que les plaquettes sécrètent des facteurs comme le TGF- $\beta$  et le PDGF qui inhibent les cellules NK [Labelle M. *et al.*, Cancer Discov, 2012], mais aussi par le fait que les plaquettes forment une protection physique contre les NK en enveloppant les cellules tumorales de fibrinogène [Palumbo J. S. *et al.*, Blood, 2007 ; Palumbo J. S. *et al.*, Blood, 2005]. Les neutrophiles peuvent avoir un rôle d'immunosuppression des lymphocytes T CD8+ [Coffelt S. B. *et al.*, Nature, 2015] et des cellules NK [Spiegel A. *et al.*, Cancer Discov, 2016] et un effet pro-métastatique par la sécrétion de MMP favorisant l'extravasation des CTC [Labelle M. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2014 ; Spiegel A. *et al.*, Cancer Discov, 2016].

### c. Extravasation et développement de métastases

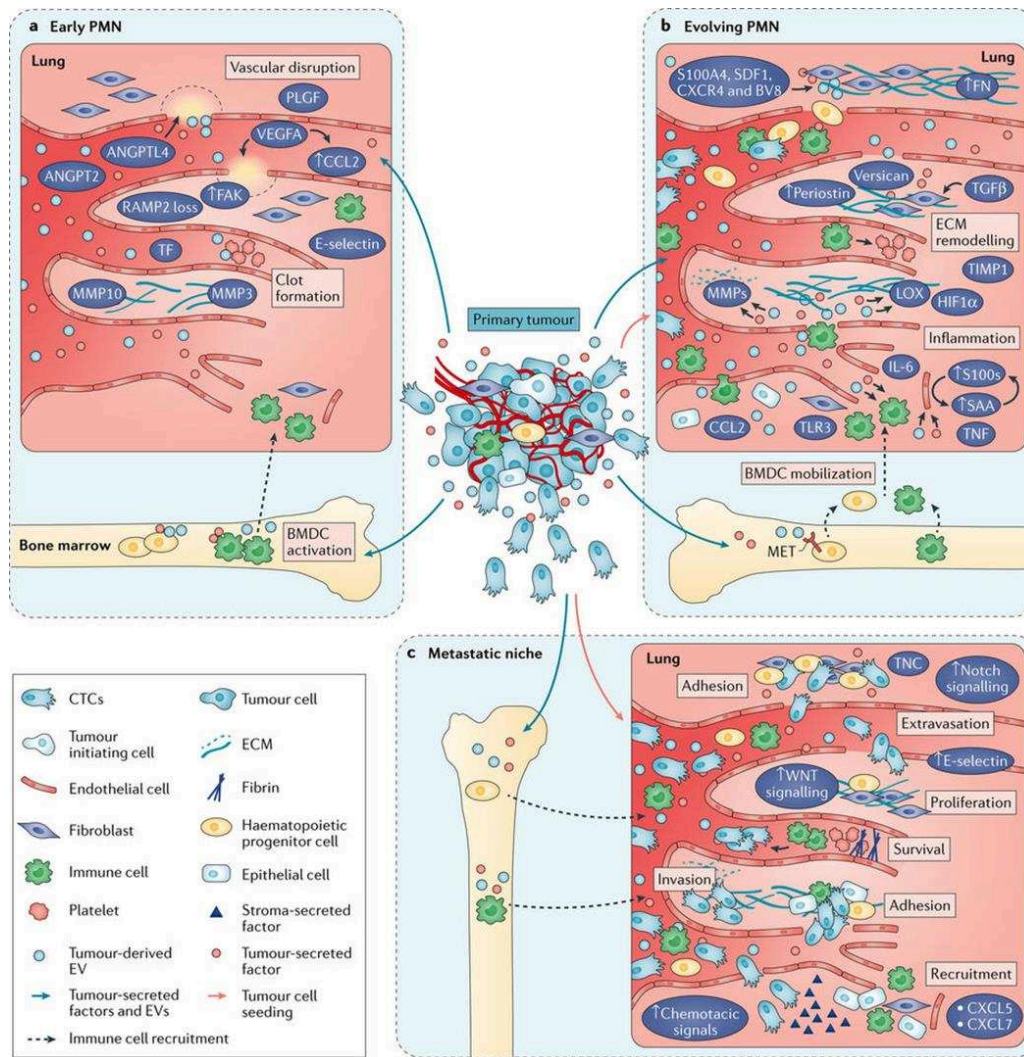
Lors de leur transit dans le sang, les CTC peuvent se fixer à la paroi d'un vaisseau au sein d'un nouvel organe soit en raison de contraintes anatomiques dans un capillaire, soit en raison de leur tropisme pour un organe spécifique. Les cellules tumorales vont ensuite extravaser et coloniser le nouvel organe. Des cellules immunitaires telles que les monocytes peuvent être recrutées par les cellules tumorales en réponse à la sécrétion de CCL2 et favoriser l'extravasation et le développement de métastases dans les poumons [Qian B. Z. *et al.*, Nature, 2011 ; Wolf M. J. *et al.*, Cancer Cell, 2012]. En miroir de la TEM, la transition inverse, TME, semble nécessaire à l'extravasation et au développement de métastases [De Craene B. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2013]. Cette transition peut expliquer pourquoi le phénotype des métastases reflète celui de la tumeur primaire. La TME comme la TEM serait un processus dynamique contrôlé par des protéines telles que GRHL2 (*grainy head-like protein 2 homolog*), ELF3/ELF5 (*E74-like factor 3/5*) ou des micro-ARN tels que miR-200, miR-3 [De Craene B. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2013 ; Ocana O. H. *et al.*, Cancer Cell, 2012]. Suite à l'extravasation des CTC dans un nouvel organe, les cellules « survivantes » doivent s'adapter à ce nouvel environnement avant de former des micro- puis des macro-métastases. Cependant, comme décrit dans la section Introduction III, une très faible

proportion de cellules ont cette capacité et vont donner naissance à des métastases. L'arrivée des cellules tumorales dans un nouvel organe va généralement être suivie par l'entrée des cellules cancéreuses dans un état de dormance, phénomène qui sera détaillé dans la section Introduction III-3), qui correspond à un état de latence avec une absence de prolifération cellulaire.

### 3) La niche pré-métastatique et la dormance tumorale

Le développement de métastases dans un tissu donné n'est pas le fruit du hasard. Les CTC ne vont pas extravaser et s'intégrer dans le parenchyme d'un nouvel organe de façon passive. Ce processus est guidé par la niche pré-métastatique dont le développement est orchestré par la tumeur primaire avant la dissémination métastatique [Peinado H. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2017]. Cette théorie repose sur l'hypothèse émise en 1889 par Stephen Paget qui proposait que la survenue de métastases était dépendante des interactions entre les cellules tumorales (« *seed* ») et le microenvironnement de l'organe hôte (« *soil* ») [Paget S., The Lancet, 1889]. La théorie de Stephen Paget fut remise en cause en 1930 par James Ewing qui pensait que la dissémination métastatique était uniquement expliquée par les CTC relarguées par la tumeur primaire dans la circulation sanguine [Ewing J., Neoplastic Diseases, 1928]. Cette dernière hypothèse prédomina sur celle de Paget jusqu'à ce qu'Isaiah Fidler démontre dans les années 1970 que, bien que la dissémination de cellules tumorales dans la circulation sanguine ait un rôle important, le développement de métastases ne peut se produire que dans certains organes [Fidler I. J. *et al.*, J Natl Cancer Inst, 1976 ; Hart I. R. *et al.*, Cancer Res, 1980]. Ainsi Isaiah Fidler pointait du doigt le phénomène d'organotropisme des cellules tumorales vers un organe secondaire. Kaplan R. N. *et al.*, ont été les premiers à démontrer en 2005 que les tumeurs primaires étaient capables de relarguer dans la circulation sanguine des facteurs qui induisaient la formation dans un organe secondaire d'une niche pré-métastatique, indispensable à la survie et au développement des cellules tumorales [Kaplan R. N. *et al.*, Nature, 2005]. À la suite de cette étude pionnière, plusieurs travaux ont identifié les acteurs moléculaires et cellulaires responsables de la formation de la niche pré-métastatique (PMN, *pre-metastatic niche*) (**Figure 20**).





**Figure 20 : Étapes de la formation de la niche pré-métastatique et ses acteurs moléculaires et cellulaires.**

a) Établissement de la niche pré-métastatique. L'étape initiale de la formation de la PMN est la formation d'un caillot et la rupture de vaisseaux sanguins dans l'organe cible. Les facteurs sécrétés par la tumeur primaire, VEGF, ANGPTL4 (*angiopoietin-like 4*) favorisent la perméabilisation des vaisseaux sanguins. L'augmentation de la concentration de cytokines sécrétés par la tumeur et par les cellules stromales permet le recrutement de cellules de la moelle osseuse favorisant l'extravasation des cellules tumorales. L'accumulation des plaquettes génère des caillots induisant une inflammation locale et permet aux CTC de pouvoir s'accrocher plus facilement au niveau de cet organe. b) Évolution de la PMN. Un remodelage important de la MEC a lieu avec l'accumulation de fibronectine et de collagène permettant l'adhérence des cellules de la moelle osseuse. La sécrétion de MMP contribue à la dégradation des vaisseaux pour favoriser l'intravasation des cellules tumorales. c) Formation de la niche métastatique. L'ensemble des acteurs cellulaires et moléculaires ont été recrutés au niveau de l'organe secondaire afin de favoriser l'extravasation et le développement de métastases.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Cancer, [Peinado H. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2017], copyright 2017.

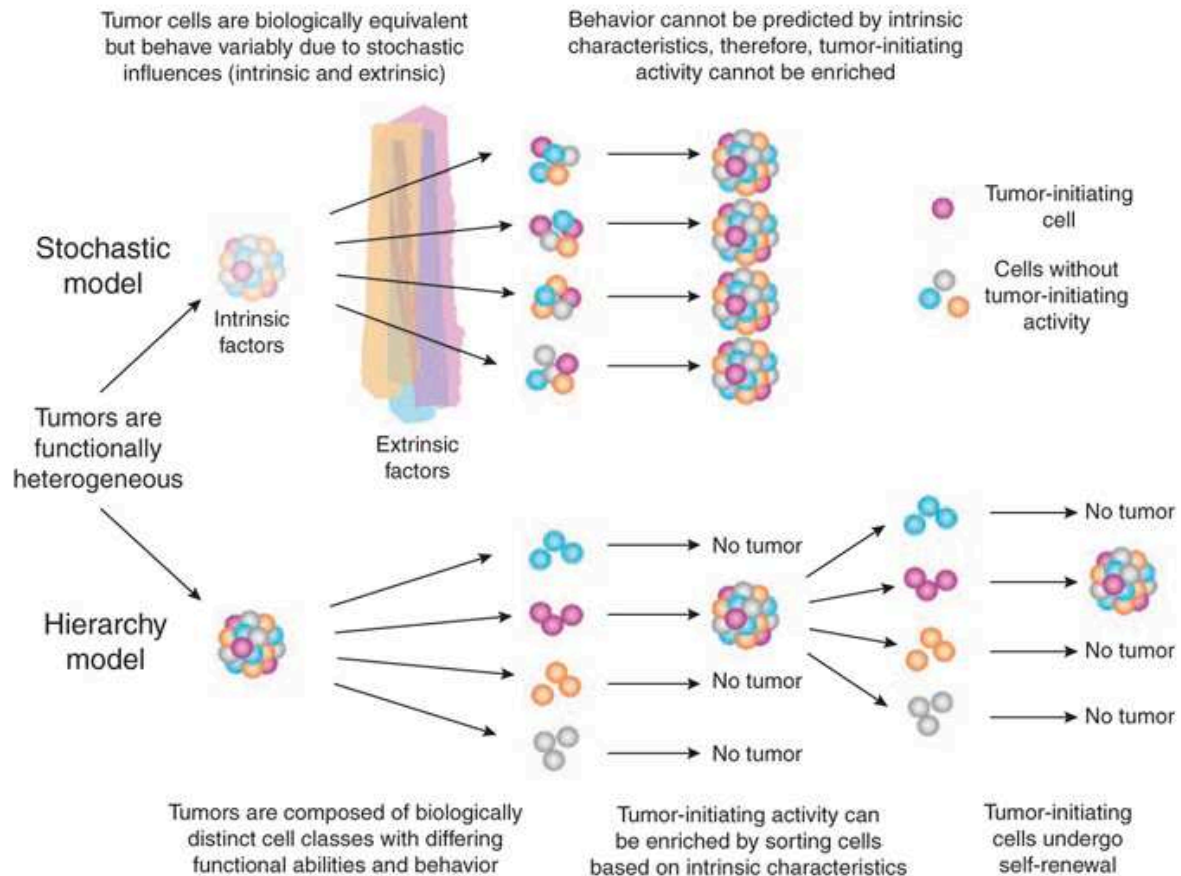


Le relargage par la tumeur primaire de facteurs sécrétés, de composants cellulaires tels que les exosomes, ou directement les CTC exprimant des facteurs spécifiques sont déjà prédisposés à former des métastases dans un organe plutôt qu'un autre. Par exemple dans le cancer du sein, il a été rapporté que les exosomes porteurs d'intégrine  $\alpha 5$  ont un rôle dans la formation de la PMN au niveau pulmonaire [Hoshino A. *et al.*, Nature, 2015]. Dans le cancer de la prostate, les cellules tumorales exprimant l'intégrine  $\alpha 2$  vont plutôt aller cibler la moelle osseuse [Hall C. L. *et al.*, Neoplasia, 2008]. L'ensemble des facteurs de la PMN vont permettre aux CTC de coloniser l'organe beaucoup plus facilement et permettre ainsi le développement de métastases dans ce nouvel organe. Cependant certaines tumeurs ne forment pas de PMN active comme décrit ci-dessus mais plutôt des niches dormantes expliquant parfois la récurrence de cancers plusieurs années après la fin des traitements, c'est le phénomène de dormance des cellules tumorales. Certains facteurs comme BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) vont favoriser la formation des niches dormantes dans le poumon [Gao H. *et al.*, Cell, 2012] ou BMP7 et TGF $\beta$ 2 dans la moelle osseuse [Bragado P. *et al.*, Nat Cell Biol, 2013 ; Kobayashi A. *et al.*, J Exp Med, 2011]. Deux raisons principales peuvent expliquer la dormance tumorale, d'une part l'incapacité des cellules tumorales à induire une angiogenèse et d'autre part l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire [Aguirre-Ghiso J. A., Nat Rev Cancer, 2007]. Bien qu'il soit difficile de prouver que la survenue de récurrence et le développement de métastases plusieurs années après la fin des traitements soit due à la prolifération de CTC en phase de dormance depuis des années, la présence de CTC dans la moelle osseuse est corrélée à un risque augmenté de récurrence [Braun S. *et al.*, N Engl J Med, 2005]. Les CTC en phase de dormance seraient insensibles à l'anoïkis mais leur incapacité à interagir avec la matrice de l'organe colonisé ne leur permettrait pas d'activer leur prolifération [Shibue T. *et al.*, Cancer Discov, 2012 ; Shibue T. *et al.*, Cancer Cell, 2013]. Un facteur activateur de la dormance est le TGF- $\beta$ 2 présent en grande quantité dans la moelle osseuse et agissant sur les récepteurs TGF- $\beta$ -R2 et TGF- $\beta$ -R3 des CTC [Bragado P. *et al.*, Nat Cell Biol, 2013]. Également la production de BMP4 par le tissu osseux et de BMP7 dans le poumon favorise respectivement l'entrée en dormance de cellules tumorales dans le cancer de la prostate et dans le cancer du sein [Gao H. *et al.*, Cell, 2012 ; Kobayashi A. *et al.*, J Exp Med, 2011].

#### **4) Les cellules souches cancéreuses**

Les cellules souches normales présentes dans des tissus sains ont une capacité d'auto-renouvellement et permettent le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ainsi selon leur environnement et les signaux qu'elles reçoivent, elles ont la capacité de rester quiescente, de s'auto-renouveler ou bien de proliférer afin de générer l'ensemble des cellules qui constituent l'organe [Reya T. *et al.*, Nature, 2001]. De la même façon, les CSC ont la capacité de rester quiescentes et s'auto-renouveler ou de générer une

tumeur (potentiel de TIC) en reconstituant l'hétérogénéité tumorale [Reya T. *et al.*, Nature, 2001]. Ce sont des cellules extrêmement rares au sein des tumeurs environ une parmi 100 000 cellules [Quintana E. *et al.*, Nature, 2008]. Deux modèles de CSC (stochastique et hiérarchique) sont en contradiction (Figure 21).



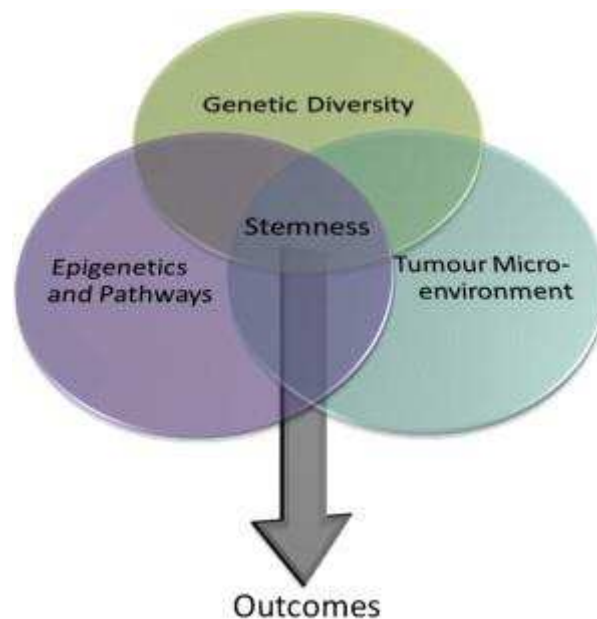
**Figure 21 : Hétérogénéité tumorale, deux modèles : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique.**

Selon le modèle stochastique toutes les cellules sont capables de reformer une tumeur avec son hétérogénéité de départ. La capacité des cellules à redonner une tumeur identique dépend uniquement de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Selon le modèle hiérarchique, seulement une partie des cellules tumorales sont des CSC et sont capables de reformer des tumeurs présentant l'hétérogénéité tumorale de départ.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Biotechnology, [Dick J. E., Nat Biotechnol, 2009], copyright 2009.

Le modèle stochastique propose que les tumeurs sont biologiquement homogènes et que l'hétérogénéité observée dans les tumeurs est due à des facteurs intrinsèques tels que le niveau d'expression de facteurs de transcription, l'activation de voies de signalisation et à des facteurs

extrinsèques comme le microenvironnement ou la surveillance du système immunitaire. Dans ce modèle toutes les cellules tumorales sont capables de reformer une tumeur à l'identique [Dick J. E., Nat Biotechnol, 2009]. En revanche le modèle hiérarchique propose que seulement une faible partie des cellules possèdent les caractéristiques de CSC et sont capables de reformer une tumeur et de reconstituer son hétérogénéité. Les autres cellules sont incapables de reformer une tumeur [Dick J. E., Nat Biotechnol, 2009]. Barker N. *et al.* et Zhu L. *et al.* ont respectivement montré que les cellules tumorales possédant les caractéristiques de CSC de cancer du côlon étaient pour le premier les cellules souches normales du côlon LGR5+ qui lorsqu'elles perdaient le gène *APC* devenaient des CSC et le deuxième les cellules tumorales exprimant l'antigène CD133 [Barker N. *et al.*, Nature, 2009 ; Zhu L. *et al.*, Nature, 2009]. Ces deux études soutenaient le modèle hiérarchique dans le cancer du côlon. Quel que soit le modèle, il est admis que le caractère souche des cellules cancéreuses dépend de plusieurs acteurs qui sont la diversité des anomalies génétiques présentes, leurs modifications épigénétiques, l'activation de certaines voies de signalisation ainsi que du microenvironnement (**Figure 22**).



**Figure 22 : L'origine multifactorielle des cellules souches cancéreuses.**

Les caractéristiques des cellules souches cancéreuses sont multifactorielles et ces facteurs peuvent être associés.

Figure reproduite avec l'autorisation de Elsevier, Cell Stem Cell, [Kreso A. *et al.*, Cell Stem Cell, 2014], copyright 2014.

Les CSC sont des cellules présentant une plasticité importante notamment par l'activation de l'EMT [Mani S. A. *et al.*, Cell, 2008 ; Morel A. P. *et al.*, PLoS One, 2008]. Parmi les DTC, les CSC sont les cellules qui sont les cellules fondatrices des métastases. Dans le cancer du sein, l'activation de voies de signalisation clés dans le maintien des CSC, telles que Wnt et Notch, est importante *in vivo* pour l'étape

de colonisation des organes secondaires [Oskarsson T. *et al.*, Nat Med, 2011]. Les DTC capables de former une tumeur après une longue phase de dormance témoignent des propriétés de CSC de ces cellules. Ceci est confirmé par l'étude de Balic M. *et al.* dans laquelle les auteurs observent des propriétés de CSC dans les DTC localisées dans la moelle osseuse de patientes atteintes de cancer du sein [Balic M. *et al.*, Clin Cancer Res, 2006]. Les cellules en phase de dormance expriment des facteurs de transcription, comme SOX2 et SOX9, caractéristiques de cellules souches [Malladi S. *et al.*, Cell, 2016]. Lawson DA. *et al.* ont montré la présence de DTC peu prolifératives issues de xénogreffes dérivées de patientes (PDX, *patient-derived xenograft*) atteintes de cancer du sein. La caractérisation de l'expression génique de ces DTC en comparaison à des lésions métastatiques avancées a montré l'expression de gènes de l'EMT, de survie et de dormance cellulaire. De plus, la réimplantation de ces DTC dans d'autres souris a montré leur potentiel tumorigénique et leur capacité à former des tumeurs plus différenciées [Lawson D. A. *et al.*, Nature, 2015]. L'analyse phénotypique, génomique et fonctionnelle des CTC et des modèles de xénogreffes issus de CTC peut donc apporter des données clés pour comprendre leur fonctionnement ainsi que les caractéristiques de CSC de certaines d'entre elles.

## **IV. Les cellules tumorales circulantes**

L'existence des CTC a été rapportée pour la première fois en 1869 par le médecin Australien Thomas Ashworth [Ashworth T.R., Australian Medical Journal., 1869]. Il découvrait, lors de l'autopsie d'un patient, des cellules dans le sang qui ne ressemblaient pas à des cellules hématopoïétiques mais présentant des similitudes avec les cellules tumorales retrouvées dans les métastases de ce patient. Il émettait donc l'hypothèse que si ces cellules provenaient d'une tumeur, elles avaient la capacité de se disséminer dans la circulation sanguine expliquant ainsi la survenue de foyers secondaires présentant des caractéristiques similaires aux cellules retrouvées dans le sang. Les CTC sont des cellules rares parmi l'ensemble des cellules présentes dans le sang, environ une CTC parmi  $10^7$  leucocytes par millilitre de sang, ainsi leur détection et leur caractérisation est un véritable défi technologique [van de Stolpe A. *et al.*, Cancer Res, 2011]. Cependant, les avancées technologiques importantes et rapides durant la dernière décennie permettent d'investiguer la biologie et le rôle des CTC dans la progression tumorale.

### **1) Les enjeux de la recherche sur les cellules tumorales circulantes**

La recherche dans le domaine des CTC est aujourd'hui encore un défi technologique malgré les grandes avancées depuis ces 15 dernières années. L'arrivée en 2004 du système CellSearch permettant la capture et la détection de CTC a été une avancée technologique majeure et a permis de mettre en évidence que le nombre de CTC pouvait être un facteur pronostic dans plusieurs cancers. Ensuite, l'émergence de d'autres technologies et leur comparaison au système CellSearch montre les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles [Alix-Panabieres C. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2014] mais aucune technologie universelle n'existe actuellement pour dénombrer les CTC. La recherche sur les CTC a deux intérêts majeurs qui sont d'une part que l'intérêt de ces cellules en clinique et d'autre part la compréhension de leurs caractéristiques biologiques qui leur confèrent un potentiel métastatique. D'un point de vue clinique, le taux de ces cellules est un facteur pronostic accessible par une simple prise de sang. En plus de leur valeur pronostique et de la disponibilité de ce matériel tumoral à tout moment de la maladie, les CTC peuvent être utilisées comme une biopsie liquide permettant de détecter des anomalies moléculaires de sensibilité à des agents thérapeutiques [Siravegna G. *et al.*, Nat Rev Clin Oncol, 2017]. Elles peuvent également permettre de détecter et de découvrir des anomalies de résistance aux traitements et *a fortiori* lorsque la réalisation de biopsies n'est pas possible. Bien que l'utilisation de l'ADN tumoral circulant, des exosomes ainsi que de d'autres liquides biologiques soit en plein essor pour l'identification d'anomalies moléculaires de sensibilité ou de résistance à des agents thérapeutiques, les CTC peuvent se démarquer par l'association du phénotype

des cellules et de leurs anomalies moléculaires permettant de faire un lien entre l'expression de marqueur de la TEM et la détection de mutations, insertions/délétions, ou modification du nombre de copies (CNV, *copy number variation*). Le deuxième intérêt de la recherche sur les CTC consiste à élucider la biologie de ces cellules afin de comprendre leurs propriétés de TIC et leurs mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux. L'étude de ces mécanismes *in vitro* ou *in vivo* nécessite obligatoirement de générer des lignées cellulaires issues de CTC ou des modèles de xénogreffes dérivées de CTC (CDX, *CTC-derived xenograft*). Ces aspects de la recherche sur les CTC ne sont pas remplaçables par l'analyse de matériel tumoral non cellulaire.

## **2) Les méthodes d'enrichissement et de détection des cellules tumorales circulantes**

Du fait de l'hétérogénéité phénotypique des CTC, de multiples technologies ont été développées. Chacune d'entre elles présente des avantages et des inconvénients mais il n'existe aujourd'hui aucune méthode universelle de détection des CTC. Pour la plupart des technologies de détection des CTC, la rareté des CTC a imposé deux étapes : une étape d'enrichissement suivie d'une étape de détection proprement dite [Alix-Panabieres C. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2014].

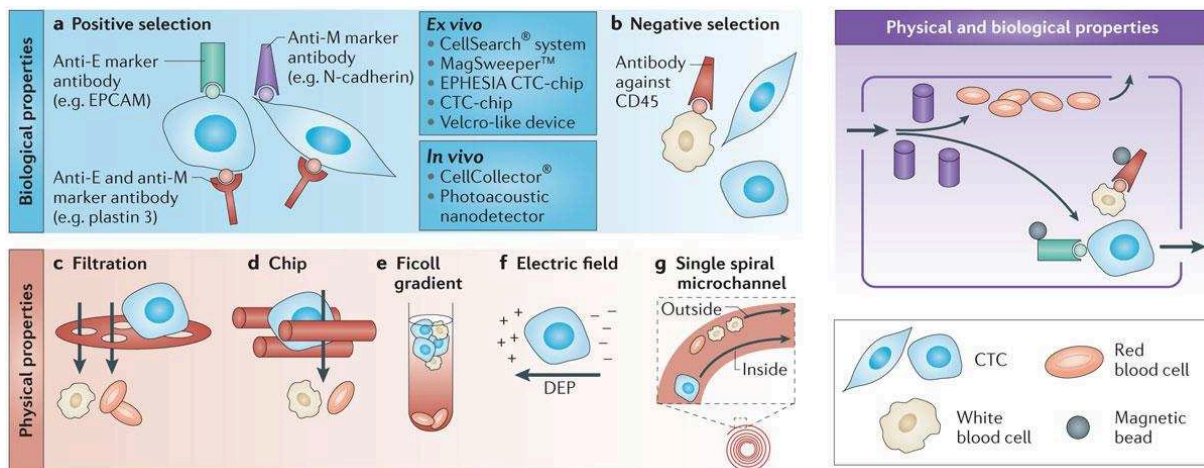
### **a. Les méthodes d'enrichissement**

Actuellement les techniques d'enrichissement de CTC reposent soit sur les propriétés biologiques de ces cellules du fait de l'expression ou non de protéines de surface, soit sur leurs propriétés physiques qui peuvent être la taille, la déformabilité, la densité ou la charge électrique. Certaines techniques ont aussi combiné les propriétés biologiques et physiques (**Figure 23**).

#### **i. Basées sur les propriétés biologiques**

L'enrichissement basé sur les propriétés biologiques des cellules peut se faire soit par sélection positive soit par sélection négative (Figure 21). La sélection positive vise à capturer les cellules tumorales à l'aide d'anticorps dirigés contre des antigènes présents à la surface des cellules tumorales, alors que la sélection négative vise à éliminer les cellules hématopoïétiques et immunitaires sanguine avec l'anticorps dirigé contre l'antigène commun leucocytaire CD45 (*protein tyrosine phosphatase receptor type C*, PTPRC) (sélection négative). Afin de pouvoir capturer les cellules, les anticorps utilisés dans ces approches sont couplés à des billes magnétiques. L'exposition du prélèvement à un aimant permet la capture des complexes antigènes-anticorps couplés aux billes magnétiques et l'isolement des cellules. La sélection positive est très souvent effectuée avec un 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 W. J. *et al.*, Clin Cancer Res, 2004].



**Figure 23 : Méthodes d'enrichissement des cellules tumorales circulantes.**

Les méthodes d'enrichissement sont basées sur les propriétés physiques, ou biologiques, ou physiques et biologiques.

Figure reproduite avec l'autorisation de Nature Publishing Group, Nature Reviews Cancer, [Alix-Panabieres C. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2014], copyright 2014.

Plus précisément, les CTC sont capturées à l'aide de billes magnétiques qui sont recouvertes d'un anticorps spécifique du marqueur épithélial EpCAM (clone VU1D9) puis marquées avec des anticorps anti-cytokératines (CK) 8, 18, 19, anti-CD45 (marqueur leucocytaire) 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 doivent répondre 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. Elle est aussi 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 techniques d'isolement. Cependant bien que cette technologie ne soit pas capable de capturer l'ensemble des CTC du fait de leur hétérogénéité phénotypique, elle est robuste,

reproductible et standardisée. Étant donné que les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 96 heures avant d'être analysés, elle présente un grand intérêt pour les études multicentriques. La robustesse du système CellSearch lui permet d'être la technique de référence à laquelle sont généralement comparées les nouvelles techniques développées sans atteindre la même fiabilité et reproductibilité des résultats à ce jour. De nombreuses autres technologies basées sur un enrichissement EpCAM ont été développées notamment les puces micro-fluidiques telles qu'Ephesia-Chip [Autebert J. *et al.*, Lab Chip, 2015], CTC-chip [Nagrath S. *et al.*, Nature, 2007], Herringbone-chip [Stott S. L. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2010] et IsoFlux [Saliba A. E. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2010]. Le dispositif MagSweeper permet d'enrichir les CTC à l'aide d'une tige magnétique recouverte de billes anti-EpCAM [Talasaz A. H. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 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 T. *et al.*, Anticancer Res, 2012]. Le système GILUPI 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 N. *et al.*, Int J Oncol, 2012].

## ii. Basées sur les propriétés physiques

Afin de capturer les CTC n'exprimant pas l'antigène EpCAM, d'autres technologies basées sur les propriétés physiques des cellules ont été développées et présentent l'avantage d'enrichir les CTC, sans discriminer les cellules EpCAM négatives, ou avec un phénotype intermédiaire (épithélial et mésenchymateux) ou mésenchymateux. Certaines de ces méthodes, basées sur un système de filtration à travers une membrane présentant des pores, permettent d'enrichir les CTC en fonction de leur taille et/ou de leur déformabilité. Plusieurs systèmes de filtration ont été développés notamment la méthode ISET (*isolation by size of tumor cells*) [Paterlini-Brechot P. *et al.*, Cancer Lett, 2007 ; Vona G. *et al.*, Am J Pathol, 2000], le système ScreenCell [Desitter I. *et al.*, Anticancer Res, 2011], les micro-filtres CellSieve [Adams D. L. *et al.*, Cytometry A, 2015] et les membranes VyCAP Microsieve [de Wit S. *et al.*, Sci Rep, 2015]. Les différences majeures de ces différentes approches sont le matériau qui constitue le filtre, la taille et l'espacement des pores, la possibilité de contrôler la pression de filtration, la nécessité de lyser les globules rouges avant la filtration ainsi que le type de tubes requis pour le prélèvement sanguin. Plus récemment, une nouvelle approche de microfluidique, la technologie Parsortix, a été développée et permet soit de capturer les CTC vivantes en utilisant des tubes de prélèvement sans fixateur et sans traitement spécifique de l'échantillon avant de le passer dans le dispositif, soit de capturer des cellules déjà fixées en prélevant le sang sur des tubes contenant un fixateur [Hvichia G. E. *et al.*, Int J Cancer, 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 en déposant le sang sur une solution de Ficoll. D'autres technologies sont basées sur les propriétés physiques de charge électrique (*dean flow fractionation*, DFF et *dielectrophoretic field-flow fractionation*, DEP-FFF) des CTC.

### iii. Basées sur les propriétés biologiques et physiques

Le dernier type d'enrichissement utilisé combine les propriétés biologiques et physiques des CTC. La puce i-CHIP allie le tri cellulaire hydrodynamique et la capture immunomagnétique [Ozkumur E. *et al.*, *Sci Transl Med*, 2013]. Une autre approche combine le RosetteSep couplé avec la centrifugation sur Ficoll. Le RosetteSep contient des anticorps bispécifiques dirigés contre les cellules hématopoïétiques et les érythrocytes permettant la formation de rosettes qui sont éliminées par centrifugation sur gradient de densité.

En résumé, chaque système présente des avantages et des inconvénients mais à l'heure actuelle il n'existe pas de méthode universelle pour l'isolement des CTC [Alix-Panabieres C. *et al.*, *Nat Rev Cancer*, 2014]. La capture des CTC basée sur l'expression d'antigènes de surface associés à la tumeur comme par exemple EpCAM, MUC1 ou EGFR ne permet pas de rendre compte de l'hétérogénéité phénotypique des CTC. 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 ». Les systèmes de filtration sont basés sur le principe que les CTC ont une taille supérieure à celle des cellules hématopoïétiques. Cependant la taille des CTC est variable et certaines passent à travers les pores au même titre que les cellules hématopoïétiques. En comparaison au système CellSearch, le système ISET permet de capturer plus de CTC dans le CBNPC et le cancer de la prostate [Farace F. *et al.*, *Br J Cancer*, 2011]. Un inconvénient des approches de filtration comme le système ISET est la rigidité du système du fait que l'échantillon doit-être pris en charge et filtré le plus rapidement possible puisque il n'est pas fixé. Les systèmes micro-fluidiques ont l'avantage d'avoir des rendements élevés mais ces dispositifs posent des problèmes dans l'écoulement du sang notamment dû à la formation de bulles d'air ou de 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. À 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.

## **b. Les méthodes de détection**

La détection des CTC peut être réalisée par immunocytochimie ou immunofluorescence puis par une observation en microscopie ou par cytométrie de flux bien que celle-ci ne soit pas quantitative. La détection indirecte de CTC par des méthodes de biologie moléculaire sur l'ADN ou l'ARN (acide ribonucléique) de sang total ou de fractions enrichies en CTC, s'inscrit majoritairement dans un cadre de caractérisation moléculaire de fractions contenant des CTC et seront évoqués dans l'Introduction paragraphe IV-3)a. Ces techniques ne sont donc pas présentées ici comme des méthodes de détection des CTC. De plus, l'approche de détection de transcrits est basée sur l'hypothèse que ceux-ci sont spécifiques de la tumeur, ce qui peut ne pas être le cas [Krebs M. G. *et al.*, Nat Rev Clin Oncol, 2014]. Également, la détection de remaniements et/ou d'amplification par la technique de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) valide le fait de trouver des CTC porteuses d'anomalies génétiques de la tumeur mais sera également présenté dans l'Introduction paragraphe IV-3)b. Le fait de ne pas retrouver le remaniement/amplification, la ou les mutations recherchées, l'expression d'un gène ou d'un groupe de gènes de la tumeur ne signifie pas l'absence de CTC dans le prélèvement. Ces méthodes permettent de valider la présence de CTC porteuses d'anomalies identiques à la tumeur. Pour les mêmes raisons, la caractérisation fonctionnelle des CTC sera présentée dans l'Introduction paragraphe IV-4). La plupart des systèmes décrits dans l'Introduction paragraphe IV-2)a. utilise une même étape de caractérisation qui consiste à marquer les cellules grâce à l'utilisation d'anticorps anti-cytokératines et anti-CD45 couplés à des fluorochromes ainsi qu'avec le marqueur nucléaire DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).

## **3) Caractérisation moléculaire des CTC**

La caractérisation moléculaire des CTC peut répondre à plusieurs besoins qui peuvent être l'utilisation des CTC comme une biopsie liquide, la compréhension de l'hétérogénéité tumorale, la détection d'anomalies de résistance aux thérapies anticancéreuses et la prédiction d'efficacité de traitement. Pour répondre à ces différentes questions, la caractérisation moléculaire des CTC peut être réalisée sur du sang total, des fractions enrichies en CTC ou des CTC uniques.

### **a. Des fractions enrichies en CTC**

La plupart des analyses moléculaires ont initialement été réalisées sur l'ADN ou l'ARN d'une fraction enrichie en CTC ou éventuellement à partir de sang total. Ces analyses étaient souvent utilisées à des fins cliniques afin de corrélérer la présence d'ARNm (acide ribonucléique messager) avec la survie ou la PFS des patients ou encore orienter le patient vers une thérapie ciblée. Inuma H. *et al.* ont analysé par RT-qPCR (*reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction*), l'expression des gènes *carcinoembryonic antigen* (CEA), les cytokératines 19 et 20 et CD133 après avoir extrait l'ADN et l'ARN

de sang total dans le cadre d'une étude rétrospective multicentrique incluant 735 patients atteints de cancers colorectaux [Iinuma H. *et al.*, J Clin Oncol, 2011]. Les auteurs ont montré que les patients qui présentaient une expression de ces gènes ont une survie sans maladie (DFS) et une OS plus courte que ceux qui ne les exprimaient pas et que cette technique pouvait être utilisée pour identifier les patients à fort risque de rechute et mauvais pronostic. La recherche du variant AR-V7 (*androgen receptor splice variant 7*) par PCR digitale a montré qu'une forte expression d'AR-V7 était corrélée avec une survie des patients sans progression du PSA, une PFS et une OS diminuée chez des patients atteints de mCRPC avant traitement par abiraterone ou enzalutamide [Seitz A. K. *et al.*, Eur Urol, 2017]. D'autres chercheurs se sont intéressés à la détection de l'ARNm de la cytokératine 19 par RT-qPCR dans des fractions enrichies en CTC, par centrifugation sur gradient de Ficoll, dans le cancer du sein [Stathopoulou A. *et al.*, Clin Cancer Res, 2003 ; Xenidis N. *et al.*, J Clin Oncol, 2009]. Xenidis N. *et al.*, ont montré que les patientes exprimant l'ARNm de cytokératine 19 après chimiothérapie présentaient une DFS et une OS plus courte que les patientes n'exprimant pas ce même ARNm [Xenidis N. *et al.*, J Clin Oncol, 2009]. La RT-qPCR a ainsi été utilisée pour détecter l'expression d'autres ARNm tels que HER2 dans le cancer du sein, PD-L1 dans les carcinomes de la tête et du cou, AR-V7 dans le cancer de la prostate [Antonarakis E. S. *et al.*, N Engl J Med, 2014 ; Fehm T. *et al.*, Breast Cancer Res Treat, 2010 ; Strati A. *et al.*, Ann Oncol, 2017]. Punnoose EA. *et al.* ont analysé les mutations d'*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), *ALT1* (*glutamic--pyruvic transaminase*) et *PI3KCA* chez des patients atteints de CBNPC dans des fractions enrichies en 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 E. A. *et al.*, PLoS One, 2010]. Ces résultats confirment la difficulté à détecter des anomalies génétiques dans une fraction enrichie de CTC. Matikas A. *et al.*, ont rapporté la détection d'une mutation *KRAS* dans des fractions enrichies de CTC après filtration ISET chez des patients atteints de cancers colorectaux [Matikas A. *et al.*, Transl Oncol, 2017]. La technique de FISH permet de mettre en évidence la présence de remaniements et/ou d'amplifications de gènes. Cette technique a permis de mettre en évidence le remaniement du gène *ERG* et l'amplification du gène *AR* dans les CTC issues de patients atteints de cancer de la prostate [Attard G. *et al.*, Cancer Res, 2009 ; Leversha M. A. *et al.*, Clin Cancer Res, 2009 ; Massard C. *et al.*, Oncotarget, 2016]. Également, l'utilisation de la technique de FISH a permis la détection de remaniement du gène *ALK* dans des CTC de patients atteints de CBNPC présentant le réarrangement dans la tumeur [Ilie M. *et al.*, Ann Oncol, 2012 ; Pailler E. *et al.*, J Clin Oncol, 2013 ; Tan C. L. *et al.*, Oncotarget, 2016]. Suite à la détection du remaniement du gène *ALK*, notre équipe a également montré la possibilité de détecter le remaniement du gène *ROS1* dans les CTC de patients atteints de CBNPC porteurs de ce remaniement [Pailler E. *et al.*, Ann Oncol, 2015], le remaniement du gène *ERG* dans le

cancer de la prostate [Massard C. *et al.*, *Oncotarget*, 2016]. Ces études montrent l'intérêt clinique de détecter ces marqueurs avec une grande spécificité et sensibilité. Récemment, notre équipe a montré que le changement dynamique du nombre de copie du gène *ALK* dans les CTC de patients *ALK* remanié sous traitement par crizotinib pouvait être un biomarqueur prédictif de l'efficacité du crizotinib chez ces patients [Pailler E. *et al.*, *Cancer Res*, 2017].

Ces analyses s'inscrivent principalement dans des études cliniques et montrent l'intérêt des CTC en tant qu'outil prédictif de réponse, de PFS et OS. Cependant, ces techniques ne rendent pas compte de l'hétérogénéité tumorale. De plus, la sensibilité limitée de ces méthodes du fait de la contamination par des cellules hématopoïétiques ne permet pas la détection d'anomalies moléculaires de résistance aux traitements. La compréhension de l'hétérogénéité phénotypique et moléculaire des CTC nécessite donc d'étudier ces cellules à l'échelle de cellule unique.

#### **b. Des CTC à l'échelle de cellule unique**

A l'inverse de l'analyse de fractions enrichies en CTC, ces cellules peuvent être analysées à l'échelle de cellule unique par des méthodes de biologie moléculaire comme le séquençage. L'analyse moléculaire par des techniques de séquençage de l'ADN et de l'ARN nécessite dans un premier temps de pouvoir isoler en cellules uniques les CTC enrichies et détectées par une des techniques présentées dans le chapitre Introduction IV-2)a. et b. Il existe plusieurs techniques d'isolement des CTC en cellules uniques. La micromanipulation à l'aide d'une micropipette a été initialement utilisée mais cette technique est relativement fastidieuse du fait qu'elle est manuelle. De plus cette méthode peut entraîner des biais puisqu'il est possible de capturer des leucocytes en même temps que les cellules d'intérêt. La microdissection laser (LMD) est une technique qui peut être utilisée pour les CTC enrichies par filtration et retenues sur une membrane. Il est également possible d'isoler des CTC en cellules uniques à partir d'une suspension cellulaire par cytométrie de flux. Le développement du DEPArray a également permis de séparer, trier et isoler les CTC en cellules uniques à partir d'une population cellulaire en suspension grâce à un principe d'électrocinétique appelé DEP [Fabbri F. *et al.*, *Cancer Lett*, 2013]. Du fait qu'une cellule contient 6,6 picogrammes d'ADN, l'analyse moléculaire des CTC en cellules uniques nécessite une étape d'amplification totale du génome (WGA, *whole genome amplification*). La caractérisation moléculaire de cellules uniques est techniquement beaucoup plus compliquée et onéreuse que la caractérisation de fraction enrichies en CTC mais permet d'évaluer l'hétérogénéité moléculaire des CTC et de pouvoir identifier des mécanismes de sensibilité ou de résistance présents seulement dans une fraction de CTC. Cependant, suite à l'étape de WGA, il est nécessaire de vérifier la qualité de l'amplification en réalisant un contrôle qualité par PCR multiplex par exemple [Polzer B. *et al.*, *EMBO Mol Med*, 2014]. En effet l'ADN de certaines cellules n'est pas amplifié ou mal amplifié et ne permet pas

la réalisation d'analyses moléculaires. De plus l'uniformité du WGA sur l'ensemble du génome est importante à la fois pour couvrir au mieux la globalité du génome mais également pour minimiser les biais introduit par le WGA. Cependant, l'amélioration rapide et considérable des technologies de séquençage permet aujourd'hui de pouvoir réaliser le séquençage de l'ensemble des exons du génome (WES, *whole exome sequencing*) [Lohr J. G. *et al.*, Nat Biotechnol, 2014] et du génome entier (WGS, *whole genome sequencing*) [Gulbahce N. *et al.*, Cancer Res, 2017 ; Jiang R. *et al.*, Oncotarget, 2015]. Les premières études sur CTC à l'échelle de cellule unique étaient des études de faisabilité et de comparaison entre les CTC et la tumeur primaire associée [De Luca F. *et al.*, Oncotarget, 2016 ; Fabbri F. *et al.*, Cancer Lett, 2013 ; Gasch C. *et al.*, Clin Chem, 2013 ; Heitzer E. *et al.*, Cancer Res, 2013 ; Klein C. A. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1999 ; Maheswaran S. *et al.*, N Engl J Med, 2008 ; Ulmer A. *et al.*, Clin Cancer Res, 2004]. Suite à l'isolement en cellules uniques par micromanipulation de CTC détectées par le CellSearch puis par séquençage Sanger, Gasch C. *et al.* ont montré la possibilité de détecter dans les CTC des mutations du gène *KRAS* avec une concordance de 100 % avec la biopsie. Ensuite, Heitzer E. *et al.*, ont rapporté pour la première fois la caractérisation de CTC uniques, dans le cancer colorectal, par CGH (*comparative genomic hybridization*) et par NGS (séquençage de nouvelle génération) en utilisant un panel de 68 gènes associés au cancer colorectal [Heitzer E. *et al.*, Cancer Res, 2013]. Ainsi les auteurs ont montré des changements du nombre de copies de gènes dans les CTC qui étaient similaires aux résultats obtenues dans les biopsies correspondantes. Les résultats de NGS ont permis de détecter des mutations communes, responsables de l'évolution de la maladie dans les gènes *KRAS*, *APC*, *PIK3CA*, entre les CTC et la tumeur correspondante. La NGS a également permis de détecter des mutations présentes uniquement dans les CTC. Pour confirmer la présence de ces mutations dans les tumeurs primitives et les métastases des patients, les auteurs ont réalisé un séquençage en profondeur (*ultra deep sequencing*) de plusieurs prélèvements en ciblant uniquement les mutations détectées dans les CTC en utilisant des amorces spécifiques. Ainsi ils ont pu démontrer que la plupart des mutations retrouvées uniquement dans les CTC étaient également présentes dans les tumeurs primitives et les métastases des patients à un niveau sous clonal. Ces résultats démontrent l'intérêt des CTC pour comprendre l'hétérogénéité moléculaire des tumeurs mais également pour détecter les clones minoritaires responsables de la résistance à un traitement. Ensuite Lohr JG. *et al.* ont réalisé du séquençage de l'exome de CTC uniques dans le cancer de la prostate et comparé les résultats obtenus à ceux des multiples biopsies de tumeurs primitives et de métastases des patients correspondants [Lohr J. G. *et al.*, Nat Biotechnol, 2014]. Les auteurs ont montré qu'il était possible de réaliser un WES de CTC et de couvrir plus de 99 % des exons en multipliant le nombre d'échantillons analysés. Leur méthodologie a été validée chez deux patients et pour un des deux patients le WES a été réalisé sur 19 CTC uniques, neuf biopsies de la tumeur primitive et une biopsie de métastase. Pour

ce patient, 70 % des mutations détectées dans les CTC étaient retrouvées dans les biopsies correspondantes. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence que les CTC permettent de détecter des mutations précoces de la maladie ainsi que des mutations apparaissant plus tardivement. Ni X. *et al.* ont réalisé du WES de CTC de patients atteints de cancer bronchique et ont montré une concordance des CNV entre les CTC et les tumeurs correspondantes [Ni X. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2013]. Jiang R. *et al.* ainsi que Gulbahce N. *et al.* ont démontré la possibilité de réaliser du séquençage de l'ensemble du génome [Gulbahce N. *et al.*, Cancer Res, 2017 ; Jiang R. *et al.*, Oncotarget, 2015]. Carter L. *et al.* ont montré que l'analyse des aberrations du nombre de copies (CNA, *copy-number aberrations*) dans les CTC de patients atteints de CBPC avant le début de leur traitement permettait de classer les patients sensibles et les patients réfractaires à la chimiothérapie [Carter L. *et al.*, Nat Med, 2017]. De plus, les patients classés comme résistants à la chimiothérapie par l'étude des CNA dans les CTC présentent une PFS plus courte que ceux classés comme des patients sensibles à la chimiothérapie.

L'analyse moléculaire des CTC à l'échelle de cellule unique nécessite des techniques de séquençage sensibles et robustes ainsi qu'une analyse bio-informatique spécifique afin d'évaluer les biais induits par le WGA lui-même. Pour cela il est donc nécessaire de séquencer en parallèle des CTC, des leucocytes du même prélèvement isolés en cellules uniques ayant subi le même processus que les CTC ainsi que l'ADN constitutionnel du patient afin de pouvoir distinguer les polymorphismes des mutations somatiques. La question du nombre de CTC nécessaire à analyser pour avoir une bonne représentation de l'hétérogénéité tumorale reste aujourd'hui en suspens.

L'analyse transcriptomique de CTC uniques reste un défi dû notamment à la conservation de l'ARN. Dans une étude menée dans le mélanome, Ramsköld D. *et al.* ont rapporté le développement du Smart Seq, une approche de séquençage de l'ARNm sur cellule unique reproductible et présentant une faible variation technique [Ramskold D. *et al.*, Nat Biotechnol, 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 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 G. M. *et al.*, PLoS One, 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.

#### **4) Caractérisation fonctionnelle des CTC**

Il est important de caractériser les CTC d'un point de vue fonctionnel. Les données obtenues par les études fonctionnelles sont à rattacher avec les études de génomique de CTC uniques. Les analyses fonctionnelles consistent à étudier les facteurs sécrétés par les CTC, à établir et caractériser des lignées cellulaires dérivées de CTC *in vitro* ainsi qu'à établir des modèles de xénogreffes *in vivo* à partir de CTC (CDX).

##### **a. Étude des facteurs sécrétés par les CTC**

L'étude des protéines sécrétées par les CTC nécessite que les cellules soient vivantes. Ce type d'étude pourrait permettre d'évaluer la sécrétion de certaines protéines et leur lien avec l'évolution de la maladie. Afin de détecter les protéines sécrétées par les CTC viables, un test fonctionnel nommé EPISPOT (*EPithelial ImmunoSPOT*) a été développé suite à une étape d'enrichissement des CTC [Alix-Panabieres C. *et al.*, Expert Rev Mol Diagn, 2015 ; Alix-Panabieres C. *et al.*, Clin Chem, 2007]. Cette méthode est basée sur un dosage immunoenzymatique qui permet de détecter les protéines sécrétées par les CTC (cytokératines, MUC1, PSA) pendant une culture à court-terme de 24 heures à 48 heures sur une membrane de nitrocellulose [Deneve E. *et al.*, Clin Chem, 2013 ; Ramirez J. M. *et al.*, Clin Chem, 2014]. Les protéines sécrétées sont capturées par les anticorps présents sur la membrane puis les protéines cibles sont détectées par immunofluorescence. Ramirez JM. *et al.* ont montré que chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatiques la technique d' EPISPOT permet de stratifier les patientes entre celles à bas et à haut risque et que les patientes à haut risque présentent une OS plus courte que les patientes à bas risque [Ramirez J. M. *et al.*, Clin Chem, 2014].

##### **b. Culture de CTC *in vitro***

Le développement de lignées cellulaires *in vitro* nécessite d'enrichir les CTC en perdant le moins possible de CTC afin d'augmenter les chances d'établir une lignée cellulaire et ne pas perdre l'hétérogénéité tumorale. Cependant, la rareté des CTC rend difficile l'établissement de lignées

cellulaires *in vitro*. Cayrefourcq L. *et al.* ont reporté l'établissement de la première lignée cellulaire *in vitro* à long terme à partir de CTC issues d'un patient atteint d'un cancer du côlon [Cayrefourcq L. *et al.*, Cancer Res, 2015]. Cette étude a été réalisée chez 71 patients atteints de cancer du côlon. Lors du prélèvement sanguin, un tube servait à la détection et la numération des CTC par le système CellSearch et un autre était utilisé pour cultiver les CTC. Les CTC ont été enrichies à partir de 10 mL de sang par une étape de déplétion des cellules CD45 positives avec le kit RosetteSep Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail couplé à une centrifugation sur gradient de Ficoll. Les CTC ont été ensuite mise en culture en hypoxie (2 % d'O<sub>2</sub>). Ce travail a permis l'établissement d'une lignée cellulaire chez un patient pour lequel 516 CTC ont été détectées par le CellSearch dans 7,5 mL de sang. Cette lignée présente les mêmes caractéristiques que la tumeur du patient. Elle est caractérisée par un phénotype épithélio-mésenchymateux ainsi que des propriétés de cellules souches cancéreuses. Les données transcriptomiques montrent une signature ostéomimétique. Des expériences fonctionnelles sur cette lignée cellulaire montrent qu'elle favorise l'angiogenèse *in vitro*, ce qui s'explique par les protéines sécrétées par ces cellules (VEGF, FGF2), et qu'elle est tumorigénique *in vivo*.

Gao D. *et al.* ont rapporté l'établissement d'un modèle de culture organoïdes de CTC dans le cancer de la prostate chez un patient présentant plus de 100 CTC dans 8 mL de sang [Gao D. *et al.*, Cell, 2014]. Le patient ayant permis le développement de ce modèle a développé des métastases cinq mois après la prostatectomie et présentait un score de Gleason de 4 + 5. Il a eu une réponse brève par dosage de PSA à une ligne d'ADT et à l'abiraterone malgré la progression radiologique de la maladie. Dans cette étude, 17 patients présentant un nombre de CTC supérieur à 100 ont été prélevés afin de cultiver leur CTC. Les CTC ont été enrichies comme dans l'étude de Cayrefourcq L. *et al.*. L'injection de ces organoïdes *in vivo* permet le développement d'une tumeur présentant une ressemblance histologique à la tumeur primaire. Enfin, Yu M. *et al.* ont établi trois lignées cellulaires, tumorigéniques *in vivo*, à partir de CTC issue de patientes atteintes de cancer du sein [Yu M. *et al.*, Science, 2014]. Les auteurs ont cultivé les CTC en condition hypoxique (4 % O<sub>2</sub>).

L'obtention de ces lignées cellulaires peut permettre d'aider à la compréhension de la biologie des CTC notamment leurs propriétés de cellules souches cancéreuses, de réaliser des tests de drogues *in vitro* et *in vivo* et ainsi de comprendre les mécanismes de résistance aux thérapies anti-cancéreuses ainsi que les mécanismes de la progression métastatique.

### **c. Développement de modèles de xénogreffes *in vivo***

Tout comme l'établissement de lignées cellulaires, le développement de CDX est relativement compliqué du fait de la rareté des CTC. Cependant quatre études ont reporté l'établissement de CDX



dans le cancer du sein, dans le CBPC, le CBNPC et le mélanome [Baccelli I. *et al.*, Nat Biotechnol, 2013 ; Girotti M. R. *et al.*, Cancer Discov, 2016 ; Hodgkinson C. L. *et al.*, Nat Med, 2014 ; Morrow C. J. *et al.*, Ann Oncol, 2016]. Baccelli I. *et al.* ont établi six CDX chez trois patients différents. Un patient a permis l'obtention de deux CDX lors du premier prélèvement et deux autres CDX à un autre stade de la maladie [Baccelli I. *et al.*, Nat Biotechnol, 2013]. Les CTC ont été enrichies comme décrit dans le chapitre précédent dans l'étude de Cayrefourcq L. *et al.* puis ont été implantées *in vivo* dans la cavité médullaire fémorale de souris immunodéprimées. Dans cette étude, l'implantation de CTC de 110 patientes différentes a été réalisée. Le nombre de CTC injectées a été estimé par le CellSearch. Sur la base de cette numération, les souris développant des métastases ont toutes reçu plus de 1000 CTC EpCAM positives et ont développé des métastases osseuses, pulmonaires et hépatiques entre 6 et 12 mois après l'injection. Les auteurs ont démontré par cytométrie de flux que les cellules ayant un potentiel de MIC exprimaient les marqueurs EpCAM, CD44, CD47 et MET. Les auteurs ont également montré que le nombre de CTC positives pour tous ces marqueurs, mais pas de l'ensemble des CTC EpCAM, étaient corrélé avec une OS diminuée chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique.

Une deuxième étude a montré la tumorigénicité des CTC issues de patients atteints de CBPC sensibles ou réfractaires à la chimiothérapie [Hodgkinson C. L. *et al.*, Nat Med, 2014]. Les CTC ont été recueillies chez six patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie. Au moment de la publication de l'étude, sur les six patients prélevés les CTC de quatre d'entre eux ont permis le développement de CDX. Les quatre patients pour lequel un CDX a été obtenu présentaient chacun plus de 400 CTC détectées par le CellSearch au moment de l'implantation des CTC chez les animaux. Le temps d'attente avant de pouvoir détecter une tumeur palpable chez les souris variait de 2,4 à 4,4 mois après l'implantation des CTC. Le traitement de ces CDX avec une chimiothérapie à base de sels de platine et d'étoposide miment la réponse aux traitements observée chez les patients. L'analyse génomique des CTC et des CDX associés montre leur similarité. Cette étude a montré que l'analyse moléculaire des CTC pourrait aider la médecine personnalisée dans le CBPC. Également le développement de ces modèles dans ce type de cancer pourrait permettre de comprendre les mécanismes de résistance aux traitements et être de bons outils pour tester de nouvelles thérapies. La même équipe a reporté le développement d'un modèle de CDX dans le CBNPC [Morrow C. J. *et al.*, Ann Oncol, 2016]. Dans cette étude, les auteurs rapportent le développement d'un CDX à partir des CTC d'un patient atteint d'un CBNPC en résistance à une ligne de chimiothérapie par cisplatine et pemetrexed. Une xénogreffe avait été réalisée au moment du diagnostic avant de débiter la chimiothérapie et n'avait pas donné de développement de CDX chez la souris. En revanche, bien qu'aucune CTC n'ait été détectée par le CellSearch au moment de la progression de la maladie après deux lignes de chimiothérapie, les CTC ont permis le

développement d'un CDX. Ce dernier, tout comme le patient, était résistant au cisplatine et au pemetrexed. De plus, la caractérisation phénotypique et moléculaire des CTC montrait l'absence de CTC épithéliales mais une quantité de CTC phénotypiquement hétérogène exprimant pour 80 % d'entre elles le marqueur mésenchymateux vimentine. Cette étude montre que l'absence de CTC EpCAM positive dans le CBNPC n'empêche pas que des CTC avec un potentiel de TIC soient présentes chez ces patients et souligne l'importance de caractériser ces CTC en transition épithélio-mésenchymateuse dans ce cancer. Girotti MR. *et al.* ont rapporté le développement de CDX chez des patients atteints de mélanome métastatique, lorsque la réalisation de biopsie n'était pas possible, dans le cadre du développement de la médecine personnalisée [Girotti M. R. *et al.*, Cancer Discov, 2016]. Dans cette étude, les auteurs rapportent un taux de succès de 13 % avec six CDX établis, 15 échecs et 26 modèles en cours de suivi. Le développement tumoral peut être détecté chez les souris seulement un mois après l'implantation des CTC.

Malgré les difficultés techniques pour établir les CDX du fait de la rareté des CTC dans le sang des patients, ces modèles pourraient permettre la découverte de biomarqueurs pronostique et prédictif, d'étudier l'évolution génétique de la tumeur et d'identifier des anomalies moléculaires activables. De plus, ces modèles issus de matériel tumoral accessible de façon non invasive permettent de récapituler l'hétérogénéité tumorale de la tumeur [Byrne A. T. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2017]. Également, les CDX développés miment la réponse aux traitements observée chez les patients et pourraient permettre de comprendre les mécanismes de résistance aux traitements. Enfin ces modèles facilitent la compréhension de la maladie à des stades avancés pour lesquels la réalisation de biopsie n'est pas toujours possible.

## **5) Intérêt clinique des CTC**

L'intérêt clinique des CTC repose sur deux volets majeurs qui sont l'énumération des CTC en tant que biomarqueur pronostique, prédictif et pharmacodynamique, et l'utilité des CTC comme une biopsie liquide. Le volet de l'intérêt des CTC comme une biopsie liquide a été détaillé dans les chapitres Introduction IV-3)a. et b. et repose essentiellement sur l'identification d'anomalies moléculaires de sensibilité ou de résistance permettant l'orientation des patients vers un traitement personnalisé. Ce chapitre traitera donc uniquement de l'intérêt clinique de l'énumération des CTC par la méthode CellSearch. Un nombre d'études considérable portant sur la détection et l'énumération des CTC a été réalisé avec le système CellSearch et ces études ont montré que le nombre de CTC détecté dans 7,5 mL de sang est informatif pour l'OS et la PFS dans de nombreux cancers métastatiques. Les cancers où l'utilité de l'énumération des CTC est la plus grande sont les cancers du sein, de la prostate et du côlon bien que l'utilité ait été démontrée dans d'autres cancers.

Dans le cancer du sein métastatique, Cristofanilli M. *et al.*, ont montré que les patientes ayant au moins cinq CTC avant de débiter une nouvelle ligne de traitement ont un mauvais pronostic avec une PFS et une OS significativement plus courtes que les patientes avec moins de cinq CTC [Cristofanilli M. *et al.*, N Engl J Med, 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 M. *et al.*, J Clin Oncol, 2005]. Ces premières études étaient réalisées chez des patientes présentant des métastases. Des études ont ensuite montré que les patientes ayant un cancer métastatique ont des nombres de CTC significativement plus élevés que les patientes ayant un cancer localisé [Bidard F. C. *et al.*, Lancet Oncol, 2014 ; Rack B. *et al.*, J Natl Cancer Inst, 2014]. Pierga JY. *et al.* ont montré que la détection de CTC avant et/ou après chimiothérapie néo-adjuvante, chez des patientes opérables, est associée à un plus grand risque de rechute métastatique précoce et que le seuil de cinq CTC ne semble pas adapté [Pierga J. Y. *et al.*, Clin Cancer Res, 2008]. Bidard FC. *et al.* ont montré 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 F. C. *et al.*, Lancet Oncol, 2014]. Grâce aux nombreuses validations cliniques dans le cancer du sein, les CTC ont été ajoutées en 2010 pour cette indication dans la nouvelle édition du manuel de stratification pathologique TNM 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 [Alix-Panabieres C. *et al.*, Bull Cancer, 2014 ; Bidard F. C. *et al.*, Bull Cancer, 2009]. Riethdorf S. *et al.* ont montré que chez des patientes opérables ou avec une maladie localement avancée la détection d'au moins une CTC par 7,5 mL de sang avant une thérapie néoadjuvante était associée à une DFS et une OS plus courte que les patientes pour lesquelles aucune CTC était détectée [Riethdorf S. *et al.*, Clin Cancer Res, 2017]. Hayes DF. *et al.*, ont montré que la diminution du nombre de CTC en dessous du seuil de 5 CTC / 7,5 mL de sang était associée à une meilleure PFS et OS [Hayes D. F. *et al.*, Clin Cancer Res, 2006]. Cette étude montre donc que les CTC peuvent également être un biomarqueur pharmacodynamique.

Dans une étude pilote menée chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique, 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 J. G. *et al.*, Urology, 2005]. Le nombre de CTC avant et après traitement a ensuite été cliniquement confirmé comme un marqueur indépendant de pronostic [de Bono J. S. *et al.*, Clin Cancer Res, 2008 ; Olmos D. *et al.*, Ann Oncol, 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 vimentine

positives ou Ki67 positives est significativement diminuée [Lindsay C. R. *et al.*, BMC Cancer, 2016]. Vogelzang N.J. *et al.* ont montré que la détection d'au moins cinq CTC par 7,5 mL de sang était significativement associée à une OS plus courte et que l'OS de ces patients est mieux prédite par le compte de CTC avant traitement que par la réponse tumorale et la réponse au dosage du PSA [Vogelzang N. J. *et al.*, Eur Urol, 2017]. Bien que ne s'inscrivant pas dans une étude d'énumération de CTC et n'utilisant pas la technique CellSearch, Scher H.I. *et al.* ont montré l'importance de caractériser l'hétérogénéité phénotypique des CTC pour la prise de décision thérapeutique dans le cancer de la prostate métastatique et résistant à la castration [Scher H. I. *et al.*, Cancer Res, 2017]. Les auteurs ont déterminé l'hétérogénéité phénotypique de CTC collectées avant le début d'une seconde ligne de traitement ou plus chez 145 patients. L'hétérogénéité a été quantifiée en utilisant l'indice de Shannon et a été associée à l'OS. Les patients avec une faible hétérogénéité phénotypique des CTC présentent une meilleure OS lorsqu'ils sont traités par un inhibiteur de la voie de signalisation du récepteur aux androgènes alors que ceux pour lesquels l'hétérogénéité phénotypique des CTC est importante présentent une OS plus longue lorsqu'ils sont traités par une chimiothérapie à base de taxanes.

Des études dans le cancer colorectal ont également montré que les CTC détectées par le CellSearch 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 S. J. *et al.*, J Clin Oncol, 2008].

Ainsi, grâce à la robustesse et à la standardisation de la méthode CellSearch, 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.

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 J. M. *et al.*, J Clin Oncol, 2012 ; Krebs M. G. *et al.*, J Clin Oncol, 2011].

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 J. M. *et al.*, J Clin Oncol, 2012].

**REVUE 1. Clinical utility of circulating tumor cells in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 2014;4:281**

Publication en *open-access*.

**REVUE 2. 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.

**REVUE 3. Routine clinical use of circulating tumor cells for diagnosis of mutations and chromosomal rearrangements in non-small cell lung cancer – ready for prime-time? *Translational Lung Cancer Research*, 2017;6(4):444-453**

Publication en *open-access*.



# 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.

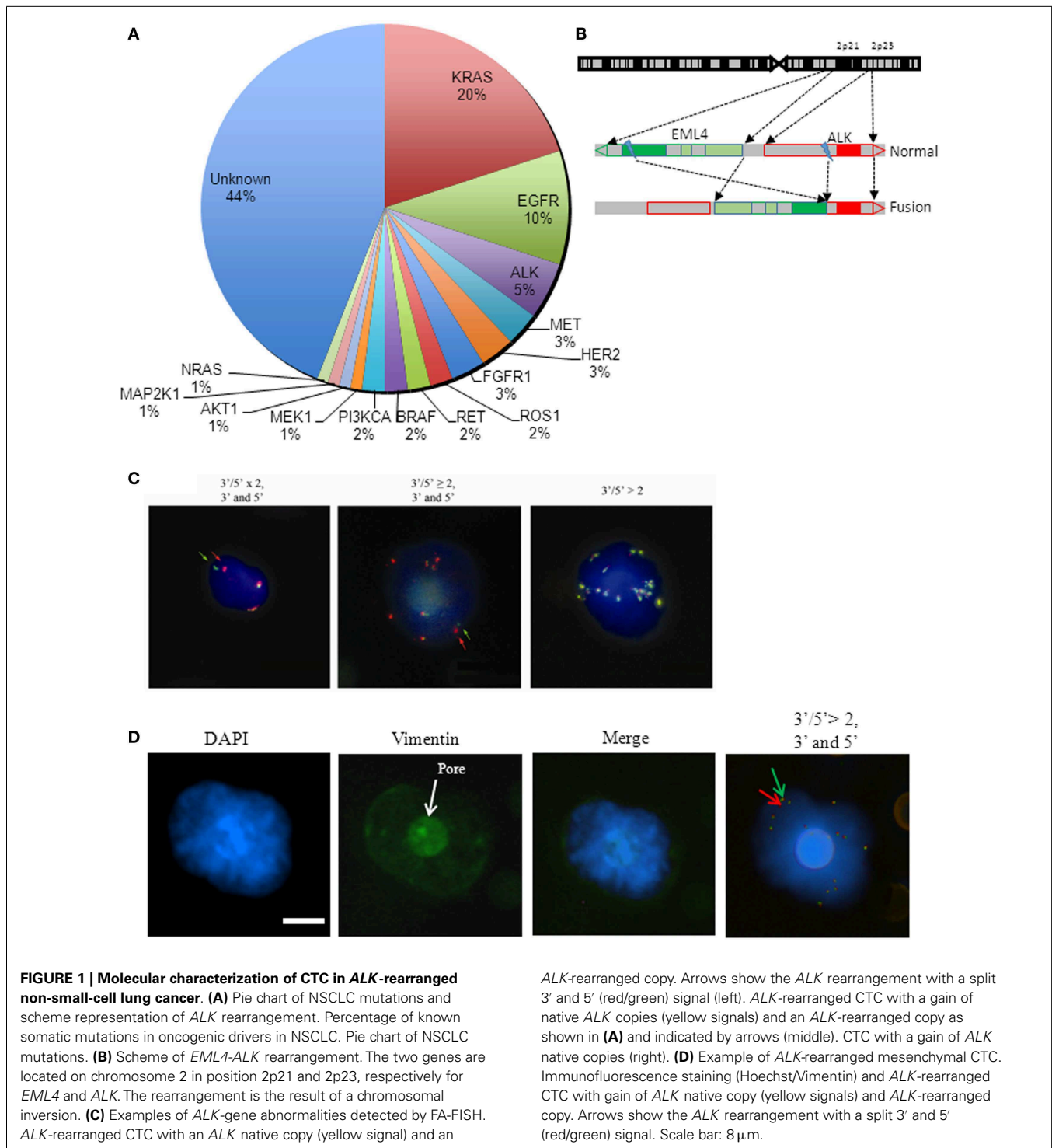
**Keywords:** *ALK* rearrangement, circulating tumor cells, targeted therapy, non-small-cell lung cancer, predictive biomarker

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, Gurubhagavata 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 (EORTAC): 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.*

# 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](mailto: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>	<ul style="list-style-type: none"> <li>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.</li> </ul>	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>	<b>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</b>	<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]
Punnoosse <i>et al.</i>	<b>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</b>	<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>	• The number of CTCs could be a useful predictive factor for the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic NSCLC.	[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> • Recruiting • Observational • Prospective	<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> • Recruiting • Observational • Prospective	<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>Dec 2015</li> <li>NCT02135679</li> </ul>	[107]
<b>Massachusetts General Hospital</b>	<b>Detecting EGFR T790M mutations from circulating tumor cells</b> • Active—not recruiting • Observational • Prospective	<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 theranostic 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> <ul style="list-style-type: none"> <li>Recruiting</li> <li>Nonrandomized</li> <li>Intervention Model: Parallel Assignment</li> <li>Primary Purpose: Diagnostic</li> </ul>	In Stage IIIb/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>Recruiting</li> <li>Observational</li> <li>Prospective</li> </ul>	<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 patients with suspected early stage non-small-cell lung cancer</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 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>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
Istituto Oncologico Veneto IRCCS	<b>Individualized treatment of patients with advanced NSCLC: potential application for circulating tumor cells (CTC) molecular and phenotypical profiling (2012/52)</b> • Recruiting • Observational • Prospective	<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.

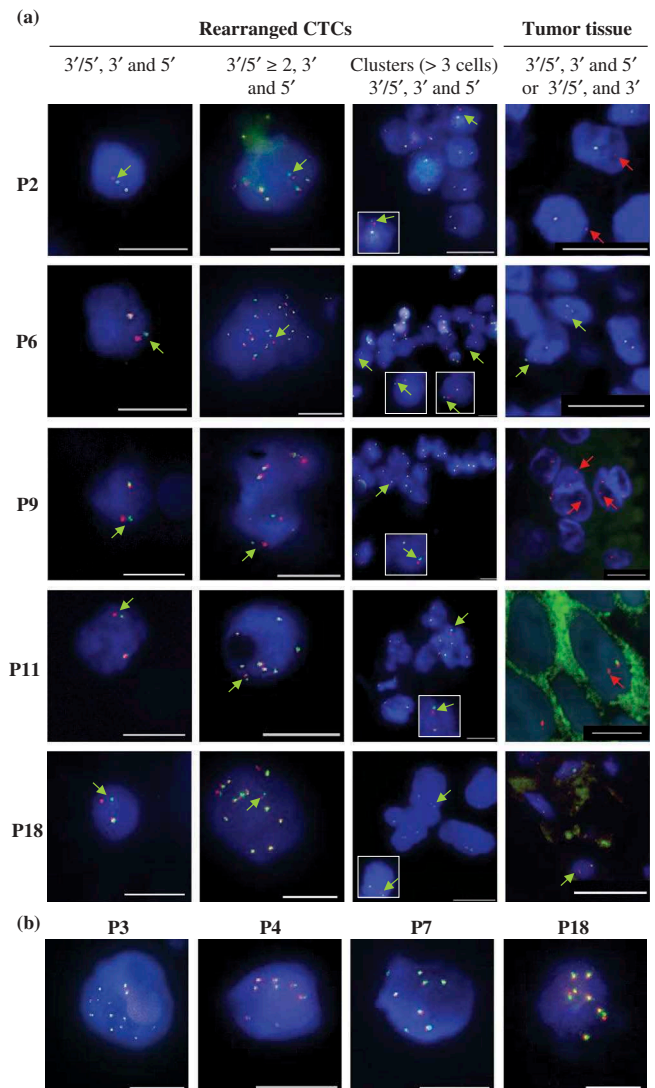


rather than the overall percentage as a cutoff value for establishing the diagnosis of *ALK* rearrangement. By combining four-color IF and FISH, *ALK*-rearranged CTCs were found to display a remarkably homogeneous mesenchymal phenotype contrasting with the heterogeneity observed between and within tumor 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]

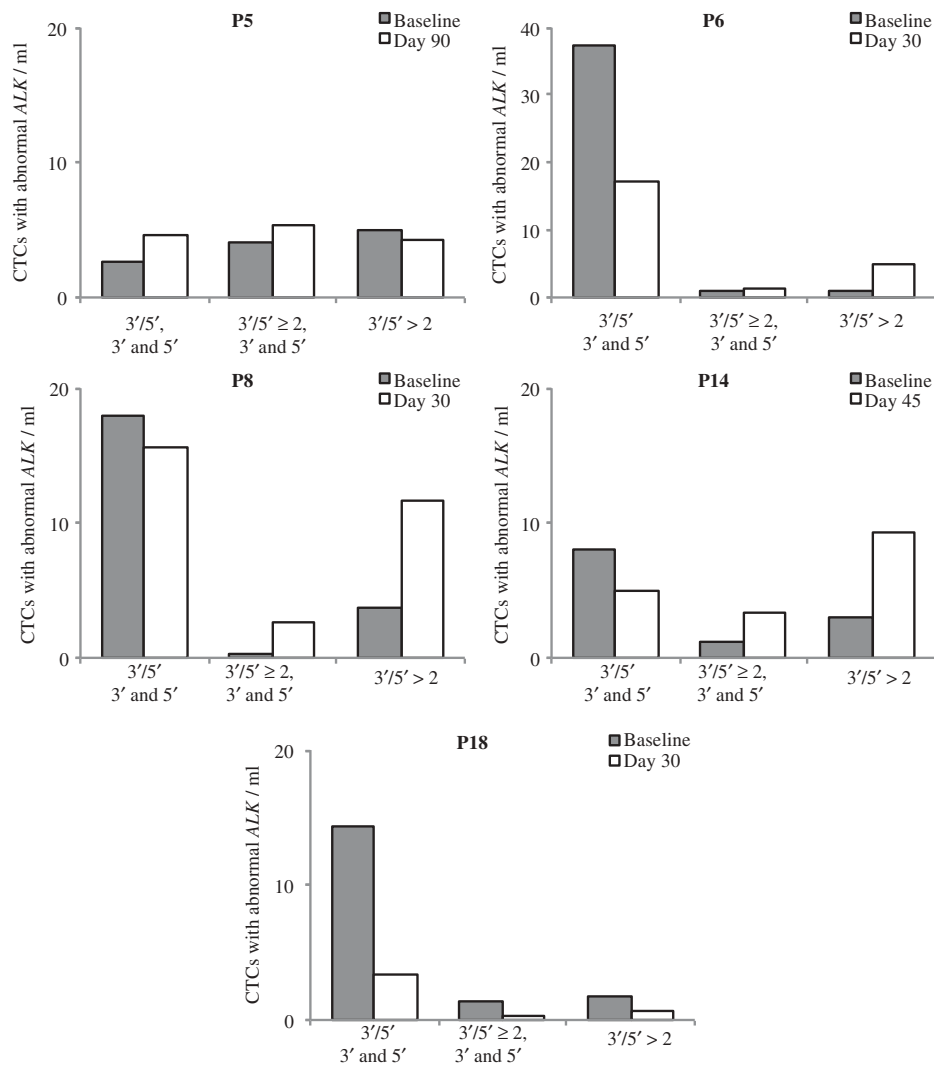
#### CTC detection in *ROS1*-rearranged NSCLC patients

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.

# Routine clinical use of circulating tumor cells for diagnosis of mutations and chromosomal rearrangements in non-small cell lung cancer—ready for prime-time?

Emma Pailler<sup>1,2,3</sup>, Vincent Faugeroux<sup>1,2,3</sup>, Marianne Oulhen<sup>1,2</sup>, Cyril Catelain<sup>1,2</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-Bicêtre, France

**Contributions:** (I) Conception and design: All authors; (II) Administrative support: F Farace; (III) Provision of study materials or patients: E Pailler, V Faugeroux, M Oulhen, C Catelain; (IV) Collection and assembly of data: E Pailler, V Faugeroux, M Oulhen, C Catelain; (V) Data analysis and interpretation: All authors; (VI) Manuscript writing: E Pailler, F Farace; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

**Correspondence to:** Dr. Françoise Farace. Gustave Roussy CNRS UMS3655 – INSERM US23 AMMICA, INSERM U981, 114 rue Édouard Vaillant, F-94805, Villejuif, France. Email: francoise.farace@gustaveroussy.fr.

**Abstract:** In non-small cell lung cancer (NSCLC), diagnosis of predictive biomarkers for targeted therapies is currently done in small tumor biopsies. However, tumor biopsies can be invasive, in some cases associated with risk, and tissue adequacy, both in terms of quantity and quality is often insufficient. The development of efficient and non-invasive methods to identify genetic alterations is a key challenge which circulating tumor cells (CTCs) have the potential to be exploited for. CTCs are extremely rare and phenotypically diverse, two characteristics that impose technical challenges and impact the success of robust molecular analysis. Here we introduce the clinical needs in this disease that mainly consist of the diagnosis of *epidermal growth factor receptor (EGFR)* activating alterations and *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* rearrangement. We present the proof-of-concept studies that explore the detection of these genetic alterations in CTCs from NSCLC patients. Finally, we discuss steps that are still required before CTCs are routinely used for diagnosis of *EGFR*-mutations and *ALK*-rearrangements in this disease.

**Keywords:** Circulating tumor cells (CTC); non-small cell lung cancer (NSCLC); *epidermal growth factor receptor (EGFR)* mutations; *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* rearrangement

Submitted Apr 24, 2017. Accepted for publication Jun 20, 2017.

doi: 10.21037/tlcr.2017.07.01

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2017.07.01>

## Preface

On the basis that ISET filtration offers higher circulating tumor cells (CTCs) recovery and a broader coverage of the phenotypic heterogeneity of CTCs when compared to CellSearch, we utilized ISET for examining *anaplastic lymphoma kinase (ALK)*-rearrangement in CTCs. Our group published in 2013 a novel approach in detecting *ALK*-rearrangement in CTCs with high sensitivity and specificity in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) combining ISET filtration (isolation by size of epithelial

tumor cells) and a fluorescent in situ hybridization (FISH) assay optimized for CTC characterization on filters called FA-FISH.

## Clinical needs

In the last decade, the success of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in selected NSCLC patients has considerably transformed the management of this disease (1,2). NSCLC and in particular adenocarcinoma has been segmented into molecular subsets based on oncogenic ‘driver’ alterations

(3-7). The two best characterized oncogene driver paradigms are the *epidermal growth factor receptor (EGFR)* activating alterations and *ALK*-rearrangement against which an increasing repertoire of TKI therapies is being developed (8). *EGFR*-activating alterations (the L858R point mutation in exon 21 and exon 19 deletions) present in about 15% of NSCLC patients confer sensitivity to first-line *EGFR* TKI therapy such as gefitinib, erlotinib or afatinib (9-15). Acquired resistance to first line *EGFR* TKIs usually developed within 12 months of treatment (15,16), the principal cause being the T790M mutation which is detectable in approximately 60% of patients (17-20). The *ALK*-gene rearrangement involves most often the *echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)* loci and defines a unique molecular subset in 4% of NSCLC patients (21-24). In 2012, crizotinib was approved for the treatment of patients with previously advanced treated *ALK*-rearranged NSCLC and is now the standard of care in the first line setting (25-28). Acquired resistance develop after a median progression-free survival (PFS) of 8 to 9 months, the most frequently identified secondary mutations being the L1196M, which is analogous to T790M in *EGFR*, and G1296A (29,30). Additional *ALK* secondary mutations distributed throughout the kinase domain (I1151Tins, L1152R, C1156Y, G1202R, S1206Y, I1171T, F1174C) have also been detected in crizotinib-resistant *ALK*-positive tumors (31-39). A third molecular entity also targetable by TKIs is a *c-ros oncogene 1 (ROS1)* fusion gene which has been more recently identified in approximately 1% of NSCLC and can benefit from crizotinib therapy (40,41).

In metastatic NSCLC, surgery is rarely a component of treatment. The availability of tumor tissue is a major hurdle to the identification of genetic alterations and screening of patients eligible for TKI therapies. Genetic profiling is most commonly performed on tumor biopsy which can be invasive, impractical and in some cases associated with risk. Furthermore tissue adequacy, both in terms of quantity and quality, is often insufficient. Importantly, a single biopsy sample may also not reflect the genetic diversity of a patient's tumor (42,43). With the increasing number of *EGFR* and *ALK* inhibitors in current clinical development, the identification of alternative noninvasive options to tumor biopsy to diagnose predictive biomarkers of sensitivity to TKIs is becoming increasingly important. Moreover, at the time of disease progression, serial biopsies are needed to identify secondary resistance mutations and re-assess the changing molecular profile of tumors.

Subjecting patients to serial biopsies to identify acquired resistance mutations is even more complicated and invasive. Therefore, monitoring the emergence of acquired resistance mutations and tumor evolution is also an important issue for the development of precision medicine in NSCLC (44).

### Biological characteristics of CTCs in NSCLC

The development of efficient, non-invasive methods to identify molecular alterations is a key challenge which CTCs have the potential to meet (45). However CTCs are very rare (rate of one cell per  $10^6$  or  $10^7$  leucocytes) and their molecular characterization must rely on the combination of successive steps which include an initial enrichment process, the identification of CTCs, and the detection of the genetic alteration itself (46-48). The CellSearch platform is based on the detection of epithelial cells expressing EpCAM, and approved by the FDA as an aid to prognosis in patients with metastatic breast, prostate and colorectal cancers (49-51). CTC levels measured by CellSearch have been reported to be prognostic in NSCLC but the levels are very low in this cancer type and patients are frequently negative even in advanced states (52). We and others groups have reported that CTCs are identified in higher numbers using an enrichment technique based on blood filtration (ISET, isolation by size of epithelial tumor cells) compared to the CellSearch method in NSCLC most likely due to the fact that CTCs expressing markers of epithelial-mesenchymal transition (EMT) which have lost epithelial features can be missed by CellSearch (53-56). Using ISET, the prognostic value of CTCs was also reported in patients with resected NSCLC with CTC thresholds tenfold higher (50 CTC/10 mL) than by the CellSearch (55). Recently our group reported that differential total CTC counts and EMT characteristics can be observed according to different genetic subtypes of NSCLC (57). CTCs from *EGFR*-mutant and *ALK*-rearranged NSCLC patients express epithelial-mesenchymal transition characteristics, not seen in CTCs from patients with *KRAS*-mutant adenocarcinoma.

The biological characteristics of CTCs including rarity and phenotypical heterogeneity impose a number of limitations and technological challenges which currently impact on the success of robust molecular analysis. In NSCLC the studies cited above support the existence of a contingent of CTCs expressing mesenchymal characteristics and a low level of truly epithelial (both EpCAM and pan-keratin positive) CTCs. The absence of a universal detection



assay capable to embrace the CTC phenotypical diversity imposes technological choices such that the results must take into account the technique used. Here we present studies reporting the detection of *EGFR*-mutations, *ALK*- and *ROS1*-rearrangements in CTCs from NSCLC, including the description of techniques used and results. Their level of validation in the context of routine clinical use is discussed.

## Detection of gene-rearrangements

### Detection of *ALK*-rearrangement

Crizotinib was approved with a companion diagnostic test, the Vysis *ALK* Break Apart FISH Probe Kit (Abott Molecular) (58). Therefore the Vysis FISH test performed on tumor biopsies has been the reference assay for years but it tends to be supplanted by immunohistochemistry (IHC) because of the greater technical facility of IHC. The detection of *ALK*-positive CTCs has been reported by four groups including our own (59-62). All groups used FISH testing, Paul Hofman's group using both FISH and IHC (59). In 2012, Ilie *et al.* reported that *ALK* status could be determined in CTCs isolated from patients with NSCLC by IHC and FISH analysis. CTCs from 87 patients with NSCLC were isolated using ISET filtration and screened for their *ALK* status both in tumor biopsy samples and in CTCs. *ALK*-FISH was carried out using the Vysis Probe Kit on two spots of one ISET filter (each spot corresponding to the filtration of one milliliter of blood). IHC 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 IHC and FISH in three different CTC samples collected per each patient. On the basis that ISET filtration offers higher CTC recovery and a broader coverage of the phenotypic heterogeneity of CTCs when compared to CellSearch, we utilized ISET for examining *ALK*-rearrangement in CTCs (60). 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. 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.

Using the threshold of four *ALK*-rearranged CTC per 1mL blood, a sensitivity and 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 rather than the overall percentage as a cutoff value for establishing the diagnosis of *ALK*-rearrangement. By combining four-color immunofluorescent-staining (IF) and FISH, *ALK*-rearranged CTCs were found to display a remarkably homogeneous mesenchymal phenotype. A unique *ALK*-FISH pattern (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, CTCs may originate from various metastatic sites. These 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 cancer stem cells. In 2016, using a sophisticated NanoVelcro Chip technology based on the selection of EpCAM positive CTCs, He *et al.* reported the detection of *ALK*-rearrangement in 21 *ALK*-positive patients in the tumor biopsy (61). All *ALK*-positive patients had at least three *ALK*-rearranged CTCs per one mL blood while 20 *ALK*-negative patients had no or two *ALK*-rearranged CTCs. The *ALK*-rearrangement status was consistent with that of the tumor. In addition the *ALK*-rearranged CTC ratio was found to correlate to the pTNM stage in *ALK*-positive patients. Although these results may appear similar to ours, it is important to note that *ALK*-rearranged CTCs were epithelial in this study. In our hands, *ALK*-rearranged CTCs collected on ISET filters expressed vimentin and N-cadherin at a level that was generally lower than that

of leucocytes but were negative for both cytokeratins and E-cadherin. This result was consistent with the absence or very low level of CTCs by the CellSearch in our *ALK*-positive cohort. Another study published in 2016 by Tan *et al.* also reported the detection of *ALK*-rearranged CTCs and concordance between CTCs and tumor biopsies (62). After red blood cell lysis, the ClearCell FX system from Clearbridge Biomedics was used here for CTC enrichment. A fraction of the CTC-enriched fraction deposited on glass slides by cytospin was tested using the Vysis Probe kit after. Using this approach, the authors reported 3 to 15 *ALK*-rearranged CTCs per 1.88 mL in 14 *ALK*-positive patients and 0 to 2 *ALK*-rearranged CTCs per 1.88 mL blood in 12 *ALK*-negative patients and five healthy donors. There was no available information on the phenotype of the CTCs.

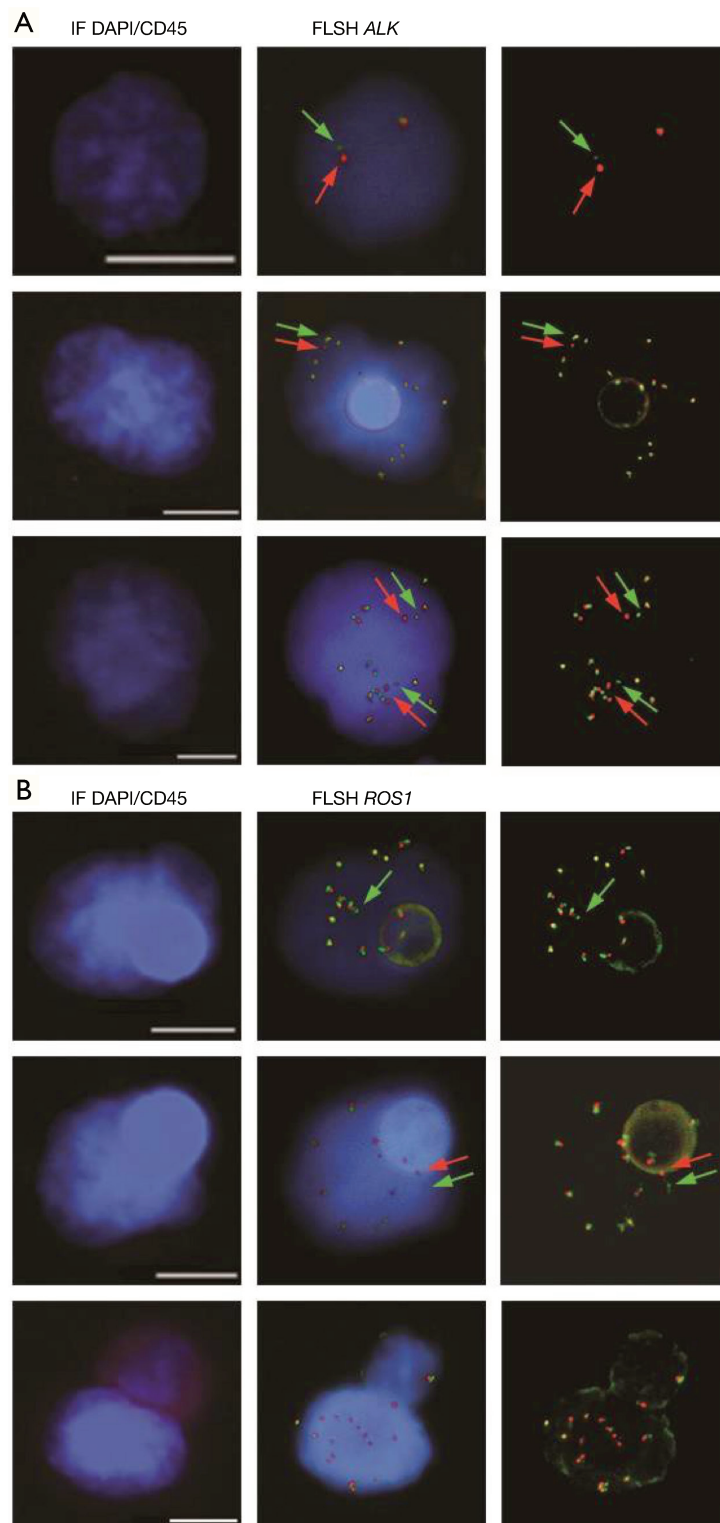
In *ALK*-rearranged NSCLC patients, treatment with crizotinib is marked by heterogeneity in the magnitude and duration of clinical response. Response durations vary from a few months to several years, and the long-term effectiveness of crizotinib is invariably limited by the development of acquired resistance (30). In our initial 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 were correlated with variable evolution on crizotinib treatment in the five examined patients (60) (Figure 1A). Based on this observation, we hypothesized that CTC subsets differing in *ALK*-FISH patterns might be associated with different clinical outcomes in *ALK*-rearranged patients treated by crizotinib. Therefore we recently evaluated whether these CTC subsets monitored on crizotinib in an extended cohort of 39 *ALK*-rearranged patients could inform on treatment benefit (64). CTCs were classified into distinct subsets according to the presence of *ALK*-rearrangement and/or *ALK*-CNG signals. As previously reported in tumors biopsies, no significant association between baseline numbers of *ALK*-rearranged or *ALK*-CNG CTCs, and PFS was observed. However, we observed a significant association between the decrease in the numbers of CTCs with *ALK*-CNG on crizotinib and a longer PFS. In multivariate analysis the dynamic change of CTCs with *ALK*-CNG was the strongest factor associated with PFS. Although not dominant, *ALK*-CNG has been reported to be one of the mechanisms of acquired resistance to crizotinib in tumor biopsies. This study shows that serial FISH analysis of CTCs could identify a predictive biomarker of therapeutic efficacy in *ALK*-rearranged NSCLC and could help to stratify patients at risk of early resistance.

### Detection of *ROS1*-rearrangement

Our group published the detection of *ROS1*-rearrangements in the CTCs of 4 patients with *ROS1*-rearrangement previously detected by FISH on tumor biopsy (65). Detection was performed using ISET filtration and FA-FISH (Figure 1B). In *ROS1*-rearranged patients, the median number of *ROS1*-rearranged CTCs at baseline was 34.5 (range, 24–55) per 3 mL of blood while in *ROS1*-negative NSCLC patients, median background hybridization of *ROS1*-rearranged CTCs was 7.5 (range, 7–11) per 3 mL blood. This study provides the proof-of-concept that CTCs can be used for non-invasive, sensitive and specific detection of *ROS1*-rearrangement in NSCLC patients. In this study we also evaluated the effect of crizotinib on *ROS1*-gene copy number; in the two patients who had 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, which was hypothesized to promote the emergence of drug resistant CTC sub-clones with increased metastatic capacity, offering potential mechanisms of *ROS1*-inhibitor-therapy resistance in *ROS1*-rearranged NSCLC tumors.

### Detection of mutations

In 2008, Maheswaran *et al.* reported the detection of *EGFR*-mutations in CTCs isolated from 27 NSCLC patients using the CTC-chip, a microfluidic device containing microposts coated with anti-EpCAM antibodies (66). *EGFR* mutational analysis was performed using allele-specific PCR amplification and was compared to the results from the 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. Punnoose *et al.* reported on the clinical correlation between change in CTC number detected during therapy and treatment response (67). The study cohort consisted of 41 patients with relapsed



**Figure 1** Examples of gene-rearrangement detection in filtration enriched-CTCs from NSCLC patients by combined fluorescent staining and 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. Adapted with permission from (63). Used under CC BY 4.0.



or refractory NSCLC who were enrolled in a single arm phase II clinical trial of erlotinib and pertuzumab, but only eight patients had confirmed *EGFR*-activating mutations in the tumor tissue. 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 endpoints. The analysis reported a statistically significant correlation between high baseline CTC counts and patient response to treatment according to RECIST ( $P=0.009$ ). *EGFR* mutational analysis was performed on CTCs captured by the CellSearch profile kit. After DNA extraction and a pre-amplification step, mutations were detected by Taqman PCR using multiplex gene-specific primers. Only one *EGFR* genetic alteration (exon 19 deletion) was detected in CTCs while eight patients had confirmed mutations in archival tumor tissue. In 2014, Marchetti *et al.* reported the results of a multi-center trial of erlotinib treatment in 37 advanced NSCLC patients with activating *EGFR*-mutations in tumor tissue. CTCs were obtained from the CellSearch and subjected to ultra-deep next generation sequencing (NGS) (68). *EGFR*-mutations were in 31 (84%) of the CTC samples examined, 25 (81%) had in frame exon 19 deletions and 6 (19%) had point mutations at exon 21. In 29 (91%) of the 31 cases the mutation type detected by NGS in CTCs corresponded to that found in matching tumor tissue by Sanger sequencing. Interestingly in 4 cases, double or multiple mutations were observed by NGS in CTCs suggesting CTC heterogeneity. No mutations were detected in control samples (CTC from 10 breast cancer patients, 12 healthy subjects). Gorges *et al.* reported the detection of mutations in the *EGFR* and *KRAS* genes in CTCs isolated by the Gilupi CellCollector *in vivo* system (69). In this study the authors provided a proof-of-principle that CTCs captured by this device were suitable for molecular analysis. Captured CTCs from two patients with known mutations in the primary tumor were analyzed using Digital PCR after whole genome amplification. The same *KRAS*- and *EGFR*-mutations found in the primary tumors were detected when one to five CTCs were detected by the system. Recently, Zhang *et al.* reported the L1196M resistance mutation in short-term cultured CTCs from *ALK*-rearranged NSCLC (70).

### Clinical use of CTCs: ready for prime-time?

Thus there is still very little data on the detection of these

gene aberrations in CTCs from NSCLC patients. All the exploratory studies presented above have only involved a small number of patients. In most cases, different CTC enrichment techniques were used which implies that CTCs identified positive for a genetic biomarker possibly differed from one study to another and the results cannot be compared. Beyond this proof-of-concept studies, there are still many steps that should be taken before CTC assays can be used in routine clinical diagnosis. First of all, because the studies presented above used different CTC enrichment techniques, it is important to identify for each genetic biomarker the most appropriate CTC enrichment technique prior to CTC identification and downstream molecular assays. Such a comparison of test performance, validation of selected assays in cohorts of positive and negative patients and their further clinical qualification will require important collaborative efforts. Such projects can only be carried out within the framework of collaborative groups, for example, the Cancer-ID European consortium whose purpose is to validate and standardize liquid biopsy assays.

Regarding FISH assays, the 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 and validation of biomarker detection. Our group recently reported a semi-automated method established to analyze filtration-enriched CTCs according to combined fluorescent staining and FISH (63). This method 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. For using CTC FISH assays in routine clinical diagnosis, another important point that increases the cumbersome nature of the analytical process is the necessity of the validation of FISH signals by an experienced cytogeneticist.

Mutational analyses have been mainly performed on DNA extracted from enriched CTC populations and in most studies the sensitivity of detection was limited by the presence of leukocyte DNA. The analysis of CTCs at the single cell level will overcome this limitation but imposes important technical challenges for individual CTC isolation, whole genome amplification (WGA), PCR for targeted mutations and NGS. WGA is a process which is prone to amplification bias, polymerase errors and results in nucleotide variations errors and allelic distortion. The distinction of true somatic variants present in CTCs from WGA errors is essential and requires a very rigorous and

careful assessment.

Assays using circulating tumor DNA (ctDNA) assays for detecting gene aberrations (i.e., mutations, gene rearrangements and gain of copy numbers) are being rapidly implemented in the clinic and several studies have shown the specificity and sensitivity of *EGFR*-mutations detection in ctDNA from NSCLC patients (71-73). Although ctDNA assays indeed offer advantages in terms of simplicity, the molecular analysis of CTCs can provide unique additional information such as the morphology and phenotype. The presence of multiple and different genetic alterations can be identified within the same CTC offering the possibility to infer tumor heterogeneity and evolution. Although the utilization of CTCs is less eminent, CTCs and ctDNA are anticipated to be complementary in their clinical utility. Moreover while tumor tissue biopsies presently remain the gold standard for CTCs and ctDNA analyzes, it is important to question their use as a reference (74). CTCs and ctDNA can be derived from lesions that were not biopsied and may contain a different genetic composition than the tumor biopsies used as a reference.

Although many steps have still to be evaluated and validated, it is anticipated that the progression from “bench-to bedside” of the molecular analysis of CTCs would be critical to aid the personalized treatment of patients with NSCLC. When considering the path that research in this field will follow over the next 5 years there are some key elements which come to mind; firstly, the validation of CTC detection and characterization techniques on large patient cohorts is necessary and secondly 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 next 5 years clinical validation of their diagnostic role in NSCLC will be achieved. Thirdly the development of single cell sequencing technologies offers the opportunity to distinguish complex tumor genomes from single CTCs and along intra-tumor heterogeneity and tumor evolution. Ultimately the overall objective is to optimize the tailoring of personalized therapies to NSCLC patients with CTCs potentially utilized in a diagnostic role and predictive assessments.

### Acknowledgements

The authors are grateful to the patients and their families.

**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). VF is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (grants No. FDT20160435543). CC is supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-CE17-0006-01). 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).

### Footnote

*Conflicts of Interest:* The authors have no conflicts of interest to declare.

### References

1. Jänne PA, Gray N, Settleman J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:709-23.
2. Hiley CT, Le Quesne J, Santis G, et al. Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *Lancet* 2016;388:1002-11.
3. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 2002;297:63-4.
4. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014;25:1681-90.
5. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014;311:1998-2006.
6. Shames DS, Wistuba, II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol* 2014;232:121-33.
7. Massard C, Michiels S, Ferte C, et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov* 2017;7:586-95.
8. 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 for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2013;15:415-53.
9. 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;350:2129-39.
10. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
  11. 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 U S A* 2004;101:13306-11.
  12. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.
  13. 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;11:121-8.
  14. 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;12:735-42.
  15. 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;13:239-46.
  16. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29:2866-74.
  17. Jackman D, Pao W, Riely GJ, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:357-60.
  18. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:75ra26.
  19. Cortot AB, Janne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor- mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev* 2014;23:356-66.
  20. Sacher AG, Janne PA, Oxnard GR. Management of acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2014;120:2289-98.
  21. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
  22. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol* 2013;31:1105-11.
  23. 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.
  24. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* 2016;387:1415-26.
  25. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, 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.
  26. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368:2385-94.
  27. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:2167-77.
  28. Blackhall F, Cappuzzo F. Crizotinib: from discovery to accelerated development to front-line treatment. *Ann Oncol* 2016;27 Suppl 3:iii35-iii41.
  29. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 2010;363:1734-9.
  30. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies. *Ann Oncol* 2016;27 Suppl 3:iii42-iii50.
  31. Katayama R, Khan TM, Benes C, 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.
  32. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, 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.
  33. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med* 2012;4:120ra17.
  34. 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.
35. Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, 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.
  36. Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2014;4:662-73.
  37. Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, et al. Secondary mutations at I1171 in the ALK gene confer resistance to both Crizotinib and Alectinib. *J Thorac Oncol* 2014;9:e86-7.
  38. 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.
  39. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov* 2016;6:1118-1133.
  40. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012;30:863-70.
  41. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013;18:865-75.
  42. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92.
  43. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 2017;168:613-28.
  44. Engelman JA, Settleman J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:73-9.
  45. 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.
  46. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014;14:623-31.
  47. Young R, Pailler E, Billiot F, et al. Circulating tumor cells in lung cancer. *Acta Cytol* 2012;56:655-60.
  48. Ross K, Pailler E, Faugeroux 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.
  49. 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.
  50. 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.
  51. 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.
  52. 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.
  53. 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;105:847-53.
  54. 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.
  55. 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;129:1651-60.
  56. 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.
  57. Lindsay CR, Faugeroux V, Michiels S, et al. A Prospective Examination of Circulating Tumor Cell Profiles in Non-Small-Cell Lung Cancer Molecular Subgroups. *Ann Oncol* 2017. [Epub ahead of print].
  58. 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.
  59. 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.
  60. 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.
  61. He W, Xu D, Wang Z, et al. Detecting ALK-rearrangement of CTC enriched by nanovelcro chip in

- advanced NSCLC patients. *Oncotarget* 2016. [Epub ahead of print].
62. Tan CL, Lim TH, Lim T, 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.
  63. Pailler E, Oulhen M, Billiot F, et al. Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells. *BMC Cancer* 2016;16:477.
  64. Pailler E, Oulhen M, Borget I, et al. Circulating Tumor Cells with Aberrant ALK Copy Number Predict Progression-Free Survival during Crizotinib Treatment in ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Res* 2017;77:2222-30.
  65. 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.
  66. 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.
  67. 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;18:2391-401.
  68. Marchetti A, Del Grammastio M, Felicioni L, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment. *PLoS One* 2014;9:e103883.
  69. Gorges TM, Penkalla N, Schalk T, et al. Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 2016;22:2197-206.
  70. Zhang Z, Shiratsuchi H, Palanisamy N, 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* 2017;12:397-402.
  71. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:472-84.
  72. Jovelet C, Ileana E, Le Deley MC, 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.
  73. Remon J, Caramella C, Jovelet C, et al. Osimertinib benefit in EGFR-mutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA. *Ann Oncol* 2017;28:784-790.
  74. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:3375-82.

**Cite this article as:** Pailler E, Faugeroux V, Oulhen M, Catelain C, Farace F. Routine clinical use of circulating tumor cells for diagnosis of mutations and chromosomal rearrangements in non-small cell lung cancer—ready for prime-time? *Transl Lung Cancer Res* 2017;6(4):444-453. doi: 10.21037/tlcr.2017.07.01

# Matériels et Méthodes

Pour les parties Résultats I, II et III, les matériels et méthodes sont détaillés dans la section « *methods* » de chaque publication. Cette section détaille uniquement les matériels et méthodes de la partie Résultats IV.

## I. Prélèvements sanguins et cytophèreses pour l'étude des cellules tumorales circulantes chez l'Homme

Les patients ont été recrutés à Gustave Roussy et ont été inclus dans l'étude « Liquid Biopsy : CEC/CTC/ADNc » (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. De plus, un amendement autorise à réaliser une cytophèrese chez un nombre limité de patients. Pendant toute la durée de mon Doctorat, j'ai suivi les 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.

## II. 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, Paris, France). Généralement, il est possible de réaliser un filtre ISET par prélèvement (10 mL de sang total). 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 (TA) 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  $\mu\text{m}$ . 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 (Silicon Biosystems, Bologne, Italie), 10 mL de sang sont prélevés sur un tube CellSave puis plus récemment sur un tube Transfix/EDTA. Ces tubes contiennent un anticoagulant et un réactif de préservation qui permettent de conserver le prélèvement pendant 96 heures à TA. 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 est collecté soit sur des tubes CellSave dans le but de trier les CTC à l'échelle de cellule unique soit sur des tubes EDTA pour l'implantation des CTC chez la souris. Pour la première approche, le kit RosetteSep Human CD45 Depletion Cocktail (StemCell, Vancouver, Canada) est utilisé. 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). 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. Pour la seconde approche, le kit RosetteSep CTC Enrichment Cocktail Containing Anti-CD36 (StemCell Technologies) est utilisé. Le RosetteSep est réalisée immédiatement après le prélèvement. Ce kit permet, grâce à un mélange préétabli d'anticorps (CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66b glycophorine A), de former des rosettes en liant les cellules non désirées et les érythrocytes. De même qu'expliqué ci-dessus, les rosettes ainsi formées vont précipiter sur un gradient de Ficoll-Paque PLUS au cours d'une centrifugation de 20 minutes à 1200 rpm.

### III. Implantation de CTC *in vivo* et établissement de modèles de xénogreffes chez la souris

L'implantation de CTC chez les souris pour l'établissement de modèles de xénogreffes et le suivi de ces modèles sont réalisés en collaboration avec Xentech, entreprise de biotechnologie dirigée par le Docteur Jean-Gabriel Judde, dans le cadre d'un projet ANR (CTC-ID 2015).

Un premier prélèvement est réalisé au jour 1 afin d'enrichir les CTC par CellSearch, par filtration ISET et pour contrôler la sérologie du patient. Au jour 2, 30 mL de sang sont prélevés pour l'enrichissement pas RosetteSep et implantation des CTC chez la souris.

Suite à l'enrichissement des CTC par l'approche de sélection négative RosetteSep CTC Enrichment Cocktail Containing Anti-CD36 détaillée dans la section Matériels & Méthodes II-3), les cellules sont resuspendues dans une solution de HBSS (*hank's balanced salt solution*) 1X- SVF (sérum de veau foetal) 2 % et de matrigel (50/50) et conservées sur glace jusqu'à l'injection dans la zone inter scapulaire d'une souris NSG (NOD scid gamma). L'animal est anesthésié avec un mélange de kétamine hydrochloride et xylazine, à 10 et 1 mg/mL respectivement, administré en intrapéritonéal à une dose de 10 mL/kg. L'animal est ensuite tondu et nettoyé avec de la chlorhexidine. Une boutonnière de cinq millimètres est réalisée sur le dos de la souris entre le tiers antérieur et le milieu de la souris à l'aide de ciseaux stériles. La peau de l'animal est ensuite décollée à l'aide de pinces stériles jusqu'à visualiser le pannicule adipeux afin de pouvoir y injecter les 100 µL de suspension cellulaire contenant les CTC. L'incision est fermée par deux agrafes Michel préalablement aseptisées qui seront retirées 1 à 3 semaines après l'injection. L'animal est surveillé jusqu'au réveil. Afin d'identifier précisément l'animal, une puce RFID (radio-identification) est insérée en sous-cutanée dans le flanc droit au moment de l'injection. Lors de l'injection de CTC enrichies à partir d'un prélèvement sanguin d'un patient atteint d'un cancer de la prostate, une capsule de testostérone de 10 mg est insérée dans le flanc gauche de l'animal.

L'animal est ensuite observé quotidiennement et pesé deux fois par semaine. Lorsqu'une tumeur devient palpable, elle est mesurée ( $\text{volume tumoral} = \frac{(\text{longueur} \times \text{largeur})^2}{2}$ ) et suivie jusqu'au sacrifice de l'animal (P0). L'animal est sacrifié par dislocation cervicale lorsque la tumeur atteint une taille de 1770 mm<sup>3</sup> ou lorsque l'animal ne peut être maintenu en vie pour des raisons éthiques (prostration, perte de poids > 30 % ou perte de poids > 20 % trois jours consécutifs). Un fragment de tumeur de 20 mm<sup>3</sup> est alors implanté en sous-cutanée dans la zone inter scapulaire en suivant les recommandations décrites ci-dessus dans trois souris NSG et trois souris Nude (P1). Un fragment de tumeur est fixé dans du formol et transmis au laboratoire d'anatomie pathologique de l'École vétérinaire d'Alfort pour examen histopathologique comprenant une coloration HES et une hybridation ALU afin de



valider l'origine humaine de la tumeur. Lorsque cela est possible et afin de réaliser les analyses phénotypiques et moléculaires du modèle, un fragment de cette tumeur est fixé dans du formol pour une inclusion en paraffine et un second fragment est congelé dans de l'azote liquide. Également, lorsque cela est possible, le sang de la souris est prélevé et les CTC sont enrichies et comptées grâce à l'approche CellSearch.

Le modèle CDX est ensuite maintenu lors de passages successifs. Des fragments de tumeur sont congelés en DMSO (diméthylsulfoxyde), glycérol et par vitrification. Également, des fragments sont fixés dans du formol et congelés dans le l'azote liquide pour les analyses ultérieures. Des tests de décongélation de fragments de tumeur sont réalisés sur 18 souris. L'amplification du modèle CDX est réalisée au P4 avec 25 souris et le stock référent est ainsi constitué. Le modèle est maintenu jusqu'à ce que la décongélation soit validée.

#### **IV. Établissement de lignées cellulaires à partir des tumeurs des modèles de xénogreffes établis**

Suite au sacrifice de la souris, la tumeur est prélevée et transférée dans un Falcon 50 contenant du milieu RPMI (ThermoFisher, Waltham, MA, États-Unis). Lors de la réception, le milieu est aspiré et la tumeur est lavée deux fois avec 50 mL de PBS 1X (*phosphate buffered saline*) puis dans une solution d'antibiotiques (1 mL de pénicilline/streptomycine pour 9 mL de PBS 1X) pendant 10 minutes. La tumeur est ensuite transférée dans une boîte de Pétri pour la dissociation mécanique à l'aide d'un scalpel et d'une pince stériles. La dissociation enzymatique est réalisée avec le kit Tumor Dissociation human (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Allemagne), en suivant les instructions du fournisseur. La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur un filtre de 100 µm puis de 40 µm afin d'éliminer les agrégats cellulaires non dissociés. La suspension cellulaire est lavée deux à quatre fois avec du PBS 1X selon la turbidité afin d'éliminer les débris. Les cellules sont comptées. Les fibroblastes murins sont ensuite éliminés par déplétion à l'aide du kit Mouse Cell Depletion (Miltenyi Biotec) en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant l'automate autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec), programme *depletes*. Les cellules (fibroblastes et cellules cancéreuses) sont comptées et mises en culture dans des plaques 6 puis (TPP, Trasadingen, Suisse) avec du milieu DMEM/F12 (ThermoFisher) 10 % SVF, 1 % antibiotiques et 1 % ultraglutamine. Les lignées cellulaires GR-CDXL3 et GR-CDXL4 sont cultivées dans des plaques recouvertes de poly-L-lysine (Merk, Sigma-Aldrich LLC., Saint-Louis, MO, États-Unis) suivant les instructions du fournisseur. Également, pour ces deux lignées cellulaires établies à partir des modèles CDX, 1 µL d'inhibiteur de ROCK1 10 nM (Y-27632 ; Selleckchem, Houston, TX, États-Unis) est ajouté par millilitre de milieu complet. Les plaques sont observées deux fois par semaine afin de suivre rigoureusement les cellules. Une fois établies, les lignées cellulaires sont trypsinées et six millions de cellules sontensemencées par flacon de culture 75 cm<sup>2</sup>. Dès que cela est possible, les cellules sont congelées pour avoir un stock de cellules précoces. Pour la congélation, les cellules sont trypsinées, centrifugées, comptées puis congelées à hauteur de six millions de cellules par cryotube dans une solution de milieu complet supplémenté de 10 % de DMSO. Les lignées cellulaires établies sont caractérisées d'un point de vue phénotypique et moléculaire aux modèles CDX dont elles sont issues afin de confirmer leur pertinence. Afin de confirmer leur potentiel tumorigène, cinq millions de cellules sont injectées par souris (trois souris NSG et trois souris Nude). Les souris sont suivies comme décrit dans la section Matériels et Méthodes III.

## V. Caractérisation par immunohistochimie des biopsies, des modèles de xénogreffes établis et des lignées cellulaires établies

L'ensemble des échantillons disponibles (biopsies, CDX et lignée cellulaire) pour chacun des modèles GR-CDXL1, GR-CDXL2, GR-CDXL3, GR-CDXL4 et GR-CDXP1 ont été caractérisés par la technique d'IHC. Les techniques et analyses sont réalisées en collaboration avec la plateforme de recherche translationnelle HCP (Histo-CytoPathologie) de Gustave Roussy dirigée par le Professeur Jean-Yves Scoazec.

Les blocs des biopsies pour les patients dont les prélèvements ont permis d'établir les modèles GR-CDXL2, GR-CDXL3, GR-CDXL4 et GR-CDXP1 ont été récupérés dans les centres où les biopsies ont été réalisées. Les tumeurs issues des CDX ont été fixées dans du formol 4 % (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) entre 20 et 30 heures. Des cyto blocs ont été réalisés à partir des culots des lignées cellulaires établies et ont été fixés 1 à 2 heures dans du formol. Suite à cette étape de fixation, les échantillons ont été déshydratés dans l'automate LOGOS (Milestone Srl, Sorisole, Italie) grâce à des bains successifs de formol, éthanol 70 %, éthanol 100 %, propanol et safesolv (substitut du xylène). Les échantillons ont ensuite été inclus en paraffine.

Pour l'ensemble des échantillons inclus en paraffine, des coupes de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées. Après un séchage pendant une nuit à 37°C, les coupes sont conservées à -20°C. La coloration HES (hémalum/éosine/safran) a été réalisée sur l'automate de coloration Tech Inter (TECH-INTER, Thoiry, France). Après déparaffinage des lames dans des bains successifs de xylène et d'alcool, une étape de réhydratation est réalisée. Les IHC ont été réalisées manuellement en utilisant le système de *coverplate* permettant que la technique des lames soit faite verticalement. Deux protocoles ont été mis au point selon l'espèce de l'anticorps primaire (souris ou lapin) afin de limiter le bruit de fond lié à la présence de cellules murines dans les tumeurs CDX. Pour certains marquages, les antigènes sont démasqués dans un tampon EDTA pH8 à 98°C pendant 40 ou 60 minutes (**Tableau 6**). Le kit klear mouse (GBI labs, Bothell, USA) est utilisé pour les IHC avec des anticorps primaires de souris tandis que le kit EnVision rabbit (Agilent Technologies, Dako, Glostrup, Danemark) est utilisé pour les IHC avec des anticorps primaires de lapin. Les anticorps primaires sont incubés 1 heure à TA excepté pour l'anticorps cytokératines 5/6 qui est incubé à 37°C. Les anticorps primaires utilisés ainsi que les conditions de marquages sont récapitulées dans le **Tableau 6**. Lors de chaque expérience, un contrôle positif est ajouté pour chacun des marqueurs. L'ensemble des lames sont ensuite lues avec un microscope Leica DM1000 (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL, USA), interprétées (pourcentage de cellules marquées) et validées par le Docteur Philippe Vielh ou le Professeur Jean-Yves Scoazec.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Clone	Espèce	Dilution	Prétraitement par démasquage
AR	Cell signaling	#5153	D6F11	lapin	1/50	40 minutes
Chromogranine A	DAKO	#M0869	DAK-A3	souris	1/50	40 minutes
CK5/6	DAKO	#M7237	D5/16B4	souris	1/10	40 minutes
CK7	DAKO	#M7018	OV-TL-12/30	souris	1/50	40 minutes
CK8.18	Novocastra	#NCL-L-CK5/6/8/18	5D3, LP34	souris	1/100	40 minutes
Epcam	Cell signaling	#2929S	VU1D9	souris	1/500	40 minutes
Ki67	DAKO	#M7240	MIB-1	souris	1/50	40 minutes
NSE	DAKO	#M0873	BBS/NC/VI-H14	souris	1/100	40 minutes
p40	DBS	#RP 163-05	polyclonal	lapin	1/50	40 minutes
PSA	DAKO	#M075029-2	ER-PR8	souris	1/50	40 minutes
Synaptophysine	DAKO	#M7315	DAK-SYNAP	souris	1/16	60 minutes
TTF1	DAKO	#M3575	8G7G3/1	souris	1/50	40 minutes
Vimentine	Santa Cruz	#SC-6260	V9	souris	1/500	pas de démasquage

**Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés pour les IHC et conditions de marquage.**

## **VI. Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux des lignées cellulaires établies**

La caractérisation phénotypique par cytométrie de flux est réalisée sur lignées cellulaires GR-CDXL1, GR-CDXL3, GR-CDXL4 et GR-CDXP1.

### **1) Détection de l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase**

Pour détecter l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), le kit Aldefluor (StemCell Technologies) est utilisé et permet de détecter les cellules ayant une activité enzymatique c'est-à-dire celles qui sont fluorescentes (aldefluor positives), et les cellules n'ayant pas cette activité c'est-à-dire celles qui ne sont pas (ou peu) fluorescentes. Les lignées cellulaires sont décollées par trypsinisation puis lavées avec du PBS 1X. Après comptage,  $1.10^6$  cellules sont incubées 45 minutes à 37°C dans le tampon ALDH contenant le substrat ALDH spécifique (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Pour contrôle,  $1.10^6$  cellules sont incubées avec l'inhibiteur spécifique de l'enzyme diéthylaminobenzaldehyde (DEAB) dans le tampon ALDH puis le substrat ALDH spécifique. Après incubation, les cellules sont centrifugées et resuspendues dans 300  $\mu\text{L}$  de tampon ALDH. L'acquisition par cytométrie de flux est réalisée avec le cytomètre LSRFortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, États-Unis) couplé au logiciel BD FACSDiva Diva. Les données sont analysées avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter France S.A.S, Roissy CDG, France).

### **2) Caractérisation phénotypique avec des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse et des cellules souches**

Les lignées cellulaires sont décollées par trypsinisation puis lavées avec du PBS 1X. Après comptage,  $2.10^5$  cellules sont incubées 20 minutes à TA avec les anticorps listés dans le **Tableau 7**. Les isotypes correspondants sont utilisés comme contrôles négatifs. Pour les anticorps anti-pan-cytokératines, anti-vimentine et anti-E-cadhérine, une étape de fixation et de perméabilisation préalable au marquage est nécessaire pour l'accès à l'épitope avec le kit Fix&Perm (ThermoFisher), selon les recommandations du fabricant. Après incubation, les cellules sont lavées avec 3 mL de PBS 1X, centrifugées et resuspendues dans 300  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. L'acquisition par cytométrie de flux est réalisée avec le cytomètre LSRFortessa couplé au logiciel BD FACSDiva Diva. Les données sont analysées avec le logiciel Kaluza.

<b>Anticorps</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Référence</b>	<b>Clone</b>	<b>Espèce</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Dilution</b>	<b>Isotypes</b>
EpCAM	BD Pharmingen	347200	EBA-1	souris	APC	1/20	Ms IgG1
CD133-2	Miltenyi	130-098-046	293C3	souris	PE	1/10	Ms IgG2b
CD90	BD Pharmingen	555596	5E10	souris	PE	1/5	Ms IgG1
ABCG2	R&D system	FAB995P	5D3	souris	PE	1/5	Ms IgG2b
CD166	R&D system	FAB6561P	105902	souris	PE	1/100	Ms IgG1
CD24	BD Pharmingen	555428	ML5	souris	PE	1/5	Ms IgG2a
CD44	BD Pharmingen	555478	G44-26	souris	FITC	1/5	Ms IgG2b
Pan-cytokeratins	ebioscience	53-9003-82	AE1/AE3	souris	AF488	1/100	Ms IgG1
E-cadhérine	BD Pharmingen	560061	36/E-Cadherin	souris	AF488	1/200	Ms IgG2a
Vimentine	Santa Cruz	sc-6260	V9	souris	AF488	1/2	Ms IgG1

**Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés pour les marquages en cytométrie de flux et conditions de marquage.**

## VII. Tests pharmacologiques sur les CDX et les lignées cellulaires établis

### 1) *In vivo*

Les tests pharmacologiques *in vivo* sont réalisés dans le cadre de la collaboration avec Xentech dirigé par le Docteur Jean-Gabriel Judde. Dans un premier temps, les agents thérapeutiques reçus par le patient sont utilisés afin de valider les modèles CDX.

Après établissement du modèle, amplification et vérification du stock référent, les tests pharmacologiques sont programmés. Pour cela, un fragment de tumeur de 20 mm<sup>3</sup> est implanté en sous-cutanée dans la zone inter scapulaire de 48 souris Nude en suivant les recommandations décrites dans la section Matériels et Méthodes III. Le taux de prise de greffe est évalué à ~50 % c'est-à-dire qu'à un instant  $t$  (Jour 0) au moins 24 souris ont une tumeur d'un volume compris entre 60 à 200 mm<sup>3</sup> ce qui permet de débiter les tests pharmacologiques. Les souris sont suivies comme décrit dans la section Matériels et Méthodes III. Le RBW (*relative body weight*) est calculé lors de chaque pesée en divisant le poids mesuré par le poids au début du traitement. Le RBW permet d'évaluer la perte de poids de l'animal au cours du traitement. Le TGD (*individual tumor growth delays*) est calculé comme le temps nécessaire pour que la tumeur atteigne un volume 3 à 5 fois supérieur à la tumeur initiale. Le TGD<sub>I</sub> (*tumor growth delay index*) est calculé comme le rapport entre le délai de croissance médian dans le groupe traité et le retard de croissance médian dans le groupe contrôle. Le rapport entre le volume tumoral moyen du groupe traité et le volume tumoral moyen du groupe contrôle est calculé à chaque mesure de tumeurs. Les analyses statistiques sont réalisées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Pour les quatre modèles CDX établis à partir d'un prélèvement sanguin de patient atteint de CBNPC, les tests pharmacologiques sont actuellement en cours. Deux drogues sont évaluées. Trois groupes sont constitués comprenant au minimum huit souris d'un poids supérieur à 20 g et ayant un volume tumoral homogène. Le premier groupe n'est pas traité, le second reçoit du cisplatine (CDDP) à 5 mg/kg une fois par semaine pendant trois semaines et le troisième reçoit du paclitaxel à 15 mg/kg une fois par semaine pendant quatre semaines. Le planning prévisionnel est présenté dans le **Tableau 8**. L'ensemble des résultats seront disponibles en février 2018.

Pour le modèle CDX établis à partir d'un prélèvement cytophérèse d'un patient atteint de mPCa, les tests pharmacologiques seront réalisés début 2018.

Modèle	Semaine de greffe des souris	Semaine prévue pour le début des tests pharmacologiques (t)
GR-CDXL1	41 - 2017	46 - 2017
GR-CDXL2	46 - 2017	2 - 2018
GR-CDXL3	36 - 2017	42 - 2017
GR-CDXL4	39 - 2017	46 - 2017

**Tableau 8 : Planning prévisionnel des tests pharmacologiques pour les modèles CDX poumon.**

## 2) *In vitro*

Pour les tests pharmacologiques *in vitro*, la lignée cellulaire A549 est utilisée comme référence. Pour chacune des lignées cellulaires, le temps de doublement est évalué précisément afin que les cellules est au moins un doublement lors du temps d'incubation avec la drogue. A l'heure actuelle, les tests pharmacologiques ont été réalisés uniquement sur la lignée cellulaire GR-CDXL1 avec les agents thérapeutiques reçus par le patient c'est-à-dire le CDDP et le docétaxel.

Au jour 0, les lignées cellulaires GR-CDXL1 et A549 sontensemencées respectivement à 9000 (puits A, B, C, D) et 3000 cellules (puits E, F, G, H) par puits dans une plaque 96 puits Falcon noire (Corning Inc., NY, États-Unis) puis incubées à 37°C 5 % CO<sub>2</sub> pendant 48 heures (**Figure 24**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible	→								[drogue] la plus forte
<b>B</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible									[drogue] la plus forte
<b>C</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible									[drogue] la plus forte
<b>D</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible									[drogue] la plus forte
<b>E</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible									[drogue] la plus forte
<b>F</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible									[drogue] la plus forte
<b>G</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible									[drogue] la plus forte
<b>H</b>	PBS 1X	diluant de la drogue	[drogue] la plus faible									[drogue] la plus forte

**Figure 24 : Plan de plaque 96 puits pour les tests pharmacologiques *in vitro*.**

Au jour 2, pour chacune des drogues, les dilutions sont préparées dans une plaque Eppendorf Deepwell 96 (Eppendorf France SAS, Montesson, France). Afin de déterminer le volume initial de drogue à prélever, la formule suivante est appliquée :

$$V_{\text{initial}} = \frac{C_{\text{finale}} \times V_{\text{final}} \times \text{facteur de dilution}}{C_{\text{initiale}}}$$

$V_{\text{initial}}$  en litres,  $C_{\text{finale}}$  en mol/litres (molaire),  $V_{\text{final}}$  en litres et  $C_{\text{initiale}}$  en mol/litres (molaire)

Le facteur de dilution à considérer est de 10 car dans chacun des puits, 20 µl de drogue sont déposés dans 180 µl de milieu de culture. Les concentrations initiales du CDDP et du docétaxel sont



respectivement de  $3,33.10^{-3}$  M et  $24,8.10^{-3}$  M. La préparation de la drogue est réalisée de la concentration la plus forte à la concentration la plus faible en faisant des dilutions en cascade au tiers (**Tableau 9**).

Drogues	Concentrations										
<b>CDDP (<math>\mu</math>M)</b>	0,01	0,03	0,09	0,27	0,82	2,46	7,4	22,2	66,7	200	
<b>Docétaxel (nM)</b>	0,023	0,069	0,21	0,62	1,87	5,6	16,8	50,4	151,1	453,6	

**Tableau 9 : Concentrations de drogues utilisées pour les tests pharmacologiques sur les lignées cellulaires.**

Lorsque la préparation des drogues à la concentration souhaitée est terminée, la drogue peut être déposée dans chacun des puits. Dans les premiers puits c'est-à-dire la colonne 2, le diluant de la drogue est ajoutée comme contrôle. Puis, dans les puits des colonnes 3 à 12, 20  $\mu$ l de drogue à la concentration souhaitée sont ajoutés par puits en suivant le plan de plaque présenté **Figure 24**. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C 5 % CO<sub>2</sub> pendant 96 heures. À noter que pour chaque concentration de drogue, quatre puits sont réalisés.

Au jour 5, le test de viabilité cellulaire est réalisé avec le kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega Biosciences LLC, madison, WIS, États-Unis) en suivant les instructions du fournisseur. La luminescence est lue grâce au Viktor X4 Series Multilabel Plate Readers (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, États-Unis).

En parallèle, au jour 0 les lignées cellulaires sontensemencées de façon similaire dans une seconde plaque 96 puits Falcon noire puis incubées à 37°C 5 % CO<sub>2</sub> pendant 48 heures. La luminescence est lue au jour 2 c'est-à-dire le jour où la drogue est ajoutée comme indiqué ci-dessus. Ces valeurs de luminescence sont comparées à celles des puits contrôles c'est-à-dire les puits contenant uniquement le diluant de la drogue afin de vérifier qu'au moins un doublement des cellules a eu lieu lors du temps d'incubation avec la drogue. Si cela n'est pas le cas, les données ne sont pas interprétées.

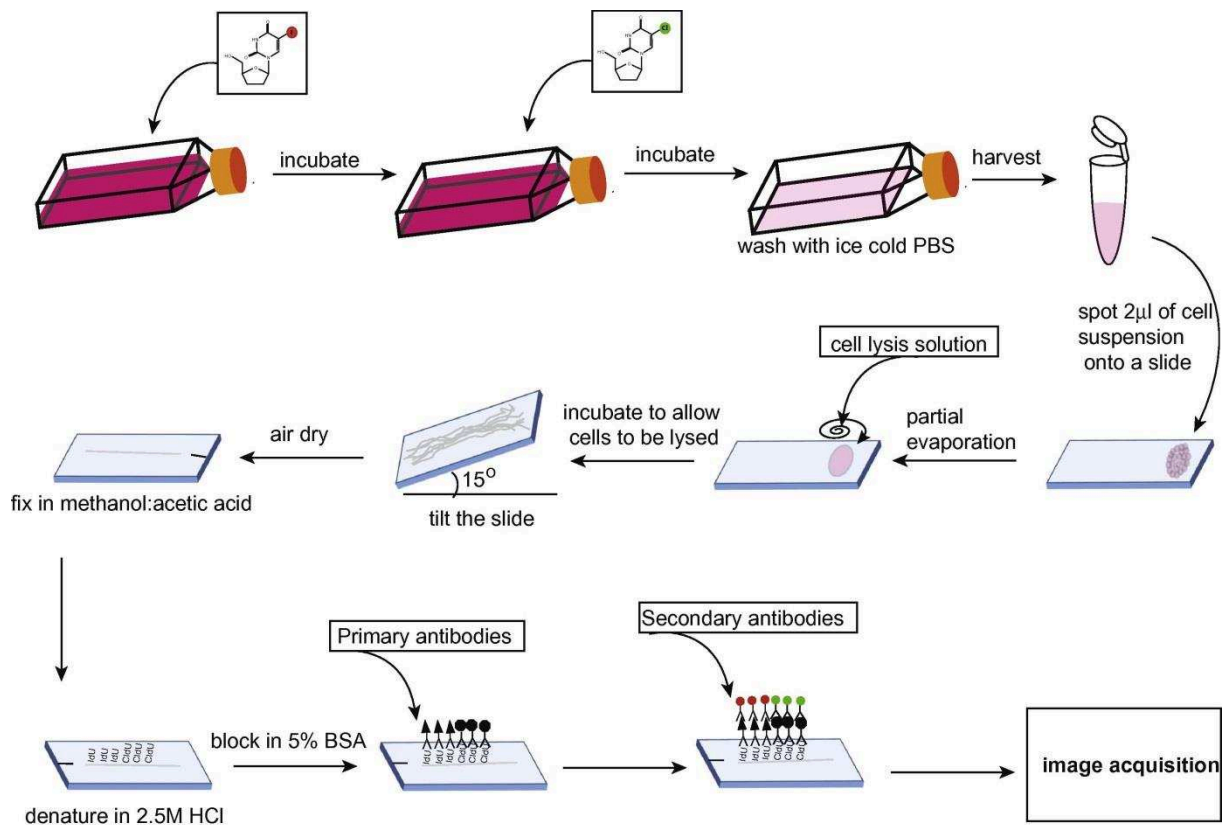
Pour les analyses, les valeurs de luminescence sont normalisées par rapport aux puits contrôles c'est-à-dire les puits contenant uniquement le diluant de la drogue. Les données sont ensuite traitées en utilisant le modèle « log(inhibitor) vs response – variable slope (four parameters) ».grâce au logiciel GraphPad Prism V7.

## VIII. Caractérisation du stress réplicatif dans les lignées cellulaires établies

La caractérisation du stress réplicatif a été réalisée pour la lignée cellulaire GR-CDXL1 établie à partir de la tumeur du CDX GR-CDXL1. Pour l'ensemble des expériences, les lignées cellulaires A549 et NCI-H1975 de CBNPC obtenues auprès de l'ATCC (*american type culture collection*) ont été utilisées comme références.

### 1) Mise en évidence des fibres d'ADN par immunofluorescence pour l'étude des fourches de réplication par la technique de *DNA fibre (DNA spreading)*

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits. La technique est réalisée sur des cellules en phase de prolifération (~50% de confluence). La **Figure 25** récapitule l'ensemble des étapes de cette technique. Pour le marquage des fourches de réplication, les cellules sont incubées 20 minutes à 37°C avec du milieu contenant de l'iododesoxyuridine (IdU) 25 µM puis rincées deux fois avec 4 mL de milieu préchauffé. Les cellules sont ensuite incubées 20 minutes à 37°C avec du milieu contenant du chlorodesoxyuridine (CldU) 50 µM. Suite à ce marquage, les cellules sont trypsinées, rincées et resuspendues dans 300 µL de PBS froid. Les cellules sont comptées puis une goutte de suspension cellulaire à 500000 cellules/mL est déposée en haut de la lame et incubée 3 minutes. Afin de lyser les cellules, 7 µL de tampon *spreading* (200 µl de Tris 1M pH 7.5 ; 100 µl de EDTA 0.5M pH 8 ; 50 µl de SDS 10% ; 650 µl d'Eau MilliQ) sont déposés et incubés 3 minutes. Les lames sont ensuite inclinées entre 3 et 5 minutes afin que les fibres d'ADN s'étalent. Les lames sont séchées à TA puis fixées pendant 10 minutes à TA dans une solution de méthanol/acide acétique 3:1. Après deux lavages de 5 minutes dans de l'Eau MilliQ, l'ADN est dénaturé dans une solution de dénaturation 2,5 M HCl pendant 1 heure. Les lames sont rincées deux fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X. Afin de diminuer le marquage aspécifique, les lames sont lavées deux fois dans une solution de blocage (100 mL de PBS, 1 g de BSA (albumine de sérum bovin), 100 µl de Tween 20) puis incubées 1 heure dans cette même solution. L'immunofluoromarkage est ensuite réalisée avec les anticorps et selon les conditions de marquage précisées dans le **Tableau 10**.



**Figure 25 : Représentation schématique de la technique de *DNA fibre* ou *DNA spreading*.**

Figure reproduite avec l'autorisation de Elsevier, *Methods*, [Nieminuszczy J. *et al.*, *Methods*, 2016], copyright 2016.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Clone	Espèce	Fluorochrome	Dilution	Conditions
Anti-BrdU (IdU)	BD Biosciences	347580	B44	souris	-	1/20	1 heure TA
Anti-BrdU (CldU)	AbCys	bC117-7513	BU1/75	rat	-	1/100	1 heure TA
Anti-mouse	ThermoFisher	A-11032	polyclonal	chèvre	AF594	1/100	30 minutes 37°C
Anti-rat	ThermoFisher	A-21470	polyclonal	poulet	AF488	1/100	30 minutes 37°C
Anti-DNA	Merck	MAB3034	16-19	souris	-	1/100	45 minutes 37°C
Anti-mouse	ThermoFisher	A-21062	polyclonal	lapin	AF350	1/100	20 minutes 27°C

**Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés pour la technique de *DNA spreading* et conditions demarquage.**

Les lames sont ensuite montées avec du milieu de montage sans DAPI (Dako). La digitalisation des lames et l'analyse des fourches de réplication sont réalisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Eclipse Ti Nikon (Nikon Instrument Europe B.V., Surrey, England).

## 2) Quantification des cassures double brin de l'ADN par immunofluorescence

Pour des raisons techniques, les lignées de référence A549 et NCI-H1975 sont ensemencées à 150000 cellules/mL sur des lamelles dans une plaque 6 puits 24 heures avant la technique tandis que

les cellules de la lignée GR-CDXL1 qui poussent sous forme de grappes, sont cultivées dans des flacons de culture 75 mm<sup>2</sup> puis cyto-centrifugées. Les cellules sont ensuite fixées 20 minutes à RT avec une solution de PBS-PFA 4 % (*phosphate buffered saline-paraformaldéhyde*). Après un lavage avec du PBS 1X à TA, les cellules sont perméabilisées 10 minutes à TA avec une solution de PBS-Triton 0,5 % (Merck, Sigma-Aldrich Co LLC). Les lames sont lavées trois fois 5 minutes avec du PBS 1X puis les anticorps primaires dilués dans du PBS-BSA 3 % sont incubés selon les conditions décrites dans le **Tableau 11**.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Clone	Espèce	Fluorochrome	Dilution	Conditions
53BP1	abcam	ab21083	polyclonal	lapin	Ac II AF555	1/300	1 heure RT
CyclinA	abcam	ab16726	polyclonal	souris	Ac II AF488	1/200	1 heure RT

**Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés pour la quantification des cassures doubles brin de l'ADN et conditions de marquage.**

Les lames sont ensuite lavées trois fois 5 minutes avec du PBS 1X puis les anticorps secondaires spécifiques sont incubés 30 minutes à TA. Les noyaux des cellules sont marqués avec du DAPI pendant 15 minutes puis les lames sont montées avec du milieu de montage l'bid (Biovalley, Nanterre, France). Les lames sont conservées au minimum 1 heure 30 à +4°C avant d'être scannées (objectif 63X) sur le scanner Ariol (Leica Biosystems Richmond Inc.) selon le principe décrit dans la partie Résultats II. Pour l'analyse, 200 cellules sont sélectionnées.

### **3) Mise en évidence des voies de signalisation et de réparation des cassures de l'ADN par la technique de *western blot***

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture 75 mm<sup>2</sup> 48 heures avant l'extraction des protéines. Après deux lavages dans du PBS 1X, les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir en plastique. Les cellules sont resuspendues dans le tampon NETN (NaCl EDTA Tris NP40). Après une incubation sur glace pendant 30 minutes, les échantillons sont soniqués pendant 15 secondes. Les échantillons sont ensuite dénaturés 10 minutes à 90-95°C dans le tampon de dénaturation Laemmli puis congelés à -20°C. Le dosage protéique est réalisé selon la méthode de Bradford et 30 µg de lysats protéiques sont utilisés pour chaque expérience. Après électrophorèse sur gel d'acrylamide, les protéines sont transférées sur membranes de nitrocellulose. Après saturation de la membrane avec du PBS-Tween 0,1%-5% lait pendant 1 heure sous agitation douce, les anticorps primaires sont dilués dans une solution de PBS-Tween 0,1%-1% lait ou TBS-Tween 20-1% lait et incubés une nuit à +4°C

sous agitation. Les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 12**. Les protéines  $\beta$ -caténine ou  $\beta$ -actine sont utilisées comme contrôles.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Clone	Espèce	Dilution	Poids moléculaires (kDa)
Chk1	Santa Cruz	sc-8408	G-4	souris	1/1000	56
Phospho-Chk1 (Ser345)	Cell Signaling	2348	133D3	lapin	1/1000	56
Chk2	Santa Cruz	sc-5278	A-12	souris	1/500	66
Phospho-Chk2 (Thr68)	Cell Signaling	2661	polyclonal	lapin	1/1000	62
PARP	Cell Signaling	9542	polyclonal	lapin	1/1000	116 89 (clivé)
PCNA	Santa Cruz	sc-56	PC10	souris	1/4000	36
Ubiquityl-PCNA (Lys164)	Cell Signaling	13439	D5C7P	lapin	1/1000	44
Rad51	Merck	PC130	polyclonal	lapin	1/25000	36
$\beta$ -actin	Merck	A5441	AC-15	souris	1/10000	42
$\beta$ -catenin	BD Biosciences	610153	14/beta-catenin	souris	1/10000	92

**Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés pour les *western blots* et conditions de marquage.**

Après trois lavages de 5 minutes avec du PBS-Tween 0,1% sous agitation douce, les membranes sont incubées pendant 45 minutes à TA sous agitation douce avec les anticorps secondaires spécifiques conjugués à la HRP (*horseradish peroxidase*) dilués au 1/5000 dans une solution de PBS-Tween 0,1%-1% lait. Après trois lavages de 5 minutes avec du PBS-Tween 0,1% sous agitation douce, les membranes sont incubées dans une solution de peroxyde et une solution de *luminol enhancer* 1:1 pendant 1 minute. La révélation est réalisée par électrochimiluminescence (ECL).

## **IX. Détection, isolement et caractérisation de cellules tumorales circulantes uniques**

- 1) Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par filtration ISET et isolement de cellules uniques par microdissection laser**

Cette partie est détaillée dans la section « *methods* » des Résultats III.

- 2) Caractérisation phénotypique par immunofluorescence des cellules tumorales circulantes enrichies par RosetteSep et isolement de cellules uniques par tri cellulaire**

Cette partie est détaillée dans la section « *methods* » des Résultats III.

- 3) Détection des cellules tumorales circulantes épithéliales par CellSearch et isolement de cellules uniques par le *puncher***

Cette partie est détaillée dans la section « *methods* » des Résultats III.

## X. Caractérisation moléculaire des biopsies, des CTC, des CDX et des lignées cellulaires établis

Pour la caractérisation moléculaire des modèles GR-CDXL1, GR-CDXL2, GR-CDXL3, GR-CDXL4 et GR-CDXP1, l'ensemble des échantillons disponibles (ADN constitutionnel, biopsies, CTC, cellules CD45+, CDX et lignée cellulaire) sont analysés.

### 1) Extractions de l'ADN et de l'ARN du sang total, des biopsies, des CDX et des lignées cellulaires

#### a. Réalisation de copeaux de tissus fixés et inclus en paraffine

Pour les blocs de biopsies des patients dont les prélèvements ont permis d'établir les modèles GR-CDXL2, GR-CDXL3, GR-CDXL4 et GR-CDXP1, des copeaux ont été réalisés afin d'extraire l'ADN et l'ARN pour les analyses moléculaires. La technique est réalisée en collaboration avec la plateforme de recherche translationnelle HCP (Histo-CytoPathologie) de Gustave Roussy dirigée par le Professeur Jean-Yves Scoazec.

Pour cela, la zone tumorale est cerclée et le pourcentage de cellules tumorales est déterminé par le pathologiste. Un nombre variable de copeaux de 10 µm est réalisé (**Tableau 13**) et mis dans un tube. Les copeaux sont conservés à +4°C jusqu'à l'extraction de l'ADN et l'ARN.

Modèle	Biopsie	Pourcentage de cellules tumorales	Copeaux
GR-CDXL1	-	-	-
GR-CDXL2	14R01287	30%-50%	25
GR-CDXL3	17R00217	50%	10
GR-CDXL4	16H10378	60%-70%	6
	16R00870	20%	20
GR-CDXP1	17R393-1	30%	4
	17R393-2	50%-60%	4
	17R394-1	50%-60%	9
	17R394-2	30%-50%	12
	17R394-3	30%-70%	14
	17R394-4	50%-70%	7
	17R394-5	50%-60%	6
	17R394-6	50%-60%	8

**Tableau 13 : Pourcentage de cellules tumorales et nombre de copeaux réalisés pour les biopsies de patients dont les prélèvements ont permis l'établissement de CDX.**

#### **b. Extraction de l'ADN et de l'ARN des biopsies et des modèles de xénogreffes établis**

Les extractions de l'ADN et de l'ARN à partir des copeaux des biopsies de patients sont réalisées par IntegraGen (Evry, France) dirigé par le Docteur Emmanuel Martin. Les extractions de l'ADN et de l'ARN des fragments de tumeurs congelées des CDX sont réalisées avec le kit AllPrep ADN/ARN (Qiagen, Hilden, Allemagne) par la plateforme de recherche transitionnelle BMO (Biopathologie Moléculaire) de Gustave Roussy dirigée par le Docteur Ludovic Lacroix.

### **2) Extraction de l'ADN des lignées cellulaires établies**

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir d'un culot sec de chaque lignée cellulaire ( $\sim 2 \cdot 10^6$  cellules) avec le kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

### **3) Extraction de l'ADN constitutionnel à partir de sang total**

L'extraction de l'ADN constitutionnel est réalisée à partir de 100  $\mu$ L de sang total avec le kit DNeasy Blood & Tissue selon les instructions du fournisseur.

### **4) Préparation des échantillons de CTC isolées**

Les étapes de contrôle de qualité, conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin et de purification sont uniquement réalisées pour les échantillons ayant subi un WGA.

#### **a. Amplification totale du génome**

Cette partie est détaillée dans la section « *methods* » des Résultats III.

#### **b. Contrôles de qualité**

Pour contrôler la qualité des WGA, le contrôle qualité (QC2) développé par le groupe de Christopher Klein et actuellement commercialisé par Silicon Biosystems dans le kit *Ampli1 QC* [Polzer B. *et al.*, EMBO Mol Med, 2014] a été utilisé. Les caractéristiques des amplicons sont présentées dans le **Tableau 14**. 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. 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.

La PCR multiplexe est réalisée avec le Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher) puis les échantillons sont migrés sur un gel d'agarose 2 %.

Gène	Localisation génomique	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille du produit de PCR (pb)
CK19	6p	gaagatccgactgtac	ttcatgctcagccgtgactg	614
TP53	17q	gaagtgtctcatgctggatc	cagccaaccctgtcctta	301
D5S2117	5q	ccaggtgagaacctagtcag	actgtgtcctccaacctatgg	147
KRAS	12p	ataaggcctgctgaaaatgac	ctgaattagctgtatcgcaagg	91

**Tableau 14. Liste des gènes de la PCR multiplexe pour les contrôles de qualité (QC2).**

#### c. 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.

#### d. Purification des échantillons de WGA

Les échantillons de WGA sont purifiés avec les billes Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter France S.A.S) 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 26**). La purification est réalisée en plaque 96 puits en suivant les instructions du fournisseur. L'élution est réalisée dans 27,5  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O sans nucléase.

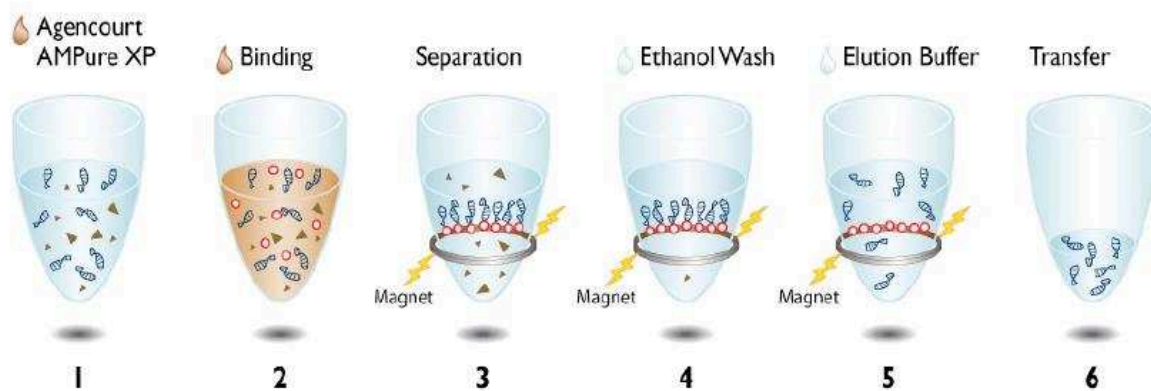


Figure 26 : Purification des échantillons de WGA par la technique d'immobilisation réversible de l'ADN sur phase solide.

## 5) Approche de PCR multiplexes ciblées et séquençage à haut débit de nouvelle génération (technologie Ion Torrent suites)

### a. Dosage des échantillons

Le dosage de l'ensemble des échantillons 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 l'échantillon est préparée puis, après 2 minutes d'incubation, le tube est placé dans la cavité prévue de l'appareil. La mesure est réalisée instantanément.

### b. Séquençage haut débit par la technologie Ion Torrent suites

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 une PCR multiplexe ciblant un panel de mutations cancer suivie d'un séquençage à haut débit avec les systèmes Ion PGM (*personal genome machine*) ou Ion S5 (ThermoFisher). Les mises au point ne sont pas détaillées dans ce manuscrit.

Trois grandes étapes sont nécessaires et sont réalisées suivant les instructions du fabricant. La première correspond à la préparation des bibliothèques incluant notamment la PCR AmpliSeq (**Figure 27**). La PCR multiplexe est réalisée à l'aide du panel Ampli1 CHPCustom Beta développé par Silicon Biosystems ciblant 48 gènes et plus de 1200 mutations cancer *hotspots* (**Tableau 15**). Ce panel comprend 315 amplicons ; 151 amplicons ciblent des régions exoniques afin de mettre en évidence les mutations cancer *hotspots* et 164 ciblent des régions spécifiques permettant de mettre en évidence la

variabilité du nombre de copies (CNV). 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. Ces étapes peuvent également être réalisées avec l'automate *Ion Chef System*. 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<sup>+</sup> 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.

Gènes ciblés			
<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 15 : Listes des gènes ciblés par le panel Ampli1 CHPCustom Beta développé par Silicon Biosystems.**

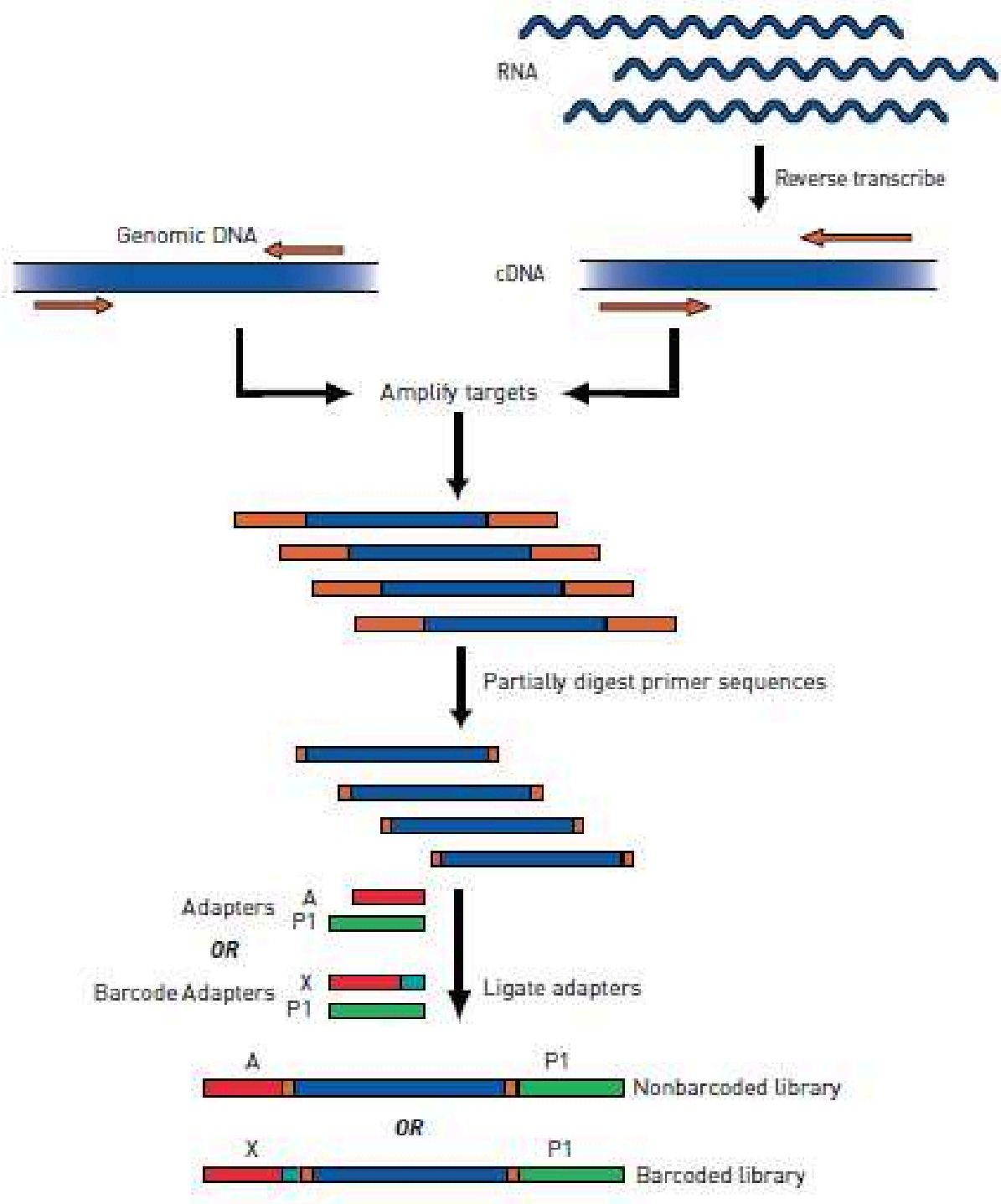


Figure 27 : Préparation des librairies pour le séquençage à haut débit de nouvelle génération avec le PGM Ion Torrent.

Suite au séquençage, les données brutes c'est-à-dire les ionogrammes, sont regroupées dans un fichier DAT qui contient la conversion des mesures brutes de pH en mesures numériques des voltages. Un algorithme spécifique permet de convertir ces données en séquences. La première étape de *trimming* permet d'éliminer les adaptateurs puis est suivie d'une étape de « filtres » qui permet d'éliminer les *reads* de petites tailles, de mauvaise qualité ainsi que les polyclonaux. Le système Ion Torrent génère un rapport de contrôle qualité incluant des contrôles de qualité avec notamment les profondeurs de couverture pour chacun des amplicons ainsi qu'un fichier BAM (*binary alignment/map*) non aligné par échantillon. Le *genome mapping* c'est-à-dire l'alignement des séquences du patient sur le génome de référence humain GRCh37/hg19 puis la détection et la quantification des variants par rapport au génome de référence appelée *variant calling* sont ensuite réalisés et les fichiers *variant caller* sont générés. Dans cette étude, seuls les amplicons ciblant les mutations *hotspots* sont analysés. Les variants homozygotes et hétérozygotes sont extraits pour chacun des échantillons puis la comparaison entre les différents échantillons d'un même patient est faite afin de mettre en évidence les variants communs. Les mutations *hotspots* sont également extraites pour chacun des échantillons.

## 6) Approche de séquençage de l'exome

Cette partie est détaillée dans la section « *methods* » des Résultats III.

## 7) Analyses bio-informatiques

Afin d'avoir un aperçu des données issues du séquençage d'exome, les premières analyses bio-informatiques des échantillons biopsies, CDX et lignées cellulaires sont réalisées à l'aide du logiciel en ligne SIRIUS développé par Integragen permettant de filtrer et analyser les variants d'intérêt. Pour cela, un variant est considéré comme d'intérêt selon les critères suivants : i) variant somatique, ii) impact et conséquence modérés ou élevés, iii) score somatique = 30 ; iv) nombre d'allèles mutées  $\geq 3$ , v) fréquence allélique  $\geq 10$  %, vi) profondeur de couverture de l'échantillon et de l'ADN constitutionnel  $\geq 6$ , vii) fréquence  $\leq 0,5$  % dans les bases de données ExAC et IntegraGen afin d'exclure les polymorphismes, viii) exclusion des variants ayant une prédiction d'impact sur la protéine « *benign* » (PolyPhen-2) ou « *tolerate* » (SIFT).

L'ensemble des analyses bio-informatiques approfondies sont ensuite réalisés avec le service GeCo (*Advances genomic Consulting Services*) d'IntegraGen.

# Résultats

## I. Étude de l'influence des sous-groupes moléculaires de CBNPC sur l'expression de la vimentine par les CTC et sur leur valeur pronostique

**Article 1. A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups. *Ann Oncol.* 2017 Jul 1;28(7):1523-1531.**

Lindsay CR, Faugeroux V, Michiels S, Pailler E, Facchinetti F, Ou D, Bluthgen MV, Pannet C, Ngo-Camus M, Bescher G, Caramella C, Billiot F, Remon J, Planchard D, Soria JC, Besse B, Farace F.

Publication reproduite avec l'autorisation de Oxford University Press, *Annals of Oncology*, copyright 2017.

L'objectif de cette étude était d'évaluer dans quelle mesure l'appartenance à différents sous-groupes moléculaires pouvait influencer certaines caractéristiques phénotypiques (expression d'un marqueur de la TEM) des CTC, leur nombre et donc leur valeur pronostique. Un parti pris dès le départ a été de détecter les CTC par la méthode CellSearch en ajoutant l'anticorps vimentine dans le canal libre du système. Il est admis que ce travail ne couvre qu'une partie du spectre phénotypique de la TEM et ne permet d'évaluer que les CTC engagées dans les premières phases de ce processus. L'approche choisie ne permet de distinguer que deux types de CTC, les CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup>/vimentine<sup>-</sup> et les CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup>/vimentine<sup>+</sup>, de les compter et d'évaluer leur valeur pronostique. L'hypothèse est ici d'évaluer dans quelle mesure l'expression de la vimentine par des CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup> pourrait refléter l'évolution vers un phénotype plus agressif associé à une évolution clinique plus défavorable. Le choix du CellSearch a été guidé par la robustesse, la simplicité et la reproductibilité de la méthode, cette question n'étant pas évaluable après enrichissement par filtration ISET compte tenu de la lourdeur expérimentale de ce type de technique. Il est donc assumé que ce travail ne prend pas en compte des CTC plus engagées dans le processus de TEM du fait de la « *down-regulation* » d'EpCAM.

Les prélèvements sanguins de 125 patients atteints de CBNPC à un stade IIIb-IV classés en sous-groupes en fonction des anomalies moléculaires présentes dans leurs biopsies, ont été analysés par la méthode CellSearch avec la vimentine dans le canal libre. Le nombre total de CTC ainsi que les nombres de CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup>/vimentine<sup>-</sup> et EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup>/vimentine<sup>+</sup> ont été corrélés à l'OS et à la PFS des patients. Avant tout traitement, 54,4 % des patients présentaient au

moins une CTC EpCAM+/pan-cytokératines+, 40,8 % d'entre eux présentaient au moins deux CTC et 19,2 % avaient au moins cinq CTC. Vingt-trois pourcents des patients avaient au moins une CTC EpCAM+/pan-cytokératines+/vimentine+, 14,4 % en avaient au moins deux, 5,6 % en avaient au moins cinq. Les patients avec au moins cinq CTC totales ont une OS médiane réduite par rapport aux patients avec moins de cinq CTC (respectivement 197 jours *versus* 386). En revanche, la présence d'au moins une CTC EpCAM+/pan-cytokératines+/vimentine+ ne modifie pas l'OS des patients. Lorsque des altérations génétiques ont été recherchées chez 104 des 125 patients, 69 d'entre eux ont présenté au moins une anomalie génétique potentiellement « actionnable ». Parmi ces patients, 22 ont des mutations du gène *KRAS*, 21 des mutations activatrices d'*EGFR* et 13 patients un remaniement du gène *ALK*.

Cette étude confirme les travaux publiés par l'équipe de Caroline Dive [Krebs M. G. *et al.*, *J Clin Oncol*, 2011] ainsi que des résultats plus récents dans des cohortes limitées de patients montrant qu'un seuil supérieur ou égal à cinq CTC chez des patients atteints de CBNPC à un stade avancé est un facteur de mauvais pronostic et est significativement associé avec une diminution de l'OS. Il montre également que les patients porteurs du remaniement *ALK* ont significativement moins de CTC totales que les patients ne présentant pas cette anomalie. Une tendance identique mais non significative a été observée chez les patients porteurs d'une mutation activatrice d'*EGFR* alors qu'aucune différence en nombres totaux de CTC n'a été observée entre les patients porteurs d'une mutation *KRAS* et ceux qui ne présentent pas cette anomalie moléculaire. De plus, les patients porteurs d'une mutation activatrice d'*EGFR* présentaient un taux significativement plus élevé de CTC EpCAM+/pan-cytokératines+/vimentine+ que les patients négatifs pour cette anomalie. Nous avons observé une totale absence de CTC EpCAM+/pan-cytokératines+/vimentine+ chez les patients porteurs d'une mutation *KRAS*. Aucune différence significative n'a été observée chez les patients porteurs ou non du remaniement *ALK*. Bien que préliminaires, ces résultats confirment l'hypothèse initiale qui est que les sous-groupes moléculaires présents dans les CBNPC diffèrent par le nombre total de CTC épithéliales (EpCAM+/pan-cytokératines+) et de CTC épithéliales engagées dans la TEM (EpCAM+/pan-cytokératines+/vimentine+). Ces résultats pourraient donc refléter les caractéristiques biologiques intrinsèques de chaque sous-groupe moléculaire, leur potentiel de dissémination et le mécanisme de leur progression métastatique. Dans la limite de notre analyse qui n'évalue que les CTC épithéliales EpCAM+/pan-cytokératines+, des taux plus élevés de CTC exprimant la vimentine chez les patients porteurs de mutations d'*EGFR* suggèrent une plus grande plasticité et des propriétés migratoires et d'invasivité des CTC dans ce sous-groupe moléculaire. Enfin, pour les patients porteurs de remaniement du gène *ALK*, le très faible nombre de patients présentant des CTC par la méthode CellSearch suggère une perte de l'expression d'EpCAM par les CTC dans ce sous-groupe moléculaire.

Ces résultats corroborent parfaitement les travaux menés par Emma Pailler dans le laboratoire montrant que les CTC porteuses du remaniement du gène *ALK* ont un phénotype purement mésenchymateux évalué par l'expression de la N-cadherine et de la vimentine et l'absence d'expression d'E-cadherine et de cytokératines. Ces résultats ainsi que ceux décrits par Farace F. *et al.* en 2011 montrent la nécessité d'utiliser d'autres techniques d'enrichissement et de détection des CTC indépendantes de l'expression d'EpCAM pour caractériser le statut de biomarqueurs prédictifs dans les CTC et étudier l'hétérogénéité moléculaire des CTC dans le CBNPC [Farace F. *et al.*, Br J Cancer, 2011].



## ORIGINAL ARTICLE

# A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups

C. R. Lindsay<sup>1</sup>, V. Faugeroux<sup>1</sup>, S. Michiels<sup>2</sup>, E. Pailler<sup>1</sup>, F. Facchinetti<sup>1</sup>, D. Ou<sup>3</sup>, M. V. Bluthgen<sup>3</sup>, C. Pannet<sup>3</sup>, M. Ngo-Camus<sup>4</sup>, G. Bescher<sup>3</sup>, C. Caramella<sup>5</sup>, F. Billiot<sup>1</sup>, J. Remon<sup>3</sup>, D. Planchard<sup>3</sup>, J.-C. Soria<sup>1,4</sup>, B. Besse<sup>1,3\*</sup> & F. Farace<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U981, University of Paris-Sud XI, Translational Research Laboratory, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France; <sup>2</sup>Department of Biostatistics and Epidemiology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France; <sup>3</sup>Department of Cancer Medicine, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France; <sup>4</sup>Drug Development Department, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France; <sup>5</sup>Department of Radiology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

\*Correspondence to: Prof. Benjamin Besse, Department of Medical Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France. Tel: +33-1-42-11-43-22; E-mail: benjamin.besse@gustaveroussy.fr

**Background:** We report the first study examining the clinical, numerical and biological properties of circulating tumor cells according to molecular subtypes of non-small-cell lung cancer.

**Patients and methods:** 125 patients with treatment-naïve stage IIIb-IV NSCLC were prospectively recruited for CellSearch analysis. Anti-vimentin antibody was included for examination of CTCs to assess their mesenchymal character. Associations of total CTCs and vimentin-positive (vim+) CTCs with clinical characteristics, tumor genotype, and survival were assessed.

**Results:** 51/125 patients (40.8%) were total CTC+ and 26/125 (20.8%) were vim CTC+ at baseline. Multivariate analysis showed patients with  $\geq 5$  total CTCs had significantly reduced OS (HR 0.55, 95% CI 0.33–0.92,  $P = 0.022$ ) but not PFS (HR 0.68, 95% CI 0.42–1.1,  $P = 0.118$ ) compared to patients with  $< 5$  total CTCs. No OS difference was evident between vim+ CTC and vim-negative CTC patients overall (HR 1.24, 95% CI 0.67–2.28,  $P = 0.494$ ), but after subdivision according to NSCLC driver mutation, we found an increase of vim+ CTCs in the *EGFR*-mutated subgroup ( $N = 21/94$  patients; mean 1.24 vs 1.22 vim+ CTCs,  $P = 0.013$ ), a reduction of total CTCs in the *ALK*-rearranged subgroup ( $N = 13/90$  patients; mean 1.69 vs 5.82 total CTCs,  $P = 0.029$ ), and a total absence of vim+ CTCs in *KRAS*-mutated adenocarcinomas ( $N = 19/78$  patients; mean 0 vs 1.4 vim+ CTCs,  $P = 0.006$ ).

**Conclusions:** We validate that the baseline presence of  $\geq 5$  total CTCs in advanced NSCLC confers a poor prognosis. CTCs from *EGFR*-mutant NSCLC express epithelial–mesenchymal transition characteristics, not seen in CTCs from patients with *KRAS*-mutant adenocarcinoma.

**Key words:** CTC, circulating tumor cell, non-small-cell lung cancer, vimentin, EMT, biomarker

## Introduction

Circulating tumor cells (CTCs) represent an alternative source of tumor tissue which are accessible using a simple blood test. Their use has the potential to allow longitudinal monitoring of tumor biology at different timepoints, guiding therapeutic decisions according to resistance in a patient's treatment course [1]. In non-small cell lung cancer (NSCLC), their optimization is particularly relevant given that an increasing demand for sequencing of

multiple genes in 'umbrella' clinical trials does not yet square with the technical difficulties and small tissue samples involved with pulmonary biopsy in many patients [2].

To date the CellSearch<sup>®</sup> technology remains the only FDA-approved CTC-isolation system proven to have both assay and clinical/biological validity in cancer: using this platform, CTCs are isolated using immunomagnetic enrichment for the epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) [3]. Two key reports have investigated CTC enumeration in NSCLC using CellSearch. An

initial proof-of-principle that CTC identification and enumeration was possible in lung cancer was followed by a report offering information on the benefits and limitations of CellSearch quantification in NSCLC: 21% of 109 treatment-naïve stage III/IV patients had positive CTC counts at baseline (defined as  $\geq 2$  CTCs in 7.5 ml blood since 1 CTC is a normal finding in healthy controls), while hypothesis-generating information on the prognostic capacity of CTC enumeration (cutoff  $\geq 5$  CTCs, 8.3% of patients) was also described [3, 4]. Other clinical reports have described a role for baseline prognostication using CellSearch in NSCLC, although with small patient numbers and no validation set [5–8].

Vimentin is a filamental protein expressed in mesenchymal cells, often recorded as a marker of tumor cell invasion via its expression during aberrant activation of the epithelial–mesenchymal transition (EMT). EMT is a biological program in which a series of dynamic and transitional steps can transform an epithelial cancer cell towards a more mesenchymal phenotype. EMT cells and their intermediate states have been associated with various tumorigenic properties including chemoresistance, tumor progression, and stem cell character [9]. Its representation in CTCs has been demonstrated on a number of occasions using various CTC isolation platforms, with ours and other groups reporting the existence of CTCs undergoing EMT in NSCLC using filtration–enrichment [10–14]. Previously we also demonstrated that isolation of vim+ CTCs in castrate-resistant prostate cancer conferred poorer survival [15, 16].

Here we examined three areas of clinical and translational significance for development of CTCs in NSCLC. First, we explored the total number of CTCs as a prognostic marker in treatment-naïve advanced NSCLC, acting as a validation for the previously estimated prognostic cutoff of  $\geq 5$  total CTCs. Second, we explored the prognostic value of vim+ CTCs in total CTC+ patients, assessing in turn their dynamic change with treatment. Finally, we correlated total CTC and vim+ CTC profiles with somatic alterations of *EGFR*, *ALK* and *KRAS*.

## Methods

### Study design

CTC analyses were performed on 154 patients with presumed advanced (stage IIIb–IV) systemic treatment-naïve NSCLC who were prospectively included into one of two Gustave-Roussy translational sample collection protocols, MSN (145 patients, 2008-A00373-52) and CEC-CTC (9 patients, IDRCB2008-AOO585-50), between September 2010 and June 2015. Patients signed informed consent to undergo a peripheral blood sample: one CellSave tube at most 7 days prior to chemotherapy. The MSN and CEC-CTC protocols were approved by the local Gustave Roussy ethics review committee.

For eligibility, patients could be diagnosed either by contemporaneous or historical biopsy, and were excluded if they were suffering from a second malignancy. Routine laboratory analyses were also performed on all patients, with data prospectively collected for age, sex, histological subtype, genotype, ECOG performance status, smoking status, sites of metastasis, treatment received, previous adjuvant treatment, stage, date of progression, date of death, date of inclusion for CellSearch analysis, CellSearch results, and date of last follow-up.

Routine analyses of patient tumor biopsies for *ALK* rearrangement, *KRAS* mutation, and *EGFR* mutation were performed as previously

described for the French molecular testing network [17]. Given their mutual exclusivity, patients whose cancers featured genetic modification of *KRAS* were assumed to be *wild-type* for *EGFR* and *ALK* in the minority of cases where these modifications had not been tested; this approach was also used in the case of cancers with *EGFR* mutation and *ALK* rearrangement.

### CTC analysis

Collection of blood, immunomagnetic selection, and immunofluorescent staining of CTCs were performed using the CellSearch® system (Janssen Diagnostics), as previously reported [18]. Blood samples were collected and stored at room temperature in 10 ml CellSave (Janssen Diagnostics, LLC) preservative tubes, then processed within 72 h of collection. FITC-labeled anti-vimentin antibody (Santa-Cruz) was added to the free channel of the CellSearch platform, as has been described previously [15]. Candidate total CTCs and vim+ CTCs were identified using the CellTracks Analyzer II (Janssen Diagnostics, LLC). In line with previous literature showing 1 CTC could be a normal finding in healthy controls, total CTC+ was defined as  $\geq 2$  total CTCs, and vim CTC+ was a patient who had  $\geq 1$  vimentin expressing CTC and known to be total CTC+ overall (i.e.  $\geq 2$  total CTCs, of which  $\geq 1$  expressed vimentin) [3, 4]. The unfavorable prognostic CTC category was defined as  $\geq 5$  total CTCs [4].

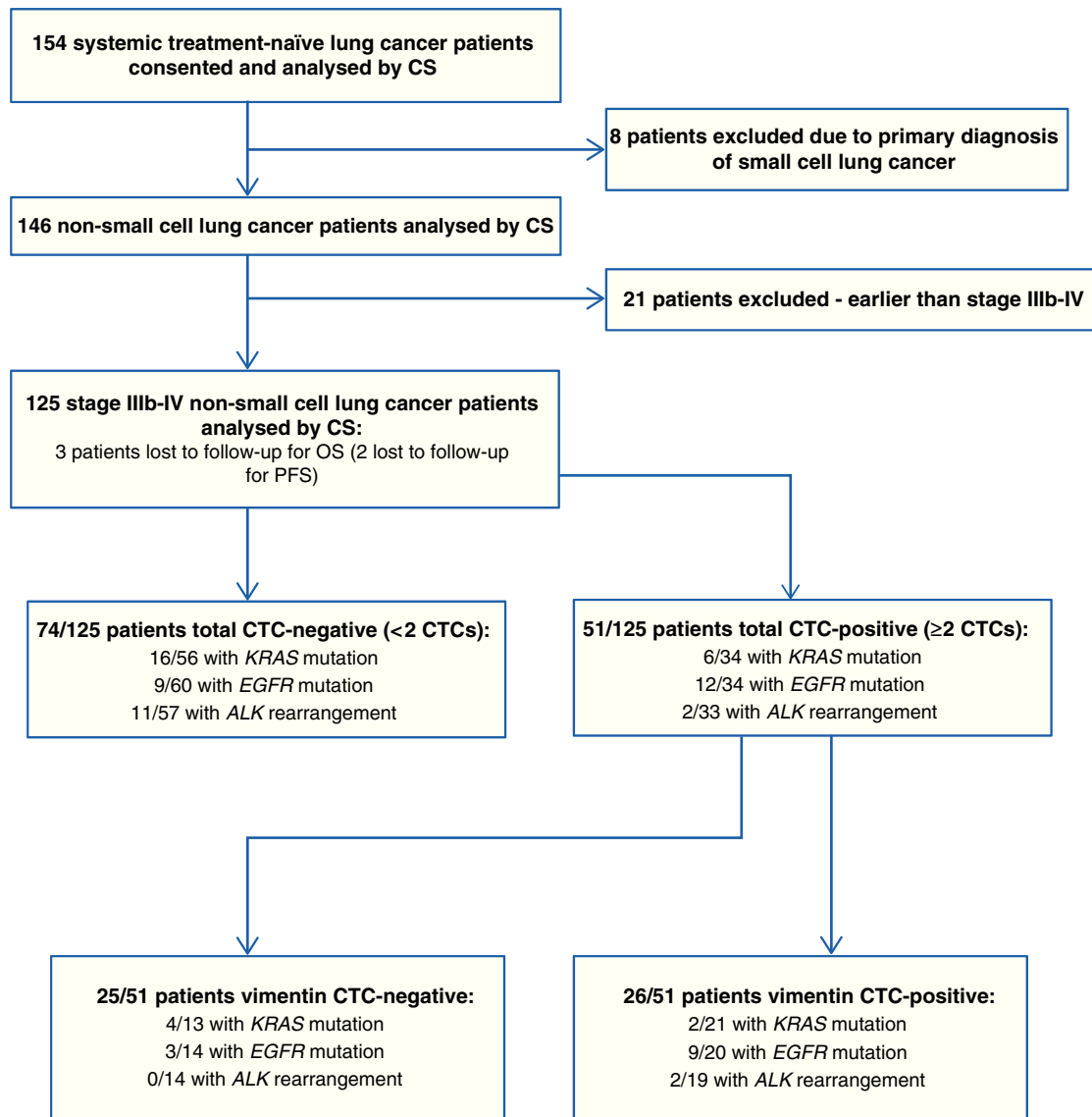
### Statistical analysis

REMARK guidelines were followed in planning, analysis and reporting of the study. The association of total and vim+ CTC number with clinical characteristics and patient demographics was assessed using Fisher's exact test for dichotomous factors, and Mann-Whitney tests for continuous data. For survival analysis, baseline CTC values and standard clinical factors including age, performance status (PS), histology, and smoking status were considered for multivariate analysis of both progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Factors that were significant in univariate analysis were included in multivariate Cox proportional hazards regression analysis (forward stepwise selection method with  $P \leq 0.2$  selected for entry into the model). The Kaplan–Meier method was used to estimate PFS and OS, and the survival distribution according to CTC values compared using the log-rank test and Cox regression. OS was defined as the time from inclusion for first CTC sample until death from any cause, cancer-related or otherwise. PFS was defined as the time from inclusion for first CTC sample until tumor progression or death, whichever came first. If no event had occurred, patients were censored at date of last follow-up. *P* values were two-sided and considered statistically significant at  $< 0.05$ . Statistical analysis was performed using SPSS version 23 and GraphPad Prism 6.03 for Windows.

## Results

### Patient characteristics

CTC runs were initially performed in 154 treatment-naïve lung cancer patients, of which 29 were subsequently excluded from analysis (eight with small cell lung cancer, 21 with stage I–IIIa NSCLC). Three patients were lost to follow-up and censored at their last appointment (Figure 1). A total of 125 advanced treatment-naïve NSCLC patients (stage IIIb–IV) were included for final analysis: 74 patients were total CTC-negative at baseline and 51 patients were total CTC+. Patient recruitment and baseline clinical details are recorded in Table 1 and Figure 1. A higher proportion of poor performance status was noted in those patients who were total CTC+ ( $P = 0.003$ ) (Table 1). Otherwise there were no significant differences between the groups in terms of



**Figure 1.** Patient flow. CS, CellSearch.

histology, smoking, or metastatic burden. A baseline analysis of patient overall survival according to *EGFR*, *ALK*, and *KRAS* subgroups was consistent with what has been described previously for each subgroup (supplementary Figure S1, available at *Annals of Oncology* online).

For baseline CTC characteristics,  $\geq 1$  total CTC(s) was present in the samples of 54.4% of patients,  $\geq 2$  total CTCs in 40.8% of patients, and  $\geq 5$  total CTCs in 19.2% (Table 2). The number of total CTCs ranged from 0 to 78 across all 125 patients, although the majority of total CTC+ patients displayed counts of between 2 and 10 total CTCs (Table 2). For vim+ CTCs,  $\geq 1$  vim+ CTC(s) was seen in 23.3% of patients,  $\geq 2$  vim+ CTCs in 14.4% of patients, and  $\geq 5$  vim+ CTCs in 5.6%. Range of vim+ CTCs was 0–35, with the majority of positive cases being in the very low end of this range (Table 2). 8/125 patients (6.4%) harbored vim+ CTCs exclusively. In total, 140/873 (16%) of CTCs were vim+ across baseline samples from the cohort (Table 2).

### Clinical relevance of total CTCs

After a median follow-up of 47 months, univariate analyses showed significant reductions in median PFS/OS were evident in patients with  $\geq 5$  total CTCs at baseline compared to those with  $< 5$  total CTCs (PFS: 147 vs 173 days and 6 month PFS 29.2% vs 45.1%, respectively; HR 0.59, 95% CI 0.37–0.94,  $P = 0.026$ ; OS: median 197 vs 386 days and 1 year OS 22.9% vs 56%, respectively; HR 0.45, 95% CI 0.28–0.75,  $P = 0.002$ ) (Figure 2A and B). Multivariate analysis confirmed that  $\geq 5$  total CTCs was an independent prognostic indicator for OS (HR 0.55, 95% CI 0.33–0.92,  $P = 0.022$ ) but not PFS (HR 0.68, 95% CI 0.42–1.1,  $P = 0.118$ ).

### Clinical relevance of vimentin-positive CTCs

We next sought to describe and establish the prognostic significance of baseline vim+ CTCs (supplementary Figure S2, available

**Table 1. Baseline characteristics of patients with treatment-naïve advanced NSCLC according to total CTC status**

Characteristic	Total CTC-negative patients (%)	Total CTC-positive patients (%)	P value
Total patient numbers	74/125 (59.2)	51/125 (40.8)	
Age, years			
Median	61	62	
Range	25.86	27.81	0.813
Sex			
Male	47/74 (63.5)	40/51 (78.4)	
Female	27/74 (36.5)	11/51 (21.6)	0.08
Histology			
Non-squamous	64/74 (86.5)	49/51 (96.1)	
Adenocarcinoma	59/74 (79.7)	45/51 (88.2)	
Others	5/74 (6.8)	4/51 (7.8)	
Squamous	10/74 (13.5)	2/51 (3.9)	0.12
Smoking status			
Non-smoker	15/74 (20.3)	9/51 (17.6)	
Ex-smoker	38/74 (51.4)	35/51 (68.6)	
Current smoker	20/74 (27)	6/51 (11.8)	
Not stated	1/74 (1.4)	1/51 (2)	0.819
Performance status (ECOG)			
0–1	66/74 (89.2)	34/51 (66.7)	
2–3	8/74 (10.8)	17/51 (33.3)	0.003
Number of metastatic sites			
0	9/74 (12.2)	4/51 (7.8)	
1	25/74 (33.8)	14/51 (27.5)	
2	21/74 (28.4)	12/51 (23.5)	
3+	19/74 (25.7)	21/51 (41.2)	0.081
Metastatic Sites			
Lungs only	7/74 (9.5)	1/51 (2)	
Lungs/LNs only	3/74 (4.1)	1/51 (2)	
Visceral	55/74 (74.3)	45/51 (88.2)	0.157
Liver	4/74 (5.4)	10/51 (19.6)	
Bone	28/74 (37.8)	27/51 (52.9)	
Lung	25/74 (33.8)	14/51 (27.5)	
Brain	16/74 (21.6)	17/51 (33.3)	
Lymph nodes	10/74 (13.5)	9/51 (17.6)	
Pleura (inc effusions)	10/74 (13.5)	12/51 (23.5)	
Adrenal	21/74 (28.4)	13/51 (25.5)	
Other(s)	13/74 (17.6)	15/51 (29.4)	
Systemic treatment planned at time of first CTC specimen			
Platinum doublet ± bev	64/74 (86.5)	47/51 (92.2)	
EGFR/ALK inhibitor	7/74 (9.5)	3/51 (5.9)	
Not stated	3/74 (4.1)	1/51 (2)	0.396
Previous treatments in last 6 months			
Primary surgery	0/74 (0)	0/51 (0)	
Primary radiotherapy	1/74 (1.4)	0/51 (0)	
Chemoradiotherapy	0/74 (0)	0/51 (0)	1.0

at *Annals of Oncology* online). Supplementary Table S1, available at *Annals of Oncology* online explores the baseline clinical characteristics of vim CTC+ and vim CTC-negative patients: no significant differences were observed between the two subgroups in terms of histology, smoking, PS, scheduled treatment, or metastatic sites. Of the 51 patients who were total CTC+, 26 (51%) were vim CTC+ and 25 (49%) were vim CTC-negative (Figure 1;

**Table 2. Baseline CTC characteristics of treatment-naïve patients with advanced NSCLC according to total and vim+ CTC status**

Group	Patient numbers (%)
Number of pts with no CTC (%)	57/125 (45.6)
Number of pts with ≥1 CTC (%)	
Total CTC	68/125 (54.4)
Vim+ CTC	29/125 (23.3)
Number of pts with ≥2 CTC (%)	
Total CTC	51/125 (40.8)
Vim+ CTC	18/125 (14.4)
Number of pts with ≥5 CTC (%)	
Total CTC	24/125 (19.2)
Vim+ CTC	7/125 (5.6)
CTC dynamic range	
Total CTC	0-78
Vim+ CTC	0-35
Number of pts with ≥2 CTC and ≥1 vim+ CTC	26/125 (20.8)
Number of pts with only vim+ CTC	8/125 (6.4)
Number of vim+ CTC	140/873 (16)

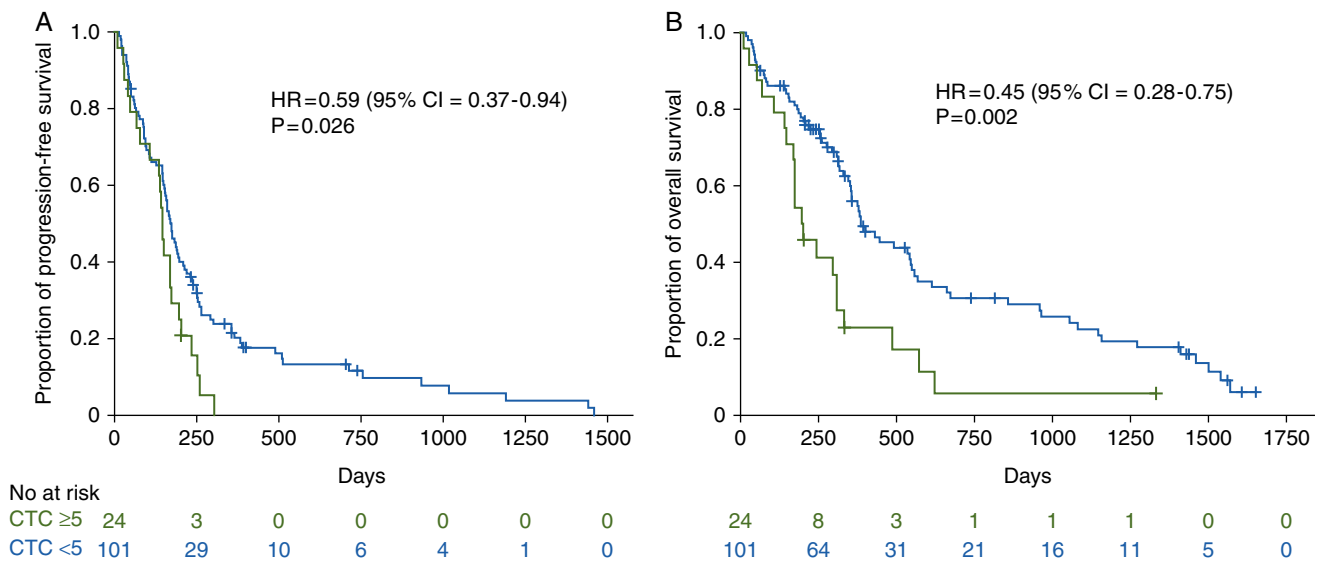
supplementary Table S1, available at *Annals of Oncology* online). In those patients who were total CTC+, the presence of ≥1 vim CTC did not diminish survival further when compared to those with no vim CTCs (median OS: 294 vs 309 days and 1 year survival 41.2% vs 29.3%, respectively; HR 1.24, 95% CI 0.67–2.28,  $P = 0.494$ ; median PFS: 147 vs 161 days and 1 year survival 17.3% vs 12.8%, respectively; HR 1.06, 95% CI 0.59–1.89,  $P = 0.855$ ) (Figure 3A and B).

As EMT has been associated with treatment resistance in CTCs, we hypothesized that the vim+ profile of CTCs may develop during treatment, even if overall CTC numbers were to diminish. 75 patients (60%) in our cohort offered a second ‘on-treatment’ sample for CellSearch analysis: 65 after cycle 1 and 10 after cycle 2. No difference was observed between baseline and paired on-treatment CTC samples for percentage of patients with vim+ CTCs (23.2% baseline vs 17.3% post-treatment,  $P = 0.373$ ) (supplementary Table S2, available at *Annals of Oncology* online), percentage of patients with dynamic change of vim+ and vim-negative CTCs during treatment (17.6% stability/increase for vim+ patients vs 13.5% for vim-negative,  $P = 0.696$ ) (supplementary Table S3, available at *Annals of Oncology* online), and ratio of vim+:total CTCs (median 0.118 at baseline vs 0.167 on-treatment;  $P = 0.645$ ) (supplementary Figure S3, available at *Annals of Oncology* online).

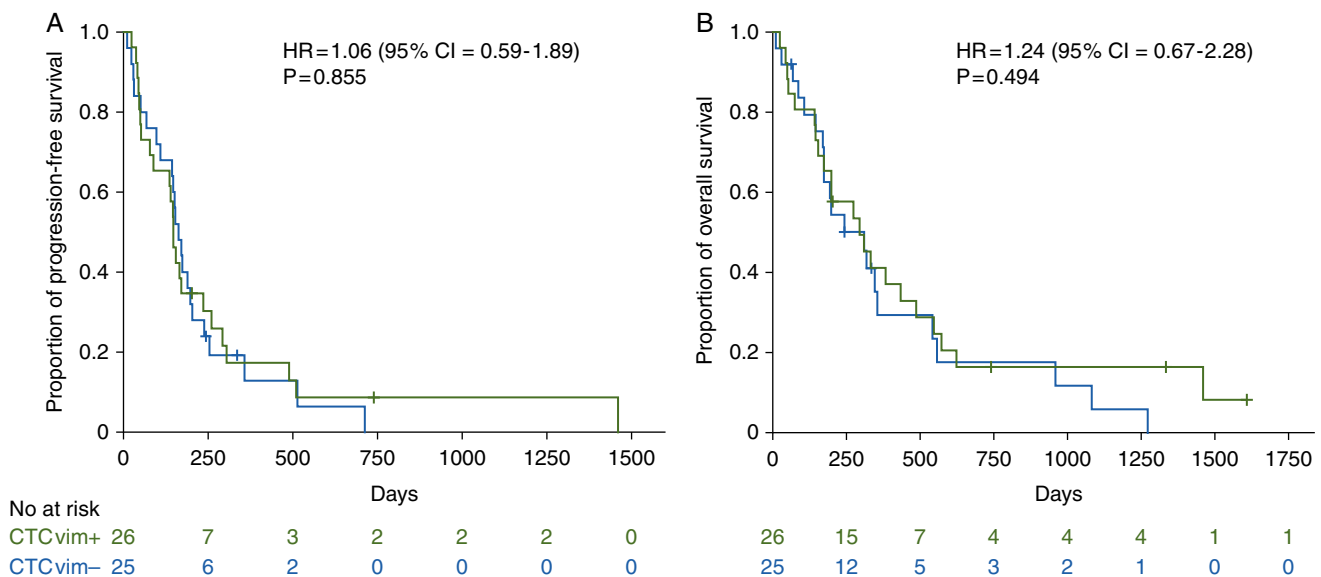
### CTCs according to NSCLC molecular subgroups

Of the 125 patients analyzed with CellSearch at baseline, 104 had their tumors tested for genetic modifications and 67 of these cancers (64.4%) were found to harbor at least one ‘actionable’ aberration. 22/90 patients (24.4%) had tumors which were *KRAS*-mutated, 21/94 (22.3%) were *EGFR*-mutated, and 13/90 (14.4%) *ALK*-rearranged.

Figure 4A and B shows bar plots of total CTC numbers and vim+ CTC proportions according to molecular subgroups, while Table 3 compares relative numbers of total CTC+ and vim CTC+ patients in each subgroup. On examination of the *KRAS*



**Figure 2.** Survival association with baseline total CTC number. Kaplan–Meier curves of PFS (A) and OS (B) according to the previously defined poor prognostic cutoff of  $\geq 5$  total CTCs. *P* values obtained by log-rank tests.



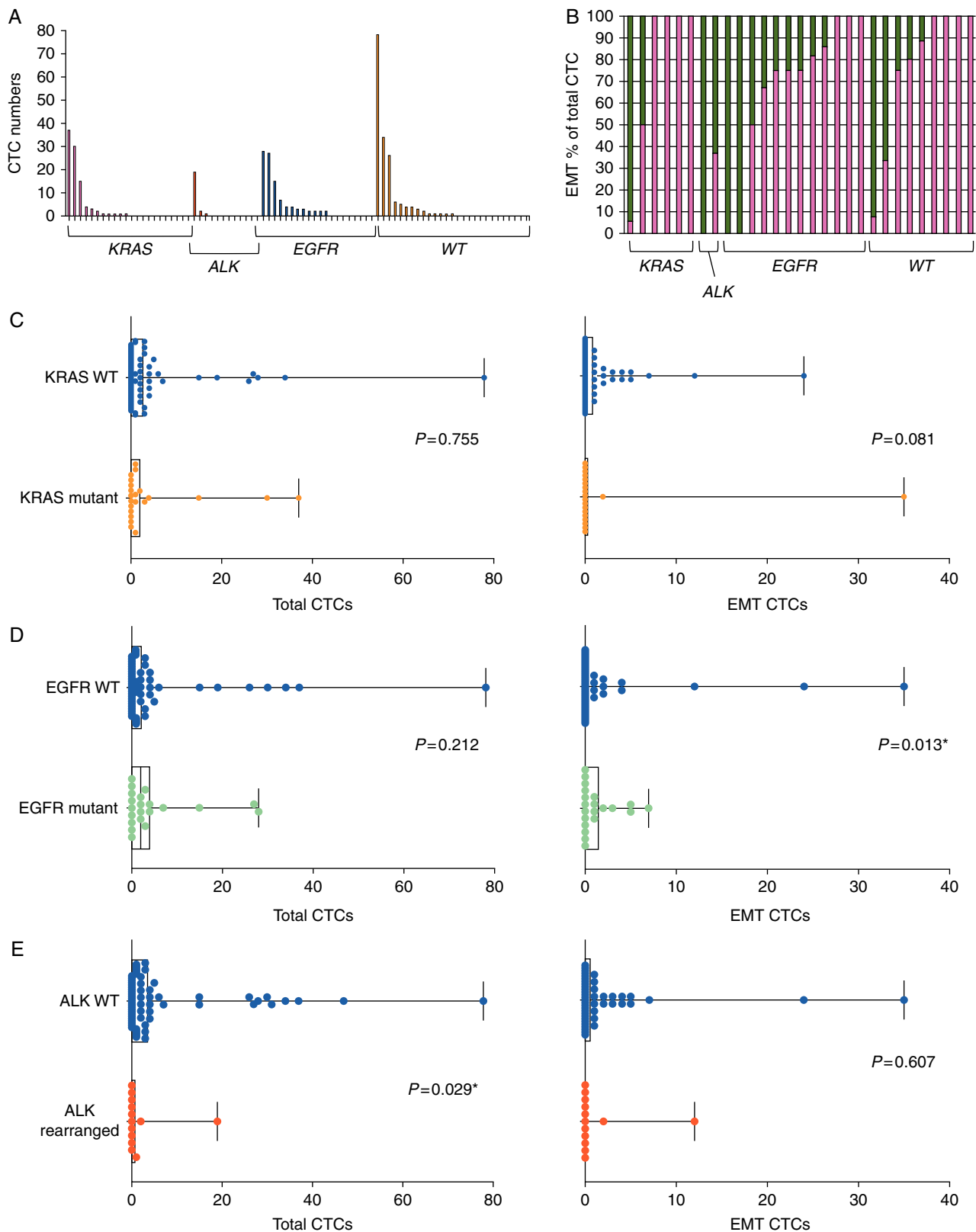
**Figure 3.** Survival association with baseline vim+ CTC status. Kaplan–Meier curves of PFS (A) and OS (B) according to vim+ CTC positivity in those patients with  $\geq 2$  total CTCs. *P* values obtained by log-rank tests.

subgroup, a trend towards a reduction of vim+ CTCs in patients with *KRAS*-mutant cancers was consistent with fewer patients harboring vim+ CTCs, but neither change reached statistical significance (*KRAS* mutant vs *WT*: 9.1% [2/22] patients vs 27.9% [19/68] patients, *P*=0.086; mean 1.68 vs 1.19 vim+ CTCs, *P*=0.081) (Table 3, Figure 4C). Only two *KRAS*-mutant patients harbored vim+ CTCs, and on review of their medical records it was noted that neither of these patients had a histological diagnosis of adenocarcinoma (1 squamous, 1 NSCLC not otherwise specified): re-examination of *KRAS*-mutant adenocarcinoma revealed a complete deficit of vim+ CTCs in this histology (0/19 vim CTC+ patients in *KRAS*-mutant vs 19/59 vim

CTC+ patients in *KRAS WT* adenocarcinoma, *P*=0.004; mean 0 vs 1.4 vim+ CTCs, *P*=0.006).

In the *EGFR*-assessed subgroup, vim+ CTC numbers were significantly high in patients with *EGFR*-mutated cancer, corresponding with an increase in *EGFR*-mutant patient numbers harboring both total CTCs and vim+ CTCs (mutant vs *WT*: 57.1% vs 30.1% total CTC+ patients, *P*=0.038; mean 4.71 vs 4.12 total CTCs, *P*=0.212; 42.9% vs 15.1% vim CTC+ patients, *P*=0.013; mean 1.24 vs 1.22 vim+ CTCs, *P*=0.013) (Table 3, Figure 4D).

For the *ALK*-assessed subgroup, a trend towards diminished patient numbers with total CTCs in *ALK*-rearranged cancer was



**Figure 4.** CTC profiles by NSCLC molecular subgroups (A) Bar plot of baseline total CTC numbers according to molecular subtype, each bar represents a patient (B) Distribution plot of vim+ (green) vs vim-negative CTCs in those patients who were total CTC-positive, according to molecular subtype with each bar representing a patient. Box plots assessing differences in relative numbers of total CTCs and vim+ CTCs in *KRAS* (C), *EGFR* (D), and *ALK* (E) subgroups. *P* values obtained by Mann-Whitney tests.



**Table 3. Total and vim+ CTC patient profiles in relation to NSCLC mutational profiles**

Patient Population	Frequency		P
	N	%	
<i>KRAS</i> mutated vs <i>KRAS</i> WT			
Number of total CTC+ patients ( $\geq 2$ total CTC)	6/22 vs 28/68	27.3 vs 41.2	0.315
Number of vim CTC+ patients ( $\geq 1$ vim+ CTC)	2/22 vs 19/68	9.1 vs 27.9	0.086
<i>EGFR</i> mutated vs <i>EGFR</i> WT			
Number of total CTC+ patients ( $\geq 2$ total CTC)	12/21 vs 22/73	57.1 vs 30.1	0.038*
Number of vim CTC+ patients ( $\geq 1$ vim+ CTC)	9/21 vs 11/73	42.9 vs 15.1	0.013*
<i>ALK</i> rearrangement vs <i>ALK</i> WT			
Number of total CTC+ patients ( $\geq 2$ total CTC)	2/13 vs 31/77	15.4 vs 40.3	0.122
Number of vim CTC+ patients ( $\geq 1$ vim+ CTC)	2/13 vs 17/77	15.4 vs 22.1	0.728

supported by a significant reduction in total CTC numbers overall (rearranged vs WT: 2/13 total CTC+ patients vs 31/77 total CTC+ patients, 15.4% vs 40.3%,  $P=0.122$ ; mean 1.69 vs 5.82 total CTCs,  $P=0.029$ ) (Table 3, Figure 4E). Both vim CTC+ *ALK*-rearranged patients were noted to have high proportions of vim+ CTCs relative to total CTCs (Figure 4B).

## Discussion

Here we report a prognostic validation of CTC estimation by CellSearch in advanced/metastatic NSCLC, as well as offering a clinical insight into their epithelial–mesenchymal properties according to analysis of the whole NSCLC population and its genetic subtypes. In line with what has been previously reported, we initially validated the prognostic value of  $\geq 5$  total CTCs at baseline through analysis of OS. The presence or absence of CTCs with EMT characteristics across the whole cohort conferred no additional prognostic significance when total CTC+ patients were subdivided into vim+ CTC and vim-CTC cohorts. However, the presence of vim+ CTCs was heterogeneous within the three main NSCLC genetic subgroups studied in our report: *EGFR*-mutation, *ALK* rearrangement and *KRAS*-mutation. A significantly high number of vim+ patients and vim+ CTC numbers in *EGFR*-mutant disease contrasted with a total loss of vim+ CTC patients and vim+ CTCs in *KRAS*-mutant adenocarcinoma. For *ALK*-rearranged patients there were fewer total CTCs with no difference in vim+ CTCs.

We validated the prognostic cutoff of  $\geq 5$  total CTCs previously identified using CellSearch, using both univariate and multivariate testing of OS, albeit with a higher number of patients with total CTC-positivity (40.8%) compared to that which was reported previously [4]. To the best of our knowledge, this is the largest clinical study of CTCs analyzed by CellSearch in advanced NSCLC patients to date. The importance of offering this validation was to follow predictive/prognostic biomarker guidelines such as REMARK and the Cancer Research UK biomarker roadmap, prospectively confirming the relationship between CTCs and NSCLC outcomes to pave the way for a clinical trial where CTCs can be used to define randomization [19, 20]. Given the association of *EGFR* mutation in this study with high numbers of total CTC+ patients, it is possible that the relative enrichment of *EGFR*-positive patients (21/94 patients, 22.3%) in our study has

contributed to this increased number of total CTC+ patients overall. A European multi-centre pooled analysis of NSCLC CTCs by CellSearch has now completed recruitment and should facilitate a final focus on clinical validity by providing an answer to this question, as well as offering a rounded picture of the percentage of patients with total CTC-positivity in advanced disease.

EMT has previously been associated with tumor invasiveness, chemoresistance, and poor clinical outcomes [9]. For vimentin assessment here, an initial biological selection during CellSearch should be noted: it will only test for vimentin after patient CTCs have been initially isolated using EPCAM-coated ferromagnetic beads, an epithelial-antibody based selection. A fully representative picture of mesenchymal or EMT CTCs is impaired as a consequence. CellSearch was selected for use due to its advanced level of assay and biological validity: its ability to prognosticate has been tested extensively in the clinic and published in a number of cancers, with FDA-approval granted for advanced breast, colorectal, and prostate cancers, and its use is consistent and reproducible across all patient cohorts for the purposes of survival analyses and correlation with clinical/molecular markers [1]. A more biological picture of mesenchymal CTCs or CTCs in EMT has been exploited by a number of other CTC isolation techniques that have not yet reached the same level of assay validity [10–14].

Across NSCLC overall, vimentin presence did not confer an additional survival difference in those patients that were total CTC-positive, although this level of survival analysis with relatively small patient numbers does not take into account that NSCLC is a diagnosis of histological exclusion which covers a myriad of different genetic and biological pathological processes [21]. With more detailed analysis, evidence of increased total and vim+ CTCs was apparent in *EGFR*-mutant patients, as well as a total absence of vim+ CTCs in *KRAS*-mutated adenocarcinomas. The presence of differential vim+ CTC profiles amongst different genetic and histological subgroups of NSCLC suggests that each subgroup may display a different level of CTC dynamic plasticity. The higher number of total CTC+ patients suggests that *EGFR*-mutant NSCLC will also be of particular interest for design of CTC-based clinical trials: this result is consistent with two other reports that used alternative methods of CTC isolation to characterize small numbers of patients with *EGFR*-mutated NSCLC [22, 23].

The network of French molecular platforms offer a unique clinical infrastructure where molecular profiling of NSCLC

patients for key modifications such as *EGFR*, *KRAS*, and *ALK* has been performed routinely for a number of years, creating opportunities for translational research such as the findings described in this report [17]. The association between *EGFR* mutation and vim+ CTCs in our study is a result that would have been expected in patients developing acquired resistance to *EGFR* inhibition, but is perhaps more surprising in the context of systemic treatment-naïve disease. Biopsy and cell line studies of *EGFR*-mutant disease have however consistently shown the presence of vimentin expression before the onset of treatment resistance, including one landmark study which detailed EMT as a mechanism of resistance in *EGFR*-mutant patients [24–27]. In this study, we noted vimentin-positivity in the baseline CTCs of 26% of *EGFR*-mutated patients. These findings reinforce a hypothesis that the development of EMT-mediated resistance in cancers treated with *EGFR* inhibitors is conferred by an increase in EMT markers, perhaps with an on–off threshold effect, rather than outright *de novo* induction. For *KRAS* mutation, the absence of vim+ CTCs in adenocarcinoma is consistent with a total lack of vimentin expression observed in tumors resected from a transgenic mouse model of *KRAS*-driven lung cancer, although this study cannot exclude the possibility that pure mesenchymal CTCs missed by CellSearch could hold importance in this molecular subtype [28]. Our previous report showing that *ALK*-rearranged CTCs exhibit a complete loss of epithelial marker expression and potentially a fully mesenchymal phenotype, expressing vimentin and N-cadherin, is consistent with the low level of total CTCs in patients with *ALK*-rearranged tumors observed in this study [13].

In conclusion, we validate a prognostic survival difference using a cutoff of  $\geq 5$  total CTCs isolated by CellSearch in the largest cohort of NSCLC patients reported so far. For the first time, we show that differential EMT characteristics and total CTC profiles can be observed according to different genetic subtypes of NSCLC. In a cancer where small samples and poor biopsy quality can often slow its molecularly driven clinical development, future studies can focus on examining how the clinical utility of CTCs can be best exploited in genetic subtypes of NSCLC.

## Acknowledgement

The authors would like to thank all the patients who took the time to participate in this research at a time when they had other priorities.

## Funding

CRL was supported by the European Society for Medical Oncology (translational research fellowship—no grant number applicable) with the aid of a grant from Hoffman-La Roche and the International Association for the Study of Lung Cancer (no grant number applicable). CRL also received support as a recipient of the grant DUERTECC/EURONCO (Diplome Universitaire Européen de Recherche Translationnelle et Clinique en Cancerologie—no grant number applicable). EP was supported by the LabEx LERMIT (ANR-10-LABX-0033-LERMIT) and the Fondation pour la Recherche Médicale (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 11th 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).

## Disclosure

The authors have declared no conflicts of interest.

## References

- Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* 2016; 6(5): 479–491.
- Hiley CT, Le Quesne J, Santis G et al. Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *Lancet* 2016; 388(10048): 1002–1011.
- 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): 6897–6904.
- 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.
- 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.
- 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.
- Muineloro-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 (Basel)* 2014; 6(1): 153–165.
- Juan O, Vidal J, Gisbert R et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients treated with docetaxel and gemcitabine. *Clin Transl Oncol* 2014; 16(7): 637–643.
- Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; 166(1): 21–45.
- 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(9): 1338–1341.
- 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(4): 827–835.
- 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(3): 989–996.
- Pailler E, Adam J, Barthélémy 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.
- Pailler E, Oulhen M, Billiot F et al. Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells. *BMC Cancer* 2016; 16: 477.
- Lindsay CR, Le Moulec S, Billiot F et al. Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer. *BMC Cancer* 2016; 16(1): 168.
- Massard C, Oulhen M, Le Moulec S 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; 7(34): 55069–55082.
- Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year



- nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* 2016; 387(10026): 1415–1426.
18. 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): 847–853.
  19. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): explanation and elaboration. *PLoS Med* 2012; 9(5): e1001216.
  20. Cancer Research UK prognostic/predictive biomarker roadmap [http://www.cancerresearchuk.org/prod\\_consump/groups/cr\\_common/@fre/@fun/documents/generalcontent/cr\\_027486.pdf](http://www.cancerresearchuk.org/prod_consump/groups/cr_common/@fre/@fun/documents/generalcontent/cr_027486.pdf).
  21. Thomas A, Liu SV, Subramaniam DS, Giaccone G. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12(9): 511–526.
  22. 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): 366–377.
  23. Hanssen A, Wagner J, Gorges TM et al. Characterization of different CTC subpopulations in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2016; 6: 28010.
  24. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3(75): 75ra26.
  25. Chung JH, Rho JK, Xu X et al. Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer* 2011; 73(2): 176–182.
  26. Suda K, Tomizawa K, Fujii M et al. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol* 2011; 6(7): 1152–1161.
  27. Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T et al. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30(7): 2513–2517.
  28. König K, Meder L, Kröger C et al. Loss of the keratin cytoskeleton is not sufficient to induce epithelial mesenchymal transition in a novel KRAS driven sporadic lung cancer mouse model. *PLoS One* 2013; 8(3): e57996.

## Appendix

Conception and Design of the study was performed by CRL, SM, FFar, and BB; acquisition of data was performed by CRL, FB, FFac, CC, CP, MN, GB, VF, EP, JR, DP, JCS, FFar, and BB; interpretation and analysis of data by CRL with review

and comment from all authors. Manuscript first drafted by BB, CRL, and FFar with contributions for final draft from FFac, JR, SM, DP, and JCS. All authors read and approved the final manuscript.

# A Prospective Examination of Circulating Tumor Cell Profiles in Non-Small Cell

## Lung Cancer Molecular Subgroups

### Supplementary appendix

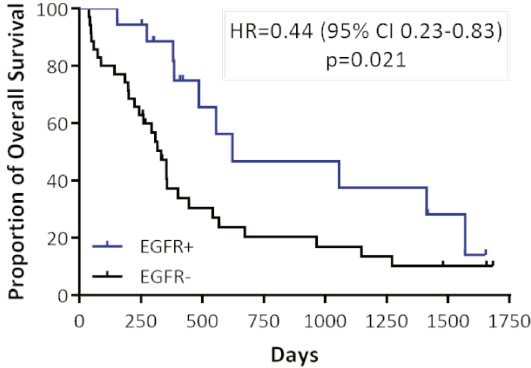
C. R. Lindsay<sup>1</sup>, V. Faugeroux<sup>1,2</sup>, S. Michiels<sup>3</sup>, E. Paillet<sup>1,2</sup>, F. Facchinetti<sup>1</sup>, D. Ou<sup>4</sup>, M. V. Bluthgen<sup>4</sup>, C. Pannet<sup>4</sup>, M. Ngo-Camus<sup>4</sup>, G. Bescher<sup>4</sup>, C. Caramella<sup>5</sup>, F. Billiot<sup>1,2</sup>, J. Remon<sup>4</sup>, D. Planchard<sup>4</sup>, J.-C. Soria<sup>4</sup>,  
B. Besse<sup>4#</sup> & F. Farace<sup>1,2</sup>

<sup>#</sup>corresponding author

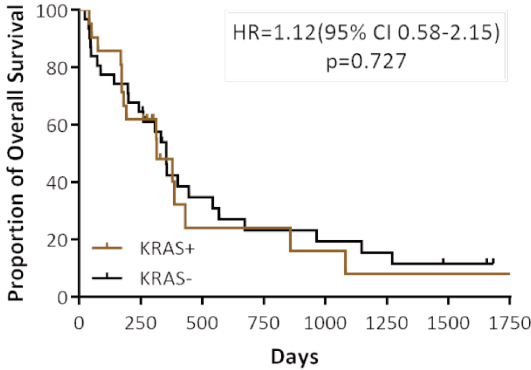
1. INSERM, U981 "Identification of Molecular Predictors and New Targets for Cancer Treatment", F-94805, Villejuif, France.
2. Gustave Roussy, Université Paris-Saclay. "Circulating Tumor Cells" Translational Platform, CNRS UMS3655 – INSERM US23, AMMICA, F-94805, Villejuif, France.
3. Department of Biostatistics and Epidemiology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.
4. Department of Medical Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.
5. Department of Radiology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.

SUPPLEMENTARY TABLES/FIGURES

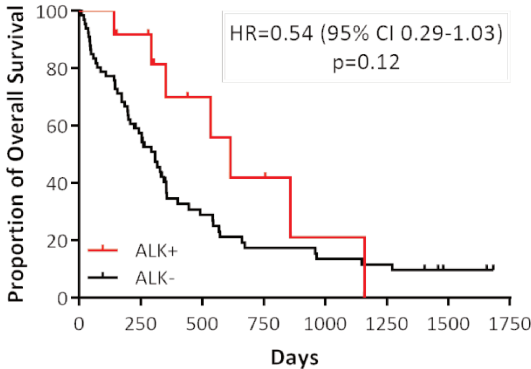
A.



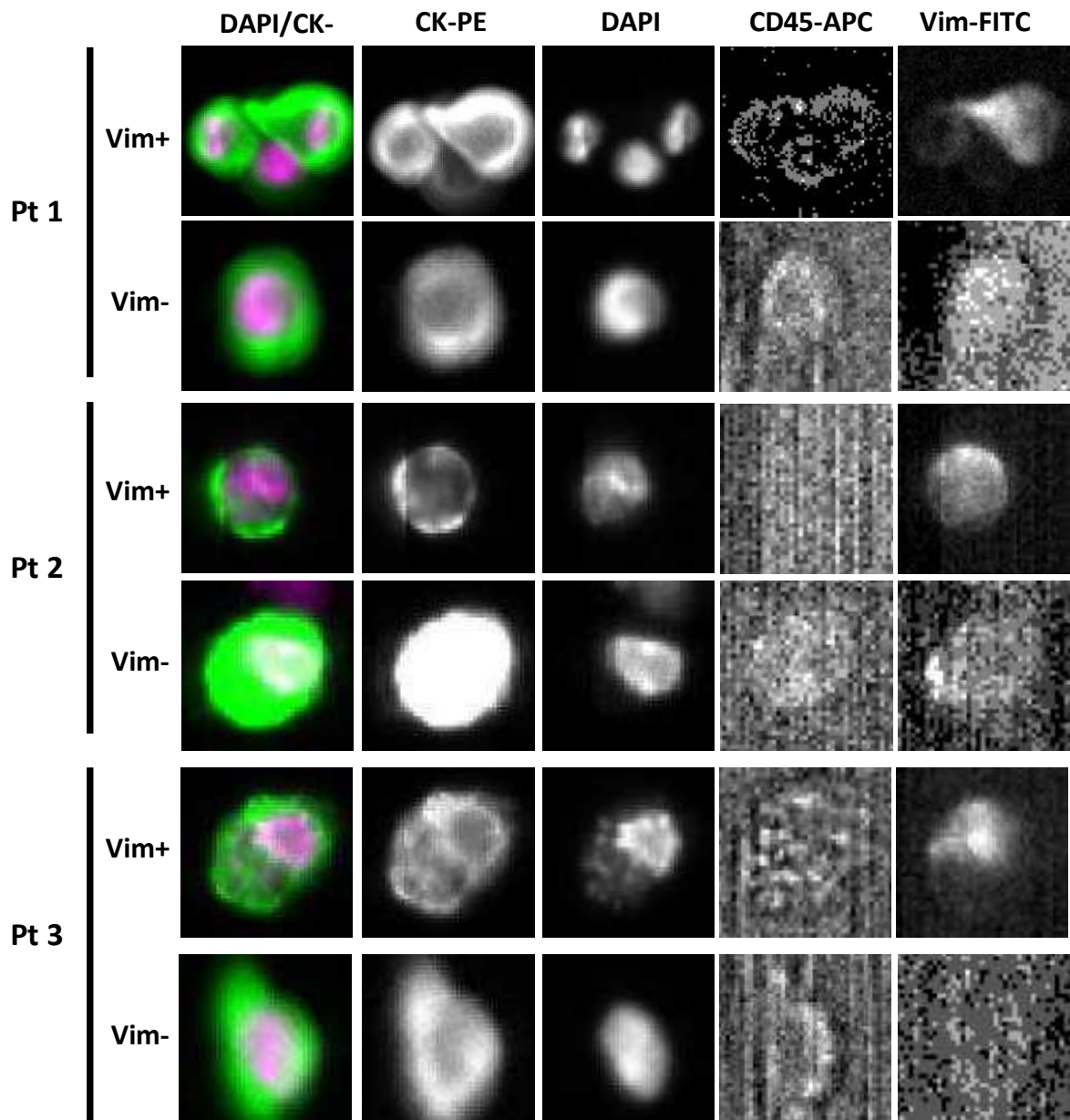
B.



C.



Supplementary Figure S1. Survival association with molecular subgroups. Kaplan Meier curves of OS for EGFR-mutant (A), KRAS-mutant (B), and ALK-rearranged (C) patients. P values obtained by log-rank tests.



**Supplementary Figure S2.** Representative pictures from CellSearch system of vimentin staining in CTCs from 3 patients

Characteristic	Vim CTC-negative patients (%)	Vim CTC-positive patients (%)	P value
<b>Total Patient Numbers</b>	25/51 (49)	26/51 (51)	
<b>Age, years</b>			
Median	37-81	27-75	
Range	65	60	0.131
<b>Sex</b>			
Male	20/25 (80)	20/26 (76.9)	
Female	5/25 (20)	6/26 (23.1)	1.0
<b>Histology</b>			
Non-squamous	24/25 (96)	25/26 (96.2)	
<i>Adenocarcinoma</i>	23/25 (92)	22/26 (84.6)	
<i>Other</i>	1/25 (4)	3/26 (11.6)	
Squamous	1/25 (4)	1/26 (3.8)	1.0
<b>Smoking Status</b>			
Non-smoker	3/25 (12)	6/26 (23.1)	
Ex-smoker	20/25 (80)	15/26 (57.7)	
Current smoker	2/25 (8)	4/26 (15.4)	
Not stated	0/25 (0)	1/26 (3.8)	0.464
<b>Performance Status (ECOG)</b>			
0-1	15/25 (60)	19/26 (73.1)	
2-3	10/25 (40)	7/26 (26.9)	0.382
<b>Number of Metastatic Sites</b>			
0	3/25 (12)	1/26 (3.8)	
1	10/25 (40)	4/26 (15.4)	
2	5/25 (20)	7/26 (26.9)	
3+	7/25 (28)	14/26 (53.8)	0.089
<b>Metastatic Sites</b>			
Lungs only	1/25 (4)	0/26 (0)	
Lungs/LNs only	0/25 (0)	1/26 (3.8)	
Visceral	21/25 (84)	24/26 (92.3)	0.365
<i>Liver</i>	4/25 (16)	6/26 (23.1)	
<i>Bone</i>	15/25 (60)	12/26 (46.2)	
<i>Lung</i>	4/25 (16)	10/26 (38.5)	
<i>Brain</i>	8/25 (32)	9/26 (34.6)	
<i>Lymph Nodes</i>	4/25 (16)	5/26 (19.2)	
<i>Pleura (inc effusions)</i>	3/25 (12)	9/26 (34.6)	
<i>Adrenal</i>	7/25 (28)	6/26 (23.1)	
<i>Other(s)</i>	4/25 (16)	11/26 (42.3)	
<b>Systemic treatment planned at time of 1<sup>st</sup> CTC specimen</b>			
Platinum doublet +/- bev	22/25 (88)	25/26 (96.2)	
EGFR/ALK inhibitor	2/25 (8)	1/26 (3.8)	
Not Stated	1/25 (4)	0/26 (0)	0.35
<b>Previous treatments in last 6 months</b>			
Primary Surgery	0/25 (0)	0/26 (0)	
Primary Radiotherapy	0/25 (0)	0/26 (0)	
Chemoradiotherapy	0/25 (0)	0/26 (0)	1.0

**Supplementary Table S1.** Baseline characteristics of patients with treatment-naive advanced NSCLC according to vim+ CTC status in those who are total CTC+. P values obtained by fisher's exact and chi-square tests.

	Baseline sample before treatment	First sample after treatment start	
Number of patients with vim+ CTCs (%)	29/125 (23.2)	13/75 (17.3)	<i>P</i> =0.373
Number of patients with vim- CTCs (%)	57/125 (45.6)	28/75 (37.3)	<i>P</i> =0.302

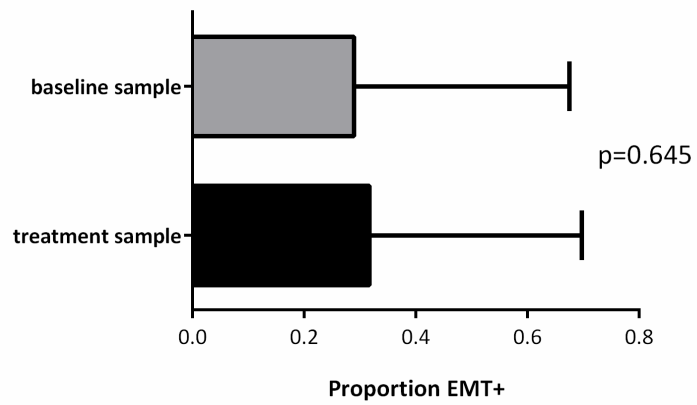
**Supplementary Table S2.** Categorical change in patient vim+ and vim-negative CTC profiles with treatment.

Fisher's exact test to analyse CTC frequencies in treatment groups. Samples from the second column were taken at cycles 1-2 following initiation of treatment. *P* values obtained by chi-square tests.

	vim+ CTC	vim- CTC	
Number of patients with increase or no change in CTC (%)	3/17 (17.6)	5/37 (13.5)	<i>P</i> =0.696
Number of patients with reduction in CTC (%)	14/17 (82.4)	32/37 (86.5)	

**Supplementary Table S3.** Dynamic change in patient vim+ and vim-negative CTC profiles with treatment.

Fisher's exact test to analyse CTC frequencies in treatment groups. All patients analysed here had  $\geq 1$  vim- or vim+ CTC at baseline and a J21 sample. *P* values obtained by chi-square tests.



**Supplementary Figure S3.** Proportion of vim+ CTCs within total CTC+ patients. Mann-Whitney test to analyse vim+ CTC proportions before and during treatment. All patients analysed here were total CTC+ ( $\geq 2$  total CTCs).

Bar plot shows mean + standard deviation.

## II. Développement d'une méthode de microscopie semi-automatisée pour l'analyse phénotypique et moléculaire de CTC enrichies par filtration

**Article 2. Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells**  
**BMC Cancer, 2016 Jul 14;16(1):477.**

Pailler E\*, Oulhen M\*, Billiot F, Galland A, Auger N, Faugeroux V, Laplace-Builhé C, Besse B, Lorient Y, Ngo-Camus M, Hemanda L, Lindsay CR, Soria JC, Vielh P, Farace F

Publication en *open-access*.

En parallèle du développement de la FISH adaptée sur filtre ISET (FA-FISH), nous avons établi une méthode combinant la caractérisation phénotypique des CTC par immunofluorescence et leur caractérisation cytomorphologique grâce à une 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. L'analyse microscopique des filtres nécessite de prendre en compte qu'ils ne sont microscopiquement pas plats et que les pores, contenant pour la plupart des débris cellulaires, sont source de fluorescence non spécifique. Ainsi, bien que les filtres ISET offrent de réels avantages notamment en termes de sensibilité et de flexibilité pour la caractérisation des CTC, leur analyse par microscopie s'est avérée délicate. 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>  $\geq 2$  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, 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 le Docteur Philippe Vielh. Les cellules colorées sont ensuite numérisées en lumière visible sur 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 optimiser la numérisation des signaux de FISH. Pour cela, nous avons déterminé le nombre de *z-stacks* ainsi que le

pas nécessaire entre les *z-stacks* 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 des patients présentant divers types de remaniement (*ALK*, *ROS1*, *ERG*) 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 fixé à 0,6  $\mu\text{m}$ ). Nous avons compté le nombre de signaux interprétables pour chacune des cellules dans les six scans indépendants. Un nombre de 30 *z-stacks* nous a permis 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 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 FITC et PE. Pour chaque cellule, 27 combinaisons sont possibles, ce qui permet d'analyser au mieux l'intensité, la taille et l'épaisseur des signaux FISH. 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 Loriot<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 Ividi 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 Ividi 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

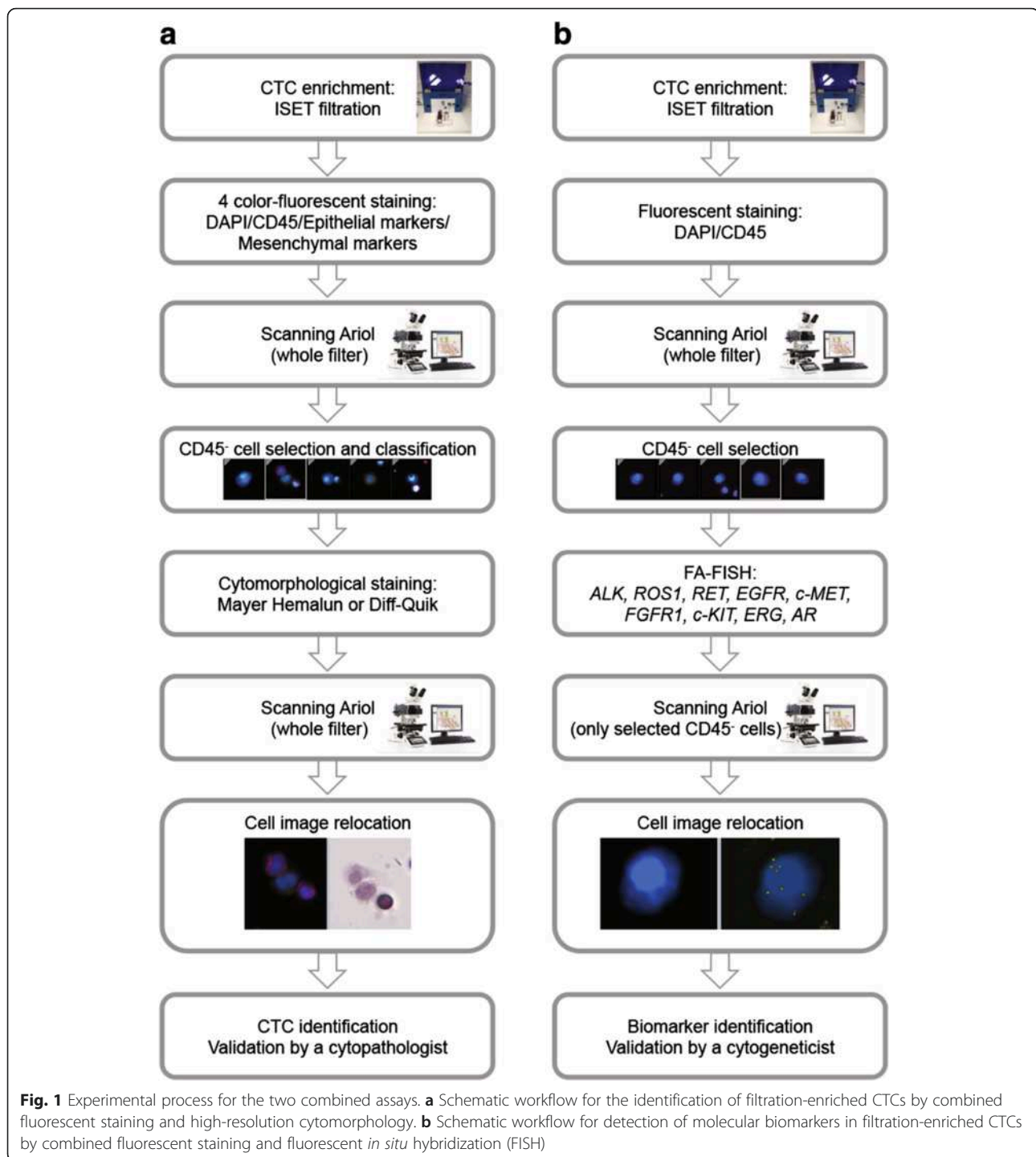
bovine serum and maintained in a humidified incubator in 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cell lines were spiked at various dilutions into blood from healthy donors filtered on ISET, as done for patient samples.

## Results

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

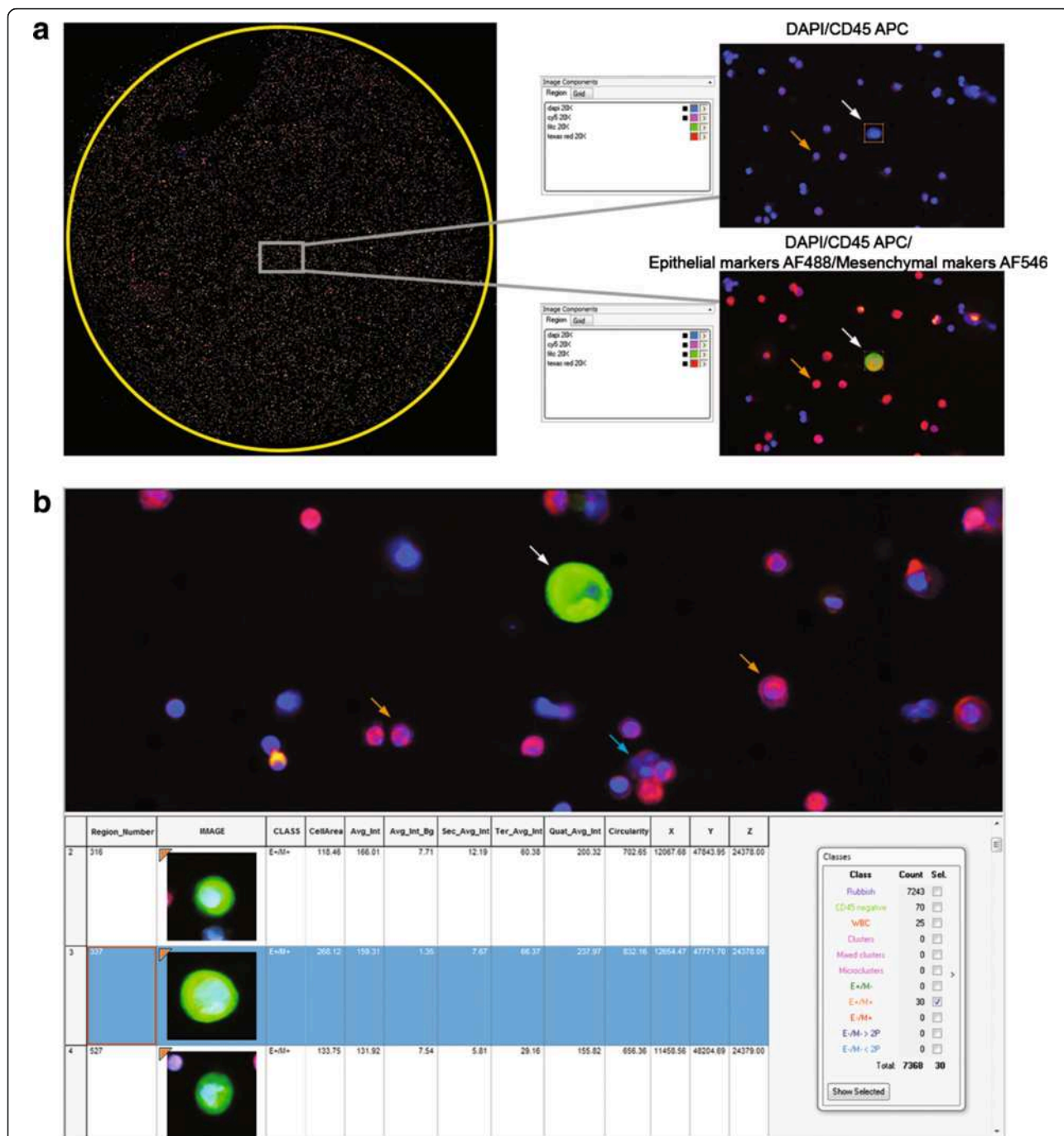
CTCs are most often identified phenotypically through the detection of epithelial markers by immunofluorescent staining. Filtration-enriched CTCs may also be identified according to true cytomorphological criteria such as nucleus size (compared with the size of the filter pores (8  $\mu\text{m}$ ) corresponding 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),

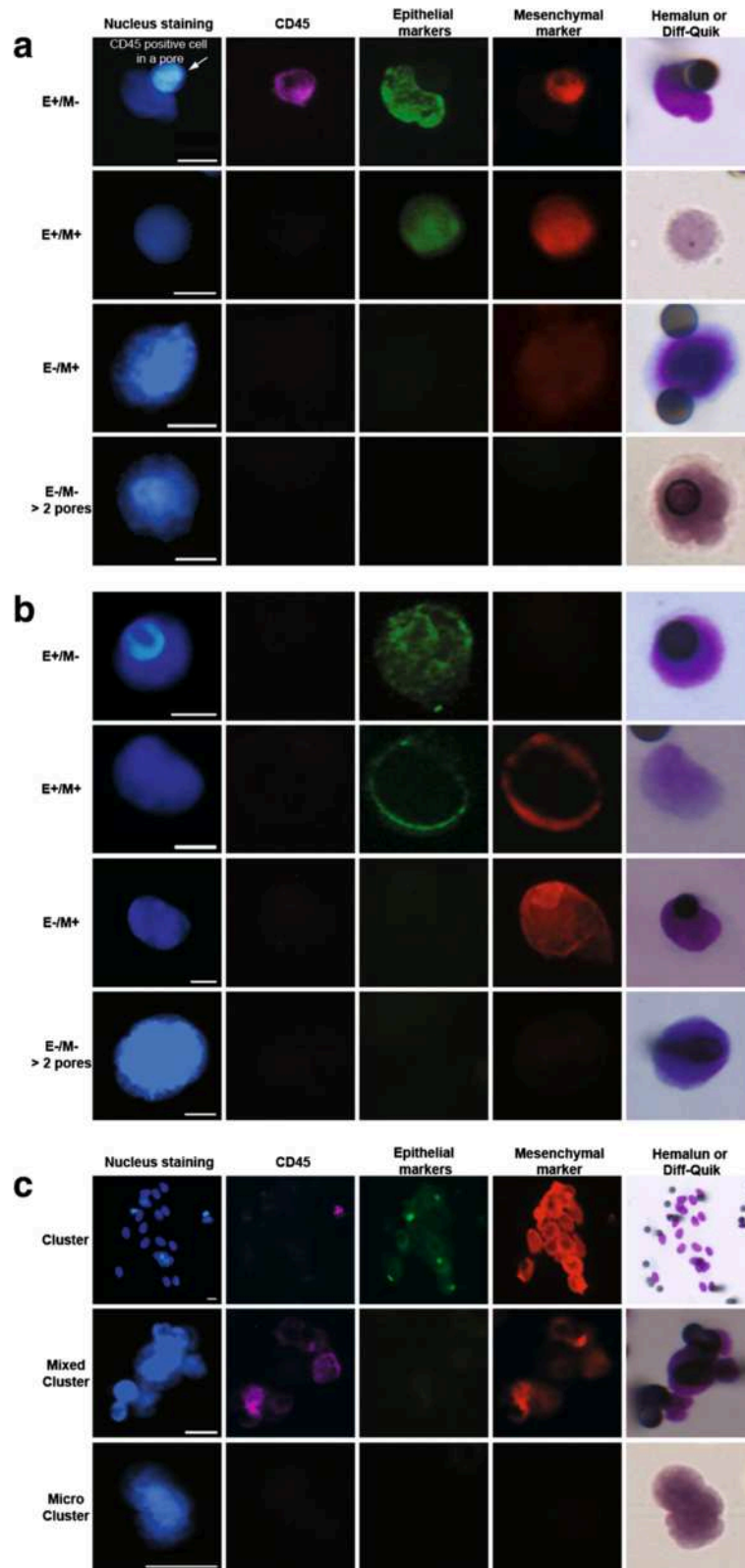


**Fig. 2** Scanning and image gallery of A459 cells spiked in normal blood and filtered by ISET. **a** Images of the whole ISET filter (left panel). Grey windows and right panels show DAPI/CD45 APC and DAPI/CD45 APC/Epithelial markers AF488/Mesenchymal markers AF546 channels. **b** Zoom in images for 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 A459 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-cos 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.



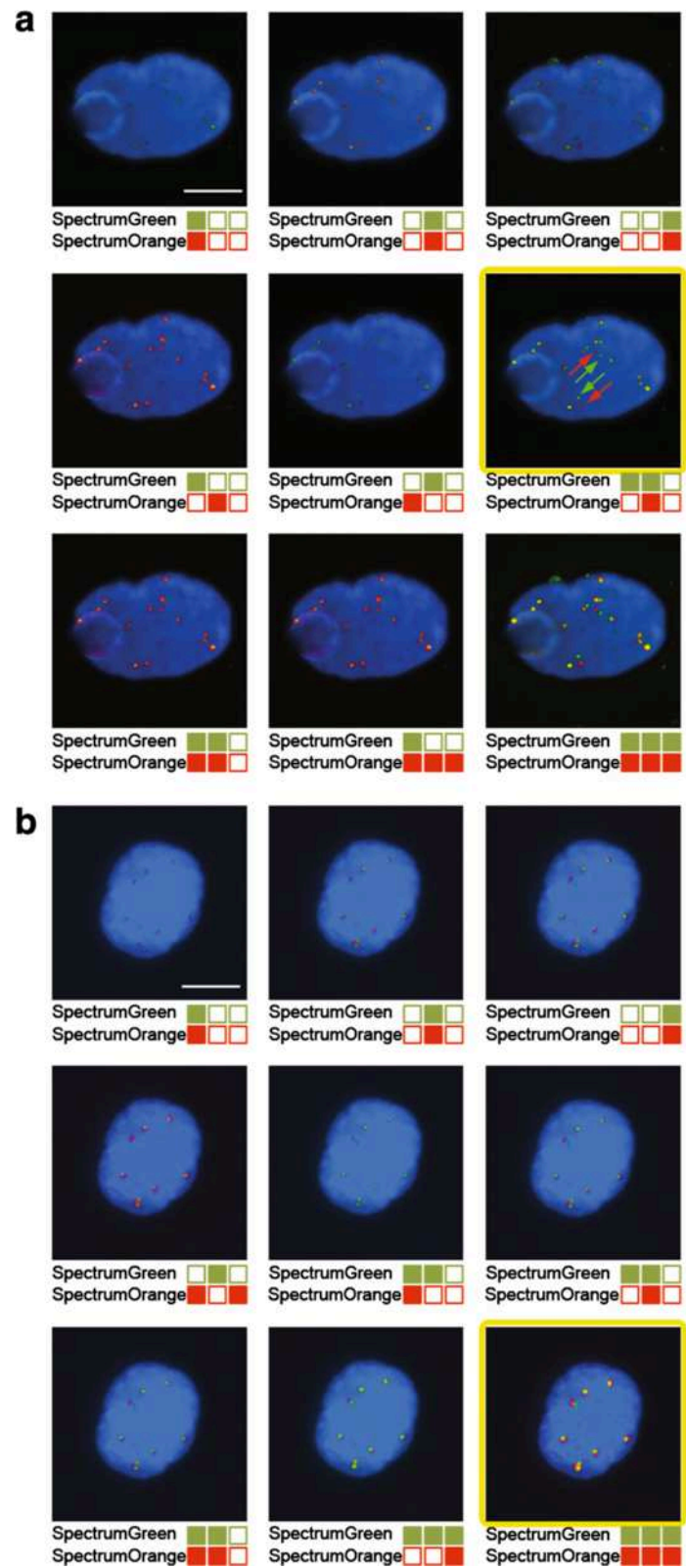
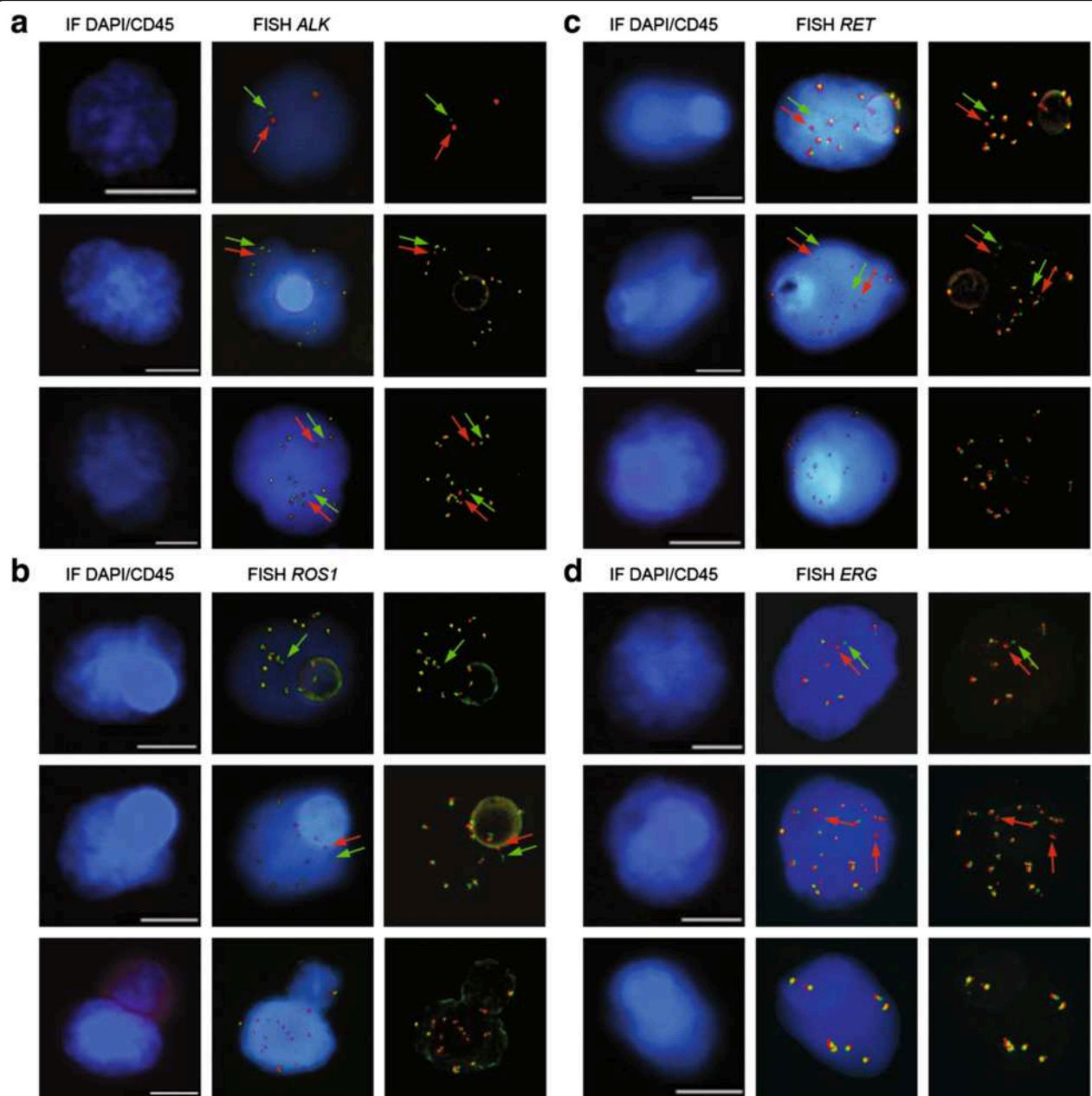


Fig. 4 (See legend on next page.)

(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. Hvhichia 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.

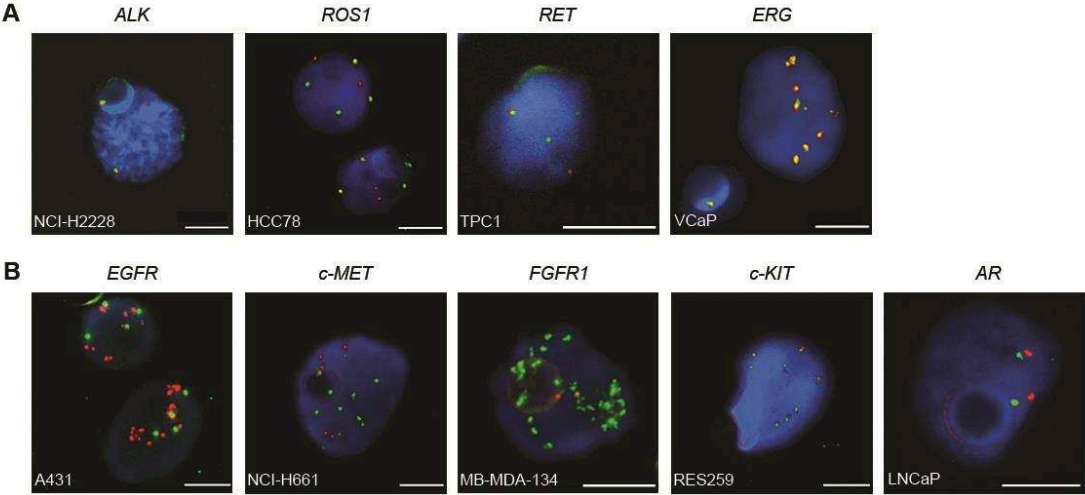
Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- 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 $\mu\text{m}$	0.6 $\mu\text{m}$	0.7 $\mu\text{m}$	0.8 $\mu\text{m}$
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.

### III. Analyse du contenu mutationnel des CTC dans les mCRPC par séquençage de l'exome

#### **Article 3. Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Reveals Undiagnosed Genomic Aberrations in Metastatic Prostate Cancer. Manuscrit soumis.**

Faugeroux V, Lefebvre C, Pailler E, Pierron V, Marcaillou C, Tourlet S, Billiot F, Dogan S, Oulhen M, Vielh P, Rameau P, NgoCamus M, Massard C, Laplace-Builhé C, Tibbe A, Taylor M, Soria JC, Fizazi K, Lorient Y, Julien S, Farace F.

Les analyses génomiques de CTC à l'échelle de cellule unique sont susceptibles de nous fournir des informations importantes sur l'hétérogénéité tumorale et les clones tumoraux dotés d'un potentiel de dissémination métastatique. Pour aborder cette question et prendre en compte l'hétérogénéité phénotypique des CTC, le premier objectif de mes travaux de thèse a été de mettre au point un processus expérimental global incluant trois approches technologiques différentes permettant d'enrichir et d'isoler des CTC individuelles de différents phénotypes (épithélial, épithélio-mésenchymateux et mésenchymateux), une étape d'amplification totale du génome (WGA) et le séquençage de l'exome (WES). La première approche consiste à enrichir les CTC par filtration ISET puis à les détecter par immunofluorescence quatre couleurs incluant les marqueurs épithéliaux EpCAM et pan-cytokératines, le marqueur mésenchymateux vimentine, le marqueur leucocytaire CD45 et le marqueur nucléaire Hoechst puis à scanner les filtres par le système Ariol comme décrit dans la partie Résultats II. Suite à l'étape de détection, les positions des CTC sur le filtre ISET sont transférées vers le microdissecteur Leica LMD6500 *via* l'utilisation du logiciel Alter développé en collaboration avec Leica. Les CTC sont ensuite microdisséquées individuellement. Cette approche permet d'isoler l'ensemble des phénotypes de CTC mais le nombre de CTC épithéliales détectées avec cette stratégie est inférieur à ceux obtenus par la deuxième et la troisième approches. La deuxième approche comprend une étape de détection par le système CellSearch puis une étape d'isolement des CTC individuelles par le système Puncher développé par VyCAP (VyCAP, Deventer, Pays-Bas). La troisième approche combine un enrichissement par RosetteSep et Ficoll puis une détection par cytométrie de flux suite à un marquage par immunofluorescence. Étant donné la supériorité du nombre de CTC détectées par filtration ISET par rapport au CellSearch dans le cancer de la prostate et les CBNPC [Farace F. *et al.*, Br J Cancer, 2011] ainsi que le développement de la méthode de détection et de caractérisation phénotypique des CTC par immunofluorescence et microscopie semi-automatisée décrites dans le paragraphe Résultats-II, les mises au point expérimentales ont été principalement réalisées sur les CTC enrichies par filtration ISET.

Les mêmes paramètres ont ensuite été appliqués aux deux autres méthodes utilisées. Les mises au point des conditions de marquage et de microdissection laser compatibles avec une analyse moléculaire à l'échelle de cellule unique ont constitué le travail de mes dix premiers mois de thèse. Pour cette partie du travail, les lignées LNCaP, A549 et NCI-H1975 ont été mélangées à du sang de donneur sain et filtrées comme du sang de patient. La première étape a été de mettre au point les paramètres de la microdissection laser. Le séchage du filtre ainsi que sa ionisation sont des paramètres cruciaux pour la qualité de la microdissection. Également, les paramètres du microdissecteur tels que la puissance, la vitesse, l'épaisseur du laser pour la coupe et pour l'impulsion du microdissécat à la fin de la coupe nécessitent des réglages importants. L'ensemble de ces paramètres de préparation du filtre ainsi que les paramètres de calibration du microdissecteur sont cruciaux pour obtenir un taux de réussite satisfaisant pour l'isolement de cellules individuelles. La deuxième étape a été l'optimisation du protocole de marquage pour l'obtention de produits de WGA de bonne qualité. En effet, certains réactifs utilisés lors de l'immunofluorescence inhibent le WGA tel que le marqueur nucléaire Hoechst 33342 qui au-delà d'une certaine quantité est concentré par le filtre. Certaines étapes ont donc dû être adaptées, notamment la concentration et l'incubation du Hoechst qui ont dû être diminuées au maximum pour obtenir des produits de WGA de bonne qualité.

Des CTC ont été isolées par ces trois approches chez 11 patients atteints de cancer métastatique de la prostate, inclus dans l'étude clinique MOSCATO 01. Nous avons réalisé le WGA pour 179 échantillons comprenant 162 échantillons de 2 à 10 CTC et 17 échantillons de CTC unique. Nous avons observé que 55 % de *pools* de CTC présentaient un WGA de bonne qualité contre seulement 18 % pour des CTC uniques. Nous avons réalisé le séquençage de l'exome de trente-quatre échantillons de CTC provenant de sept de ces patients sélectionnés sur des critères de qualité et d'uniformité du WGA, ainsi que des biopsies de métastases correspondantes. La moyenne de couverture à 10X était de 54 % (avec une amplitude de 12 à 71 %). La moyenne de régions non couvertes était de 25,5 % et variait de 11 à 77 %. Également nous avons observé que les régions non couvertes ne sont pas identiques indiquant que toutes les régions du génome peuvent être correctement amplifiées par WGA.

Parmi ces 34 échantillons de CTC, quinze, majoritairement de phénotype épithélial, partagent des mutations avec les biopsies de métastases correspondantes. Chez deux patients analysés plus en profondeur du fait de l'hétérogénéité phénotypique de leur CTC, nous avons observé que cinq et quatre échantillons de CTC épithéliales individuelles suffisaient pour couvrir respectivement 59 % et 33 % des mutations de la biopsie. De plus, ces mutations se sont révélées être systématiquement les mêmes pour les CTC d'un même patient. Afin d'identifier les mutations exclusivement présentes dans les CTC (non détectées dans la biopsie), nous avons développé une approche bio-informatique permettant de distinguer ces véritables mutations des erreurs produites par le WGA. Pour cela nous avons établi un

taux de mutations par mégabase et nous avons observé que lorsqu'une mutation était présente dans au moins trois échantillons de CTC d'un même patient le taux de mutations par mégabase était inférieur à celui observé dans la biopsie tumorale du patient correspondant. Nous avons donc considéré les mutations exclusivement présentes dans les CTC lorsqu'elles étaient détectées dans au moins trois échantillons du même patient. Ces mutations « CTC spécifiques » sont présentes dans tous les phénotypes de CTC et affectent particulièrement les gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette, la réparation de l'ADN, l'invasion et les gènes « *cancer drivers* ».

Ce travail montre que le séquençage d'un faible nombre de CTC individuelles peut refléter une partie significative du contenu génomique d'une biopsie et permettre d'identifier des clones tumoraux dominants susceptibles d'avoir un rôle dans la dissémination métastatique. De plus, nous démontrons pour la première fois que les CTC peuvent révéler des aberrations génomiques non diagnostiquées dans les biopsies de métastases, et représentatives de l'hétérogénéité tumorale. Sur la base des mutations partagées avec les biopsies et des mutations spécifiques aux CTC, la réalisation d'une classification hiérarchique des CTC a révélé l'existence de mutations partagées entre les CTC de différents phénotypes. Certaines cellules caractérisées par un noyau supérieur à 16  $\mu\text{m}$  mais n'exprimant pas de marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux présentent des mutations communes avec des CTC épithéliales suggérant l'existence d'un ancêtre commun mais une évolution différente pendant le processus métastatique.

Ce travail met en évidence l'intérêt des CTC pour identifier des cibles thérapeutiques en médecine de précision pour une sélection optimale des traitements.

## Original article

# Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Reveals Undiagnosed Genomic Aberrations in Metastatic Prostate Cancer

V. Faugeroux<sup>1,2</sup>, C. Lefebvre<sup>1</sup>, E. Pailler<sup>1,2</sup>, V. Pierron<sup>3</sup>, C. Marcaillou<sup>4</sup>, S. Tourlet<sup>3</sup>, F. Billiot<sup>2</sup>, S. Dogan<sup>1</sup>, M. Oulhen<sup>2</sup>, P. Vielh<sup>5</sup>, P. Rameau<sup>6</sup>, M. NgoCamus<sup>7</sup>, C. Massard<sup>7</sup>, C. Laplace-Builhé<sup>6</sup>, A. Tibbe<sup>8</sup>, M. Taylor<sup>2</sup>, J.C. Soria<sup>1,7</sup>, K. Fizazi<sup>1,7</sup>, Y. Loriot<sup>1,7\*</sup>, S. Julien<sup>3\*</sup> and F. 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 US23AMMICA, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>3</sup>IPSEN-Innovation, F-91140, LES ULIS France

<sup>4</sup>IntegraGen SA, F-91000, EVRY France

<sup>5</sup>Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, “Histo-Cytopathology” Translational Platform, CNRS UMS3655 – INSERM US23 AMMICA, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>6</sup>Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, “Flow cytometry and Imaging” Platform, CNRS UMS3655 – INSERM US23AMMICA, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>7</sup>Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Department of Cancer Medicine, F-94805, VILLEJUIF France

<sup>8</sup>VYCAP BV, NL-7525, DEVENTER The Netherlands



\*FF, SJ and YL contributed equally to the study.

**§Corresponding author:** Dr Françoise Farace, CNRS UMS3655-INSERM US23 AMMICA, 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)

## Abstract

**Background:** Genomic analysis of circulating tumor cells (CTCs) may provide a unique and accessible representation of tumor diversity and dominant clones with metastatic potential, but remains hindered by technical hurdles associated with CTC rarity and heterogeneity. Here, we present the whole-exome sequencing (WES) of individual CTCs with various epithelial and mesenchymal phenotypes in 11 metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients.

**Patients and Methods:** Patients were pre-treated with enzalutamide or abiraterone. Three isolation strategies including filter laser-capture microdissection, self-seeding microwell chips, and fluorescence activated cell-sorting were used to isolate individual CTCs with distinct phenotypes. Whole-genome amplification (WGA) uniformity and WES performance were qualified. Shared somatic mutations between CTCs and matched-metastasis biopsies were identified. A customized approach based on the determination of mutation rates of CTC samples was developed for the identification of CTC-private (exclusively detected in CTCs) mutations.

**Results:** Among 179 WGA of CTCs, 87 (49%) achieved a satisfying quality. Of the 34 WES performed on selected WGA products, 27/34 (79%) had more than 50% coverage at 10X-depth, 28/34 (82%) had less than 30% allelic-dropout and uncovered regions. In two patients analyzed more deeply in whom a greater number of phenotypically different CTCs were sequenced, shared mutations representing 1/3 to 1/2 of mutations of the matched-metastasis biopsy were recurrent in epithelial CTCs. Forty-five % of shared mutations with matched-metastasis biopsy including in TP53 had a predictive high-impact on protein function. CTC-private mutations undiagnosed in matched-metastasis biopsies were identified in both epithelial and non-epithelial

CTCs and affected cytoskeleton, invasion, DNA repair, and cancer-driver genes. Forty-one % of CTC-private mutations impacted on protein function.

**Conclusions:** We demonstrate that CTCs can provide unique insight into metastasis mutational diversity and reveal undiagnosed genomic aberrations in matched-metastasis biopsies. Our findings emphasize how CTCs can serve an unmet need for optimal therapy selection and precision medicine.

**Keys words:** circulating tumor cells; liquid biopsy; prostate cancer; whole-exome sequencing

## Introduction

Advances in the development of precision medicine for cancer patients rely on the accurate identification of the genomic features underlying a patient's tumor [1]. As the number of genomic targets with matched therapies grows, the current hurdle remains the availability of tumor tissue that can reflect a constantly evolving disease [2]. Recognition that metastatic lesions have a discordant genomic fingerprint compared to primary tumor has led to recommendations for invasive biopsies. However, tumor heterogeneity poses the predicament that single-site biopsies may not capture the genomic alterations relevant to targeted therapy [3]. This is especially true in metastatic prostate cancer where bone metastases arising several years after diagnosis and therapeutic interventions are either inaccessible or yield insufficient material for genomic profiling of the disease [4, 5].

CTCs captured as a "liquid biopsy" are currently regarded as a non-invasive and repeatable source of tumor material that may overcome the sampling challenges of metastatic disease [6-9]. CTCs are likely to arise from distinct metastatic sites, and may better represent tumor heterogeneity in both space and time [10]. CTCs could allow routine monitoring of metastatic spread, drug resistance and disease relapse during the course of treatment [7-9]. CTCs often exhibit combinations of epithelial and mesenchymal traits highlighting the role of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the process of intravasation and cancer cell dissemination [11]. Therefore, non-epithelial-based CTC enrichment methods are essential to capture the phenotypic heterogeneity of CTCs in terms of EMT-marker expression [12-14].

Reports of single-cell high-dimensional analyses of CTCs are scarce and limited to EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)-positive CTCs [15-17]. The rarity and biological heterogeneity of CTCs has imposed technical challenges for their isolation and analyses at single-cell level, and impacted success of robust processing of complex and costly downstream methodologies. Once isolated, individual CTC must undergo whole-genome amplification (WGA) –a mandatory process to identify CTC somatic variants but prone to amplification bias, polymerase errors and allelic dropout (ADO) [18]. Our central hypothesis was that the genetic heterogeneity of CTCs assessed at the single cell level by whole-exome sequencing (WES) reflected their phenotypic heterogeneity in metastatic prostate cancer. Here, we report for the first time the isolation, qualification and WES of individual CTCs harboring various epithelial, mesenchymal and/or morphological characteristics from 11 metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients. All mCRPC patients were included in the MOSCATO 01 clinical trial evaluating the potential clinical benefit of screening metastasis biopsies by high-throughput genomic analyses to identify actionable alterations in patients with advanced cancer [1]. Somatic mutations shared between CTCs and matched metastatic biopsies, and CTC-private (exclusively identified in CTCs and not in matched biopsies) mutations were thoroughly explored. Our results reveal new perspectives for CTCs to identify tumor mutations in a clinical setting and provide a comprehensive genomic picture into disseminating clones involved in metastasis.

## **Patients and Methods**

### **Patients**

Patients with mCRPC were enrolled in the MOSCATO 01 prospective clinical trial (IDRCB 2010-A00841-40; NCT02613962) [1]. The study was 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. Blood was collected into EDTA and CellSave tubes.

### **CTC enrichment, detection and isolation**

ISET (isolation by size of epithelial tumor cells)-filtration, immunofluorescence staining and scanning of ISET-enriched CTCs were performed as previously reported [19]. Isolation of individual CTCs from ISET-filters was performed by laser-microdissection using the ALTER-software to transfer CTC positions from the scanner to the laser-microdissector. CTC detection by the CellSearch was performed as previously described [8, 19]. Isolation of CellSearch CTCs was done using self-seeding microwell chips [20]. Enrichment by RosetteSep was performed according to the manufacturer's protocol. RosetteSep-enriched CTCs were permeabilized, stained by immunofluorescence and isolated by fluorescence-activated-cell-sorting (FACS). All the methods are described in the supplementary section.

### **WGA, quality controls and purification**

WGA was performed using the Ampli1 WGA kit version 1 (MenariniSilicon Biosystems Inc., San Diego, CA, USA). All WGA products were evaluated by a qPCR assay allowing to determine their quality score (QS). The methods are described in the supplementary section.

### **Isolation of genomic DNA from blood and tumor biopsies**

DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tumor biopsies and constitutional DNA were purified as described in the supplementary section.

### **Library preparation and WES**

DNA capture, library preparations, sequencing and base calling are described in the supplementary section.

### **Bioinformatic analysis: alignment, quantification of ADO, identification of somatic mutations, determination of the mutation rate of CTC samples**

ADO was computed as the percentage of germline heterozygous variants identified in the metastasis biopsy that were retrieved as homozygous in CTC sample (i.e. with allelic variant frequency >90% or <10%). The sample mutational load was computed according to the number of somatic mutations per CTC sample, the estimated number of bases at risk, and the minimum number of occurrence required per mutation per patient to be selected as a true positive mutation. The mutational load per megabase was calculated as following:  $N_{Mut} \times 10^6 / N_{BasesAtRisk}$ , where  $N_{mut}$  is the number of mutations selected,  $N_{BasesAtRisk}$  the number of bases at risk according to the coverage of the sample(s) under consideration. The bioinformatics analysis is described in the supplementary section.

## Results

Overall, 11 patients were included in the current analysis. Patient characteristics are reported in table S1. At a time of CTC collection, all patients had metastases from CRPC and all but one were previously treated with either abiraterone or enzalutamide. 3/11 (27%) had been treated with prior docetaxel.

We initially developed a CTC enrichment strategy based on ISET-filtration prior to a multistep process combining immunofluorescent staining with epithelial and mesenchymal markers, scanning of filters for CTC identification, and laser-microdissection to isolate individual CTCs (Figure 1A). Individual CTCs from five mCRPC patients (P1-P5) were isolated accordingly, although we detected very few epithelial CTCs in all patients compared to higher counts of epithelial CTCs detected by CellSearch among two (P2 and P3) of these five patients (Table S2). Interestingly, ISET revealed hybrid cells, and populations of large (nuclei  $\geq 16 \mu\text{m}$ ) and mesenchymal candidate CTCs, of possible interest for further analysis by WES (Figure 1B). We developed two other strategies to capture epithelial and other candidate CTCs. In the second strategy, CTCs were enumerated by the CellSearch and individually isolated using the self-seeding microwell chips platform [20] (Figure 1A). Our third approach involved hematopoietic blood-cell depletion and individual CTC isolation by FACS (Figure 1A). These three strategies allowed the identification of five phenotypic subtypes of candidate CTCs based on both epithelial and mesenchymal marker expression and/or morphological characteristics (Figure 1B). These initial results led us to explore and isolate CTCs in six more mCRPC patients (Tables S1 and S2). A global workflow was established based on these strategies, WGA and qualification,



and WES of individual CTCs (Figure 1C). We hypothesized that pools of a limited number of individual CTCs could result in higher quality WGA, less amplification errors and ADO, and could subsequently yield a higher sensitivity of variant detection than single CTCs. We isolated 162 pools of 2 to 10 individual CTCs, and 17 single CTCs from the 11 mCRPC patients. The quality of WGA was controlled by a qPCR assay allowing to determine their QS ranging from 1 to 7 (Table S3, Figure S1A). To determine the QS required to achieve at least 50% coverage at 10X-depth sequencing, we sequenced the whole-exome of a training set of 13 CTC samples with different QS. Only WGA products with a  $QS \geq 3$  presented homogeneous coverage (Figure S1B). Consequently, we determined a cut-off at a QS of 3 for WES eligibility that was reached by 87/179 (49%) WGA samples. As hypothesized the quality of WGA samples depended on the number of CTCs per pool (Figure 1D). Among the 87 WGA samples with a  $QS \geq 3$  from all mCRPC patients, 31 from seven presented phenotypical heterogeneity in their CTC samples and were selected for an experimental set of WES. Two supplementary epithelial CTC pools (P7-E-7 and P7-E-8) of 10 CTCs and a single CTC bearing a hybrid phenotype, all with a  $QS < 3$ , were included for patient P7 to address CTC heterogeneity (Table S4). We qualified the WES from a total of 34 CTC samples (Figure 1E, Figure S1). Twenty-seven of the 34 (79%) CTC samples had more than 50% coverage at 10X (mean of 54%; range, 12-71%); Twenty-eight of the 34 (82%) CTC samples had less than 30% of ADO (mean of 40%; range, 17-96%) (Figures S1C, 1D). Twenty-eight of the 34 (82%) CTC samples had less than 30% of uncovered regions (mean of 25.5%; range, 11%-77%) (Figure S1E). We observed that uncovered regions were not conserved between the 34 CTC samples indicating that all the genome regions can be amplified by WGA (Figure S1F). Overall, the percentage coverage at 10X, percentage of ADO and

percentage of uncovered targets depended on the QS of WGA products. Our results indicated that rigorous qualification of WGA uniformity reliably predicts high-quality WES.

We analyzed shared mutations between CTCs and matched metastatic biopsy in mCRPC patients. Among the 34 CTC samples analyzed by WES, 15 samples from four patients (P1, P7, P10, P11) shared mutations with the matched-biopsy (Figure 2A). A total of 136 shared mutations for 65 unique mutations were detected (Figures S2,S3A). We found that 61/65 (93.9%) of shared unique mutations with the matched-biopsy were detected exclusively in epithelial CTCs, and 4/65 (6.1%) of shared unique mutations were detected in CTCs bearing various phenotypical characteristics (Figure 2B). In patients P7 and P11, for whom a larger number of CTC samples with various characteristics were sequenced, 59% and 33% of mutations detected in metastasis biopsies were identified in CTCs, respectively (Figure 2C). For P7, shared mutations were mostly identified in two CTC pools with a high QS (Table 1). For P11, 31% of shared mutations with the matched biopsy were present in one pool of five and one single epithelial CTC with a  $QS \geq 5$  (Figure S4). Most shared mutations, including those in GRM8 and TP53, were identified in several epithelial CTC samples (Figure 2B, Table S5). Overall, 24/53 (45%) of shared unique mutations had a predicted high-impact on protein function. Our results demonstrated that WES of a small number of pools of individual epithelial CTCs or single epithelial CTCs, selected by a rigorous qualification process, achieved significant coverage when compared to the accessible exome of the metastasis biopsy. Mutations shared between CTCs and matched-metastasis biopsies were recurrent in CTCs, suggesting their possibly important role in metastatic spread.

To reliably discern somatic CTC-private mutations from WGA errors, we established a customized approach and removed all shared variants between CTCs and matched biopsies (Table S6). Secondly, given that there were no shared mutations between the metastasis biopsies of the seven patients, we hypothesized, in this setting, that shared variants between CTCs from different patients would be considered as WGA errors and therefore excluded –a choice not necessarily applicable to other cancers. Thirdly, variants were classified according to the number of times these were observed in CTC samples (Figure S3B). We determined a mutation rate per Mb per CTC sample after requiring variants to be observed in one, two, three samples, as shown in patient P11 (Figure 3A), as well as a mean mutation rate per Mb per patient (Figure S5). Mutations identified in CTC samples with a mutation rate per Mb  $\leq$  to that of metastasis biopsies were considered as private mutations and not artifacts. Among the 240 variants identified in two CTC samples, 32 were known mutations listed in databases with a predictive impact on protein function, including variants in cancer genes such as HSP90AB1 and KDM5B (Figure S2, Table S7). When variants were required to be observed in three CTC samples, the mutation rates per Mb per sample was  $\leq$  values of matched metastases (Figure 3A, Figure S5). Twenty-two somatic variants were present in at least three CTC samples, of which 13/22 variants were reported in databases (Table 1). Nine of the 22 (41%) private mutations were identified in genes involved in DNA repair (e.g. HERC2), cytoskeleton (e.g. MACF1) or invasion (e.g. NEDD9) and known to impact protein function. In patient P11, 20% of CTC private-variants were identified in at least three CTC samples (Figure 3B). When we examined the distribution of these 22 private variants according to CTC phenotype, 12/22 (55%) private variants were detected exclusively in CTCs with an epithelial phenotype, and 10/22 (45%) were present in CTCs harboring various

characteristics (Figure 3C). These data demonstrated the existence of private mutations in CTCs that were not detected by standard WES in matched biopsies.

To evaluate the relationship between CTCs with distinct characteristics in P7 and P11, we performed hierarchical clustering for mutations observed in at least three CTC samples (Figure S6). The existence of shared mutations between CTCs with distinct characteristics supported their phylogenetic relationship but divergent evolution.

## Discussion

Herein, we present the first genomic analysis of individual CTCs with various phenotypical characteristics. Three different CTC isolation strategies were evaluated in order to enrich CTCs on the basis of physical properties rather than relying solely on EpCAM expression and to accommodate the challenge of CTC heterogeneity. We determined a global workflow to generate high-quality libraries for WES in which rigorous qualification of WGA uniformity could reliably predict which CTC pool or single CTC would most likely yield high-quality WES data. Our results differ from those reported by Lohr et al. in which ADO and a lack of systematic coverage in WGA products from single EpCAM-positive CTCs necessitated WES of multiple single CTCs (n=19) for variant determination [15]. Although perhaps less pertinent for exploring tumor heterogeneity, the approach presented here, which limited WES to a small number of high-quality CTC samples and integrated CTC pools, is technically more practical and cost-effective for a clinical setting.

We show that WES of a very small number of pools of individual epithelial CTCs or single epithelial CTCs, selected after rigorous qualification, yielded significant coverage of the exome of matched-metastasis biopsies including mutations in prostate cancer genes such as GRM8 or TP53. Our results indicate that CTC sequencing can provide a reasonable and feasible proxy for metastasis sampling in disseminated cancer. Interestingly recurrent mutations were systematically identified in both CTCs and matched-metastasis biopsies and sequencing more CTCs did not significantly extend the number of mutations identified. Also, a fraction of mutations identified within the matched-metastasis biopsy was not detected in CTCs, suggesting that these mutations may not convey the capacity to disseminate or transit in blood. By analogy,

it could be hypothesized that these recurrent mutations found in CTCs and shared by matched-metastasis biopsies could play an important role in metastatic progression.

One third of shared mutations between CTCs and matched-metastasis biopsies were observed in three CTC samples. For more reliability, we only considered CTC-private mutations observed in at least three CTC samples and assumed that some potentially interesting mutations present in less than three CTC samples were lost. CTC-private mutations included known mutations with predictive high-impact on protein function in cancer-driver genes such as HSP90AB1 and KDM5B, and in genes which may have a crucial role in CTCs biological specificity (e.g. cytoskeletal remodeling) or survival (e.g. DNA repair). CTC-private mutations were mostly present in epithelial CTCs or in both epithelial and CTCs with other morphological characteristics. Our data suggest that CTCs harboring these private mutations derived from distinct metastatic sites or represented minor subclones that were undetectable in metastatic biopsies.

These results demonstrate for the first-time that sequencing individual CTCs can reveal a metastasis mutational content and diversity that was otherwise inaccessible. While tumor tissue biopsies presently remain the gold-standard to confirm the genetic abnormalities found in CTCs, it is important to question the representability of a needle or single-site biopsy. Our findings emphasize the crucial interest and anticipate the clinical utility of detecting such mutations in CTCs through minimally invasive blood-draws for optimal therapy selection, precision medicine and treatment resistance options. Recently, it has been shown that by quantifying digital pathology features of CTC, a low CTC phenotypic heterogeneity was associated with better OS in patients treated with androgen receptor signaling inhibitors, whereas high heterogeneity was

associated with better OS in patients treated with taxane chemotherapy [21]. Beyond identifying potential targets, WES at single-cell level may quantify heterogeneity and help in decision-making for patients with mCRPC.

This pioneering study emphasizes the crucial interest of CTCs to represent metastasis mutational content and tumor diversity that is otherwise inaccessible. By offering real-time monitoring of a constantly evolving disease and detecting potentially critical mutations through minimally invasive blood draws, CTCs sequencing can serve an unmet need for optimal therapy selection and precision medicine.

## **Acknowledgements**

We thank the patients and their families as well as E. Martin PhD for fruitful discussion and M. Letexier for help in bioinformatics analysis.

## **Funding**

The study was supported by IPSEN-Innovation, F-91140, Les Ulis. V. Faugeron is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (no FDT20160435543). C. Lefebvre was supported by the SIRIC Socrate. E. Pailler was supported by the LabEx LERMIT (no ANR-10-LABX-0033-LERMIT) and the Fondation pour la Recherche Médicale (no FDT20150532072).

**Conflict of interest disclosure statement:** Authors disclose no potential conflicts of interest.



## References

1. Massard C, Michiels S, Ferte C et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov* 2017.
2. 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.
3. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015; 161: 1215-1228.
4. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 2015; 520: 353-357.
5. Hong MK, Macintyre G, Wedge DC et al. Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat Commun* 2015; 6: 6605.
6. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 623-631.
7. Miyamoto DT, Sequist LV, Lee RJ. Circulating tumour cells-monitoring treatment response in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11: 401-412.
8. 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: 2912-2918.
9. 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.
10. Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 2016; 529: 298-306.
11. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; 166: 21-45.
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: 1338-1341.
13. Massard C, Oulhen M, Le Moulec S 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; 7: 55069-55082.
14. 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: 306-315.
15. Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 479-484.
16. 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.
17. Polzer B, Medoro G, Pasch S et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 1371-1386.
18. Adalsteinsson VA, Love JC. Towards Engineered Processes for Sequencing-Based Analysis of Single Circulating Tumor Cells. *Curr Opin Chem Eng* 2014; 4: 97-104.
19. 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.

20. Swennenhuis JF, Tibbe AG, Stevens M et al. Self-seeding microwell chip for the isolation and characterization of single cells. *Lab Chip* 2015; 15: 3039-3046.
21. Scher HI, Graf RP, Schreiber N et al. Phenotypic Heterogeneity of Circulating Tumor Cells Informs Clinical Decisions between AR Signaling Inhibitors and Taxanes in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res* 2017.

## Figure legends

**Fig. 1: Experimental process for whole-exome sequencing of individual CTCs from mCRPC patients.** (A), Schematic process of the three experimental strategies used for enrichment, detection and isolation of individual CTCs. (B), Nomenclature of CTC candidates according to epithelial and mesenchymal marker expression and the experimental strategy used for isolation. Epithelial CTCs (E) were CD45 negative, positive for EpCAM and pan-cytokeratin (green staining), and Hoechst 33342 (blue staining). Hybrid CTCs (H) were CD45 negative, positive for EpCAM and pan-cytokeratin, vimentin (red staining) and Hoechst 33342. Large CD45 negative, Hoechst 33342 positive cells (L) with a nucleus  $\geq 16\mu\text{M}$  and epithelial and mesenchymal expression below the threshold of the assay were selected for WES on the basis of cytomorphological features reported in previous studies [19]. Large mesenchymal CD45 negative Hoechst 33342 positive cells (LM) with a nucleus  $\geq 16\mu\text{M}$  and vimentin expression were selected for WES on the basis of cytomorphological features. CD45 negative Hoechst 33342 positive small cell candidates (S) with cytokeratin expression below the threshold of the assay and containing a nucleus morphologically distinct from surrounding CD45 positive cells were tested by WES. (C), Workflow for whole-exome sequencing of individual CTCs. (D) Percentage of WGA products with  $QS \geq 3$  according to the number of individual CTCs per sample. CTC samples were classified according to the number of individual CTC per sample. The percentage of WGA with  $QS \geq 3$  was dependent on the number of individual CTCs per sample. (E) Coverage at 10X depth sequencing of the 34 selected CTC samples from the experimental set of WES. The nomenclature of CTCs is detailed in the Table S4. The mean

percentage coverage at 10 X is 54.3% (range, 12- 71%). The lower percentage of coverage at 10X was due to WGA with a QS<3.

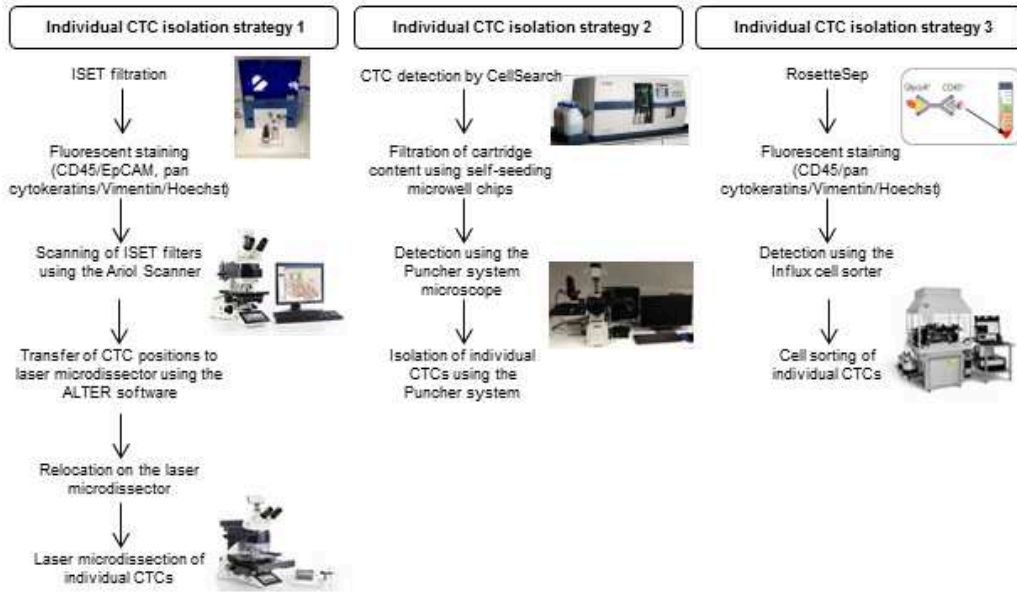
**Fig. 2: Characterization of variants shared by metastasis biopsies and CTCs.** (A), Number of variants shared by metastasis biopsies and CTCs. Fifteen CTC samples from four of the seven patients shared a total of 136 variants with matched-metastasis biopsy of which 65 were unique. For each patient the sum of variants shared by metastasis biopsy and CTCs was represented in hatched bars. (B), Distribution of shared unique variants according to CTC phenotype. Sixty-one (93.9%) variants were detected in epithelial CTC (E), two (3.1%) variants were only detected in large CTCs (L), one (1.5%) variant was detected both in epithelial and large (E+L) CTCs and one (1.5%) variant was detected in epithelial, large and hybrid CTCs (E+L+H). (C), Percentage of variants shared by CTCs and metastasis biopsies, or only present in metastasis biopsies in patients P7 and P11. (D), Heatmap of variants identified in the metastasis biopsy and shared by CTCs in patient P7. Forty one percent of variants were exclusively identified in the metastasis biopsy and 59% were shared with CTCs. The P7-E-10 pool (QS=7) displayed 51% of shared mutations with the matched biopsy. The two pools P7-E-10 and P7-E-9 (QS=6) had almost the same mutations and detected 54% of shared mutations with the matched biopsy. The positions of variants present in the metastasis biopsy and not covered in CTCs are shown.

**Fig. 3: Characterization of CTC-private variants.** (A), Mutation rate per Mb in CTCs from patient P11 after requiring variants to be observed in one, two or three CTC samples. When variants were required to be observed in two CTC samples, the mutation rates per Mb per sample were close to the values of the corresponding metastasis, although for some CTC samples, this

value was greater, indicating that WGA errors could be conserved. When variants were required to be observed in three CTC samples, the mutation rates per Mb per sample was  $\leq$  values of matched metastases. **(B)**, Heatmap of CTC-private variants in patient P11. Eighty-one (80.2%) of 101 CTC variants were detected in two CTC samples, 15 (14.8%) in three CTC samples, four (4%) in four CTC samples and one (1%) in five CTC samples. The positions of variants not covered in CTC samples are shown. **(C)**, Distribution of unique CTC private-variants present in at least in three CTC samples according to the phenotype of CTC samples. Twenty two unique CTC-private variants were detected in at least three CTC samples with exclusively an epithelial phenotype (55%) or with different phenotypes (45%).

**Figure 1**

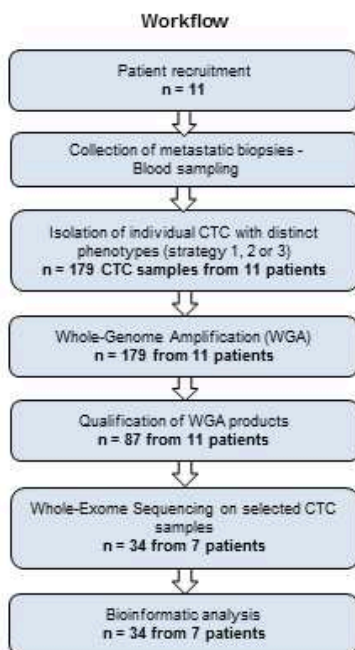
**A**



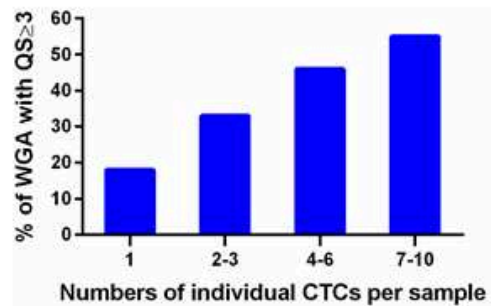
**B**

	E (Epithelial)	H (Hybrid)	L (Large)	LM (Large Mesenchymal)	S (Small)
<b>Nomenclature</b>					
<b>Phenotype (CD45)</b>	Epithelial	Epithelial and mesenchymal	Large nucleus (>16 μm) without expression of epithelial and mesenchymal markers	Mesenchymal and large nucleus (>16 μm)	Nucleus <16 μm, without expression of epithelial and mesenchymal markers
<b>Isolation strategy</b>	Strategy 1 Strategy 2 Strategy 3	Strategy 1 Strategy 3	Strategy 1	Strategy 1	Strategy 1

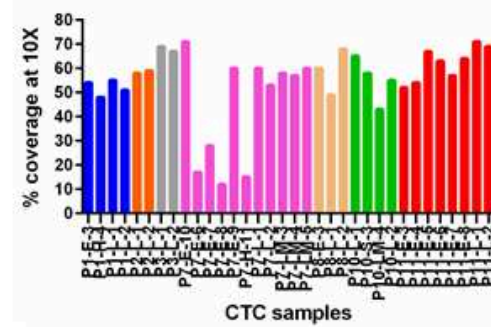
**C**



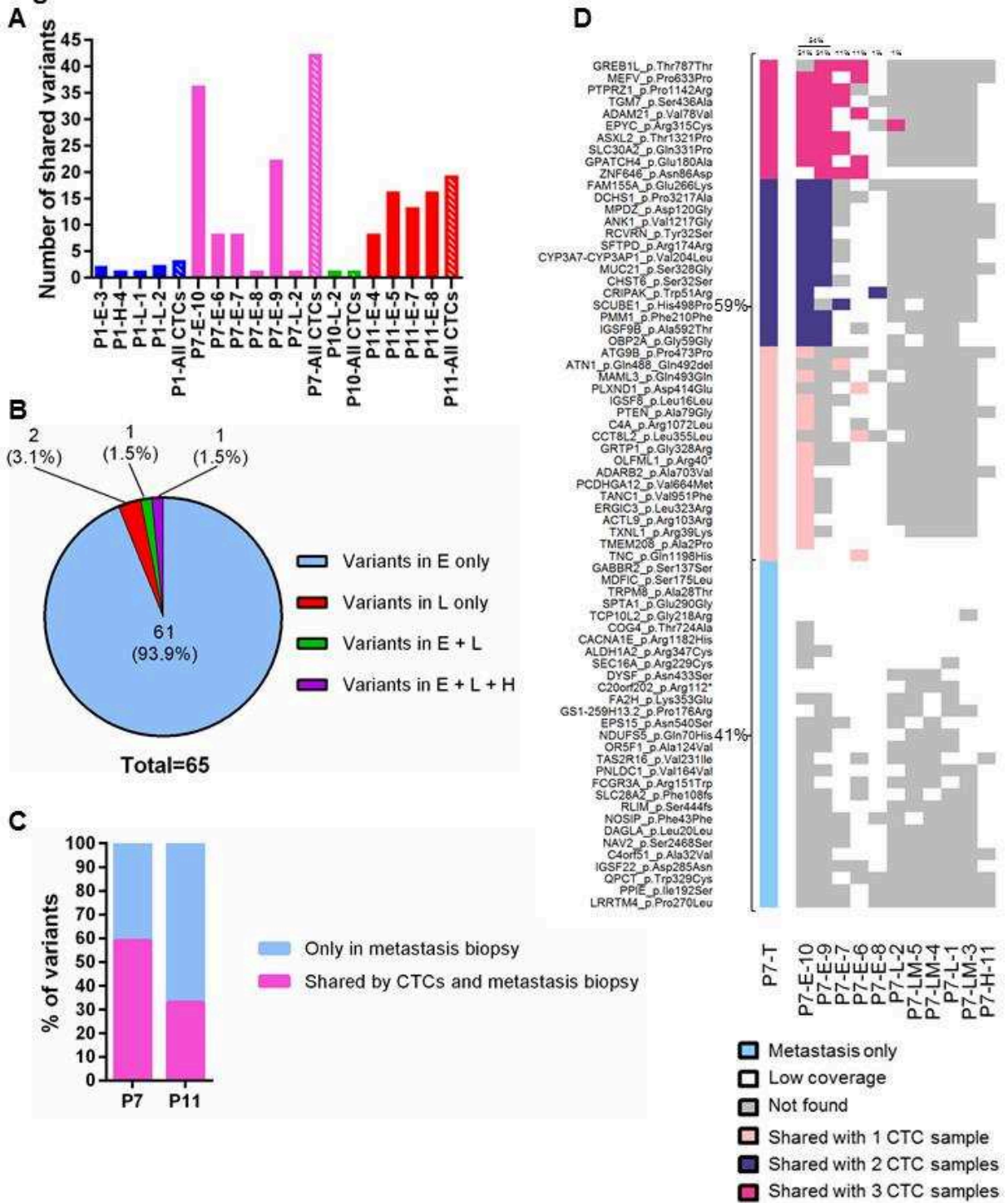
**D**



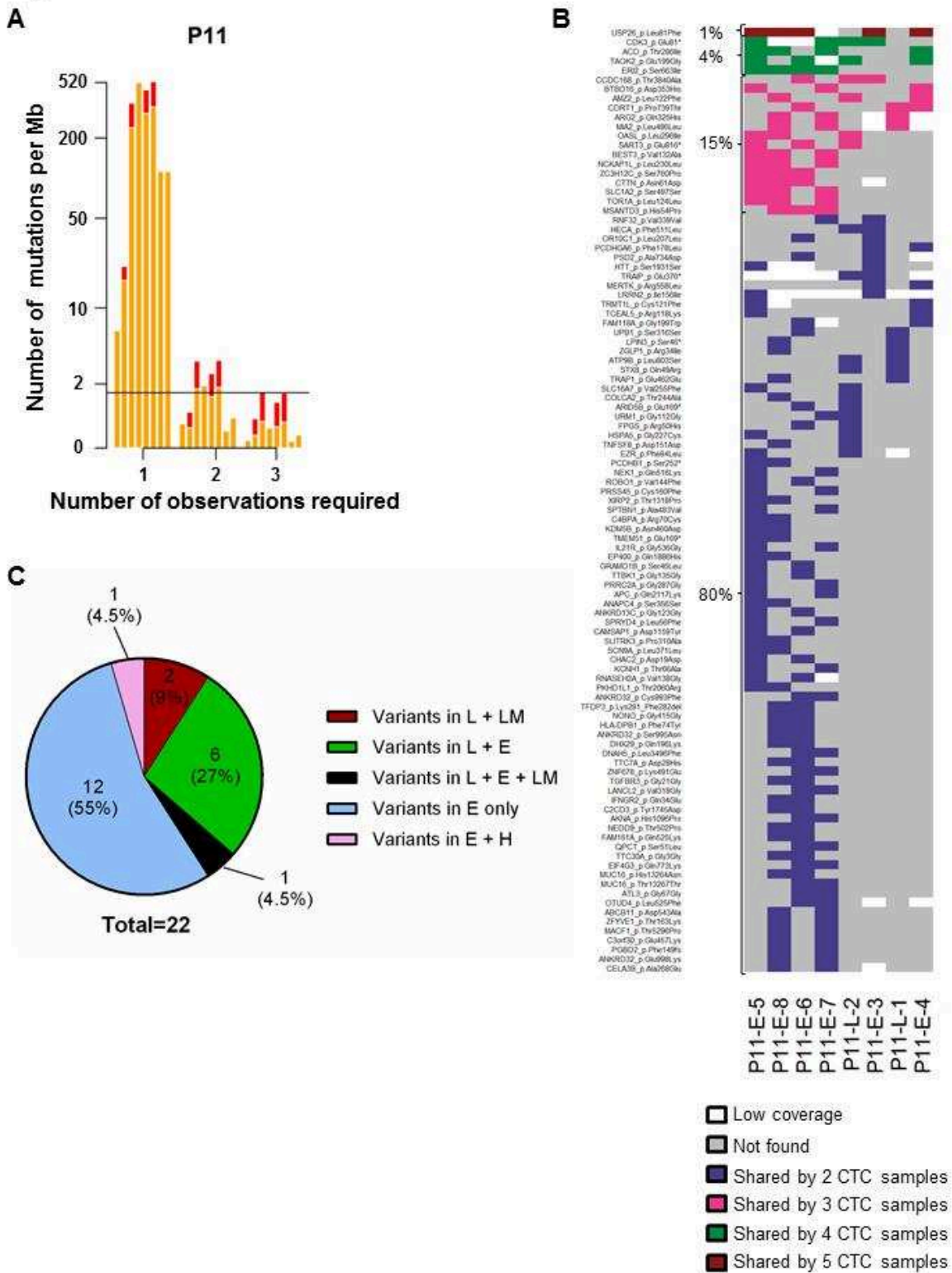
**E**



**Figure 2**



**Figure 3**





**Table 1:** Examples of shared variants between CTCs and matched metastatic biopsies, and CTC-private variants

Genes	Transcript ID	Database		sSNVs		Prediction (Polyphen2 Sift)	Number of CTC samples	Patient ID
		dbSNP	COSMIC	codon change	aa change			
<b>Shared variants by CTCs and matched metastatic biopsies</b>								
GRM8	NM_000845.2	-	-	c.2207C>T	p.Ala736Val	D, T	4 (P11-E-4 ; P11-E-5 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
TP53	NM_000546.5	-	COSM10656	c.742C>T	p.Arg248Trp	D, D	4 (P11-E-4 ; P11-E-5 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
PTEN	NM_000314.4	-	-	c.236C>G	p.Ala79Gly	B, NA	1 (P7-E-10)	P7
<b>CTC-private variants observed in at least 3 CTC samples</b>								
PPAPDC1A	NM_001030059.1	.	.	c.301_305delATTAA	p.Ile101fs	NA, NA	3 (P7-L-2 ; P7-LM-3 ; P7-LM-5)	P7
INO80	NM_017553.2	.	.	c.2867C>T	p.Pro956Leu	B, T	3 (P7-L-1 ; P7-L-2 ; P7-LM-3)	P7
C3orf30	NM_152539.2	rs199919487	.	c.1369G>A	p.Glu457Lys	D, D	4 (P11-L-2 ; P11-E-4 ; P11-E-5 ; P11-E-6)	P11
ANKRD32	NM_032290.3	.	.	c.2992G>A	p.Glu998Lys	B, T	4 (P11-L-2 ; P11-E-3 ; P11-E-5 ; P11-E-7)	P11
MUC16	NM_024690.2	rs78831402	.	c.39790C>A	p.His13264Asn	P, D	3 (P11-L-1 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
EIF4G3	NM_001198801.1	.	.	c.2317C>A	p.Gln773Lys	B, T	3 (P11-L-2 ; P11-E5 ; P11-E-8)	P11
OTUD4	NM_001102653.1	.	.	c.1575A>C	p.Leu525Phe	P, T	3 (P11-L-2 ; P11-E-4 ; P11-E-8)	P11
ZFYVE1	NM_021260.3	.	COSM470205	c.488C>A	p.Thr163Lys	B, T	3 (P11-L-2 ; P11-E-3 ; P11-E-6)	P11
GZMH	NM_033423.4	rs140193391	.	c.280C>G	p.Pro94Ala	B, T	5 (P7-L-2 ; P7-LM-3 ; P7-LM-4 ; P7-E-6 ; P7-E-9)	P7
CELA3B	NM_007352.2	rs202129706	.	c.803C>A	p.Ala268Glu	B, T	5 (P11-E-3 ; P11-E-4 ; P11-E-5 ; P11-E-6 ; P11-E-8)	P11
HERC2	NM_004667.5	rs150363648	.	c.905C>T	p.Thr302Met	P, D	4 (P7-E-6 ; P7-E-7 ; P7-E-9 ; P7-E-10)	P7
PGBD2	NM_170725.2	.	.	c.441_442insT	p.Phe149fs	NA, NA	4 (P11-E-4 ; P11-E-5 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
MACF1	NM_012090.5	rs202091916	COSM128604	c.15886A>C	p.Thr5296Pro	D, NA	4 (P11-E-5 ; P11-E-6 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
ABCB11	NM_003742.2	rs200687717	.	c.1628A>C	p.Asp543Ala	B, T	3 (P11-E-4 ; P11-E-5 ; P11-E-7)	P11
QPCT	NM_012413.3	.	.	c.152C>T	p.Ser51Leu	B, D	3 (P11-E-5 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
FAM161A	NM_001201543.1	rs200331923	.	c.1573C>A	p.Gln525Lys	B, T	3 (P11-E-5 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
NEDD9	NM_001142393.1	.	.	c.1504A>C	p.Thr502Pro	D, T	3 (P11-E-5 ; P11-E-6 ; P11-E-8)	P11
AKNA	NM_030767.4	rs200970909	.	c.3287A>C	p.His1096Pro	P, D	3 (P11-E-5 ; P11-E-6 ; P11-E-8)	P11
C2CD3	NM_001286577.1	rs200719890	.	c.5233T>G	p.Tyr1745Asp	D, D	3 (P11-E-5 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
IFNGR2	NM_005534.3	.	.	c.100C>G	p.Gln34Glu	B, T	3 (P11-E-5 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
LANCL2	NM_018697.3	rs201180232	COSM453253	c.953T>G	p.Val318Gly	D, D	3 (P11-E-6 ; P11-E-7 ; P11-E-8)	P11
NDUFV2	NM_021074.4	rs72935225	.	c.401T>C	p.Val134Ala	B, T	3 (P7-E-9 ; P7-E-10 ; P7-H-11)	P7

Abbreviations: CTC, circulating tumor cells; sSNVs, somatic single nucleotide variants

## **Supplementary Materials**

### **Supplementary Methods**

#### **ISET filtration, immunofluorescence staining and scanning of ISET-enriched CTCs**

ISET filters are composed of 10 spots and each spot (filtration of 1 mL of blood per spot) was cut out individually for independent analysis. Individual spots were immobilized on glass slides using adhesive ribbon. Before immunofluorescence staining, a ‘snick’ was made on each spot to allow precise relocation of cells on the laser microdissector LMD6500 (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond Inc., IL, USA). Spots were rehydrated 5 minutes in TBS 1X (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at room temperature and cell permeabilization was performed in TBS 1X-Triton X-100 0.2% (Roche, Sigma-Aldrich Co. LLC., Saint-Louis, MO, USA) for 7 minutes at room temperature. After washing with TBS 1X, cells were incubated 25 minutes in a humidity dark chamber with antibodies against epithelial, mesenchymal and leukocyte markers. Epithelial markers included a mouse anti-pancytokeratin (CK) monoclonal antibody (clone A45-B/B3, AS Diagnostik, Hueckeswagen, Germany) 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, Littleton, CO, USA). An anti-vimentin (clone V9, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) conjugated to AF546 was used as mesenchymal marker and an anti CD45 APC (clone HI30, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) was used as leukocyte marker. After two washes with TBS 1X-Tween20 0.05% (Dako, Les Ulis, France) and one wash with TBS 1X, Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) was added and incubated for 10 min at room temperature. After two washes with TBS 1X-Tween20 0.05% (Dako) and one wash with TBS 1X, ISET spots were mounted between a slide and coverslip

using Ibidi mounting medium (Biovalley, Nanterre, France) and immediately scanned with the ARIOL scanner (Leica Biosystems Richmond Inc.). Candidate CTCs were classified according to epithelial and mesenchymal marker expression and/or morphological characteristics.

### **Detection of CTCs by the CellSearch**

CTC enrichment using the CellSearch system was performed on 7.5 mL of blood collected in CellSave tubes as previously described [9,17]. At the end of the autprep run, the cartridge was immediately removed and analyzed to prevent cells from sticking to the cartridge surface.

### **Enrichment of CTCs by RosetteSep and immunofluorescence staining**

Negative selection of CTCs by the RosetteSep Human CD45 Depletion Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) was performed according to the manufacturer's protocol starting from blood samples collected in CellSave tubes. RosetteSep-enriched CTCs were washed with PBS 1X and centrifuged 6 minutes at 1600 rpm. The cell pellet was suspended with 100  $\mu$ L of fixative solution medium A from the Fix&Perm kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) before incubation 15 minutes at room temperature. After three washes with PBS 1X cells, were centrifuged 5 minutes at 1200 rpm. The cell pellet was re-suspended with 100  $\mu$ L of permeabilization solution medium B from the Fix &Perm kit, 50  $\mu$ L of staining reagent containing cytokeratin-PE and CD45-APC antibodies from the CellSearch reagent kit and 5  $\mu$ L of vimentin-FITC antibody (clone V9, Santa Cruz Biotechnology) and incubated 20 minutes in the dark at room temperature. Cells were washed, centrifuged and suspended in 300  $\mu$ l of PBS 1X. Hoechst 33342 was added before cell sorting on a BD Influx cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

## **Individual CTC isolation**

### Isolation of ISET-enriched CTCs by laser microdissection

A software called ALTER (Leica Biosystems Richmond Inc.) was developed in collaboration with Leica Biosystems to precisely transfer the coordinates of CTC positions on filters to the laser microdissector LMD6500. Slides were washed successively in TBS 1X-Tween20 0.05% and in TBS 1X to remove the coverslip and mounting medium. Then, slides were dried at 45°C for 5 minutes before being ionized so as to avoid static electricity during microdissection. After relocation, individual CTCs were microdissected with the laser and collected in the cap of PCR tubes. Tubes were then frozen at -80°C for at least 30 minutes before whole-genome amplification (WGA).

### Isolation of CTCs using self-seeding microwell chips

The CellSearch cartridges were kept at 4°C and delivered to VyCAP (Deventer, the Netherlands) within 24 hrs. Upon receipt CTC enriched samples were removed from the cartridges and seeded in individual silicon microwells using a negative pressure (FM-510, VyCAP). The silicon microwell chip was mounted in a plastic slide that is removed from the disposable after seeding of the single cells was completed [18]. Next, the slide with the single cell containing microwells, is transferred to the Puncher system for single cell isolation (TiE-PS, VyCAP). Using this system, fluorescence images of individual wells were acquired. Based on the fluorescence signals, individual cells were selected and transferred by punching the bottom plus cell out of the microwell to the cap of a PCR tube positioned below the microwell, by lowering a Puncher needle into the microwell.

### Cell sorting of RosetteSep enriched CTCs

Individual CTC isolation was performed using a BD Influx cell sorter equipped with four lasers (a 405 nm laser, a 488 nm laser, a 561 nm laser and a 640 nm laser). The system was run with 25 psi pressure and a 86  $\mu\text{m}$  nozzle. Cell sorting started by gating Hoechst positive elements. The second gate enabled selecting CD45-APC negative events. Two populations including CD45-APC negative/CK-PE positive/Vim-FITC negative and CD45-APC negative/CK-PE positive/Vim-FITC positive cells were sorted. Tubes were centrifuged 10 minutes at 1200 rpm and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for at least 30 minutes before WGA.

### **WGA and quality controls**

WGA was performed using the ligation-mediated PCR (LM-PCR) Ampli1 WGA kit version 1 (MenariniSilicon Biosystems Inc., San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol (Czyz & Klein, 2015). The quality of all WGA products was evaluated by qPCR of seven genes spread over 7 different chromosomes (Table S3). The number of qPCR cycles necessary to amplify each of the seven genes allowed to determine the quality score (QS) of each WGA product and eligibility for whole-exome sequencing (WES). When the number of qPCR cycles was inferior to 20, genes were considered correctly and sufficiently amplified after WGA. When the number of qPCR cycles was  $\geq 20$ , amplification was considered incorrect or insufficient. By comparison with a reference of HgDNA (Coriell NA12892), a QS ranging from 1 to 7 was established to estimate the level of genome integrity of the WGA, based on the number of genes correctly amplified in the qPCR assay.

### **Isolation of genomic DNA from blood and tumor biopsies**

DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tumor biopsies was purified with QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's protocol. Constitutional DNA was purified from blood samples with QIAamp DNA blood kit (Qiagen).

### **Purification of WGA products**

LM-PCR adapters from WGA products were removed by digestion with the restriction enzyme MseI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Samples were purified using AgencourtAMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Precisely, 55 $\mu$ L of Ampli1 product was digested with 10 units of MseI in 0.75X final concentration of NEB4 buffer at 37°C, 3 hours and then purified by 1.8X AgencourtAMPure XP beads according to the manufacturer's protocol. All samples were eluted in 30 $\mu$ L of H<sub>2</sub>O.

### **Library preparation and WES**

DNA was captured using the Agilent's solution enrichment methodology (SureSelect Human AllExon kit, version 5; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with the biotinylated oligonucleotide probe library (Human All Exon kit, version 5, 50 Mb; Agilent Technologies), and underwent paired-end, 75-base massively parallel sequencing on an HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) as previously described (Gnirke et al, 2009). Sequence capture, enrichment, and elution were performed according to the manufacturer's instructions except for library preparations, which were performed with the NEBNext Ultra kit (New England Biolabs). For library preparations, 600 ng of genomic DNA was fragmented by sonication and purified to yield fragments of 150 to 200 bp. Paired-end adaptor oligonucleotides from the NEB kit were ligated on repaired, A-tailed fragments and then were purified and enriched by 8 PCR cycles. These purified libraries (1200 ng) were hybridized to the Sure Select

oligoprobe capture library (Agilent Technologies) for 72 hours. After hybridization, washing, and elution, the eluted fraction was PCR-amplified with 9 cycles and was then purified and quantified by qPCR to obtain sufficient DNA template for downstream applications. Each eluted enriched DNA sample was then sequenced on an Illumina HiSeq 2000 as paired-end, 75-base reads. Image analysis and base calling were performed with real-time analysis (RTA 1.12.4.2 Illumina) with the default parameters.

### **Bioinformatic analysis: preprocessing, alignment and quantification of ADO**

Fastq files were treated for adapter removal using cutadapt 1.7.1. Resulting sequences were aligned to the reference genome GRCh37/hg19 using the BWA mem algorithm to produce one BAM file per sample. Base recalibration and local realignment around insertions/deletions (indels) was done with the Genome Analysis ToolKit (GATK) (McKenna et al, 2010). The quality of raw and aligned sequences was assessed using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) and Picard tools (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Each BAM file was treated with GATK HaplotypeCaller to retrieve its variants as compared to the reference genome GRCh37/hg19. To calculate ADO, the allelic frequency of germline variants identified in CTC and corresponding metastasis biopsy samples was compared. ADO was computed as the percentage of germline heterozygous variants identified in the metastasis biopsy that were retrieved as homozygous in the CTC sample under consideration (i.e. with allelic variant frequency >90% or <10%).

### **Identification of somatic mutations**

Paired metastasis biopsy/blood or CTC sample/blood BAM files were treated with Mutect to identify somatic substitutions and with IndelGenotyper to identify somatic small indels

(Cibulskis et al, 2013). We selected the somatic mutations satisfying the following filters: -1) a variant allelic frequency  $>0.05$ , -2) a minimum variant coverage of three, -3) a maximum variant allelic frequency in normal blood of 0.04, -4) a maximum variant coverage in normal blood of three, and -5) a minimum total coverage at the position of eight. Common polymorphisms and patient polymorphism variants in paired CTCs and blood samples were removed. The resulting somatic mutations were annotated with the snpEff and snpSift algorithms and only somatic mutations occurring in coding regions were selected (Cingolani et al, 2012). We removed variants that were annotated as common polymorphisms (MAF  $>0.001$  as reported by 1000 Genomes or ESP databases) unless the variant was also reported in COSMIC. To identify CTC private-mutations, we excluded somatic variants that were shared by at least two CTC samples from different patients and classified variants according to the number of times (N) these were detected in CTC samples.

### **Determination of the mutation rates of CTC samples**

The sample mutational load was computed according to the number of somatic mutations per CTC sample, the estimated number of bases at risk, and the minimum number of occurrence required per mutation per patient to be selected as a true positive mutation. The mutational load per megabase was calculated as following:  $NMut \times 10^6 / NBasesAtRisk$ , where Nmut is the number of mutations selected, NBasesAtRisk the number of bases at risk according to the coverage of the sample(s) under consideration. For N=1 (where N is the number of times the variants were detected in CTC samples), we considered the actual coverage of each sample and all mutations identified by the somatic mutation identification pipeline as described previously. For N=2 and N=3, we considered all mutations shared between the CTC samples and the paired metastatic biopsy and all mutations selected in at least 2 or 3 CTC samples of the same patient



but not shared by any CTC sample of other patients. The number of bases at risk was computed as the mean of the estimated number of bases at risk between 2 or 3 samples, as computed with a binomial distribution estimate of the common region covered by 2 or 3 samples according to the coverage of individual samples.

## Supplementary Figures

**Fig. S1: Qualification of whole-genome amplification (WGA) and whole-exome sequencing (WES).** (A), Quality score (QS) of WGA products from 179 CTC samples of 11 mCRPC patients. The quality score assay was used to determine the genome integrity of WGA products in which the number of genes ranging from one to seven properly amplified by qPCR determined the overall integrity of each of the 179 WGA products. (B), Percentage coverage according to depth sequencing for seven CTC samples tested in the training set of WES. Seven CTC samples with different quality scores of WGA products ranging from 1 to 7, and four constitutional DNA (normal, N) samples were sequenced. CTC samples with QS of WGA products between 3 and 7 had a homogeneous coverage ranging from 53% and 69% at 10X depth sequencing. CTC samples with a QS of WGA products with a quality score of 1 and 2 had a lower coverage ranging from 12% and 28% at 10X depth sequencing. (C), Percentage of allelic drop out of the 34 selected CTC samples from the experimental set of WES. The mean percentage allelic drop out is 40.2% (range, 17-96%). (D), Allelic frequency of heterozygous germline variants in the metastasis biopsy and CTC samples from patient P7. The tumor biopsy showed a unique peak frequency at 0.5 confirming the heterozygosity of variants. The allelic frequency of heterozygous germline variants of CTC samples is dependent on the quality score of the corresponding WGA products. CTC samples with the lower quality score of WGA product had no peak at a frequency of 0.5 and higher allelic distortion. (E), Percentage of uncovered targets of the 34 selected CTC samples from the experimental set of exome sequencing. The mean percentage of uncovered targets is 25.5% (range, 11-77%). (F), Percentage of common regions with low coverage

according to the number of CTC samples tested at coverage of 0, 5 or 10X. There were no common regions uncovered at 0X when all 34 CTC samples were analyzed.

**Fig. S2: Flowchart of unique somatic variants detected in selected CTC samples.**

A total of 396 unique variants were detected in the 34 selected CTC samples from seven patients. Of the 396 variants, 65 from four patients were shared by CTCs and the matched-metastasis biopsy, and 331 variants from the seven patients were CTC-private variants. Of the 65 variants shared by CTC samples and matched-metastasis biopsies, 53 were non-synonymous and among them, 24 variants had a predictive deleterious impact on the protein activity according to polyphen2 and sift tools. Of the 331 CTC-private variants, 305 were detected in two CTC samples, and 26 from two patients were detected in at least three CTC samples. Of the 305 variants detected in two CTC samples, 240 were non-synonymous, 60 were in database dbSNP and/or COSMIC and among them 32 variants had a predictive deleterious impact on the protein activity according to polyphen 2 and sift tools. Of the 26 variants detected in at least three CTC samples, 22 were non-synonymous, 13 were in database dbSNP and/or COSMIC and among them, seven variants had a predictive deleterious impact on the protein activity (two variants with a predictive impact were not in databases).

**Fig. S3: Distribution of unique variants in CTC samples.** (A), Distribution of unique variants shared by metastasis biopsies and CTCs in the four patients. Twenty-five (38.5%) variants were detected in one CTC sample, 17 (26.1%) were detected in two CTC samples, 15 (23.1%) were detected in three CTC samples and eight (12.3%) in four CTC samples. (B), Distribution of

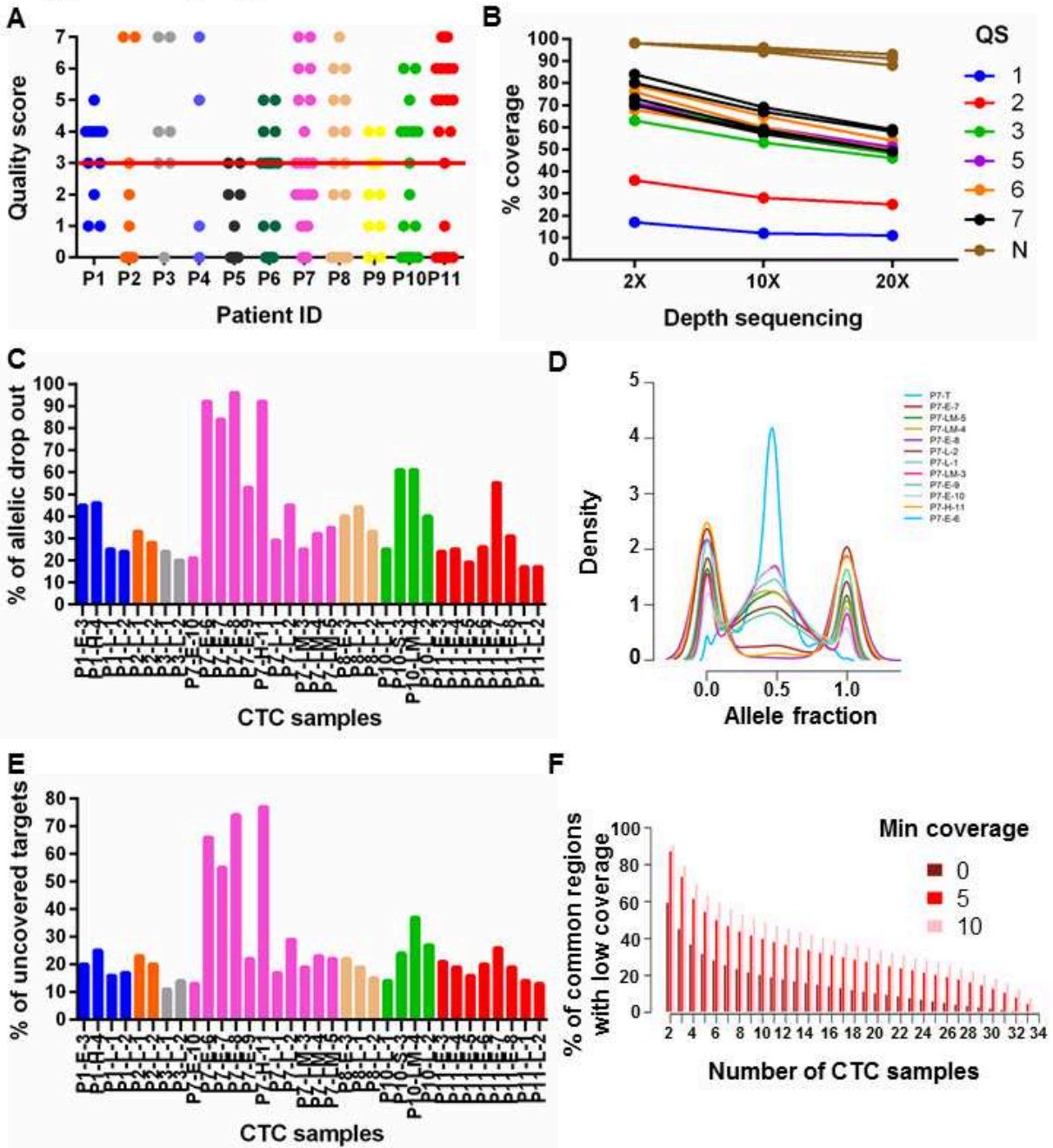
unique CTC-private variants in the seven patients. The 331 unique CTC-private variants were required to be observed in two, three or four CTC samples.

**Fig. S4: Heatmap of genes and variants detected in CTC samples and shared by the matched the metastasis biopsy in patient P11.** Thirty-three percent of variants were shared by CTCs and the metastasis biopsy while 67% of variants were only detected in the biopsy. Among the shared variants, 21% were detected in one CTC sample, 16% in two CTC samples, 26% in three CTC samples and 37% in four CTC samples.

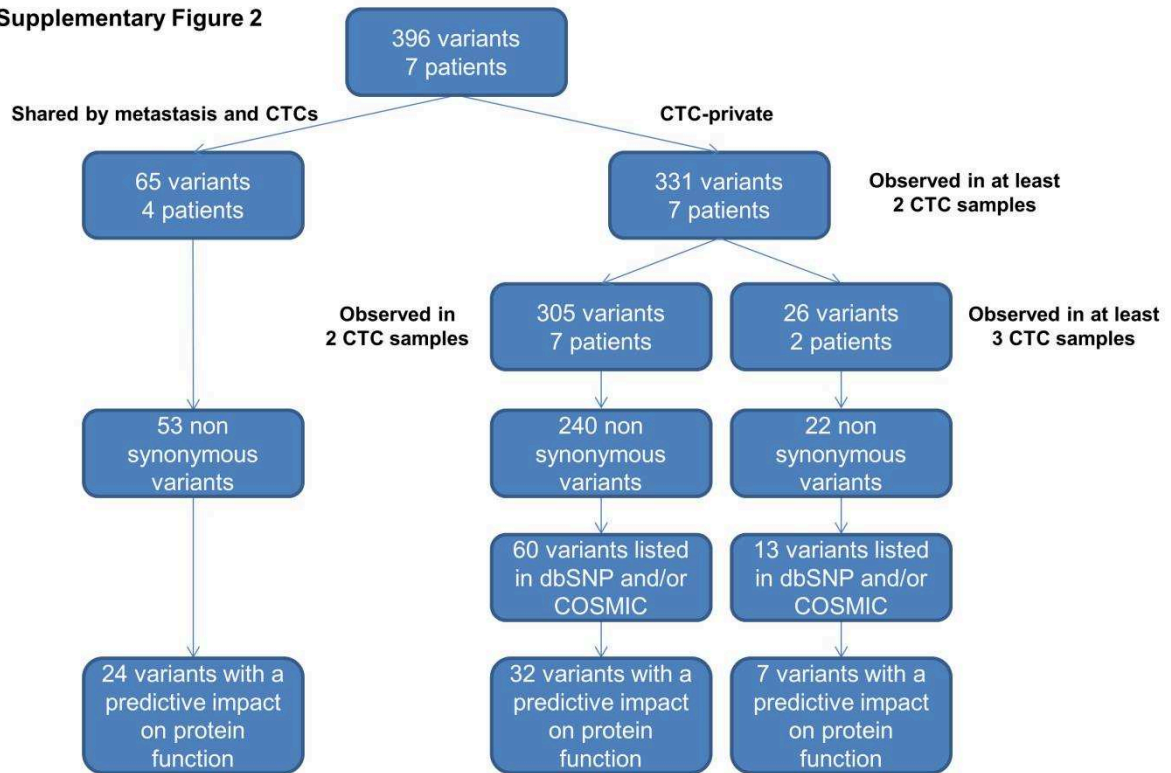
**Fig. S5: Mean mutation rate per Mb per patient after requiring variants to be observed in one, two or three CTC samples.** When variants were required to be observed in two CTC samples, the mutation rates per Mb per patient were below the values of the matched-metastasis biopsy except for patient P7. When variants were required to be observed in three CTC samples the mutation rates /Mb per patient dropped under the values of matched-metastasis biopsies.

**Fig. S6: Hierarchical clustering of CTCs and matched-metastasis biopsies.** (A), Hierarchical clustering of CTCs and matched-metastasis biopsy in patient P7 according to mutational similarities between CTCs and the matched-metastasis biopsy, and between different CTC samples for variants required to be observed in at least three samples. The number of shared variants is represented by the red color gradient from dark red (high number of variants) to white (no shared variant). (B), Hierarchical clustering of CTCs and matched-metastasis biopsy in patient P11 according to the same representation.

# Supplementary Figure 1

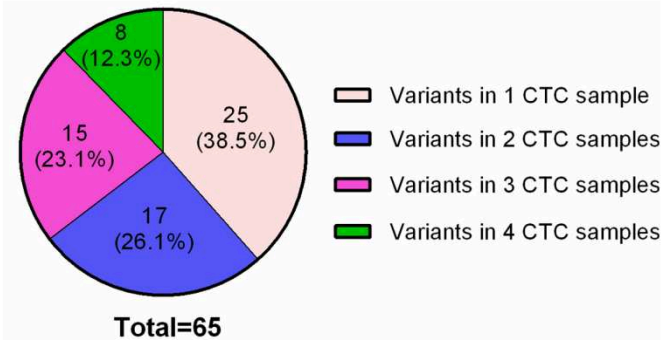


Supplementary Figure 2

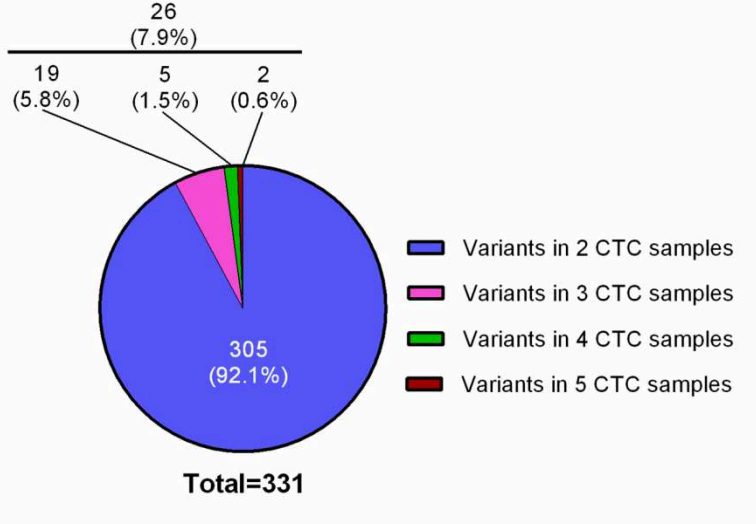


**Supplementary Figure 3**

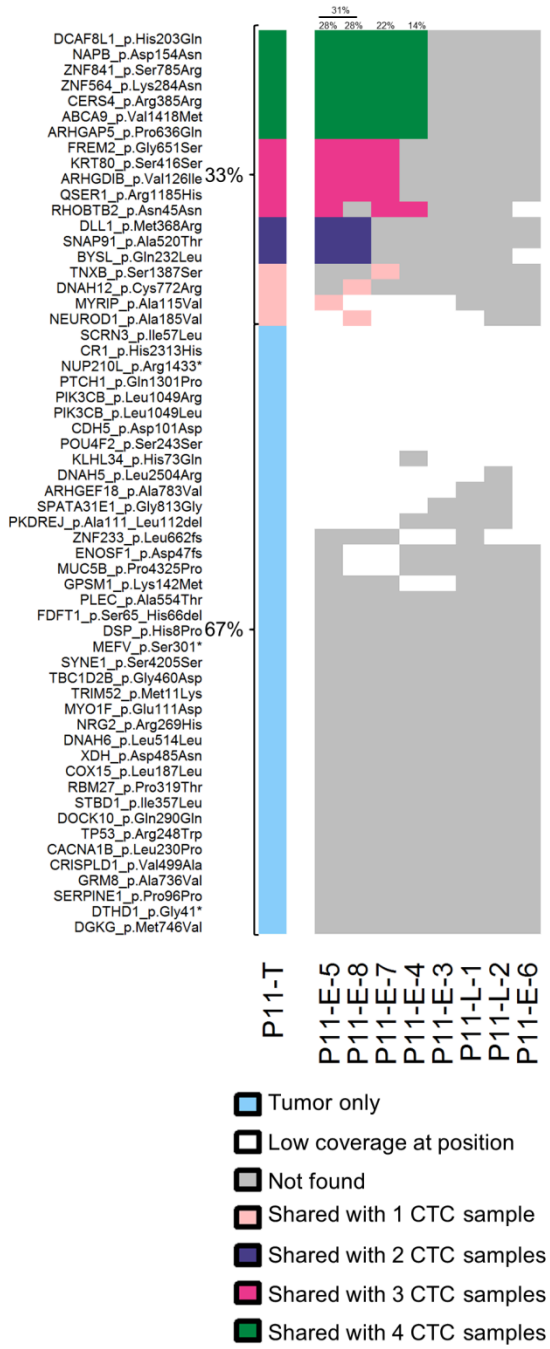
**A**



**B**

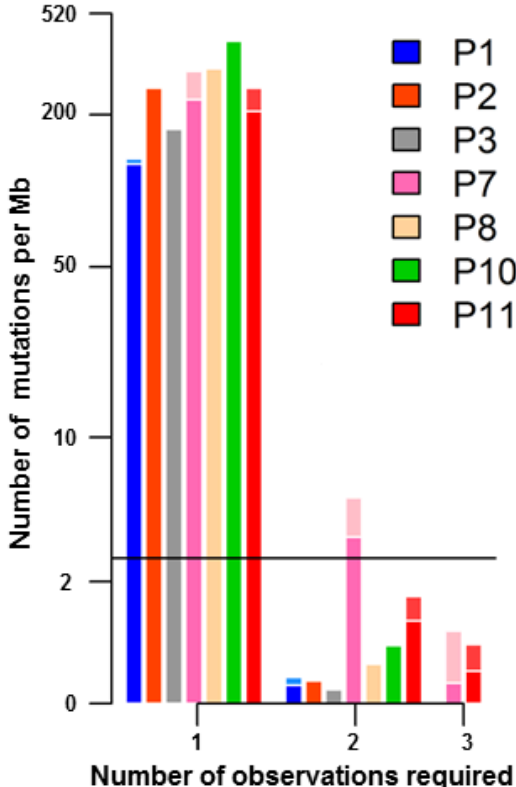


# Supplementary Figure 4



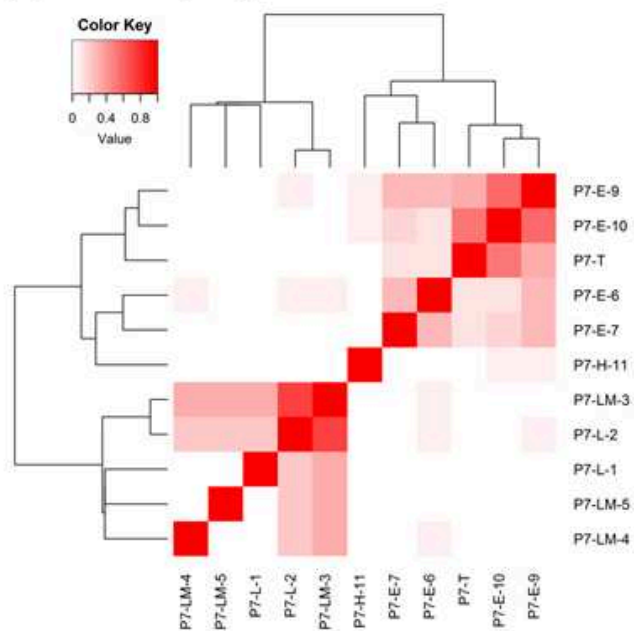


Supplementary Figure 5

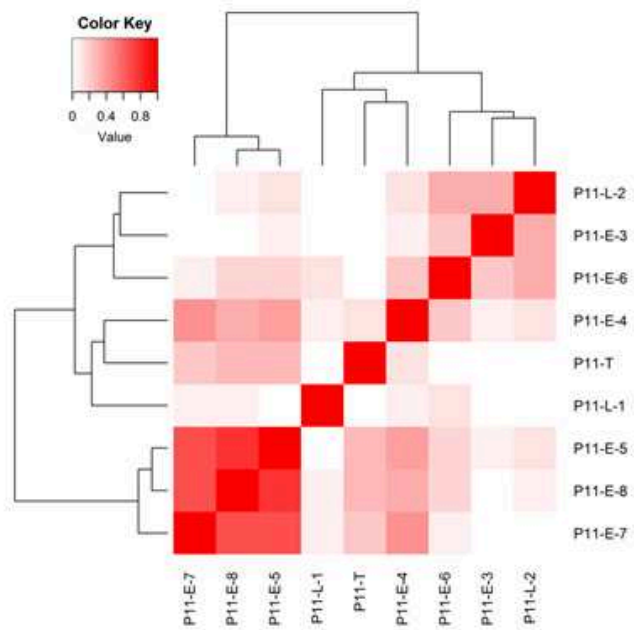


## Supplementary Figure 6

**A**



**B**



**Table S1:** Clinical characteristics of mCRPC patients

Patients	Age	TNM*	Metastatic sites	PSA **	Gleason score	Time from mPCa diagnosis to biopsy (months)	Site of biopsy	Previous treatment			
								Chemotherapy	Castration	Enzalutamide	Abiraterone
<b>P1</b>	77	TxNxM1	Bones and lymph nodes	333	7 (4+3)	46	Lymph node	No	Yes	No	Yes
<b>P2</b>	77	T1N0M0	Bones and lymph nodes	101	7 (3+4)	32	Lymph node	No	Yes	No	Yes
<b>P3</b>	73	T3N0M0	Lymph nodes	249	7 (4+3)	22	Lymph node	No	Yes	No	Yes
<b>P4</b>	46	TxN0M1	Bones and liver	85	8	14	Liver	No	Yes	No	Yes
<b>P5</b>	68	T3N0M0	Lymph nodes	14	9	24	Lymph node	Yes	Yes	No	Yes
<b>P6</b>	65	T3N0M0	Lymph nodes	283	8 (4+4)	13	Lymph node	No	Yes	No	Yes
<b>P7</b>	60	T3N0M0	Bones and lymph nodes	1715	7 (4+3)	26	Lymph node	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>P8</b>	66	T3N0M0	Bones and lymph nodes	51	9	2	Lymph node	No	Yes	No	Yes
<b>P9</b>	67	TxN1M1	Lymph nodes and bones	27	8 (4+4)	12	Lymph node	Yes	Yes	No	No
<b>P10</b>	71	TxNxM1	Bones, liver and lymph nodes	10	NA	72	Liver	No	Yes	Yes	No
<b>P11</b>	76	T3N0M0	Bones	163	NA	24	Bone	No	Yes	No	Yes

Abbreviations: mCRPC, metastatic castration resistant prostate cancer; TNM, tumor node metastasis; PSA, prostate specific antigen

\*at diagnosis, \*\* at the time of metastatic biopsy

**Table S2:** CTC subpopulations identified using CellSearch and ISET according to epithelial and mesenchymal expression in mCRPC patients

Patients	CellSearch (/7.5 ml)	ISET (/7.5mL) <sup>a</sup>			
		Epithelial	Hybrid <sup>b</sup>	Large <sup>c</sup>	Large Mesenchymal <sup>d</sup>
<b>P1</b>	0	2	9	52	11
<b>P2</b>	40	1	5	25	23
<b>P3</b>	10	0	0	45	57
<b>P4</b>	1	0	0	45	41
<b>P5</b>	0	0	3	30	14
<b>P6</b>	13	2	4	22	15
<b>P7</b>	274	5	0	30	58
<b>P8</b>	0	0	4	7	12
<b>P9</b>	0	0	5	45	13
<b>P10</b>	29	0	4	79	10
<b>P11</b>	17	0	5	150	13

Abbreviations: CTC, circulating tumor cell; ISET, isolation by size of epithelial tumor cells; mCRPC, metastatic castration resistant prostate cancer

<sup>a</sup> CTC subpopulations were characterized by four-color immunofluorescent staining (cytokeratins 8, 18, 19 and EpCAM in the same channel, Vimentin, CD45, Hoechst 33342).



<sup>b</sup> Hybrid cells were CD45 negative and positive for epithelial and mesenchymal markers (18,33).

<sup>c</sup> Large CD45 negative cells with a nucleus  $\geq 16 \mu\text{m}$ , and an epithelial and mesenchymal marker expression below the threshold of the assay were counted according to cytological features as previously reported (33,35).

<sup>d</sup> Large mesenchymal CD45 negative cells with a nucleus  $\geq 16 \mu\text{m}$ , and positive for vimentin were counted according to cytological features as previously reported(33,35).

**Table S3:** Example of WGA product qualification using the qPCR assay and quality score determination

Patient ID	Sample ID <sup>a</sup>	Numbers of qPCR cycles <sup>b</sup>							QS
		CLRN1	GPR98	EGFR	PRKG1	RNaseP	CDC6	PCNT	
P7	P7-L-1	15	21	17	16	19	15	17	6/7
	P7-L-2	17	31	21	16	21	16	31	3/7
	P7-LM-3	16	21	18	16	21	21	21	3/7
	P7-LM-4	15	19	18	17	17	16	18	7/7
	P7-LM-5	18	19	19	18	22	17	28	5/7
	P7-E-6	15	34	18	33	34	34	18	3/7
	P7-E-7	14	17	37	37	37	37	37	2/7
	P7-E-8	18	32	38	39	38	38	39	1/7
	P7-E-9	15	20	19	17	33	19	18	6/7
	P7-E-10	15	20	18	16	15	17	14	7/7
	P7-E-11	33	33	20	32	31	14	30	2/7

 ≤20 qPCR cycles  
 >20 qPCR cycles

Abbreviations: WGA, whole genome amplification; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; QS, quality score.

<sup>a</sup>CTC sample ID is presented in Supplementary Table 4.

<sup>b</sup>The number of qPCR cycles necessary to amplify each of the seven selected genes allowed to determine the quality score (QS) of each WGA product. When the number of qPCR cycles was inferior or equal to 20, the selected genes were considered correctly amplified while a number of qPCR cycles superior to 20 corresponded to an amplification of insufficient quality.

**Table S4:** Description of the 34 CTC samples selected for WES

<b>Patients</b>	<b>Sample ID*</b>	<b>Sample description</b>	<b>Isolation process</b>	<b>Quality Score</b>
<b>P1</b>	P1-L-1	10 large	Laser microdissection	4
	P1-L-2	10 large	Laser microdissection	4
	P1-E-3	1 epithelial	Laser microdissection	5
	P1-H-4	4 hybrid	Laser microdissection	4
<b>P2</b>	P2-L-1	10 large	Laser microdissection	7
	P2-L-2	5 large	Laser microdissection	7
<b>P3</b>	P3-L-1	10 large	Laser microdissection	7
	P3-L-2	8 large	Laser microdissection	7
<b>P7</b>	P7-L-1	10 large	Laser microdissection	6
	P7-L-2	10 large	Laser microdissection	3
	P7-LM-3	10 large mesenchymal	Laser microdissection	3
	P7-LM-4	6 large mesenchymal	Laser microdissection	7
	P7-LM-5	10 large mesenchymal	Laser microdissection	5
	P7-E-6	10 epithelial	Puncher	3
	P7-E-7	10 epithelial	Puncher	2
	P7-E-8	10 epithelial	Puncher	1
	P7-E-9	10 epithelial	Cell sorting	6
	P7-E-10	10 epithelial	Cell sorting	7
	P7-H-11	1 hybrid	Cell sorting	2
<b>P8</b>	P8-L-1	10 large	Laser microdissection	3
	P8-L-2	10 large	Laser microdissection	5
	P8-E-3	3 epithelial	Cell sorting	6
<b>P10</b>	P10-L-1	10 large	Laser microdissection	6
	P10-L-2	10 large	Laser microdissection	4
	P10-S-3	10 small	Laser microdissection	6
	P10-LM-4	4 large mesenchymal	Laser microdissection	4
<b>P11</b>	P11-L-1	10 large	Laser microdissection	7
	P11-L-2	10 large	Laser microdissection	7
	P11-E-3	5 epithelial	Cell sorting	3
	P11-E-4	5 epithelial	Cell sorting	5
	P11-E-5	5 epithelial	Puncher	7
	P11-E-6	5 epithelial	Puncher	7
	P11-E-7	1 epithelial	Puncher	6
	P11-E-8	1 epithelial	Puncher	6

\*patient number-phenotype-CTC sample number

Abbreviations: CTC, circulating tumor cell; WES, whole exome sequencing

**Table S5:** List of somatic variants shared by CTCs and matched metastatic biopsies (n=53)

Genes	Transcript ID	Database		sSNVs		Prediction		Number of CTC samples	Patient ID
		dbSNP	COSMIC	codon change	aa change	Polyphen 2	Sift		
CACNA1B	NM_000718.3	-	-	c.689T>C	p.Leu230Pro	D	D	4 (P11-E-4; P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
CRISPLD1	NM_031461.5	-	-	c.1496T>C	p.Val499Ala	D	D	4 (P11-E-4; P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
GRM8	NM_000845.2	-	-	c.2207C>T	p.Ala736Val	D, B	T	4 (P11-E-4; P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
SLC35G5	NM_054028.1	rs76944947	COSM328226	c.307T>C	p.Trp103Arg	B	T	4 (P1-L-1; P1-L-2; P1-E-3; P1-H-4)	P1
DGKG	NM_001346.2	-	COSM1308918	c.2236A>G	p.Met746Val	B, P, P, B	D	4 (P11-E-4; P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
DTHD1	NM_001170700.2	-	-	c.121G>T	p.Gly41*	NA	T	4 (P11-E-4; P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
TP53	NM_000546.5	-	COSM10656, COSM120005, COSM120006, COSM120007, COSM164083, COSM3388183	c.742C>T	p.Arg248Trp	D	D	4 (P11-E-4; P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
SLC28A2	NM_004212.3	-	-	c.322delT	p.Phe108fs	NA	NA	3 (P7-E-6; P7-E-7; P7-E-9)	P7
XDH	NM_000379.3	-	-	c.1453G>A	p.Asp485Asn	B	T	3 (P11-E-4; P11-E-5; P11-E-7)	P11
QPCT	NM_012413.3	-	-	c.987G>C	p.Trp329Cys	D	D	3 (P7-E-7; P7-E-9; P7-E-10)	P7
LRRTM4	NM_001134745.1	-	-	c.809C>T	p.Pro270Leu	P, D	T	3 (P7-E-6; P7-E-7; P7-E-9)	P7

IGSF22	NM_173588.3	-	-	c.853G>A	p.Asp285Asn	P	T	3 (P7-E-7; P7-E-9; P7-E-10)	P7
PPIE	NM_001195007.1	-	-	c.575T>G	p.Ile192Ser	D, B, P	D, T	3 (P7-E-6; P7-E-9; P7-E-10)	P7
C4orf51	NM_001080531.1	-	-	c.95C>T	p.Ala32Val	B	T	3 (P7-E-6; P7-E-9; P7-E-10)	P7
RLIM	NM_016120.3	-	-	c.1329dupG	p.Ser444fs	NA	NA	3 (P7-E-6; P7-E-9; P7-E-10)	P7
STBD1	NM_003943.4	-	-	c.1069A>C	p.Ile357Leu	B	T	3 (P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
RBM27	NM_018989.1	-	-	c.955C>A	p.Pro319Thr	D	T	3 (P11-E-5; P11-E-7; P11-E-8)	P11
ALDH1A2				c.1039C>T	p.Arg347Cys			2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
NRG2	NM_013982.2	-	-	c.806G>A	p.Arg269His	B, D	D	2 (P11-E-5; P11-E-8)	P11
EPS15	NM_001981.2	-	-	c.1619A>G	p.Asn540Ser	B, P	T	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
CACNA1E	NM_001205293.1	rs376174454	-	c.3545G>A	p.Arg1182His	D, P	D	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
NDUFS5	NM_001184979.1	-	-	c.210G>T	p.Gln70His	B	T	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
FCGR3A	NM_000569.6	-	COSM1335686	c.451C>T	p.Arg151Trp	P	D	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
SEC16A	NM_014866.1	-	-	c.685C>T	p.Arg229Cys	B	D	2 (P7-E-7; P7-E-10)	P7
DYSF	NM_001130987.1	-	-	c.1298A>G	p.Asn433Ser	B	T	2 (P7-E-8; P7-E-10)	P7
GS1-259H13.2	NM_001195541.1	-	-	c.527C>G	p.Pro176Arg	NA	NA	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
TAS2R16	NM_016945.2	rs200634681	COSM673704	c.691G>A	p.Val231Ile	B	T	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
OR5F1	NM_003697.1	-	-	c.371C>T	p.Ala124Val	B	T	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
COG4	NM_015386.2	-	-	c.2170A>G	p.Thr724Ala	B	D	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
FA2H	NM_024306.4	-	-	c.1057A>G	p.Lys353Glu	B	T	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7



C20orf202	NM_001009612.2	-	-	c.334C>T	p.Arg112*	NA	T	2 (P7-E-9; P7-E-10)	P7
MYO1F	NM_012335.3	-	-	c.333G>C	p.Glu111Asp	D	D	2 (P11-E-5; P11-E-8)	P11
PTEN	NM_000314.4	-	-	c.236C>G	p.Ala79Gly	B	NA	1 (P7-E-10)	P7
TNC	NM_002160.3	-	-	c.3594G>T	p.Gln1198His	P, D	D	1 (P7-E-6)	P7
TRPM8	NM_024080.4	rs199755852	-	c.82G>A	p.Ala28Thr	B	T	1 (P7-E-10)	P7
ADARB2	NM_018702.3	-	-	c.2108C>T	p.Ala703Val	P, D	T	1 (P7-E-10)	P7
C4A	NM_007293.2.4	-	-	c.3215G>T	p.Arg1072Leu	B, P	T	1 (P7-E-10)	P7
TANC1	NM_033394.2	-	-	c.2851G>T	p.Val951Phe	P, D	D	1 (P7-E-10)	P7
PCDHGA12	NM_003735.2	-	-	c.1990G>A	p.Val664Met	P	D	1 (P7-E-10)	P7
SPTA1	NM_003126.2	-	-	c.869A>G	p.Glu290Gly	D	T	1 (P7-E-7)	P7
MEFV	NM_000243.2	-	-	c.902C>A	p.Ser301*	NA	T	1 (P11-E-8)	P11
SP8	NM_182700.5	rs372591893	COSM303275, COSM303276	c.493_495delG GC	p.Gly165del	NA	NA	1 (P1-E-3)	P1
MUC6	NM_005961.2	rs201059141	COSM129756, COSM1297567	c.3211A>C	p.Thr1071Pro	B	D	1 (P1-L-2)	P1
TCP10L2	NM_001145121.1	-	-	c.652G>A	p.Gly218Arg	D	T	1 (P7-E-10)	P7
OLFML1	NM_198474.3	rs371797612	COSM931975	c.118C>T	p.Arg40*	NA	T	1 (P7-E-10)	P7
GRTP1	NM_001286732.1	-	-	c.982G>A	p.Gly328Arg	B	T	1 (P7-E-10)	P7
TMEM208	NM_014187.3	-	-	c.4G>C	p.Ala2Pro	B	T	1 (P7-E-10)	P7
ERGIC3	NM_198398.1	-	-	c.968T>G	p.Leu323Arg	D	D	1 (P7-E-10)	P7
MDFIC	NM_199072.4	-	COSM1084306	c.524C>T	p.Ser175Leu	B	T	1 (P7-E-6)	P7
TXNL1	NM_004786.2	-	-	c.116G>A	p.Arg39Lys	B	T	1 (P7-E-6)	P7
TNN	NM_022093.1	-	-	c.3764T>G	p.Val1255Gly	D	D	1 (P10-L-2)	P10
TRIM52	NM_032765.2	-	-	c.32T>A	p.Met11Lys	B	NA	1 (P11-E-7)	P11
TBC1D2B	NM_144572.1	-	-	c.1379G>A	p.Gly460Asp	B	T	1 (P11-E-8)	P11

Abbreviations: CTC, circulating tumor cells; sSNVs, somatic single nucleotide variants; D, deleterious; T, tolerated; B, benign; NA, not annotated; P, possibly damaging

**Table S6:** Number of variants identified in the 34 CTC samples

Sample ID	Total *	shared by CTCs and biopsy **	Number of CTC private variants**			
			patient specific ***(1)	detected in only one CTC sample (2)	detected in at least 2 CTC samples (1-2)	detected in at least 3 CTC samples
P1-L-1	1073	1	1026	1023	3	0
P1-L-2	662	2	634	633	1	0
P1-E-3	5403	2	5307	5303	4	0
P1-H-4	7025	1	6877	6871	6	0
P2-L-1	8420	0	8257	8251	6	0
P2-L-2	5777	0	5667	5661	6	0
P3-L-1	4631	0	4571	4567	4	0
P3-L-2	6431	0	6325	6321	4	0
P7-L-1	10198	0	10047	9990	57	1
P7-L-2	12092	1	11924	11867	57	3
P7-LM-3	6204	0	6115	6063	52	3
P7-LM-4	11299	0	11151	11091	60	1
P7-LM-5	14017	0	13864	13802	62	1
P7-E-6	3539	8	3504	3496	8	2
P7-E-7	1334	8	1314	1310	4	1
P7-E-8	563	1	553	551	2	0
P7-E-9	1042	22	978	966	12	4
P7-E-10	1393	36	1319	1311	8	3
P7-H-11	613	0	596	593	3	2
P8-L-1	13625	0	13395	13381	14	0
P8-L-2	12772	0	12561	12544	17	0
P8-E-3	774	0	732	729	3	0
P10-L-1	4589	0	4520	4509	11	0
P10-L-2	15050	1	14812	14784	28	0
P10-S-3	7631	0	7531	7520	11	0
P10-LM-4	11463	0	11280	11254	26	0
P11-L-1	3537	0	3485	3476	9	3
P11-L-2	3570	0	3492	3474	18	6
P11-E-3	186	0	156	144	12	3
P11-E-4	494	8	448	437	11	6
P11-E-5	7209	16	7105	7059	46	14
P11-E-6	14728	0	14571	14526	45	9
P11-E-7	8024	13	7924	7886	38	11
P11-E-8	9800	16	9680	9631	49	14
<b>TOTAL variants</b>	<b>215168</b>	<b>136</b>	<b>211721</b>	<b>211024</b>	<b>697</b>	<b>87</b>
<b>TOTAL of unique variants</b>	<b>212852</b>	<b>65</b>	<b>211355</b>	<b>211024</b>	<b>331</b>	<b>26</b>

\*Total variants satisfying the five bioinformatics filters as described in the material and method section

\*\* Both non-synonymous and synonymous variants were considered

\*\*\*Determined after exclusion of shared variants by the CTC sample and the metastatic biopsy, and shared CTC-private variants detected in CTC samples of the others patients.

**Table S7:** CTC-private variants observed in two CTC samples listed in databases (n=32)

Genes	Transcript ID	Database		sSNVs		Prediction		CTC sample ID	Patient ID
		dbSNP	COSMIC	codon change	aa change	Polyphen2	Sift		
HLA-DRB1	NM_002124.3	rs111934004	.	c.23G>A	p.Gly8Glu	D	D	2 (P2-L-1 ; P2-L-2)	P2
ECE2	NM_014693.3	rs368866385	.	c.772C>T	p.Arg258Cys	D, D, P, D, D, D	D	2 (P3-L-1 ; P3-L-2)	P3
LTF	NM_002343.4	rs146006710	.	c.454C>T	p.Arg152Cys	D, D, D	T	2 (P7-L-1 ; P7-L-2)	P7
BMP5	NM_021073.2	rs147691986	.	c.1069G>A	p.Glu357Lys	D, D	D	2 (P7-L-1 ; P7-L-2)	P7
GABRA5	NM_000810.3	.	COSM554588	c.542C>T	p.Pro181Leu	P	D	2 (P7-L-1 ; P7-L-2)	P7
PTPN9	NM_002833.3	.	COSM3690544	c.1150C>T	p.Arg384Cys	B	D	2 (P7-L-1 ; P7-L-2)	P7
KDM5B	NM_006618.3	.	COSM902362	c.4381C>T	p.Arg1461Cys	P, B	D	2 (P10-L-1 ; P10-L-2)	P10
HSP90AB1	NM_001271969.1	rs61729441	.	c.1997C>T	p.Ser666Phe	D, D, D	D	2 (P1-L-1 ; P1-L-2)	P1
TTN	NM_001267550.2	rs371840978	.	c.94817G>A	p.Arg31606Gln	B, B, B, B	D	2 (P7-L-2 ; P7-LM-5)	P7
OR51G1	NM_001005237.1	.	COSM226675	c.793C>T	p.Arg265Cys	D	D	2 (P7-L-2 ; P7-LM-4)	P7
TRIM67	NM_001004342.3	.	COSM123039, COSM1230396	c.1855C>T	p.Arg619Trp	P	D	2 (P7-L-1 ; P7-LM-5)	P7
RANBP6	NM_012416.3	rs149409404	COSM2777695	c.1148G>A	p.Arg383Gln	D	D	2 (P7-L-1 ; P7-LM-3)	P7
GRIK1	NM_000830.3	.	COSM14135, COSM1413578	c.607C>T	p.Arg203Cys	D, D, D, D, D, D	D	2 (P10-L-2 ; P10-LM-4)	P10
GABRB3	NM_000814.5	rs144496462	COSM156299, COSM960020	c.712C>T	p.Arg238Trp	B, B, B	D	2 (P10-L-1 ; P10-LM-4)	P10
C22orf42	NM_001010859.1	.	COSM3694032	c.379C>T	p.Pro127Ser	B	D	2 (P8-L-2 ; P8-E-3)	P8

CNKS2	NM_014927.3	.	COSM488246	c.260C>A	p.Thr87Asn	D, B, B	T	2 (P7-E-6 ; P7-E-9)	P7
RNASEH2A	NM_006397.2	rs201995029	.	c.413T>G	p.Val138Gly	D	D	2 (P11-E-4 ; P11-E-6)	P11
KDM5B	NM_006618.3	rs80340455	.	c.1378A>G	p.Asn460Asp	P, D	D	2 (P11-E-5 ; P11-E-7)	P11
XIRP2	NM_152381.5	rs200947121	.	c.3952A>C	p.Thr1318Pro	D, D, D	D	2 (P11-E-5 ; P11-E-8)	P11
PRSS45	NM_199183.2	rs199904747	.	c.479G>T	p.Cys160Phe	D	D	2 (P11-E-5 ; P11-E-7)	P11
FPGS	NM_004957.5	rs200706232	.	c.149G>A	p.Arg50His	P, D	D	2 (P11-E-5 ; P11-E-6)	P11
TRMT1L	NM_030934.4	rs78652979	.	c.362G>T	p.Cys121Phe	D	D	2 (P11-E-6 ; P11-E-7)	P11
AMZ2	NM_001033569.1	rs200392154	.	c.366G>T	p.Leu122Phe	P	D	2 (P11-E-6 ; P11-E-7)	P11
MUC16	NM_024690.2	rs199790313	.	c.36550A>G	p.Asn12184Asp	B	D	2 (P7-E-8 ; P7-LM-5)	P7
NBEAL1	NM_001114132.1	.	COSM1015055	c.1442G>A	p.Arg481Gln	D	T	2 (P7-LM-4 ; P7-LM-5)	P7
LMO7	NM_015842.2	rs372334697	COSM121349, COSM275869, COSM275870	c.1391G>A	p.Arg464Gln	D, D, D, D, D	D	2 (P7-LM-3 ; P7-LM-5)	P7
AKAP13	NM_006738.5	rs369043507	.	c.6712C>T	p.Arg2238Cys	D, D, D	D	2 (P7-LM-4 ; P7-LM-5)	P7
PTBP3	NM_001244898.1	.	COSM1674730	c.1562C>T	p.Ala521Val	D, D, P, D, D	D	2 (P7-LM-3 ; P7-LM-4)	P7
TDG	NM_003211.4	rs61937630	COSM221796	c.602A>C	p.Lys201Thr	B, P, P	D, T	2 (P7-LM-3 ; P7-LM-4)	P7
ZNF750	NM_024702.2	rs375467494	.	c.182G>A	p.Arg61Gln	D	NA	2 (P7-LM-3 ; P7-LM-4)	P7
DNAJC6	NM_001256864.1	.	COSM1204223	c.521G>A	p.Arg174Gln	D, P, D	T	2 (P10-S-3 ; P10-LM-4)	P10
TECTA	NM_005422.2	rs202092043	.	c.6100G>A	p.Asp2034Asn	D	D	2 (P10-S-3 ; P10-LM-4)	P10

Abbreviations: CTC, circulating tumor cells; sSNVs, somatic single nucleotide variants; D, deleterious; T, tolerated; B, benign; NA, not annotated; P, possibly damaging

## **IV. Établissement et caractérisation de modèles de xénogreffes dérivées de CTC dans le CBNPC et le mCRPC**

Suite à la caractérisation moléculaire des CTC, nous avons souhaité évaluer leur potentiel tumorigénique en réalisant des xénogreffes de CTC de patients atteints de CBNPC ou de cancer de la prostate chez des souris immunodéprimées. Pour cela, j'ai collecté des prélèvements sanguins ou des produits de cytophérèse dans ces deux types de cancers lors de la progression de la maladie c'est-à-dire lors du changement ou de l'arrêt des traitements. Les CTC ont été enrichies et implantées chez des souris NSG. Les patients pour lesquels des cytophérèses ont été réalisées sont des patients à des stades plus précoces de la maladie et en bon état général. Quatre modèles de CDX ont été obtenus dans le CBNPC et un dans le cancer de la prostate. Dans ce chapitre, l'ensemble des implantations réalisées sont présentées. Pour chacun des CDX obtenus, une lignée cellulaire a été établie ou est en cours d'établissement. La caractérisation extensive des biopsies tumorales des patients, des CTC recueillies au moment de la xénogreffe, des CDX et des lignées cellulaires dérivées des CDX est détaillée dans ce chapitre.

### **1) Établissement et caractérisation de modèles de xénogreffes dérivées de CTC dans le CBNPC**

#### **a. Établissement de CDX de CBNPC**

##### **i. Caractéristiques de l'ensemble des patients inclus dans l'étude**

Les CTC issues de prélèvements sanguins (30 mL) de 58 patients atteints de CBNPC et les CTC issues de produits de cytophérèse de neuf patients atteints de CBNPC à un stade moins avancé ont été implantées *in vivo* chez des souris NSG. Pour chacune des xénogreffes réalisées, des CTC ont en parallèle été enrichies par filtration ISET et par le système CellSearch au moment de l'injection dans le but de réaliser des analyses moléculaires sur cellules uniques. Les comptes de CTC détectées par le CellSearch nous ont également permis d'estimer le nombre de CTC épithéliales (EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup>) injectées chez les souris pour chacun des prélèvements (**Tableau 16**). Pour les 58 patients, la moyenne du nombre de CTC détectées par le CellSearch dans 7,5 mL de sang est de 163 CTC et la médiane de deux CTC. Le nombre de CTC implantées a été estimé sur la base des comptes du CellSearch. La moyenne du nombre de CTC implantées est de 693 [minimum de 0, maximum de 17 694] et la médiane de 9 CTC. Quatre CDX ont été développés à partir des CTC des patients P8, P39, P51 et P53 et ont été respectivement nommés GR-CDXL1, GR-CDXL2, GR-CDXL3 et GR-CDXL4 (**Tableau 6** et **Figure 28**). Trois patients ayant permis le développement des CDX avaient

des comptes de CTC EpCAM+/pan-cytokératines+ élevés (750, 177 et 243 CTC respectivement pour les patients P8, P51 et P53) par le CellSearch au moment de la xénogreffe alors que le patient P39 présentait uniquement 10 CTC détectées. Ces données tendent à montrer que plus le nombre de CTC EpCAM+/pan-cytokératines+ est élevé, plus la chance d'établir un CDX est importante. Cependant, le développement du CDX GR-CDXL2 suite à l'implantation de 35 CTC EpCAM+/pan-cytokératines+ du patient P39 montre que le nombre n'est pas le seul critère requis.

Pour les neuf patients ayant eu une cytophérèse, les CTC présentes dans les produits de cytophérèses ont elles aussi été comptées par le CellSearch. Ceci nous a permis d'estimer le nombre de CTC injectées (**Tableau 17**). Le nombre moyen de CTC détectées dans le sang et les produits de cytophérèses est respectivement de 0 et 3 et la médiane est de 0 et 3. Les nombres de CTC EpCAM+/pan-cytokératines+ détectées dans les produits de cytophérèses sont globalement plus importants que ceux détectés dans le sang de ces patients (**Figure 29**). La moyenne du nombre de CTC implantées est de 26 et s'étend de zéro à 144 et la médiane est de 11. Aucun CDX n'a été obtenu à partir des CTC issues de produits de cytophérèses. Les nombres de CTC implantées *in vivo* à partir des produits de cytophérèses sont inférieurs à ceux ayant permis le développement des modèles GR-CDXL1, GR-CDXL3 et GR-CDXL4. Ceci peut s'expliquer par le fait que les neufs patients ayant eu la cytophérèse étaient des patients à un stade moins avancé de leur maladie.

Patients	Statut moléculaire	Nombre de CTC/7,5 mL par CellSearch	Estimation du nombre de CTC implantées
P1	Inconnu	9	23
P2	Inconnu	1	3
P3	EGFR muté	22	62
P4	KRAS muté	5	17
P5	Inconnu	Abandon	-
P6	EGFR muté	0	0
P7	KRAS muté	0	0
P8	Inconnu	750	3500
P9	ROS1 réarrangé	1	5
P10	KRAS muté	0	0
P11	Inconnu	0	0
P12	Inconnu	0	0
P13	KRAS muté	0	0
P14	ALK réarrangé	9	38
P15	Inconnu	0	0
P16	KRAS muté	0	0
P17	EGFR muté	2	9
P18	EGFR muté	32	137
P19	Inconnu	1	4
P20	Inconnu	3	12
P21	Inconnu	3	13
P22	Inconnu	0	0
P23	ALK remanié	5	19
P24	Inconnu	0	0
P25	Inconnu	2	8
P26	KRAS muté	15	62
P27	KRAS muté	11	47
P28	Inconnu	1	4
P29	Inconnu	6	22
P30	ALK remanié	1	4
P31	KRAS muté	12	42
P32	ALK remanié	1	4
P33	KRAS muté	76	253
P34	Inconnu	13	49
P35	EGFR muté	4	17
P36	Inconnu	0	0
P37	Inconnu	19	86
P38	Inconnu	6	19
P39	KRAS muté	10	35
P40	KRAS muté	16	66
P41	EGFR muté	3903	15612
P42	EGFR muté	3903	17694
P43	Inconnu	0	0
P44	Inconnu	0	0
P45	EGFR muté	1	4
P46	EGFR muté	13	54
P47	Inconnu	1	4
P48	Inconnu	9	47
P49	Inconnu	0	0
P50	HER2 amplifié	0	0
P51	Inconnu	177	330
P52	ALK remanié	3	16
P53	Met amplifié	243	1102

P54	BRAF muté	19	86
P55	EGFR muté	2	8
P56	KRAS muté	0	0
P57	KRAS muté	0	0
P58	Inconnu	0	0

Tableau 16 : Statut moléculaire des tumeurs des patients et nombre de CTC implantées à partir des 58 prélèvements sanguins.

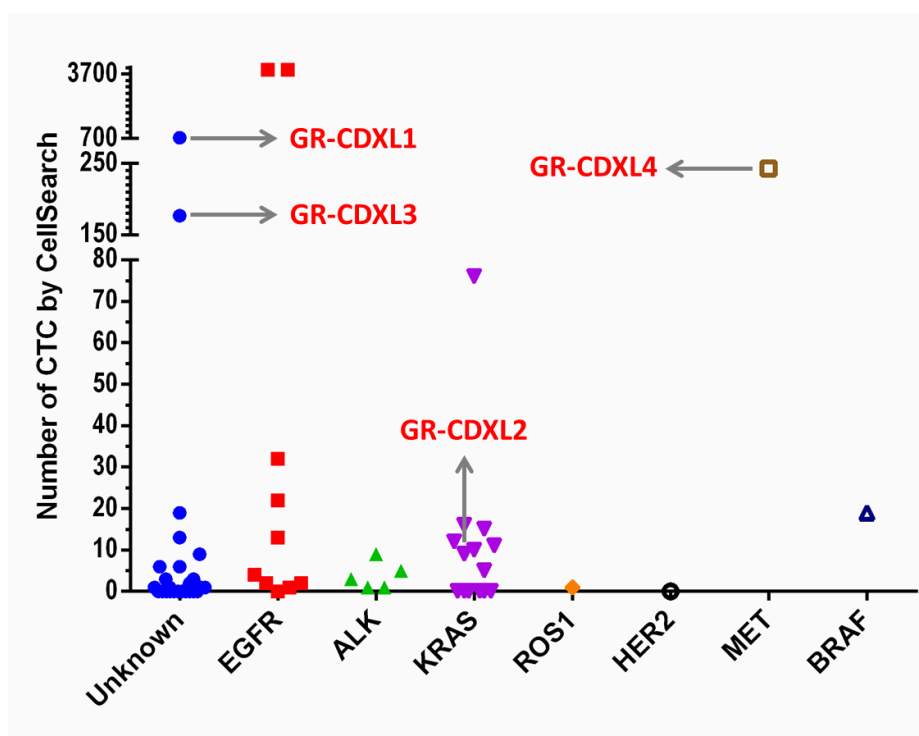


Figure 28 : Nombre de CTC détectées par le CellSearch en fonction du statut moléculaire des tumeurs des 58 patients.

Patients	Statut moléculaire	Nombre de CTC par CellSearch / 7,5mL de sang	Nombre de CTC par CellSearch / 7,5mL de produit de cytophérèse	Estimation du nombre de CTC implantées
P1	EGFR muté	1	3	11
P2	KRAS muté	0	0	0
P3	ALK remanié	0	0	0
P4	ALK remanié	0	0	0
P5	KRAS muté	0	0	0
P6	KRAS muté	0	4	38
P7	Inconnu	0	15	144
P8	EGFR muté	0	4	18
P9	EGFR muté	0	4	20

Tableau 17 : Statut moléculaire des tumeurs des patients et nombre de CTC implantées à partir des neuf produits de cytophérèse.



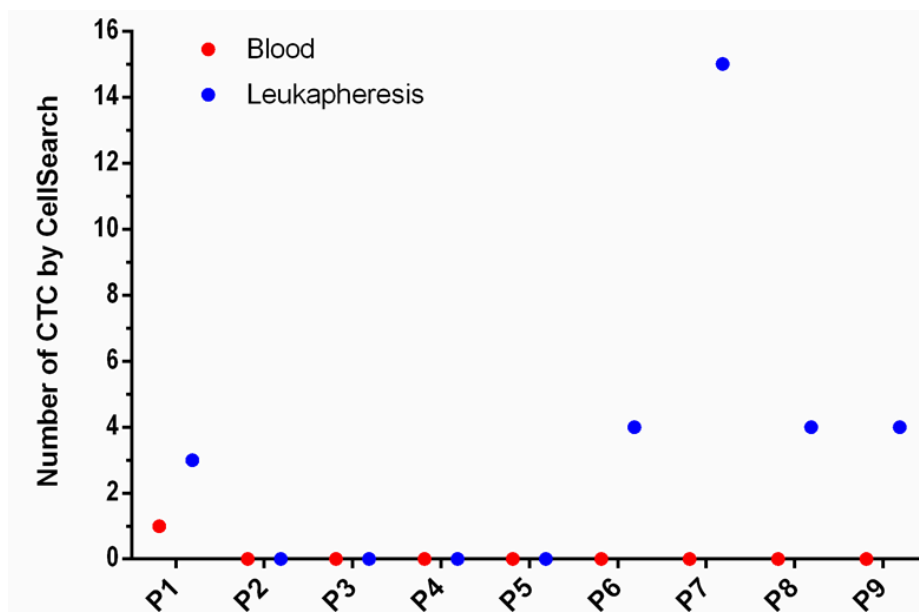


Figure 29 : Nombre de CTC détectées par le CellSearch dans le sang et dans les produits de cytophèrese.

## ii. Caractéristiques des patients à l'origine des CDX et développement des CDX

Les caractéristiques clinico-biologiques des quatre patients à partir desquels nous avons développé les CDX ainsi que les nombres de CTC détectées par le CellSearch au moment des xénogreffes et le nombre de CTC implantées sont présentés dans le **Tableau 18**.

Patients	Nom du CDX	Age	Consommation de tabac en paquets années	Histologie	Statut moléculaire	Nombre de CTC par CellSearch	Estimation du nombre de CTC implantées
P8	GR-CDXL1	39	50	adénocarcinome	Inconnu	750	3500
P39	GR-CDXL2	45	25	adénocarcinome	KRAS muté	10	35
P51	GR-CDXL3	56	34	carcinome squameux	Inconnu	177	330
P53	GR-CDXL4	66	25	adénocarcinome	MET amplifié	243	1102

**Tableau 18 : Caractéristiques clinico-biologiques des quatre patients à partir desquels les CDX ont été établis.**

Le patient P8 était un homme âgé de 39 ans au diagnostic, fumeur (50 paquets années), qui présentait un adénocarcinome multi-métastatique et pour lequel nous ne connaissons pas le statut moléculaire car les analyses n'étaient pas contributives en raison du faible pourcentage de cellules tumorales dans la biopsie. Le patient a reçu une première ligne de traitement par cisplatine plus pemetrexed du 08 novembre 2013 au 30 novembre 2013. Il a ensuite reçu du docétaxel en deuxième ligne thérapeutique puis du crizotinib les 10 derniers jours précédents son décès le 26 mai 2014. Au moment

de la xénogreffe, le patient présentait 750 CTC détectées par le CellSearch. L'implantation de 3 500 CTC *in vivo* a permis le développement d'une tumeur mesurable 100 jours après la xénogreffe des CTC (**Figure 30A**). Suite au sacrifice de la première souris, le modèle GR-CDXL1 a été amplifié par passages successifs dans plusieurs générations de souris. Ceci a permis de réaliser des congélations précoces du modèle. Actuellement, le nombre de passages est de dix pour ce modèle et le temps entre deux passages est de dix semaines.

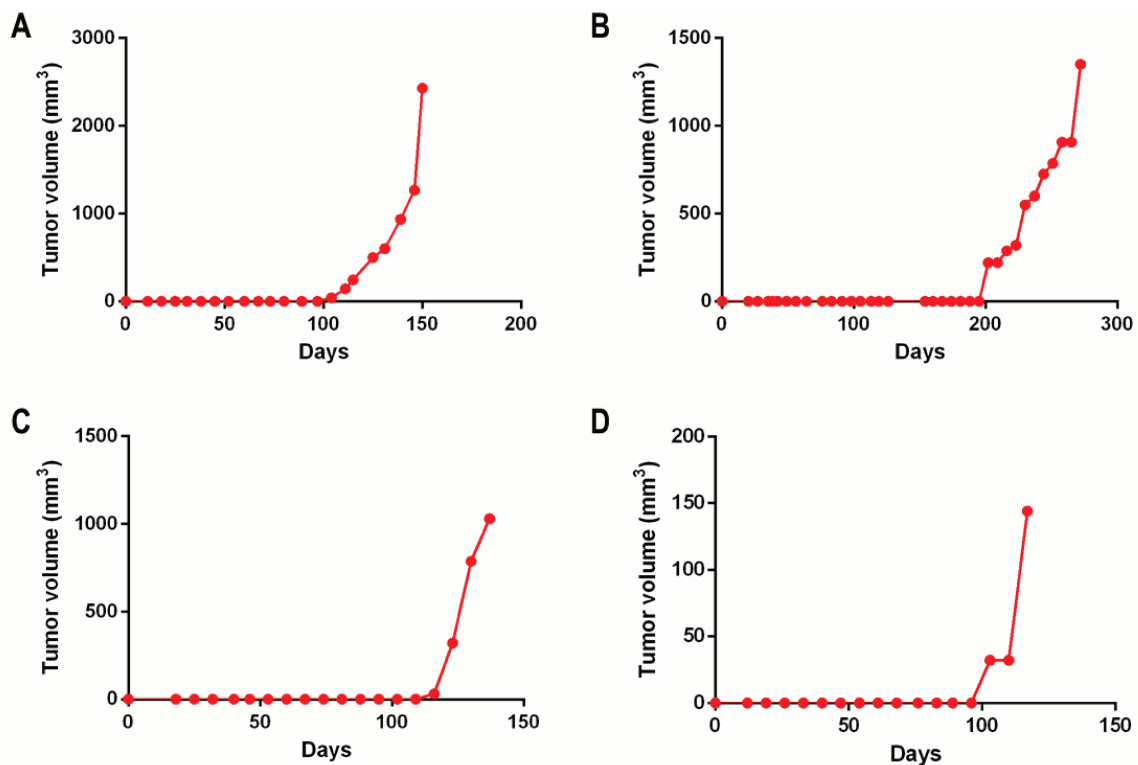
Le patient P39 était une femme âgée de 45 ans, fumeuse (25 paquets années), atteinte d'un adénocarcinome *KRAS* muté dans la biopsie tumorale. Cette patiente a été traitée en première ligne par cisplatine plus pemetrexed de juin à septembre 2014 puis par pemetrexed seul de septembre à octobre 2014. La deuxième ligne thérapeutique était constituée de l'association de paclitaxel plus avastin de novembre 2014 à mars 2015. La patiente est décédée en avril 2015. Chez cette patiente présentant dix CTC au CellSearch, l'implantation de 35 CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup> a permis d'observer une tumeur mesurable 200 jours après l'implantation des CTC aboutissant au modèle GR-CDXL2 (**Figure 30B**). Ce modèle est actuellement au passage quatre et le temps entre deux passages est de 14 semaines.

Ce patient âgé de 56 ans atteint d'un CBNPC de type carcinome squameux, fumeur (34 paquets années), présentait une tumeur avec un statut moléculaire inconnu. La prise en charge thérapeutique de ce patient a consisté en une première ligne par paclitaxel plus carboplatine de décembre 2015 à mai 2016 puis une deuxième ligne par nivolumab. Le patient avait 177 CTC détectées par le CellSearch au moment de la xénogreffe. L'implantation de 330 CTC a permis d'observer une tumeur mesurable 116 jours après la xénogreffe (**Figure 30C**). Ce modèle, GR-CDXL3, est actuellement au passage cinq et le temps entre deux passages est de dix semaines.

La patiente permettant le développement du modèle GR-CDXL4 est une femme âgée de 66 ans présentant un CBNPC de type adénocarcinome avec une amplification du gène *MET*. Cette patiente fumeuse (25 paquets années) a reçu une première ligne de traitement par cisplatine plus pemetrexed de mars à mai 2016, une deuxième ligne par crizotinib puis une troisième ligne par avastin paclitaxel avant de décéder en décembre 2016. La patiente avait 243 CTC détectées par le CellSearch au moment de la xénogreffe. L'implantation de 1 100 CTC a permis le développement du modèle GR-CDXL4 100 jours après l'implantation (**Figure 30D**). Ce modèle est actuellement au passage trois et le temps entre deux passages est de dix semaines.

Pour chacun des CDX développés, l'origine humaine de la tumeur a été confirmée par une hybridation Alu à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort. La compatibilité de l'origine pulmonaire des CDX a également été confirmée pour chacun d'entre eux par deux ou trois médecins anatomopathologistes le

Docteur Jean Jacques Fontaine de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort, le Docteur Philippe Vielh et le Professeur Jean-Yves Scoazec.

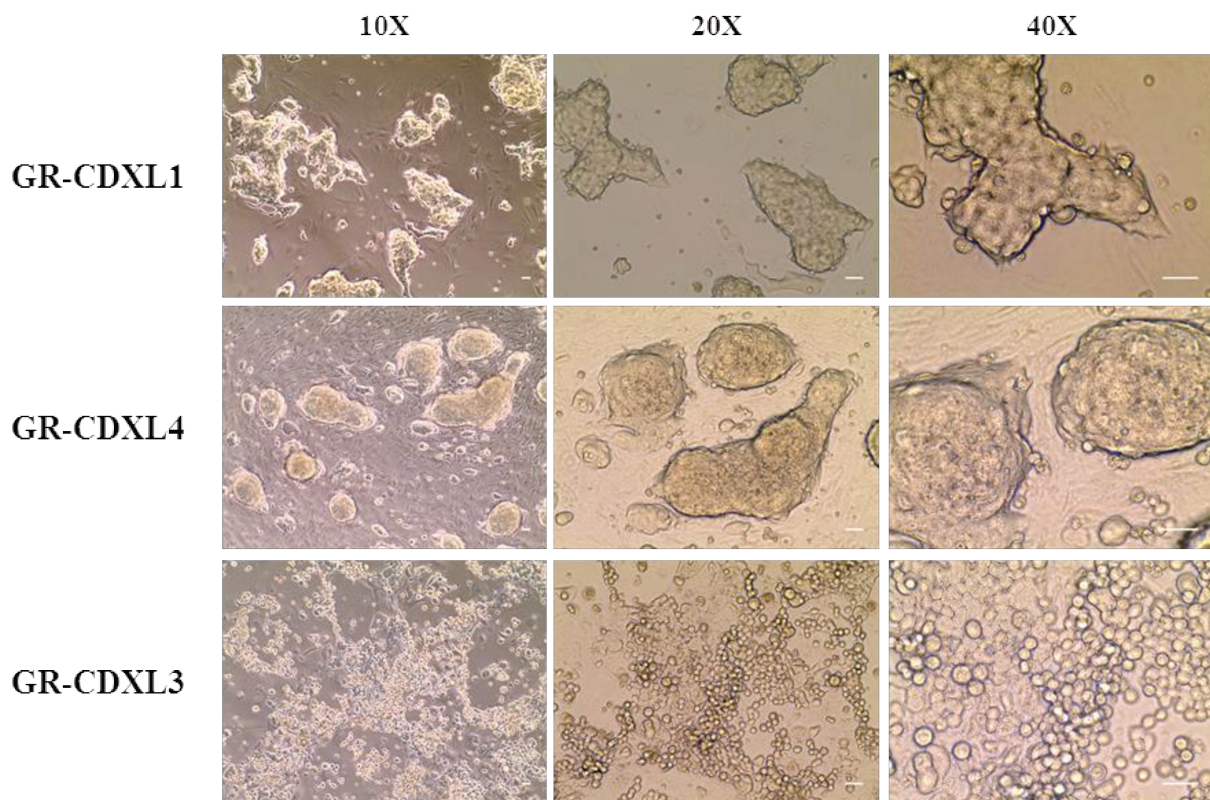


**Figure 30 : Courbes de croissance des quatre modèles de CDX de CBNPC**

A) Courbe de croissance du modèle GR-CDXL1 montrant le volume tumoral en millimètres cube en fonction du nombre de jours après l'implantation. B) Courbe de croissance du modèle GR-CDXL2. C) Courbe de croissance du modèle GR-CDXL3. D) Courbe de croissance du modèle GR-CDXL4.

### b. Établissement et caractérisation phénotypique des lignées cellulaires *in vitro* par cytométrie de flux

J'ai réussi à établir une lignée cellulaire *in vitro* à partir des trois CDX, GR-CDXL1, GR-CDXL3 et GR-CDXL4. La lignée cellulaire dérivée du modèle GR-CDXL2 est en cours d'établissement. Les lignées cellulaires dérivées des GR-CDXL1 et GR-CDXL4 poussent en microsphères (**Figure 31**, panels du haut et du milieu). La lignée cellulaire GR-CDXL1 est passée deux fois par semaine au demi. La lignée cellulaire GR-CDXL4 est passée une fois tous les dix jours au quart. La lignée cellulaire dérivée du modèle GR-CDXL3 pousse en monocouche et présente une morphologie de cellules épithéliales (**Figure 31**, panel du bas). Cette lignée cellulaire est moins proliférative et est passée tous les dix jours au demi. Les trois lignées cellulaires ont été implantées *in vivo* chez des souris immunodéprimées. La lignée cellulaire GR-CDXL1 est tumorigénique. Les lignées cellulaires GR-CDXL3 et GR-CDXL4 ont été implantées récemment et les résultats sont attendus dans les prochaines semaines.

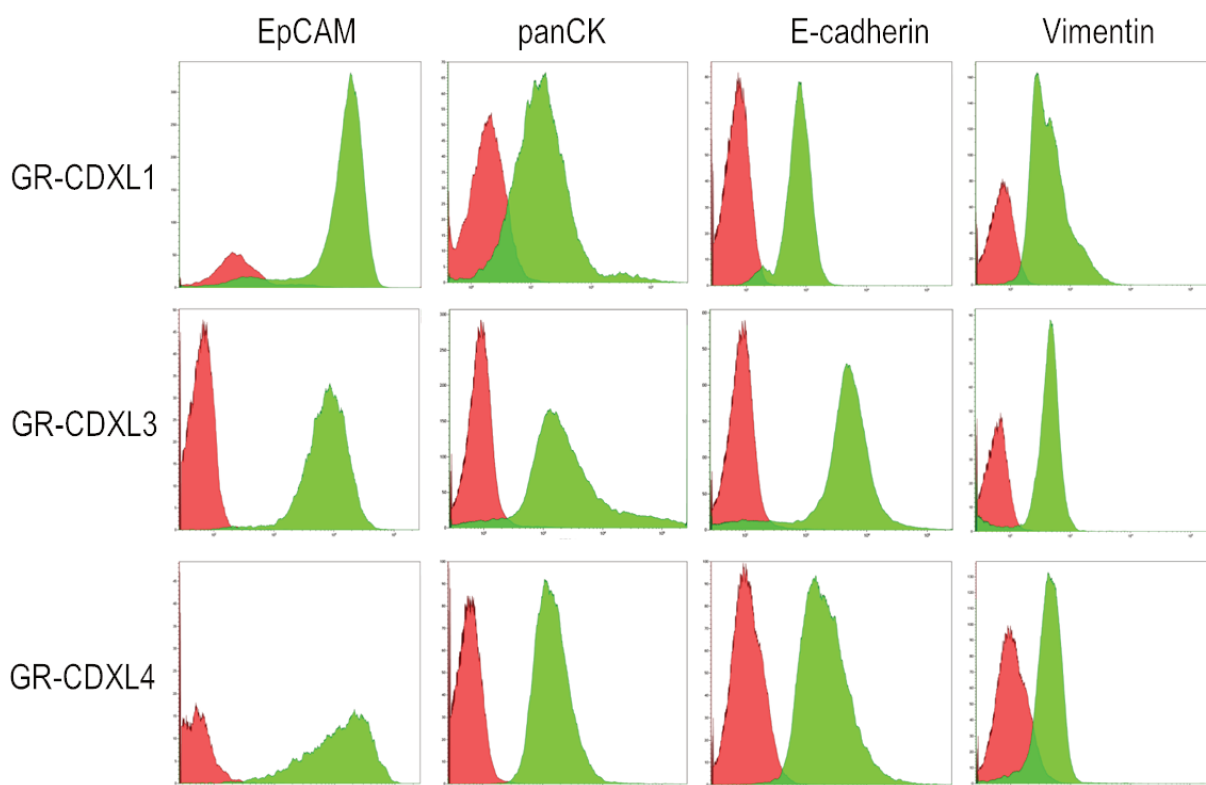


Scale: white bars = 50  $\mu$ m

**Figure 31 : Images des trois lignées cellulaires établies *in vitro* à partir des CDX GR-CDXL1, GR-CDXL3 et GR-CDXL4.**

Images des trois lignées cellulaires aux grossissements 10X, 20X et 40X. Le panel du haut correspond à la lignée cellulaire dérivée du modèle GR-CDXL1. Le panel du milieu correspond à la lignée cellulaire dérivée du modèle GR-CDXL4. Le panel du bas correspond à la lignée cellulaire dérivée du modèle GR-CDXL3.

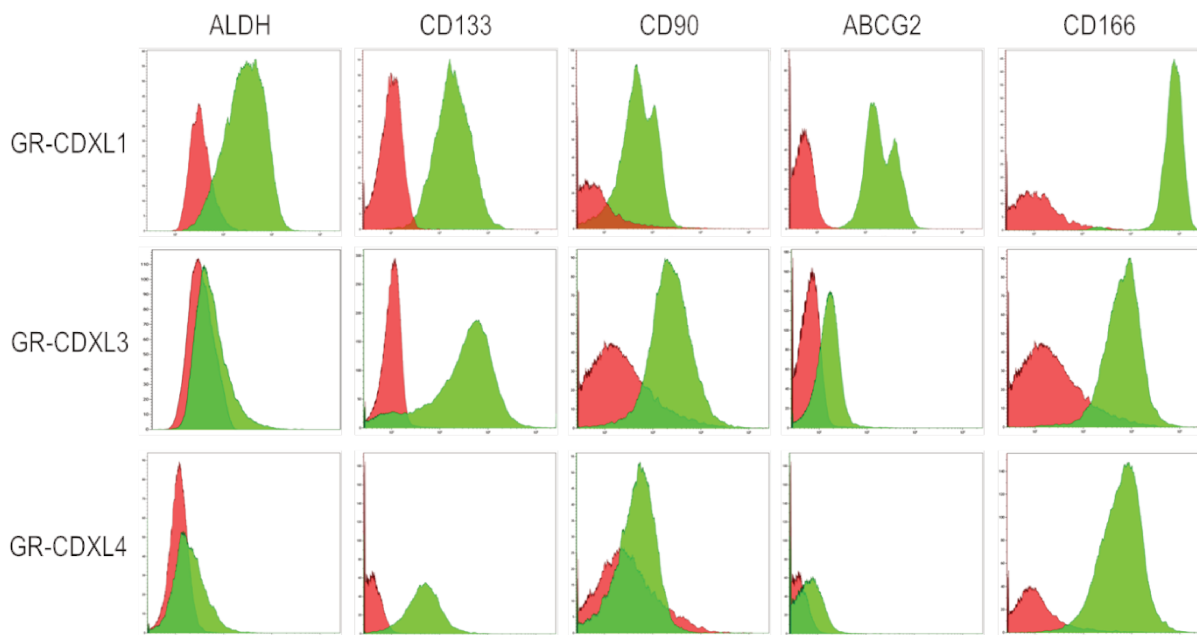
L'expression des marqueurs épithéliaux EpCAM, pan-cytokératines, E-cadhérine et du marqueur mésenchymateux vimentine a été recherchée par cytométrie de flux. Les résultats sont présentés en **Figure 32**. Les trois marqueurs épithéliaux sont globalement fortement exprimés par les trois lignées cellulaires. Le marqueur mésenchymateux est faiblement exprimé par les trois lignées cellulaires. Compte tenu de ce faible niveau d'expression nous pensons qu'il a été probablement acquis pendant la culture *in vitro*. Ces résultats montrent une origine épithéliale des tumeurs. La caractérisation des lignées cellulaires par IHC, présentée dans le chapitre suivant, et la comparaison avec les biopsies tumorales et les CDX permettront de confirmer ces résultats par une deuxième technique.



**Figure 32 : Expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux par les trois lignées cellulaires dérivées de CDX.**

Pour chacune des lignées cellulaires l'expression des antigènes EpCAM, pan-cytokératines, E-cadhérine et vimentine a été recherchée par cytométrie de flux. Le panel du haut montre l'expression des quatre antigènes par la lignée cellulaire GR-CDXL1. Le panel du milieu montre l'expression des mêmes marqueurs par la lignée GR-CDXL3 et le panel du bas l'expression de ces marqueurs par la lignée GR-CDXL4.

Nous avons recherché par cytométrie de flux l'expression des marqueurs de CSC CD133, CD166, CD90, ABCG2 ainsi qu'une activité ALDH. Les résultats sont présentés dans la **Figure 33**. Les trois lignées cellulaires expriment les marqueurs de cellules souches CD133 et CD166. CD90 est exprimé par les lignées GR-CDXL1 et GR-CDXL3. L'expression du marqueur ABCG2 ainsi que l'activité ALDH sont uniquement détectées dans la lignée cellulaire GR-CDXL1. Il semblerait donc que les cellules possédant le plus de caractéristiques phénotypiques de CSC soient celles de la lignée cellulaire GR-CDXL1, puis de la lignée cellulaire GR-CDXL3 et enfin de la lignée cellulaire GR-CDXL4. La recherche de l'expression de ces deux marqueurs directement sur les CTC des patients pourrait permettre de savoir si leur expression peut être corrélée avec le développement de CDX *in vivo* et/ou avec la survie des patients.



**Figure 33 : Expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses par cytométrie de flux par les trois lignées cellulaires dérivées de CDX.**

Pour chacune des lignées cellulaires l'activité ALDH et l'expression des antigènes CD133, CD90, ABCG2 et CD166 ont été recherchées par cytométrie de flux. Le panel du haut, du milieu et du bas montre respectivement l'expression des cinq marqueurs dans la lignée cellulaire GR-CDXL1, la lignée GR-CDXL3 et la lignée GR-CDXL4.

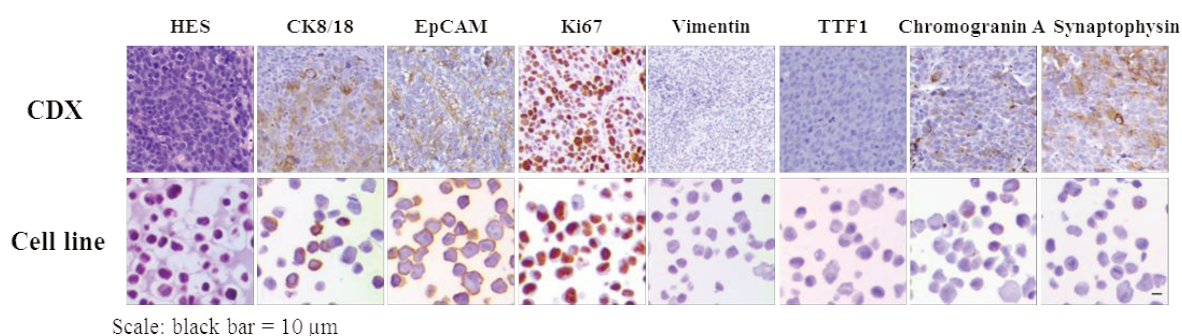
### c. Caractérisation phénotypique par immunohistochimie des biopsies tumorales, CDX et lignées cellulaires

Les biopsies tumorales, les CDX ainsi que les lignées cellulaires ont été caractérisées par IHC. Pour le modèle GR-CDXL1, la biopsie du patient n'était pas disponible. Pour le modèle GR-CDXL3, compte tenu de la faible quantité de matériel disponible, nous avons privilégié la caractérisation moléculaire par WES. La caractérisation par IHC présentée ci-dessous n'a donc pas été réalisée avec les anticorps similaires à ceux utilisés pour les autres biopsies. Pour le modèle GR-CDXL4 deux biopsies étaient disponibles, l'une faite au diagnostic et l'autre au moment de la xénogreffe des CTC. Les résultats sont présentés dans les **Figures 34, 35, 36 et 37**.

La coloration HES du CDX GR-CDXL1 montre la présence de cellules tumorales compatibles avec une origine pulmonaire de type adénocarcinome peu différencié. Le CDX est constitué d'un contingent exprimant les marqueurs épithéliaux CK8/18 et EpCAM et d'un contingent n'exprimant pas ces marqueurs. Les mêmes résultats sont obtenus sur la lignée cellulaire (**Figure 34**). Le CDX et la lignée cellulaire expriment fortement le marqueur de prolifération cellulaire Ki67 et n'expriment pas le marqueur mésenchymateux vimentine et le facteur de transcription TTF1. Le CDX comporte un



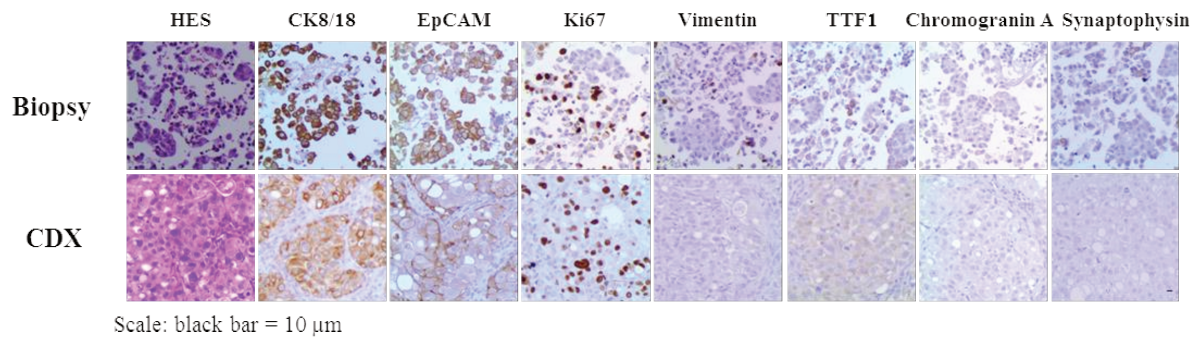
contingent de 10 % de cellules exprimant les marqueurs neuroendocrines chromogranine A et synaptophysine et un deuxième contingent n'exprimant pas ces deux marqueurs. Il semblerait que le contingent positif pour ces deux marqueurs neuroendocrines soit également le contingent exprimant les marqueurs épithéliaux CK5/18 et EpCAM. Cependant ceci reste à vérifier en analysant des coupes sériées marquées avec les différents anticorps. Globalement, le CDX et la lignée cellulaire montrent en IHC des caractéristiques similaires. GR-CDXL1 est donc un modèle présentant des caractéristiques épithéliales avec une composante neuroendocrine, et une absence de marqueur mésenchymateux.



**Figure 34 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL1.**

De gauche à droite sont présentés la coloration hématoxyline/éosine/safran puis les marquages épithéliaux CK8/18, EpCAM, le marqueur de prolifération cellulaire Ki67, le marqueur mésenchymateux vimentine, le facteur de transcription TTF1 et les marqueurs neuroendocrines chromogranine A et synaptophysine. Le panel du haut montre les différents marquages sur le CDX et le panel du bas la lignée cellulaire établie *in vitro*.

La coloration HES de la biopsie et du CDX du modèle GR-CDXL2 révèle la présence d'un adénocarcinome bronchique peu différencié (**Figure 35**). La biopsie et le CDX expriment fortement les marqueurs épithéliaux CK8/18 et EpCAM et n'expriment pas le marqueur mésenchymateux vimentine. Le marqueur de prolifération Ki67 est exprimé par 30 % des cellules tumorales de la biopsie et par 70 % des cellules tumorales du CDX. Les marqueurs neuroendocrines ne sont exprimés ni dans la biopsie ni dans le CDX. Globalement, le modèle GR-CDXL2 est une tumeur purement épithéliale qui présente des caractéristiques très similaires à celle de la biopsie tumorale du patient.

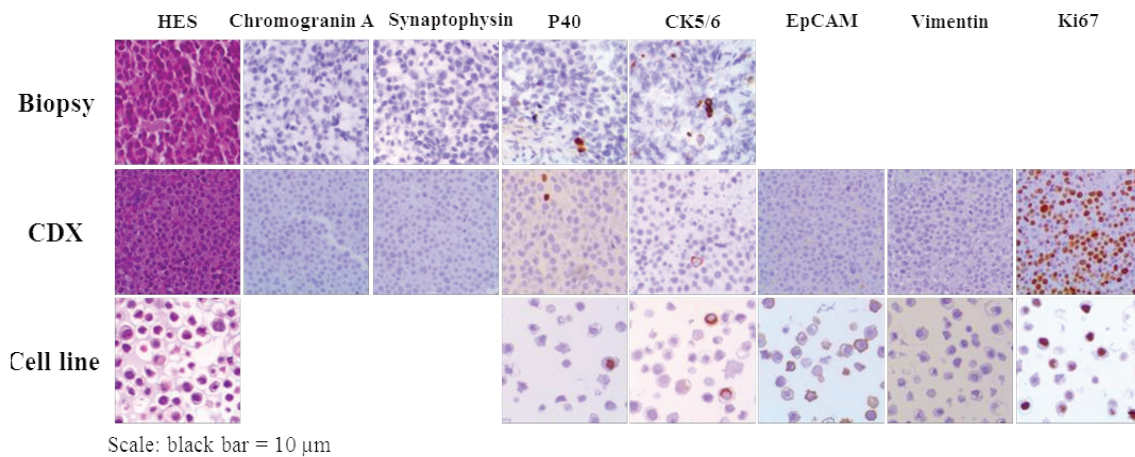


**Figure 35 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL2.**

De gauche à droite sont présentés la coloration hématoxyline/éosine/safran puis les marquages épithéliaux CK8/18, EpCAM, le marqueur de prolifération cellulaire Ki67, le marqueur mésenchymateux vimentine, le facteur de transcription TTF1 et les marqueurs neuroendocrines chromogranine A et synaptophysine. Le panel du haut montre les différents marquages sur la biopsie tumorale et le panel du bas concerne le CDX.

Pour le modèle GR-CDXL3, les marqueurs de tumeurs épidermoïdes p40 et CK5/6 sont tous les deux exprimés par 10 % des cellules tumorales (**Figure 36**). Ces marqueurs sont également exprimés par 5 % des cellules tumorales du CDX et de la lignée cellulaire. Le marqueur EpCAM est exprimé respectivement par 5 % et 100 % des cellules du CDX et de la lignée cellulaire et n'a pas été réalisé sur la biopsie. Le marqueur de prolifération Ki67 est exprimé respectivement par 70 % et 40 % des cellules du CDX et de la lignée cellulaire et n'a pas été réalisé sur la biopsie. Les marqueurs neuroendocrines chromogranine A et synaptophysine ne sont pas exprimés par les cellules de la biopsie ni par le CDX et n'ont pas été réalisés sur la lignée cellulaire. La vimentine n'est pas exprimée par le CDX et la lignée cellulaire et n'a pas été réalisée sur la biopsie tumorale.

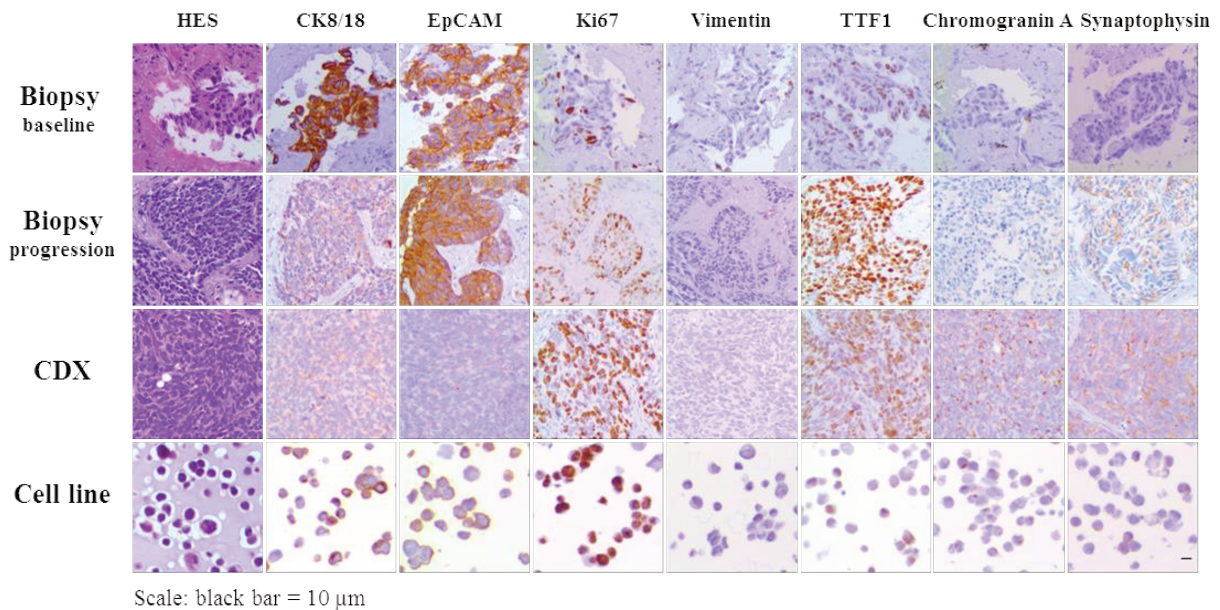




**Figure 36 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL3.**

De gauche à droite sont présentés la coloration hématoxyline/éosine/safran puis les marqueurs neuroendocrines chromogranine A et synaptophysine, le marqueur épidermoïde p40, les marqueurs épithéliaux épidermoïdes CK5/6, EpCAM, le marqueur mésenchymateux vimentine et le marqueur de prolifération cellulaire Ki67. Le panel du haut montre les différents marquages sur la biopsie tumorale, le panel du milieu concerne le CDX et le panel du bas concerne la lignée cellulaire établit *in vitro*.

Les biopsies au diagnostic et lors de la progression (qui correspond également au moment de la réalisation de la xénogreffe de CTC), le CDX et la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL4 expriment les marqueurs CK8/18 et EpCAM et n'expriment pas la vimentine (**Figure 37**). Respectivement 50 % et 40 % des cellules des biopsies au diagnostic et au moment de la xénogreffe expriment le marqueur de prolifération Ki67 et ce marqueur est exprimé dans 80 % des cellules du CDX et de la lignée cellulaire. Le facteur de transcription TTF1 est exprimé dans 20 % des cellules de la biopsie du diagnostic, il est exprimé par toutes les cellules de la biopsie à résistance ainsi que par le CDX et par 80 % des cellules de la lignée cellulaire. Le marqueur neuroendocrine chromogranine A est exprimé par 10 % des cellules de la biopsie au moment du diagnostic, 20 % des cellules de la biopsie au moment de la xénogreffe, 50 % et 30 % des cellules du CDX et de la lignée cellulaire. Le marqueur synaptophysine n'est pas exprimé dans la biopsie au diagnostic alors que 60 % des cellules de la biopsie au moment de la xénogreffe, 40 % des cellules du CDX et 25 % des cellules de la lignée cellulaire expriment ce marqueur avec une faible intensité. Globalement pour ce modèle, nous observons que les biopsies tumorales, le CDX et la lignée cellulaire expriment les mêmes marqueurs, le CDX et de la lignée cellulaire présentant plus de similarité avec la biopsie faite au moment de la xénogreffe qu'avec la biopsie au diagnostic. Pour ce modèle, l'expression de marqueurs neuroendocrines augmente entre la biopsie au diagnostic, la biopsie au moment de la xénogreffe, le CDX et la lignée cellulaire.



**Figure 37 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXL4.**

De gauche à droite sont présentés la coloration hématoxyline/éosine/safran puis les marquages épithéliaux CK8/18, EpCAM, le marqueur de prolifération cellulaire Ki67, le marqueur mésenchymateux vimentine, le facteur de transcription TTF1 et les marqueurs neuroendocrines chromogranine A et synaptophysine. Les deux panels du haut montrent respectivement les différents marquages sur la biopsie tumorale au diagnostic (panel le plus haut) et au moment de la xénogreffe des CTC (panel du dessous). Les deux panels du bas montrent les mêmes marquages sur le CDX (panel le plus haut) et sur la lignée cellulaire établit *in vitro* (panel le plus bas).

Globalement les CDX et les lignées cellulaires sont très similaires aux biopsies tumorales correspondantes. L'expression de marqueurs neuroendocrines par une biopsie tumorale, deux CDX et les lignées cellulaires correspondantes pourrait témoigner de l'agressivité de la maladie. Ces quatre modèles expriment des marqueurs épithéliaux alors que la vimentine n'est jamais exprimée. La caractéristique commune à l'ensemble de ces modèles est le caractère peu différencié des cellules. Cette caractéristique pourrait aussi témoigner de l'agressivité de la maladie au stade avancé. La réalisation de xénogreffes de CTC issues de tumeurs peu différenciées pourrait peut-être permettre d'augmenter le taux de développement de CDX.

#### **d. Caractérisation moléculaire par séquençage ciblé et séquençage de l'exome des biopsies tumorales, CTC uniques, CDX et lignées cellulaires**

La caractérisation moléculaire des quatre modèles de CDX a été d'abord réalisée par séquençage ciblé puis par séquençage de l'exome. Les résultats des biopsies tumorales, des CTC isolées en cellules uniques lors de la xénogreffe, des CDX et des lignées cellulaires ont été comparés afin en premier lieu de valider le modèle puis de construire des arbres phylogéniques afin d'identifier les anomalies clonales

et sous-clonales, ainsi que celles associées au potentiel de dissémination et de tumorigénicité des CTC. Cette analyse pourra aussi nous permettre d'identifier des anomalies moléculaires « actionnables » par des agents thérapeutiques.

### i. Isolement de CTC unique

Pour chacun des 67 patients atteints de CBNPC pour lesquels une xéno greffe de CTC a été réalisée (58 à partir de prélèvements sanguins et 9 à partir de produits de cytophérèse), des CTC ont été collectées au moment de la xéno greffe et conservées pour leur caractérisation ultérieure. Les CTC des quatre patients à l'origine des quatre CDX ont été enrichies, détectées et isolées en utilisant les trois stratégies développées pour le séquençage d'exome de CTC individuelles dans le cancer de la prostate. Ces stratégies ont été présentées dans le paragraphe Résultats III. Pour chacun des quatre patients, des leucocytes ont également été isolés et amplifiés comme contrôle.

Les CTC uniques isolées par les différentes stratégies, les nombres de produits de WGA présentant un index d'intégrité du génome GII supérieur ou égal à 3 et ceux pour lesquels le GII est égal à 2 mais qui ont un phénotype intéressant, c'est-à-dire épithélial ou hybride, sont présentés dans le **Tableau 19**. Pour le modèle GR-CDXL1, 64 échantillons de CTC unique et de leucocytes ont été isolés et ont subi un WGA. Parmi ces 64 échantillons, 18 (28 %) présentent un GII supérieur ou égal à trois. L'ensemble de ces 18 échantillons ainsi que deux échantillons avec un GII égal à un ou deux mais présentant des phénotypes intéressants ont été sélectionnés pour réaliser le séquençage ciblé dans un premier temps puis le séquençage de l'exome. Pour le modèle GR-CDXL2, six échantillons (15 %) parmi 40 présentent un WGA de bonne qualité et ont été sélectionnés pour les analyses de séquençage. Concernant le modèle GR-CDXL3, 125 échantillons ont été isolés, 19 (15 %) présentent un WGA de bonne qualité et deux échantillons avec un WGA de qualité inférieure mais présentant un phénotype hybride ont été sélectionnés. Parmi les 41 échantillons du modèle GR-CDXL4, 11 (27 %) présentaient un WGA de bonne qualité et ont été engagés pour les analyses génomiques.

Globalement, pour les quatre modèles, 270 échantillons ont été isolés, 54 (20 %) présentent un WGA de bonne qualité permettant de réaliser des études génomiques par séquençage ciblé et WES avec une bonne couverture du génome et une bonne profondeur de lecture. Quatre échantillons avec un phénotype épithélial ou hybride ont été récupérés bien qu'ils aient un score de qualité inférieur. Les CTC hybrides sont des cellules très rares exprimant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux et qui pourraient avoir un rôle important dans la dissémination métastatique ce qui explique la raison pour laquelle nous avons fait le choix de les sélectionner. Pour ces quatre patients l'obtention d'échantillons avec un WGA de bonne qualité et représentant l'hétérogénéité phénotypique des CTC a été très difficile particulièrement pour les cellules épithéliales et hybrides ainsi que pour les leucocytes, ce que nous

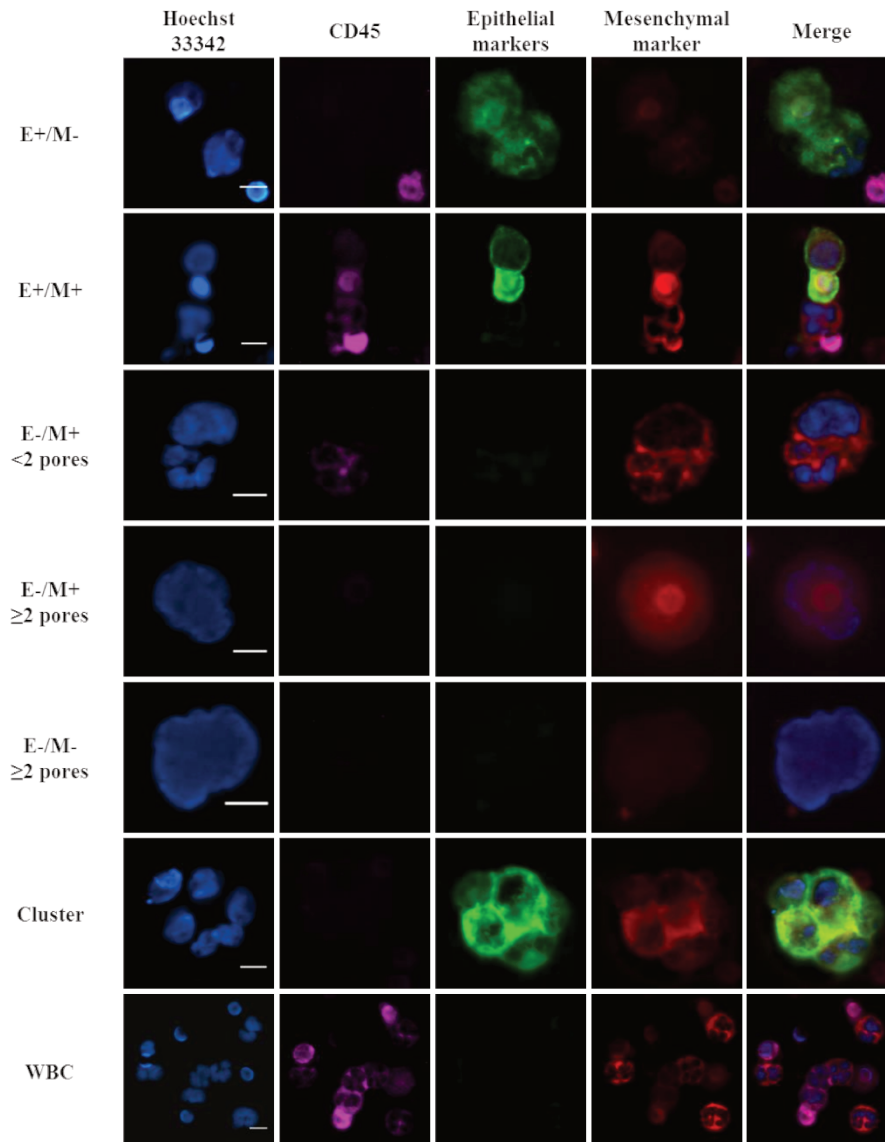
n'avions pas observé précédemment dans le projet de séquençage de l'exome de CTC de prostate et dans d'autres projets du laboratoire. Il est fort possible que les CTC de ces patients qui sont à un stade très avancé de leur maladie, n'aient pas une qualité et une intégrité cellulaire suffisantes pour réaliser de manière reproductible des analyses à l'échelle de cellule unique.

	Phénotype	Nombre d'échantillons engagés en WGA	Nombre d'échantillons avec un GII $\geq 3$	Nombre d'échantillons avec un GII =1 ou 2	
<b>GR-CDXL1</b>	ISET/LMD	E+/M-	10	1	1
		E+/M+	11	0	1
		E-/M+ <2 pores	1	0	0
		E-/M+ $\geq 2$ pores	0	0	0
		E-/M- $\geq 2$ pores	9	8	0
		E-/M- <2 pores	7	5	0
		WBC	20	4	0
	CellSearch/Puncher	E+/M-	6	0	0
		<b>64</b>	<b>18 (28%)</b>	<b>2 (3%)</b>	
<b>GR-CDXL2</b>	ISET/LMD	E-/M+ <2 pores	1	0	0
		E-/M- $\geq 2$ pores	13	4	0
		E-/M- <2 pores	10	1	0
	WBC	16	1	0	
		<b>40</b>	<b>6 (15%)</b>	<b>0</b>	
<b>GR-CDXL3</b>	ISET/LMD	E+/M-	12	0	0
		E+/M+	43	0	2
		E-/M+ <2 pores	7	0	0
		E-/M+ $\geq 2$ pores	2	1	0
		E-/M- $\geq 2$ pores	9	1	0
		E-/M- <2 pores	6	1	0
	WBC	23	7	0	
CellSearch/Puncher		23	9	0	
		<b>125</b>	<b>19 (15%)</b>	<b>2 (2%)</b>	
<b>GR-CDXL4</b>	ISET/LMD	E-/M+ <2 pores	2	0	0
		E-/M- $\geq 2$ pores	8	6	0
		E-/M- <2 pores	10	1	0
	WBC	16	1	0	
CellSearch/CellSorting		5	3	0	
		<b>41</b>	<b>11 (27%)</b>	<b>0</b>	
		<b>270</b>	<b>54 (20%)</b>	<b>4 (1%)</b>	

**Tableau 19 : Caractéristiques phénotypiques des CTC individuelles isolées et amplifiées et nombre de CTC avec un WGA de bonne qualité pour chacun des quatre patients.**

Les images des CTC enrichies par filtration ISET, détectées par immunofluorescence puis isolées en cellules uniques par microdissection laser pour les quatre patients à l'origine des CDX sont présentées dans les **Figures 38, 39, 40 et 41**. Les CTC isolées par microdissection laser de filtres ISET peuvent présenter un phénotype épithélial, hybride et mésenchymateux. Des candidates CTC identifiées par leur

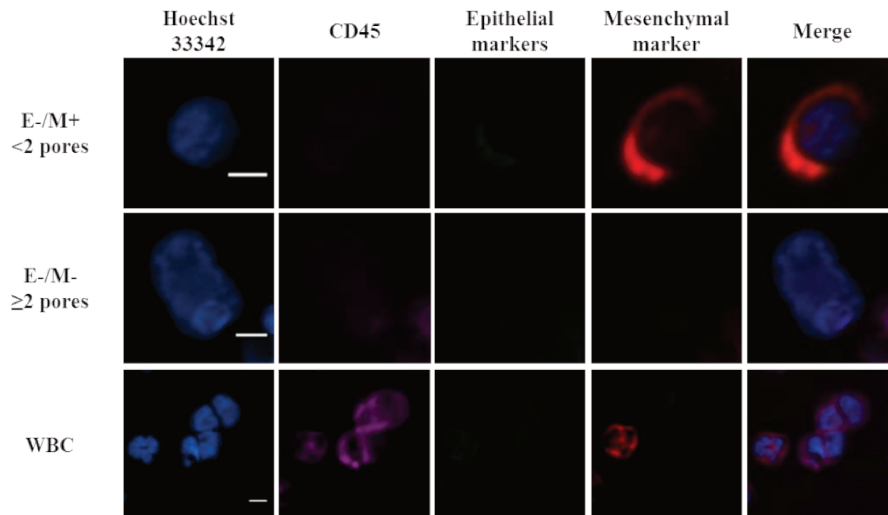
morphologie ont aussi été isolées, comme des cellules mésenchymateuses supérieures ou inférieures à 16  $\mu\text{m}$ , des cellules supérieures à 16  $\mu\text{m}$  sans expression de marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux, des cellules inférieures à 16  $\mu\text{m}$  sans expression de marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux et des clusters de CTC.



**Figure 38 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL1.**

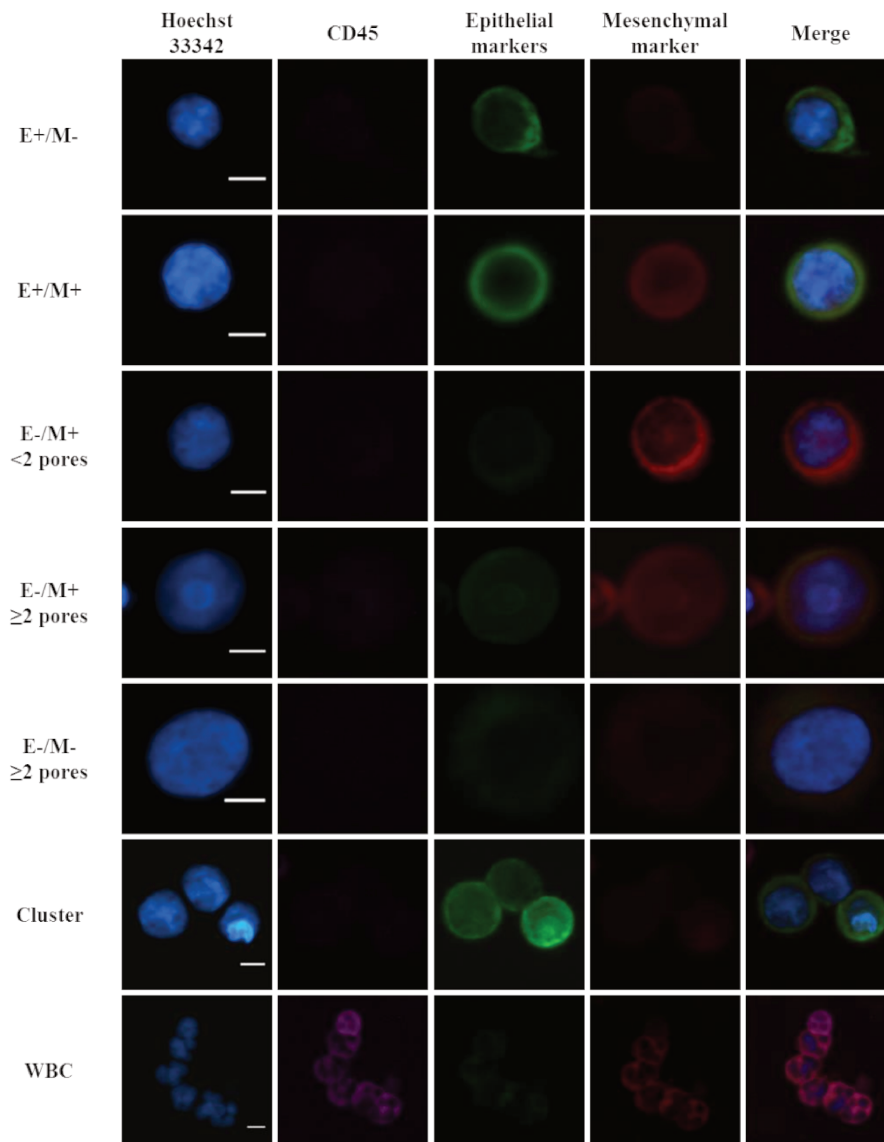
De gauche à droite le panel présente le marquage nucléaire Hoechst 33342, le marquage leucocytaire CD45, les marqueurs épithéliaux pan-cytokératines et EpCAM, le marqueur mésenchymateux vimentine et la superposition des quatre marquages. De haut en bas le panel présente, deux cellules épithéliales (E+/M-) positives pour le marqueur nucléaire Hoechst, négatives pour le CD45, positives pour les marqueurs épithéliaux et négatives pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule hybride (E+/M+) positive pour le marqueur nucléaire Hoechst, négative pour le CD45, positive pour les marqueurs épithéliaux et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule mésenchymateuse de taille inférieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M+ <2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule mésenchymateuse supérieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M+  $\geq$ 2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule supérieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M-  $\geq$ 2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst ; un cluster de CTC, positif pour le marqueur nucléaire Hoechst, négatif pour le CD45, positif pour les marqueurs épithéliaux et pour le marqueur mésenchymateux ; des leucocytes positifs pour le marqueur nucléaire Hoechst, positifs pour le CD45, négatifs pour les marqueurs épithéliaux et positifs pour le marqueur mésenchymateux.





**Figure 39 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL2.**

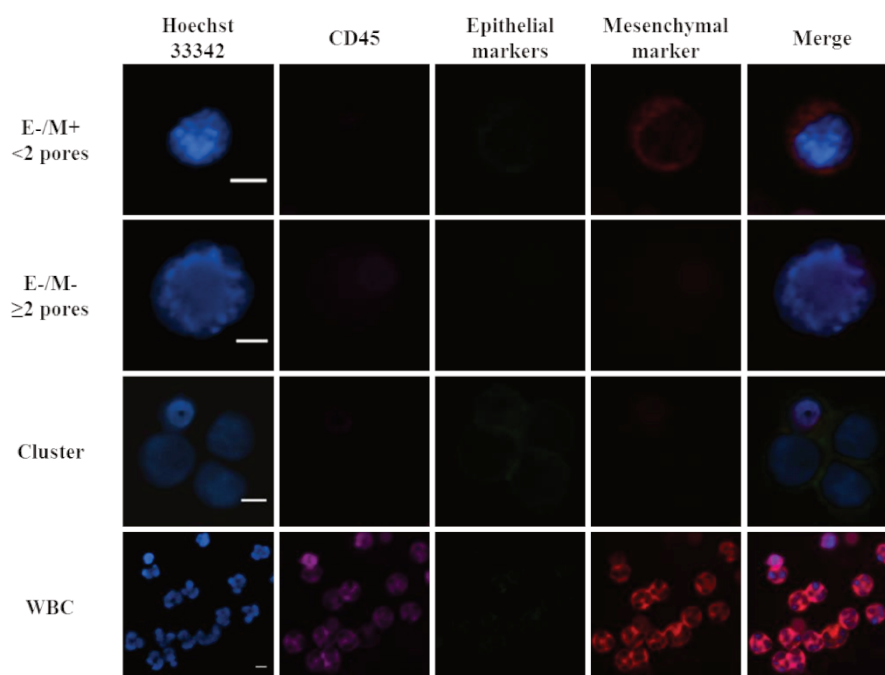
De gauche à droite le panel présente le marquage nucléaire Hoechst 33342, le marquage leucocytaire CD45, les marqueurs épithéliaux pan-cytokératines et EpCAM, le marqueur mésenchymateux vimentine et la superposition des quatre marquages. De haut en bas le panel présente, une cellule mésenchymateuse de taille inférieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M+ <2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule supérieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M-  $\geq$ 2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst ; des leucocytes positifs pour le marqueur nucléaire Hoechst, positifs pour le CD45, négatifs pour les marqueurs épithéliaux et positifs pour le marqueur mésenchymateux.



**Figure 40 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL3.**

De gauche à droite le panel présente le marquage nucléaire Hoechst 33342, le marquage leucocytaire CD45, les marqueurs épithéliaux pan-cytokératines et EpCAM, le marqueur mésenchymateux vimentine et la superposition des quatre marquages. De haut en bas le panel présente, une cellule épithéliale (E+/M-) positive pour le marqueur nucléaire Hoechst, négative pour le CD45, positive pour les marqueurs épithéliaux et négative pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule hybride (E+/M+) positive pour le marqueur nucléaire Hoechst, négative pour le CD45, positive pour les marqueurs épithéliaux et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule mésenchymateuse de taille inférieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M+ <2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule mésenchymateuse supérieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M+  $\geq$ 2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule supérieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M-  $\geq$ 2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst ; un cluster de CTC, positif pour le marqueur nucléaire Hoechst, négatif pour le CD45, positif pour les marqueurs épithéliaux et négatif pour le marqueur mésenchymateux ; des leucocytes positifs pour le marqueur nucléaire Hoechst, positifs pour le CD45, négatifs pour les marqueurs épithéliaux et positifs pour le marqueur mésenchymateux.





**Figure 41 : Caractérisation phénotypique des CTC microdisséquées pour le modèle GR-CDXL4**

De gauche à droite le panel présente le marquage nucléaire Hoechst 33342, le marquage leucocytaire CD45, les marqueurs épithéliaux pan-cytokératines et EpCAM, le marqueur mésenchymateux vimentine et la superposition des quatre marquages. De haut en bas le panel présente, une cellule mésenchymateuse de taille inférieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M+ <2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst et pour le marqueur mésenchymateux ; une cellule supérieure à 16  $\mu\text{m}$  (E-/M-  $\geq$ 2p) uniquement positive pour le marqueur nucléaire Hoechst ; un cluster de CTC, uniquement positif pour le marqueur nucléaire Hoechst et négatif pour le CD45 ; des leucocytes positifs pour le marqueur nucléaire Hoechst, positifs pour le CD45, négatifs pour les marqueurs épithéliaux et positifs pour le marqueur mésenchymateux.

## ii. Séquençage ciblé

La recherche de mutations en utilisant le panel Ampli1 CHP Custom Beta développé par Silicon Biosystems couplé à la technologie de séquençage Ion AmpliSeq mis au point par Emma Pailler sur des lignées cellulaires et validées sur des CTC individuelles a été réalisée sur l'ensemble des échantillons de CTC des quatre patients présentés dans le **Tableau 19**. De plus, l'ADN constitutionnel extrait à partir du sang total des patients, les tumeurs de souris, les lignées cellulaires excepté pour le modèle GR-CDXL2, ainsi que les biopsies tumorales lorsqu'elles étaient disponibles ont également été séquencés. L'objectif de réaliser ce séquençage ciblé était de vérifier la présence de mutations communes entre les biopsies et l'ensemble des autres échantillons cités ci-dessus pour chacun des quatre modèles. Les résultats ont ainsi permis de sélectionner les échantillons pour le séquençage de l'exome.

Les contrôles de qualité de WGA et de séquençage de chacun des échantillons du modèle GR-CDXL3 sont présentés dans le **Tableau 20**. Les mêmes contrôles de qualité ont été réalisés pour les trois autres modèles. Conformément au travail de développement et de validation réalisé par Emma Pailler, les échantillons ayant subi un WGA et qui ont un score de qualité GII de trois ou quatre présentent un pourcentage d'amplicons non couverts faible et un pourcentage d'amplicons avec une profondeur supérieure ou égale à 100X élevé à l'inverse des échantillons avec un GII de un ou deux. Ces résultats justifient la sélection d'échantillons WGA présentant un GII de trois ou quatre. La sélection d'échantillons avec un GII de un ou deux a été justifiée par le phénotype des CTC.

Échantillons	GII	Profondeur moyenne	Profondeur médiane	% d'amplicons avec une profondeur de 0X	% d'amplicons avec une profondeur de 1-99X	% d'amplicons avec une profondeur de ≥100X
1c_punch_E+/M-	4	1017	680	11%	7%	82%
1c_punch_E+/M	4	1019	589	11%	7%	82%
1c_punch_E+/M	2	769	2	40%	23%	36%
1c_punch_E+/M	4	989	746	5%	9%	85%
1c_punch_E+/M	4	893	492	13%	15%	73%
1c_punch_E+/M	4	932	520	13%	10%	77%
1c_punch_E+/M	3	1305	483	8%	10%	82%
1c_punch_E+/M	4	1585	621	7%	18%	75%
2c_LMD_<2 pores E-/M-	4	1117	274	26%	10%	64%
1c_LMD_E+/M+	2	1188	16	43%	15%	42%
1c_LMD_E+/M+	1	784	2	36%	50%	14%
1c_LMD_≥2 pores E-/M+	3	1065	160	34%	9%	57%
1c_LMD_≥2 pores E-/M-	4	625	234	6%	32%	62%
10c_LMD_CD45+	4	789	427	13%	7%	80%
ADN constitutionnel	-	592	596	0%	2%	98%
CDX	-	1085	531	0%	2%	98%
Lignée cellulaire	-	976	455	0%	3%	97%

**Tableau 20 : Contrôle de qualité de l'amplification totale du génome et du séquençage haut débit de nouvelle génération des échantillons du modèle GR-CDXL3.**

Pour le modèle GR-CDXL1, pour lequel nous n'avons pas pu récupérer de matériel de la biopsie tumorale, une mutation COSMIC dans le gène *TP53* (COSM43814 → p.R196P) est partagée par une CTC de phénotype épithéliale, par la tumeur de souris et la lignée cellulaire. Pour le modèle GR-CDXL2 pour lequel nous n'avons actuellement pas la lignée cellulaire, deux mutations (*KRAS* COSM516 → p.G12C et *KDR*) sont partagées par la biopsie tumorale et la tumeur de souris mais pas par les CTC. Pour le modèle GR-CDXL3, une mutation dans le gène *TP53* (COSM129855 → p.Y31C) présente dans la biopsie tumorale est également détectée dans le CDX, la lignée cellulaire et dans six CTC individuelles de phénotype épithélial. Enfin pour le modèle GR-CDXL4, une mutation du gène *TP53*

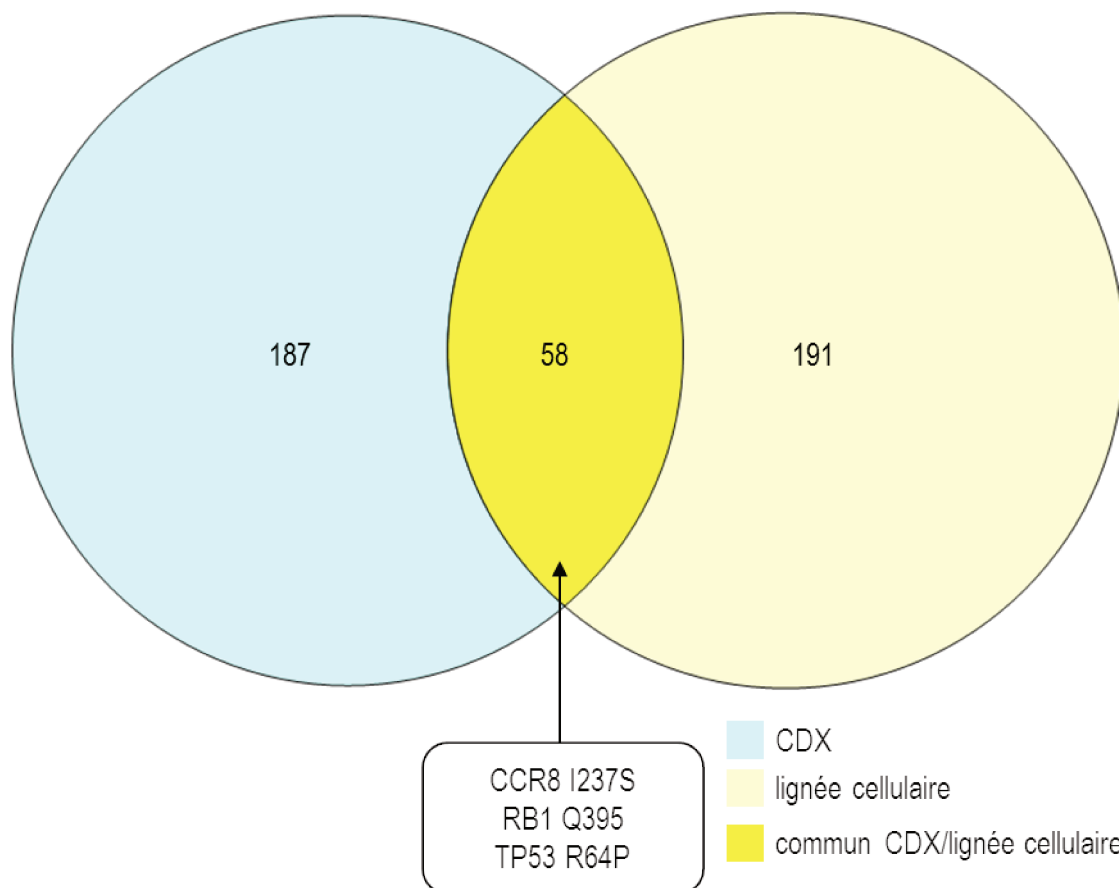
(COSM99648 → p.M2371) est détectée dans la biopsie réalisée au moment de la xénogreffe des CTC dans le CDX, dans la lignée cellulaire ainsi que dans deux échantillons de CTC épithéliales.

Le nombre de mutations communes entre la biopsie et les autres échantillons est très faible du fait du nombre relativement faible de mutations recherchées lors du séquençage ciblé. Cependant, la détection d'au moins un variant commun pour chacun des modèles entre les échantillons comparés nous a permis de sélectionner les échantillons pour le séquençage de l'exome.

### iii. Séquençage de l'exome

Pour chacun des quatre modèles, le séquençage de l'exome des biopsies tumorales (hormis pour le modèle GR-CDXL1), des CDX et des lignées cellulaires (hormis pour le modèle GR-CDXL2) a été réalisé et les résultats sont présentés ci-dessous. Le séquençage de l'exome des CTC n'est pas encore réalisé et va débuter dans les prochaines semaines pour les quatre modèles.

Pour le modèle GR-CDXL1, le séquençage de l'exome du CDX et de la lignée cellulaire a révélé respectivement la présence de 245 et 249 mutations (**Figure 42**). Cinquante-huit mutations sont communes entre le CDX et la lignée cellulaire, comprenant trois mutations COSMIC dans les gènes *CCR8*, *RB1*, *TP53*. Le gène *CCR8* est impliqué dans la migration cellulaire tandis que les deux autres sont des gènes suppresseurs de tumeurs. La détection de 58 mutations communes entre le CDX et la lignée cellulaire valide la pertinence biologique de la lignée cellulaire. Les résultats du séquençage d'exome des CTC individuelles nous permettront de valider définitivement ce modèle. La liste des 58 mutations communes et des 187 mutations spécifiques au CDX est reportée dans le **Tableau 21**. Ce modèle, dans lequel la charge mutationnelle est élevée, présente également un nombre de remaniements du génome important révélés par le profil d'aberrations du nombre de copies (**Figure 43**). L'instabilité génomique de la lignée cellulaire pourrait être un facteur d'agressivité et de résistance aux thérapies dans ce modèle. Les résultats de la caractérisation de l'instabilité génomique de cette lignée cellulaire sont présentés dans le paragraphe Résultats IV-1)e.



**Figure 42 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL1.**

Le diagramme de Venn du CDX et de la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL1 montre que le CDX présente 245 mutations, la lignée cellulaire en possède 249. Cinquante-huit mutations sont communes entre le CDX et la lignée cellulaire et contiennent trois mutations COSMIC dans les gènes *CCR8*, *RB1*, *TP53*.

Gene	HGVSc	Protein variation	Consequences	COSMIC/HGMD	Polypeptide n2	SIFT
AGPAT9	NM_032717.4:c.1257G>T	Q419H	missense_variant	.	P	D
ARID1A	NM_139135.2:c.4484dupT	1494-1495X	frameshift_variant	.	.	.
ATP6AP1	NM_001183.5:c.298G>C	E100Q	missense_variant	.	P	D
BBS9	NM_198428.2:c.476G>T	G159V	missense_variant	.	P	D
BRCA2	NM_000059.3:c.9028C>T	H3010Y	missense_variant	.	P	D
BZW1	NM_001321691.1:c.262G>C	D88H	missense_variant	.	.	.
C2CD5	NM_001286175.1:c.168T>G	F56L	missense_variant	.	P	D
CCR8	NM_005201.3:c.710T>G	I237S	missense_variant	COSM4117494	P	D
CDC14A	NM_001319212.1:c.137G>T	R46L	missense_variant	.	.	.
CGNL1	NM_001252335.1:c.1769C>T	S590F	missense_variant	.	P	D
CNOT6L	NM_144571.2:c.581A>G	Y194C	missense_variant	.	P	D
E2F3	NM_001949.4:c.1100A>T	D367V	missense_variant	.	P	D
EIF4A3	NM_014740.3:c.571G>A	E191K	missense_variant	.	P	D
EPHA3	NM_182644.2:c.446A>T	D149V	missense_variant	.	P	D
F9	NM_001313913.1:c.1126C>A	P376T	missense_variant	.	P	D
FAM186A	NM_001145475.1:c.193-2A>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
FBN1	NM_000138.4:c.4854A>T	Q1618H	missense_variant	.	P	D
FRY	NM_023037.2:c.2770G>T	G924	stop_gained	.	.	.
FSD1	NM_024333.2:c.251_265del	QLAACT83-88Q	inframe_deletion	.	.	.
HELB	NM_033647.4:c.2004C>G	I668M	missense_variant	.	P	D
HRH1	NM_000861.3:c.754G>T	G252W	missense_variant	.	P	D
IFNGR1	NM_000416.2:c.119A>G	Y40C	missense_variant	.	P	D
MALRD1	NM_001142308.2:c.3256+1G>T	.	splice_donor_variant	.	.	.
MAP1A	NM_002373.5:c.2014G>C	E672Q	missense_variant	.	P	D
MAP2K7	NM_001297556.1:c.926G>A	G309D	missense_variant	.	P	D
MAP3K7CL	NM_001286634.1:c.157C>T	Q53	stop_gained	.	.	.
MCM7	NM_182776.2:c.594C>A	N198K	missense_variant	.	P	D
MFI2	NM_005929.5:c.1539C>G	F513L	missense_variant	.	P	D
MGAT4A	NM_001160154.1:c.607G>T	V203L	missense_variant	.	P	D
MGAT5B	NM_198955.1:c.1066G>T	G356W	missense_variant	.	P	D
<del>MLL</del> LLT4	NM_001291964.1:c.2629G>T	G877	stop_gained	.	.	.
MUC19	NM_173600.2:c.3961G>C	V1321L	missense_variant	.	.	.
OR52A5	NM_001005160.2:c.344del	G115X	frameshift_variant	.	.	.
OS9	NM_001017958.2:c.253G>T	E85	stop_gained	.	.	.
PABPC1L	NM_001124756.2:c.1033G>T	E345	stop_gained	.	.	.
PGM5	NM_021965.3:c.1265G>T	W422L	missense_variant	.	P	D
PIEZO1	NM_001142864.3:c.418G>T	G140W	missense_variant	.	P	D
PIK3C2G	NM_001288772.1:c.4435T>C	Y1479H	missense_variant	.	P	D
PNLIPRP3	NM_001011709.2:c.928G>T	G310	stop_gained&splice_region_variant	.	.	.
RB1	NM_000321.2:c.1183C>T	Q395	stop_gained	COSM936, COSM1559414	.	.
REPS1	NM_031922.4:c.2249C>G	S750	stop_gained	.	.	.
RXRB	NM_001291989.1:c.515C>A	S172Y	missense_variant	.	P	D
RYR3	NM_001243996.2:c.9049C>A	L3017I	missense_variant	.	P	D
SHC3	NM_016848.5:c.1684A>T	S562C	missense_variant	.	P	D

SPTA1	NM_003126.2:c.5192A>T	E1731V	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
STK38L	NM_015000.3:c.363G>C	L121F	missense_variant	.	P	D
TAT	NM_000353.2:c.434G>A	S145N	missense_variant	.	P	D
TOP1	NM_003286.2:c.1696G>C	D566H	missense_variant	.	P	D
TP53	NM_001126115.1:c.191G>C	R64P	missense_variant	COSM218533, COSM218535, COSM3733288, COSM43814, COSM45444, COSM44599, COSM2744765,C OSM218534, COSM218532	P	D
TRHDE	NM_013381.2:c.2882T>A	L961H	missense_variant	.	P	D
TRIM25	NM_005082.4:c.976G>T	E326	stop_gained	.	.	.
TRPM1	NM_001252020.1:c.1234G>T	D412Y	missense_variant	.	P	D
TTBK2	NM_173500.3:c.710C>G	S237C	missense_variant	.	P	D
TTC7B	NM_001010854.1:c.1460-1G>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
USP11	NM_004651.3:c.1643A>G	H548R	missense_variant	.	P	D
USP4	NM_003363.3:c.2644+2del	.	splice_donor_variant	.	.	.
ZNF519	NM_145287.3:c.1478G>T	C493F	missense_variant	.	P	D
ZNF735	NM_001159524.1:c.14C>A	P5Q	missense_variant	.	P	D
ABCG5	NM_022436.2:c.394G>T	V132F	missense_variant	.	P	D
ACTR3C	NM_001164459.1:c.369G>T	W123C	missense_variant	.	P	D
ADAMTSL2	NM_014694.3:c.821C>A	P274H	missense_variant	.	P	D
ANO7	NM_001001891.3:c.2211G>T	W737C	missense_variant	.	P	D
ANO8	NM_020959.2:c.2482G>C	G828R	missense_variant	.	P	D
AP3B1	NM_003664.4:c.3181G>T	E106I	stop_gained	.	.	.
ARAP1	NM_015242.4:c.3166G>T	D1056Y	missense_variant	COSM931722, COSM931723	P	D
ARL3	NM_004311.3:c.325G>T	E109	stop_gained	.	.	.
ASH1L	NM_018489.2:c.3765G>T	R1255S	missense_variant	.	P	D
ATP8A1	NM_006095.2:c.1315G>T	D439Y	missense_variant	.	P	D
ATXN1	NM_001128164.1:c.1574C>A	T525N	missense_variant	.	P	D
B4GALT1	NM_001497.3:c.163G>T	G55	stop_gained	.	.	.
BEGAIN	NM_001159531.1:c.107G>T	R36L	missense_variant	.	P	D
BSN	NM_003458.3:c.8056C>A	P2686T	missense_variant	.	N/A	D
BTRC	NM_033637.3:c.340G>T	G114C	missense_variant	.	P	D
C14orf1	NM_007176.3:c.47C>G	S16C	missense_variant	.	P	D
C2orf74	NM_001143959.1:c.491G>T	G164V	missense_variant	.	P	D
C7orf50	NM_032350.5:c.457G>T	G153C	missense_variant	.	P	D
CALHM3	NM_001129742.1:c.651C>A	S217R	missense_variant	.	P	D
CAPN15	NM_005632.2:c.119G>T	R40L	missense_variant	.	P	D
CASZ1	NM_001079843.2:c.4282G>T	G1428C	missense_variant	.	P	D
CCBL2	NM_001008661.2:c.812G>T	R271I	missense_variant	.	P	D
CCDC183	NM_001039374.4:c.773C>A	T258N	missense_variant	.	P	D
CDHR1	NM_001171971.2:c.184C>A	P62T	missense_variant	.	P	D
CDK13	NM_003718.4:c.1282_1296del	HRLSRS426-431H	inframe_deletion	.	.	.
CDK5RAP2	NM_018249.5:c.520G>T	A174S	missense_variant	COSM3903644	P	D

CERS1	NM_021267.4:c.1039G>T	D347Y	missense_variant	.	P	D
CHST7	NM_019886.3:c.773G>T	G258V	missense_variant	.	P	D
CHTF18	NM_022092.2:c.1928G>T	G643V	missense_variant	.	P	D
CLP1	NM_001142597.1:c.344C>A	P115H	missense_variant	.	P	D
CNTN4	NM_175607.2:c.364G>T	D122Y	missense_variant	.	P	D
COL1A2	NM_000089.3:c.2377G>C	G793R	missense_variant	.	N/A	D
CORIN	NM_001278585.1:c.2555del	Q852X	frameshift_variant	.	.	.
CROT	NM_001143935.1:c.1147G>T	G383C	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
CSGALNAC T2	NM_001319654.1:c.580C>A	P194T	missense_variant	.	.	.
DBF4	NM_006716.3:c.350C>T	T117I	missense_variant	.	P	D
DCAF11	NM_181357.2:c.1394G>T	W465L	missense_variant	COSM5847906	P	D
DHX30	NM_014966.3:c.2467G>T	D823Y	missense_variant	.	P	D
DHX30	NM_014966.3:c.3253G>T	D1085Y	missense_variant	.	P	D
DMD	NM_004006.2:c.6913-1G>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
EBF3	NM_001005463.2:c.1631C>A	S544Y	missense_variant	.	P	D
EFNA3	NM_004952.4:c.353G>T	S118I	missense_variant	.	P	D
EMILIN2	NM_032048.2:c.145G>T	A49S	missense_variant	.	P	D
ENOX2	NM_182314.2:c.415G>T	G139W	missense_variant	.	P	D
ERGIC3	NM_015966.2:c.701G>T	S234I	missense_variant	.	P	D
ETNPPL	NM_001146627.1:c.4G>T	G2	stop_gained&splice_region_variant	.	.	.
FAM65B	NM_001286447.1:c.661G>T	D221Y	missense_variant	.	P	D
FAM84B	NM_174911.4:c.670G>T	G224C	missense_variant	.	P	D
FILIP1L	NM_014890.3:c.1562G>A	G521E	missense_variant	.	P	D
FRYL	NM_015030.1:c.1643G>T	G548V	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
FRZB	NM_001463.3:c.307G>T	E103	stop_gained	.	.	.
FZD2	NM_001466.3:c.1238G>T	R413L	missense_variant	.	P	D
GABRA5	NM_001165037.1:c.408C>A	H136Q	missense_variant	.	P	D
GALNT13	NM_052917.3:c.152C>A	S51	stop_gained	COSM3568047, COSM3568046	.	.
GALNT9	NM_001122636.1:c.3G>A	M1I	start_lost	.	P	D
GCK	NM_000162.3:c.736G>T	G246W	missense_variant	.	P	D
GFI1	NM_001127216.1:c.794C>A	S265Y	missense_variant	.	P	D
GNAT1	NM_000172.3:c.694G>T	E232	stop_gained	.	.	.
GPR34	NM_005300.3:c.450G>T	L150F	missense_variant	.	P	D
GRM8	NM_000845.2:c.244G>T	A82S	missense_variant	.	P	D
HES7	NM_032580.3:c.96_98del	LE32-33L	inframe_deletion	.	.	.
HIF1A	NM_181054.2:c.452G>T	R151I	missense_variant	.	P	D
HPS5	NM_181507.1:c.256G>C	D86H	missense_variant	.	P	D
HTR1A	NM_000524.3:c.386C>A	A129D	missense_variant	.	P	D
INCENP	NM_020238.2:c.312G>T	K104N	missense_variant	.	N/A	D
INPP5A	NM_001321042.1:c.801G>C	E267D	missense_variant	.	.	.
IRX2	NM_001134222.1:c.709G>T	D237Y	missense_variant	COSM3615302	P	D
ISPD	NM_001101417.3:c.170G>T	G57V	missense_variant	.	P	D
JMJD1C	NM_001322252.1:c.3396G>T	Q1132H	missense_variant	.	.	.
KCNS1	NM_001322799.1:c.389G>T	C130F	missense_variant	.	P	D
KDM7A	NM_030647.1:c.1069C>A	L357I	missense_variant	.	P	D

KIAA1109	NM_015312.3:c.5652C>A	S1884R	missense_variant	.	P	D
KIAA1429	NM_015496.4:c.4894G>T	G1632C	missense_variant	.	P	D
KIAA1456	NM_020844.2:c.166G>T	G56	stop_gained	.	.	.
KIAA2022	NM_001008537.2:c.783_784del	FE261-262LX	frameshift_variant	.	.	.
KIF17	NM_020816.3:c.156C>A	F52L	missense_variant	.	P	D
KIF20B	NM_001284259.1:c.4895C>A	P1632Q	missense_variant	.	P	D
KIF26A	NM_015656.1:c.2516G>T	S839I	missense_variant	.	P	D
KLHDC7A	NM_152375.2:c.1818C>G	D606E	missense_variant	.	P	D
KMT2C	NM_170606.2:c.380C>A	A127D	missense_variant	.	P	D
L3MBTL3	NM_032438.2:c.1199G>A	R400H	missense_variant	.	P	D
LCN1	NM_001252617.1:c.76G>T	E26	stop_gained	.	.	.
LPCAT1	NM_024830.3:c.470G>T	S157I	missense_variant	.	P	D
LRRRC10	NM_201550.3:c.246G>T	L82F	missense_variant	.	P	D
LRRRC70	NM_181506.4:c.1720C>G	Q574E	missense_variant	.	P	D
LRRRC70	NM_181506.4:c.1823C>A	P608H	missense_variant	.	P	D
LRRRC75A	NM_001113567.2:c.805G>T	G269C	missense_variant	.	P	D
MAP4K2	NM_004579.4:c.503G>T	R168M	missense_variant	.	P	D
MGAT3	NM_002409.4:c.952G>A	A318T	missense_variant	.	P	D
MIOS	NM_019005.3:c.774G>T	K258N	missense_variant	.	P	D
MIOS	NM_019005.3:c.2017C>A	Q673K	missense_variant	.	P	D
MN1	NM_002430.2:c.1261C>A	P421T	missense_variant	.	P	D
MRV1	NM_001206880.1:c.155C>A	A52D	missense_variant	.	P	D
MSX1	NM_002448.3:c.361G>T	G121W	missense_variant	.	P	D
NAP1L2	NM_021963.3:c.387C>A	F129L	missense_variant	.	P	D
NHLH1	NM_005598.3:c.285C>A	F95L	missense_variant	COSM162904	P	D
NR5A1	NM_004959.4:c.813G>T	Q271H	missense_variant	.	P	D
NTRK2	NM_001018064.2:c.1031G>T	G344V	missense_variant	.	P	D
NUP210	NM_024923.3:c.2332C>A	P778T	missense_variant	.	P	D
NWD2	NM_001144990.1:c.959C>G	S320C	missense_variant	.	P	D
OPN1SW	NM_001708.2:c.529C>A	P177T	missense_variant	.	P	D
ORC5	NM_002553.3:c.1227C>A	C409	stop_gained	.	.	.
P4HTM	NM_177939.2:c.1279G>T	D427Y	missense_variant	.	P	D
PALD1	NM_014431.2:c.2384C>A	S795Y	missense_variant	COSM3440111	P	D
PBRM1	NM_018313.4:c.653C>A	P218Q	missense_variant	.	P	D
PCDH7	NM_032457.3:c.3159C>A	N1053K	missense_variant	.	.	.
PCSK5	NM_001190482.1:c.168G>T	K56N	missense_variant	.	P	D
PHACTR2	NM_001100165.1:c.1607C>A	A536E	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
PHF8	NM_001184898.1:c.99-1G>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
PHIP	NM_017934.5:c.4078C>A	P1360T	missense_variant	.	P	D
PIGA	NM_020473.3:c.40C>A	P14T	missense_variant	.	P	D
PLCB3	NM_000932.2:c.1926G>C	Q642H	missense_variant	.	P	D
PLCXD3	NM_001005473.2:c.554G>T	W185L	missense_variant	.	P	D
PLEC	NM_201381.2:c.6142C>G	R2048G	missense_variant	.	N/A	D
POLG	NM_002693.2:c.3454G>T	A1152S	missense_variant	.	P	D
POLQ	NM_199420.3:c.862C>A	R288S	missense_variant	COSM1221483	P	D
POMC	NM_001319205.1:c.206C>A	P69H	missense_variant	COSM4913875	P	D

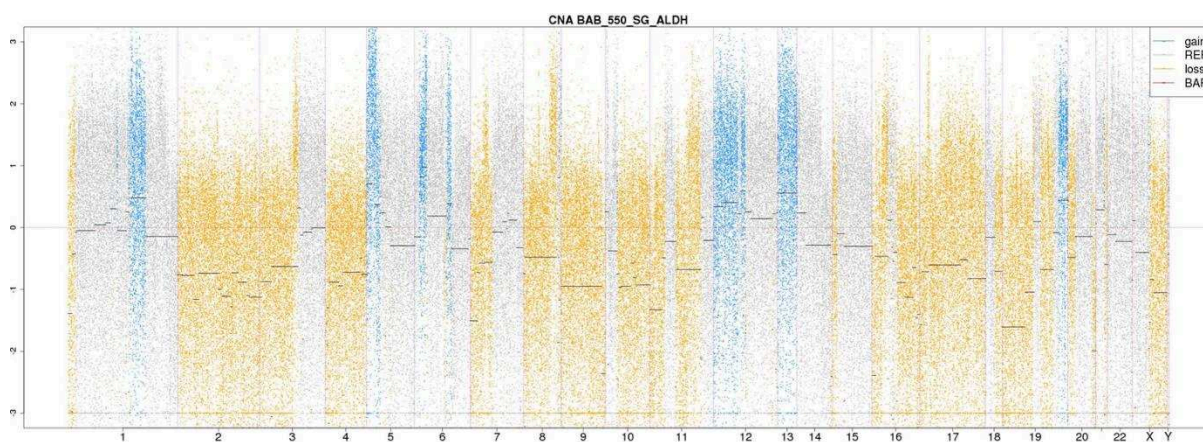


PPARGC1A	NM_013261.3:c.1575G>T	W525C	missense_variant	.	P	D
PPFIA4	NM_001304331.1:c.96C>A	N32K	missense_variant	COSM4143237	.	.
PRDM16	NM_199454.2:c.226G>T	E76	stop_gained	.	.	.
PREPL	NM_006036.4:c.1168G>T	A390S	missense_variant	.	P	D
PTAR1	NM_001099666.1:c.41G>T	R14L	missense_variant	COSM4547330, COSM4547329	P	D
PTGER2	NM_000956.3:c.379C>G	L127V	missense_variant	.	P	D
PTPRG	NM_002841.3:c.4036C>A	P1346T	missense_variant	.	P	D
PXN	NM_001243756.1:c.1301G>T	C434F	missense_variant	.	P	D
RAB3IP	NM_175623.3:c.66G>T	L22F	missense_variant	.	P	D
RABEP1	NM_001291581.1:c.1049C>A	S350	stop_gained	.	.	.
RASSF5	NM_182665.3:c.33C>A	Y11	stop_gained	.	.	.
RB1	NM_000321.2:c.844G>T	E282	stop_gained	.	.	.
RBFOX1	NM_001142333.1:c.458G>A	R153Q	missense_variant	.	P	D
RBM47	NM_001098634.1:c.238C>A	R80S	missense_variant	COSM2847144, COSM2847143, COSM2847142	P	D
RBMX	NM_002139.3:c.349G>T	G117	stop_gained	.	.	.
RCL1	NM_001286700.1:c.550G>T	E184	stop_gained	.	.	.
RIMS1	NM_001168407.1:c.248C>A	P83H	missense_variant	.	P	D
RNF216	NM_207116.2:c.1573G>T	E525	stop_gained	.	.	.
RPS6KA4	NM_001318361.1:c.2022C>A	S674R	missense_variant	.	.	.
SALL2	NM_005407.2:c.1115G>T	R372M	missense_variant	.	P	D
SAMD14	NM_001257359.1:c.727G>T	D243Y	missense_variant	.	P	D
SCAP	NM_001320044.1:c.901G>T	G301	stop_gained	.	.	.
SCN9A	NM_002977.3:c.3923C>A	P1308H	missense_variant	.	P	D
SCRIB	NM_182706.4:c.4889G>T	G1630V	missense_variant	.	P	D
SEC13	NM_030673.3:c.673C>A	P225T	missense_variant	.	P	D
SEC24D	NM_001318066.1:c.2842C>A	P948T	missense_variant	.	P	.
SEMA3A	NM_006080.2:c.2047G>T	G683	stop_gained	.	.	.
SEPN1	NM_206926.1:c.700C>A	R234S	missense_variant	.	.	.
SF3B1	NM_012433.3:c.1225C>A	P409T	missense_variant	.	P	D
SGK223	NM_001080826.2:c.3705C>A	S1235R	missense_variant	.	P	D
SIRT1	NM_012238.4:c.364G>T	D122Y	missense_variant	.	P	D
SLAIN2	NM_020846.1:c.1355C>A	S452	stop_gained	.	.	.
SLC19A1	NM_001205206.1:c.398G>T	R133L	missense_variant	.	P	D
SLC25A25	NM_001006641.3:c.735G>T	K245N	missense_variant	.	P	D
SLC39A10	NM_020342.2:c.1468G>T	E490	stop_gained	.	.	.
SLC45A1	NM_001080397.2:c.1164G>T	R388S	missense_variant	COSM5579595, COSM5579596	P	D
SMARCAD1	NM_020159.4:c.2328G>T	M776I	missense_variant	.	P	D
SMU1	NM_018225.2:c.1312G>T	G438C	missense_variant	.	P	D
SNRPG	NM_001317167.1:c.7_8+2del	3-?	splice_donor_variant&coding_sequence_variant	.	.	.
SNX27	NM_030918.5:c.581C>A	S194Y	missense_variant	.	P	D
SNX33	NM_001318146.1:c.938G>T	W313L	missense_variant	COSM1135724	.	.
SORBS2	NM_021069.4:c.2884G>T	G962	stop_gained&splice_region_variant	.	.	.
SPEG	NM_005876.4:c.6991G>T	A2331S	missense_variant	.	P	D

SPIN1	NM_006717.2:c.16G>T	G6	stop_gained	.	.	.
SREBF1	NM_001005291.2:c.3163G>T	A1055S	missense_variant	.	P	D
SRRM2	NM_016333.3:c.7025G>T	R2342L	missense_variant	.	P	D
TCF7L1	NM_031283.2:c.676C>G	H226D	missense_variant	.	P	D
TEC	NM_003215.2:c.1513G>T	V505L	missense_variant	.	P	D
THOP1	NM_003249.4:c.529G>T	D177Y	missense_variant	.	P	D
TLE2	NM_001300846.1:c.1826G>T	G609V	missense_variant	.	P	D
TLE3	NM_001282981.1:c.2205G>T	L735F	missense_variant	.	P	D
TMEM164	NM_032227.3:c.475G>T	A159S	missense_variant	.	P	D
TMEM198	NM_001303098.1:c.911C>A	P304H	missense_variant	.	P	D
TMPRSS7	NM_001042575.2:c.304G>C	G102R	missense_variant	.	P	D
TPP1	NM_000391.3:c.1369G>T	D457Y	missense_variant	.	P	D
TTN	NM_001256850.1:c.89609G>A	G29870D	missense_variant	.	N/A	.
TTN	NM_001256850.1:c.66913G>T	A22305S	missense_variant	.	N/A	.
TUBB4B	NM_006088.5:c.121G>T	D41Y	missense_variant	.	P	D
UBN1	NM_001079514.2:c.137G>T	R46L	missense_variant	.	P	D
UNC13B	NM_006377.3:c.2463G>T	M821I	missense_variant	.	P	D
USO1	NM_001290049.1:c.363C>A	F121L	missense_variant	.	P	D
USP34	NM_014709.3:c.2875G>C	D959H	missense_variant	.	P	D
WDR60	NM_018051.4:c.31G>T	D11Y	missense_variant	COSM1190797	P	D
WNK3	NM_020922.4:c.5131C>G	R1711G	missense_variant	COSM141639	P	D
YTHDC1	NM_001031732.2:c.847G>T	G283W	missense_variant	.	P	D
YTHDF1	NM_017798.3:c.1530G>T	E510D	missense_variant	.	P	D
ZFAND5	NM_001102421.2:c.307G>T	E103	stop_gained	.	.	.
ZGRF1	NM_018392.4:c.5546C>A	A1849E	missense_variant	.	P	D
ZNF286A	NM_001288644.1:c.191G>T	G64V	missense_variant	.	.	.
ZNF703	NM_025069.2:c.1645G>T	G549C	missense_variant	.	P	D

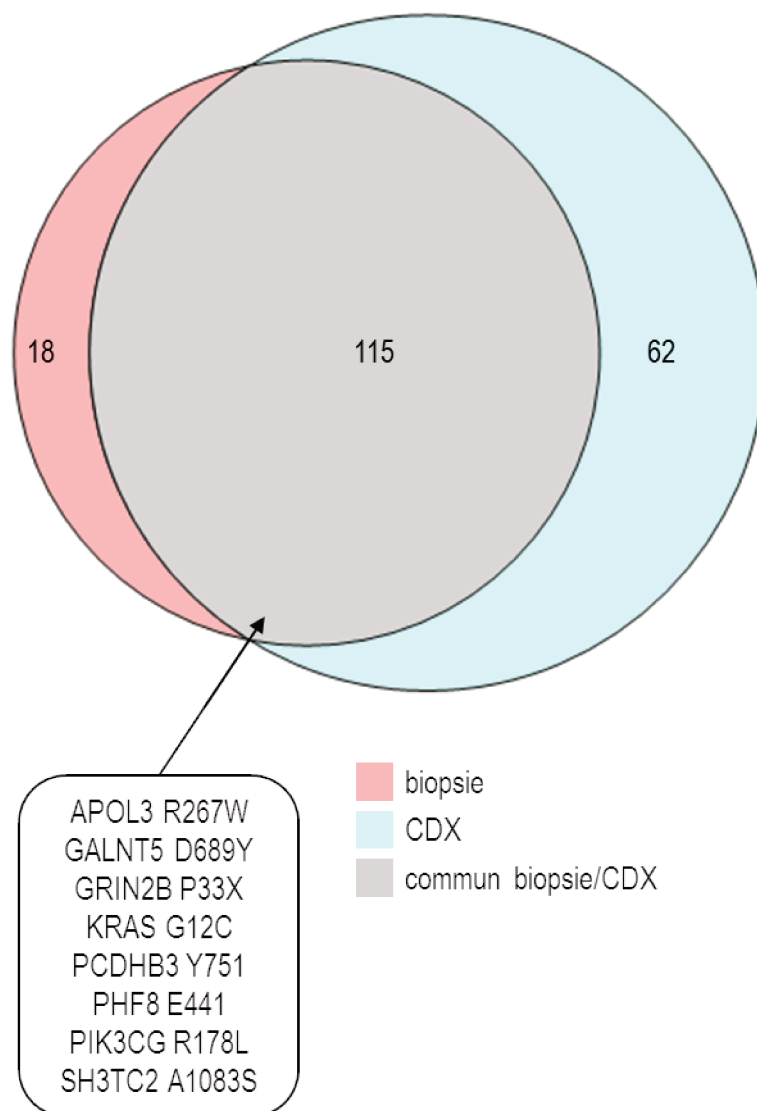
**Tableau 21 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL1.**

Les mutations communes au CDX et à la lignée cellulaire figurent en jaune et les mutations spécifiques au CDX en bleu.



**Figure 43 : Profil des anomalies du nombre de copies de la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL1.**

Pour le modèle GR-CDXL2, la biopsie du patient réalisée un an avant le prélèvement sanguin et la xénogreffe de CTC présentent respectivement 133 et 177 mutations (**Figure 44**). L'implantation de 35 CTC (estimation d'après le compte par CellSearch) a permis le développement d'un CDX dix mois après la xénogreffe. Ce CDX présente 177 mutations. Cent-quinze mutations de la biopsie tumorale, soit 86 %, sont retrouvées dans le CDX incluant huit mutations COSMIC dont la mutation *KRAS* G12C et des mutations dans les gènes *APOL3*, *GALNT5*, *GRIN2B*, *PCDHB3*, *PHF8*, *PIK3CG*, *SH3TC2*. L'ensemble des 115 mutations communes sont listées dans le **Tableau 22**. Ce modèle montre que l'implantation d'un nombre très faible de CTC a permis de « récapituler » l'hétérogénéité tumorale retrouvée dans la biopsie tumorale au moment du diagnostic et avant traitement par chimiothérapie. L'étude plus approfondie des 62 mutations retrouvées uniquement dans le CDX (**Tableau 12**) et la comparaison avec les mutations détectées dans les CTC pourraient permettre d'identifier certaines mutations potentiellement responsables de la résistance aux traitements et à l'évolution de la maladie.



**Figure 44 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL2.**

Le diagramme de Venn de la biopsie et du CDX du modèle GR-CDXL2 montre que la biopsie présente 133 mutations et que le CDX en possède 177. 115 mutations sont communes entre la biopsie et le CDX. Parmi les 115 mutations, huit mutations COSMIC sont détectées et notamment la mutation *KRAS G12C*.

Gene	HGVSc	Protein variation	Consequences	COSMIC/HGMD	Polypeptide n2	SIFT
ACTG2	NM_001615.3:c.1071G>T	W357C	missense_variant	COSM4520727	P	D
BHMG1	NM_001310124.1:c.395C>T	T132I	missense_variant	.	P	D
COX7B2	NM_130902.2:c.49A>T	S17C	missense_variant	.	P	D
EYA4	NM_172105.3:c.1187G>T	G396V	missense_variant	.	P	D
GRM1	NM_001278066.1:c.2330T>A	V777E	missense_variant	.	P	D
HOXA5	NM_019102.3:c.685G>A	A229T	missense_variant	.	P	D
HYOU1	NM_006389.4:c.833G>T	R278L	missense_variant	COSM3710106, COSM3710105	P	D
MYH2	NM_001100112.1:c.4709A>C	E1570A	missense_variant	COSM1258444	P	D
NUP133	NM_018230.2:c.742G>T	G248W	missense_variant	.	P	D
PCDH8	NM_032949.2:c.2758G>A	V920I	missense_variant	.	P	D
PPP1R3C	NM_005398.5:c.352G>T	D118Y	missense_variant	.	P	D
RFWD2	NM_022457.6:c.325G>T	G109C	missense_variant	.	P	D
RUVBL1	NM_003707.2:c.196G>T	V66F	missense_variant	.	P	D
SFRP2	NM_003013.2:c.379C>A	P127T	missense_variant	.	P	D
SHISA2	NM_001007538.1:c.146G>C	R49P	missense_variant	.	P	D
SLC44A4	NM_001178044.1:c.97A>T	T33S	missense_variant	.	P	D
SP8	NM_182700.5:c.144C>A	F48L	missense_variant	.	P	D
ZNF160	NM_001322129.1:c.872G>T	G291V	missense_variant	COSM4743098	P	D
STK11	NM_000455.4:c.745del	T249X	frameshift_variant	.	.	.
ACAN	NM_001135.3:c.4792G>A	G1598R	missense_variant	.	P	D
ADAM19	NM_033274.4:c.50T>A	L17Q	missense_variant	.	N/A	D
ALPI	NM_001631.4:c.1232T>C	L411P	missense_variant	.	P	D
ANKS1A	NM_015245.2:c.370G>A	G124R	missense_variant	.	P	D
ASXL3	NM_030632.2:c.272A>T	D91V	missense_variant	.	P	D
BEND4	NM_001159547.1:c.560A>C	K187T	missense_variant	.	.	.
BFAR	NM_016561.2:c.774G>A	W258	stop_gained	.	.	.
BPI	NM_001725.2:c.914G>T	G305V	missense_variant	.	P	D
BTF3L4	NM_152265.4:c.337C>G	L113V	missense_variant	.	P	D
C5orf42	NM_023073.3:c.2875C>T	P959S	missense_variant	.	P	D
C7orf61	NM_001004323.1:c.30G>T	W10C	missense_variant	.	P	D
CCDC102A	NM_033212.3:c.1529_1552del	RRQQQNAPL5 10-518L	inframe_deletion	.	.	.
CES5A	NM_001190158.1:c.714C>A	N238K	missense_variant	.	P	D
CHEK2	NM_007194.3:c.1151T>A	L384	stop_gained	.	.	.
CNNM1	NM_020348.2:c.2299G>C	D767H	missense_variant	.	P	D
COL2A1	NM_001844.4:c.1430G>A	G477D	missense_variant	.	P	D
CSTF2T	NM_015235.2:c.1573G>T	G525	stop_gained	.	.	.
CTNNA2	NM_004389.3:c.2299C>A	P767T	missense_variant	.	P	D
CUX2	NM_015267.3:c.2736C>A	N912K	missense_variant	COSM5362012	P	D
DSCAM	NM_001389.3:c.1764C>A	S588R	missense_variant	.	P	D
EFTUD1	NM_001040610.2:c.1709C>T	A570V	missense_variant	.	P	D
EIF2AK4	NM_001013703.3:c.4645C>T	R1549C	missense_variant	.	P	D
FAT2	NM_001447.2:c.6940G>C	D2314H	missense_variant	.	P	D
FKBP9	NM_007270.4:c.368-2A>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.

GABRB2	NM_000813.2:c.700C>A	L234I	missense_variant	.	P	D
GK5	NM_001039547.2:c.619+2T>G	.	splice_donor_variant	.	.	.
GUCY2C	NM_004963.3:c.2299C>T	R767C	missense_variant	.	P	D
GZMK	NM_002104.2:c.166C>A	L56M	missense_variant	.	P	D
IDS	NM_001166550.3:c.824G>T	G275V	missense_variant	COSM3973372	.	.
ITGA8	NM_003638.2:c.591G>T	Q197H	missense_variant	.	P	D
ITGB1BP2	NM_012278.2:c.199G>T	E67	stop_gained	COSM3800740	.	.
LNX1	NM_001126328.2:c.1862C>T	P621L	missense_variant	.	P	D
MAGEB18	NM_173699.3:c.222dupT	I74IX	frameshift_variant	.	.	.
MAN1C1	NM_001289010.1:c.896_906del	PTGI298-301X	frameshift_variant	.	.	.
MRC1	NM_002438.3:c.3392C>A	A1131D	missense_variant	.	P	D
NOTCH4	NM_004557.3:c.2143T>A	C715S	missense_variant	.	P	D
NT5C1A	NM_032526.2:c.196G>C	E66Q	missense_variant	COSM1296414, COSM3489488	P	D
NUDT7	NM_001243657.1:c.328C>A	L110M	missense_variant	.	P	D
NUTM1	NM_175741.2:c.1261_1263del	QK420-421Q	inframe_deletion	.	.	.
OR2W3	NM_001001957.2:c.856A>T	N286Y	missense_variant	.	P	D
OSGIN2	NM_001126111.2:c.335A>T	Q112L	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
PCDH19	NM_001105243.1:c.2304C>G	D768E	missense_variant	.	P	D
PORCN	NM_203473.2:c.994A>T	S332C	missense_variant	.	P	D
RAP2A	NM_021033.6:c.527G>A	C176Y	missense_variant	.	P	D
SEMA5A	NM_003966.2:c.1014A>C	Q338H	missense_variant	.	P	D
SEZ6L	NM_001184774.1:c.2542T>C	C848R	missense_variant	.	P	D
SLC12A5	NM_001134771.1:c.554G>T	G185V	missense_variant	.	P	D
SLC17A6	NM_020346.2:c.1358G>C	G453A	missense_variant	.	P	D
SLC4A7	NM_001321104.1:c.590A>T	D197V	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
SMARCA5	NM_003601.3:c.1592G>A	G531D	missense_variant	.	P	D
SPARC	NM_001309444.1:c.913C>A	P305T	missense_variant	.	.	.
TLR10	NM_001017388.2:c.1955_1975del	LIPNLEKE652-659	stop_gained&inframe_deletion	.	.	.
TLR8	NM_016610.3:c.2366del	G789X	frameshift_variant	COSM5028846	.	.
TMEM119	NM_181724.2:c.56C>A	S19Y	missense_variant	.	P	D
TRPM7	NM_001301212.1:c.1610A>G	Y537C	missense_variant	.	P	D
TSHR	NM_001018036.2:c.691C>A	L231M	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
TTN	NM_001256850.1:c.101082T>G	H33694Q	missense_variant	.	N/A	.
WDR49	NM_178824.3:c.896C>T	T299M	missense_variant&splice_region_variant	COSM4812198, COSM1308798	P	D
ZNF354C	NM_014594.2:c.1374T>G	H458Q	missense_variant	.	P	D
ZNF605	NM_183238.3:c.1448G>T	R483M	missense_variant	.	P	D
ZNF99	NM_001080409.2:c.1328A>G	H443R	missense_variant	.	P	D
ADGRL3	NM_015236.5:c.599A>G	Y200C	missense_variant	.	P	D
AGT	NM_000029.3:c.1441C>A	P481T	missense_variant	.	P	D
ANK3	NM_020987.4:c.3844A>T	R1282	stop_gained&splice_region_variant	.	.	.
APOL3	NM_145639.1:c.799C>T	R267W	missense_variant	COSM1033799, COSM1033798	P	D
ARHGEF11	NM_014784.3:c.1596G>T	K532N	missense_variant	.	P	D
ARHGEF6	NM_004840.2:c.1966G>T	D656Y	missense_variant	.	P	D
ARID1B	NM_017519.2:c.3644del	G1215X	frameshift_variant	.	.	.



ASH2L	NM_004674.4:c.887G>A	R296Q	missense_variant	.	P	D
ATP13A1	NM_020410.2:c.1166A>T	K389M	missense_variant	.	P	D
ATP6V1C2	NM_001039362.1:c.676G>A	V226M	missense_variant	.	P	D
ATRNL1	NM_207303.4:c.3084C>A	C1028	stop_gained	.	.	.
BIRC7	NM_139317.2:c.127del	L42X	frameshift_variant	.	.	.
C10orf111	NM_153244.1:c.83G>A	G28D	missense_variant	.	N/A	D
C14orf1	NM_007176.3:c.370G>T	G124W	missense_variant	.	P	D
C17orf74	NM_175734.4:c.731C>A	P244H	missense_variant	.	P	D
C2orf54	NM_001085437.2:c.684del	L228X	frameshift_variant	.	.	.
C5orf15	NM_020199.2:c.465G>T	W155C	missense_variant	.	P	D
CACNA1C	NM_001129843.1:c.4074G>T	Q1358H	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
CASP5	NM_001136109.1:c.118G>T	E40	stop_gained	.	.	.
CCDC108	NM_194302.3:c.3190C>A	L1064M	missense_variant	.	P	D
CDH6	NM_004932.3:c.524-1G>A	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
CDR1	NM_004065.2:c.612G>T	K204N	missense_variant	.	P	D
CFAP46	NM_001200049.2:c.1751T>A	L584Q	missense_variant	.	P	D
CHIT1	NM_001270509.1:c.94G>T	A32S	missense_variant	.	.	.
CNGA1	NM_001142564.1:c.222G>A	M74I	missense_variant	.	P	D
COL3A1	NM_000090.3:c.809G>C	G270A	missense_variant	.	N/A	D
CSAG1	NM_153478.2:c.20G>T	C7F	missense_variant	.	P	D
CTNNA3	NM_001291133.1:c.965G>A	G322E	missense_variant	.	.	.
CUX1	NM_181552.3:c.2627C>T	S876L	missense_variant	.	N/A	D
CXCL12	NM_001277990.1:c.245C>A	P82H	missense_variant	.	N/A	.
CYB561	NM_001017917.1:c.542A>T	E181V	missense_variant	.	P	D
DCAF12L1	NM_178470.4:c.1148T>A	L383Q	missense_variant	.	P	D
DCAF12L1	NM_178470.4:c.637C>A	R213S	missense_variant	.	P	D
DCHS1	NM_003737.3:c.560C>A	A187D	missense_variant	.	P	D
DNAH5	NM_001369.2:c.10376A>T	D3459V	missense_variant	.	P	D
DNAH9	NM_001372.3:c.6844G>T	A2282S	missense_variant	.	P	D
FAM193A	NM_001256666.1:c.1061C>T	S354L	missense_variant	.	P	D
FBXL7	NM_001278317.1:c.936C>A	H312Q	missense_variant	.	P	D
FBXO44	NM_033182.5:c.379G>T	V127F	missense_variant	.	P	D
FCRL3	NM_001320333.1:c.1330G>T	E444	stop_gained	.	.	.
FNBP4	NM_001318339.1:c.957G>T	E319D	missense_variant	.	.	.
FNDC1	NM_032532.2:c.5169C>A	N1723K	missense_variant	.	P	D
FRG2	NM_001286820.1:c.542G>T	R181L	missense_variant	.	P	D
GALNT5	NM_014568.1:c.2065G>T	D689Y	missense_variant	COSM5911648	P	D
GGNBP2	NM_024835.4:c.1560G>T	W520C	missense_variant	.	P	D
GRID2	NM_001510.3:c.1547G>T	R516I	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
GRIN2B	NM_000834.3:c.99del	P33X	frameshift_variant	COSM1360383	.	.
GUCA1A	NM_001319061.1:c.298G>T	D100Y	missense_variant	.	P	D
HECTD4	NM_001109662.3:c.4296G>T	Q1432H	missense_variant	.	P	D
HHIPL1	NM_001127258.1:c.1315T>A	W439R	missense_variant	.	P	D
HIVEP2	NM_006734.3:c.2757G>T	Q919H	missense_variant	.	P	D
HMCES	NM_001006109.1:c.363A>T	L121F	missense_variant	.	P	D
IGF2	NM_001127598.2:c.1A>G	M1V	start_lost	.	P	D

JAG2	NM_145159.2:c.901G>C	G301R	missense_variant	.	P	D
KIAA1804	NM_032435.2:c.1343G>T	R448L	missense_variant	.	P	D
KRAS	NM_004985.4:c.34G>T	G12C	missense_variant	COSM517, COSM1152506, COSM516, COSM1140136, COSM518, COSM1157797	P	D
LPA	NM_005577.2:c.3717C>A	Y1239	stop_gained	.	.	.
LRRN2	NM_006338.2:c.944T>A	L315Q	missense_variant	.	P	D
MAP1B	NM_001324255.1:c.128A>G	Q43R	missense_variant	.	.	.
MAST1	NM_014975.2:c.2372C>T	P791L	missense_variant	.	P	D
MROH2B	NM_173489.4:c.2400C>A	S800R	missense_variant	.	P	D
MUC2	NM_002457.3:c.806C>A	A269D	missense_variant	.	.	.
MYO10	NM_012334.2:c.3497G>T	R1166L	missense_variant	.	P	D
MYO1C	NM_033375.4:c.2898G>T	E966D	missense_variant	.	P	D
NCAPH	NM_015341.4:c.1673C>T	T558I	missense_variant	.	P	D
NDRG4	NM_001242834.1:c.571-1G>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
NRXN2	NM_138732.2:c.2297-2A>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
OGT	NM_181672.2:c.547G>A	A183T	missense_variant	.	P	D
P2RX3	NM_002559.3:c.173C>A	S58Y	missense_variant	.	P	D
PADI3	NM_016233.2:c.1017G>C	Q339H	missense_variant	.	P	D
PCDHB3	NM_018937.4:c.2253C>A	Y751	stop_gained	COSM84931	.	.
PDZK1IP1	NM_005764.3:c.220G>T	G74	stop_gained	.	.	.
PHF8	NM_001184896.1:c.2188C>A	L730M	missense_variant	.	P	D
PHF8	NM_001184898.1:c.1321G>T	E441	stop_gained&splice_region_variant	COSM4526929, COSM4526928, COSM4526930, COSM4526931	.	.
PHIP	NM_017934.5:c.2030C>A	S677Y	missense_variant	.	P	D
PIK3CG	NM_002649.3:c.533G>T	R178L	missense_variant	COSM94992, COSM4187460	P	D
PRELID2	NM_138492.5:c.47-1G>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
PRR32	NM_001122716.1:c.526C>A	P176T	missense_variant	.	P	D
PRRC2B	NM_013318.3:c.1547G>T	R516L	missense_variant	.	P	D
PRSS38	NM_183062.2:c.151del	C51X	frameshift_variant&splice_region_variant	.	.	.
PTRF	NM_012232.5:c.421A>G	N141D	missense_variant	.	P	D
RASGRF1	NM_002891.4:c.3625del	E1209X	frameshift_variant	.	.	.
RBBP8NL	NM_080833.2:c.523G>T	G175C	missense_variant	.	P	D
RBFOX1	NM_001142333.1:c.454G>T	E152	stop_gained	.	.	.
RBM10	NM_001204468.1:c.1096+1G>T	.	splice_donor_variant	.	.	.
RBMXL3	NM_001145346.1:c.350G>T	S117I	missense_variant	.	P	D
RPTOR	NM_020761.2:c.2623G>T	G875W	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
SDHAF3	NM_020186.2:c.43C>A	R15S	missense_variant	.	P	D
SH3TC2	NM_024577.3:c.3247G>T	A1083S	missense_variant	COSM3211290	P	D
SLC6A1	NM_003042.3:c.369G>T	K123N	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
SLC7A14	NM_020949.2:c.304G>T	G102C	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
SNTG1	NM_018967.4:c.1421C>A	A474D	missense_variant	.	P	D
SPATA13	NM_153023.3:c.1549G>T	D517Y	missense_variant	.	P	D



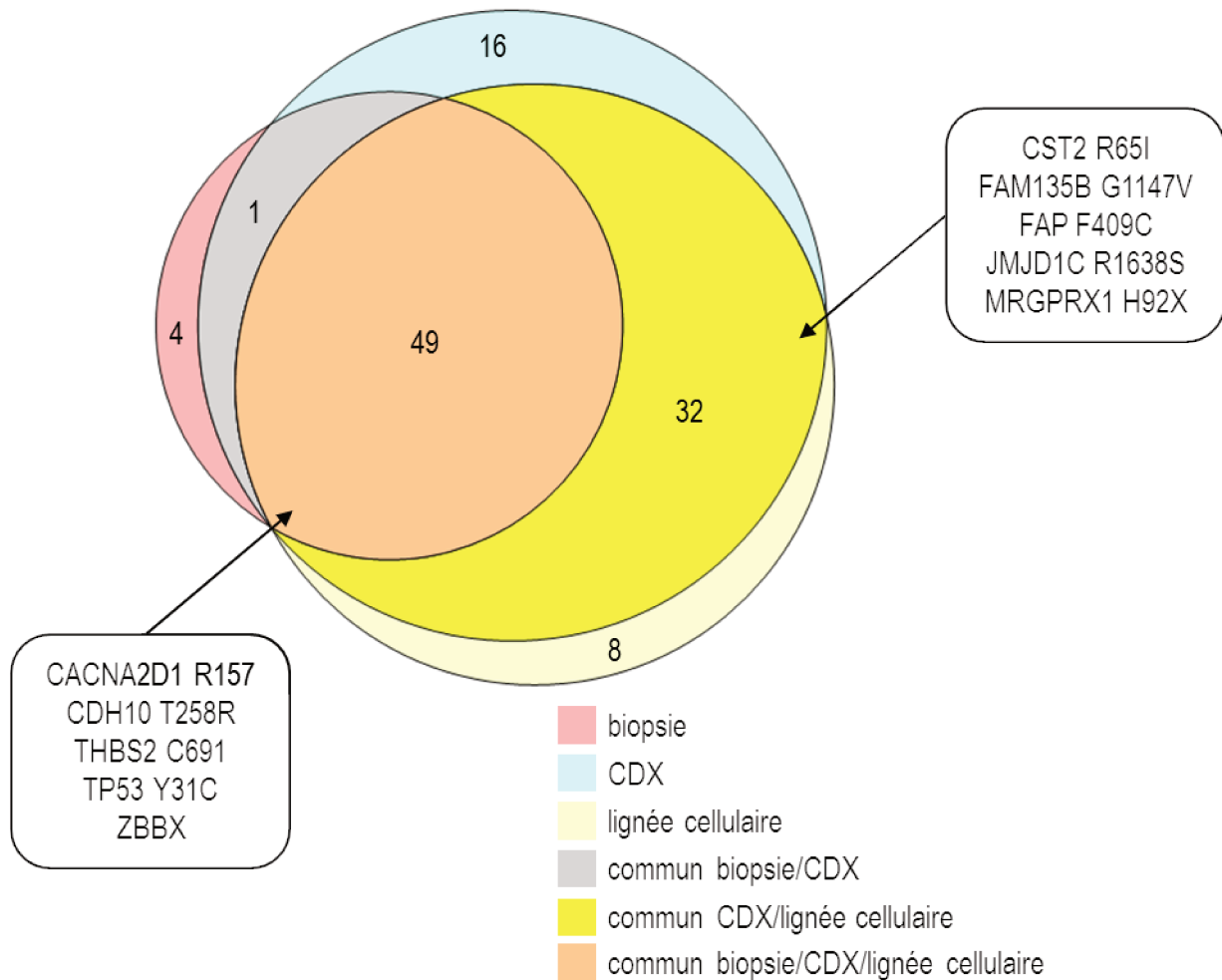
SPTA1	NM_003126.2:c.6783G>T	Q2261H	missense_variant	.	P	D
SPTBN2	NM_006946.2:c.175C>A	Q59K	missense_variant	.	P	D
SRRT	NM_001128854.1:c.1742del	G580X	frameshift_variant	.	.	.
SYT1	NM_005639.2:c.1222C>A	L408M	missense_variant	.	P	D
TNIP1	NM_001258456.1:c.700G>T	D234Y	missense_variant	.	P	D
TPRA1	NM_001142646.2:c.130C>T	R44W	missense_variant	.	P	D
TRIML2	NM_173553.2:c.1060G>T	V354F	missense_variant	.	P	D
TTC6	NM_001310135.1:c.1204C>T	Q402	stop_gained	.	.	.
USH2A	NM_206933.2:c.10993G>T	G3665W	missense_variant	.	P	D
VWF	NM_000552.4:c.5671G>T	D1891Y	missense_variant	.	P	D
WIPF1	NM_001077269.1:c.290C>T	P97L	missense_variant	.	P	D
WLS	NM_024911.6:c.439G>T	E147	stop_gained	.	.	.
WNT10A	NM_025216.2:c.41C>A	P14H	missense_variant	.	N/A	D
XK	NM_021083.2:c.648C>G	S216R	missense_variant	.	P	D
XKR7	NM_001011718.1:c.824G>A	W275	stop_gained	.	.	.
ZAN	NM_003386.2:c.2894C>A	S965Y	missense_variant	.	P	D
ZBTB34	NM_001099270.1:c.187T>G	L63V	missense_variant	.	P	D
ZFHX4	NM_024721.4:c.7415C>A	S2472Y	missense_variant	.	P	D
ZIC4	NM_032153.5:c.769G>T	V257L	missense_variant	.	P	D
ZNF318	NM_014345.2:c.1897C>T	R633C	missense_variant	.	P	D
ZNF80	NM_007136.3:c.4A>T	S2C	missense_variant	.	P	D
ZNF831	NM_178457.2:c.50C>A	P17Q	missense_variant	.	P	D

**Tableau 22 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL2.**

Les mutations spécifiques à la biopsie figurent en rose, les mutations spécifiques au CDX figurent en bleu et les mutations communes à la biopsie et au CDX figurent en gris.

Pour le modèle GR-CDXL3, nous avons pu comparer les résultats de la biopsie tumorale, réalisée au moment du diagnostic huit mois avant le prélèvement sanguin et la xénogreffe des CTC, du CDX et de la lignée cellulaire. Les nombres de mutations détectées dans la biopsie tumorale, le CDX et la lignée cellulaire sont respectivement de 54, 98 et 89. Parmi les 54 mutations détectées dans la biopsie tumorale, 49 sont communes au CDX et à la lignée cellulaire, une est uniquement partagée avec le CDX et les quatre restantes sont spécifiques à la biopsie (**Figure 41**). Parmi les 49 mutations partagées par la biopsie, le CDX et la lignée cellulaire, cinq sont des mutations COSMIC dans les gènes *CACNA2D1*, *CDH10*, *THBS2*, *TP53* et *ZBBX*. D'autre part, 32 mutations détectées dans le CDX sont partagées avec la lignée cellulaire et parmi les 32 mutations, cinq sont des mutations COSMIC dans les gènes *CST2*, *FAM135B*, *FAP*, *JMJD1C* et *MRGPRX1*. Enfin, 16 mutations sont spécifiques au CDX. L'analyse des CTC permettra de faire le lien entre les mutations dans la biopsie tumorale, le CDX et la lignée cellulaire. L'ensemble des mutations sont présentées dans le **Tableau 23**. Le CDX et la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL3 reflètent bien l'hétérogénéité moléculaire de la biopsie tumorale du

patient puisque 91 % des mutations de la biopsie tumorale sont retrouvées dans le CDX et la lignée cellulaire.



**Figure 45 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL3.**

Le diagramme de Venn de la biopsie, du CDX et de la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL3 montre la présence de 49 mutations communes aux trois échantillons. Une mutation de la biopsie est uniquement retrouvée dans le CDX, 32 mutations sont communes entre le CDX et la lignée cellulaire. Quatre mutations sont spécifiques de la biopsie, 16 sont spécifiques du CDX et huit sont spécifiques de la lignée cellulaire. Les encadrés montrent les mutations COSMIC de chaque intersection.

Gene	HGVSc	Protein variation	Consequences	COSMIC/HGMD	Polyphen2	SIFT
ADAMTS9	NM_182920.1:c.2067C>A	F689L	missense_variant	.	P	D
ARHGAP17	NM_018054.5:c.1886C>A	P629Q	missense_variant	.	P	D
ASPM	NM_018136.4:c.2995G>T	A999S	missense_variant	.	P	D
C2CD3	NM_015531.5:c.346G>C	E116Q	missense_variant	.	P	D
CACNA2D1	NM_000722.3:c.469C>T	R157	stop_gained	COSM219445, COSM4416432	.	.
CDH10	NM_001317224.1:c.773C>G	T258R	missense_variant	COSM4388281	.	.
CDH9	NM_016279.3:c.1937T>A	I646K	missense_variant	.	P	D
CEP131	NM_001319229.1:c.2609G>T	R870L	missense_variant	.	P	D
CFAP221	NM_001271049.1:c.2019T>A	Y673	stop_gained	.	.	.
CNTN4	NM_175613.2:c.593C>A	S198	stop_gained	.	.	.
COL21A1	NM_001318752.1:c.95G>T	R32L	missense_variant	.	P	D
COL5A3	NM_015719.3:c.3505G>A	G1169S	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
CREBBP	NM_004380.2:c.4434A>T	E1478D	missense_variant	.	N/A	D
CSMD2	NM_052896.4:c.9559del	P3187X	frameshift_variant&splice_region_variant	.	.	.
CSMD3	NM_198124.1:c.9884G>T	G3295V	missense_variant	.	P	D
DDB1	NM_001923.4:c.3104G>A	G1035D	missense_variant	.	P	D
DDX49	NM_019070.4:c.466C>T	R156W	missense_variant	.	P	D
FCRLB	NM_001320241.1:c.32-2A>G	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
FUT3	NM_001097641.1:c.716C>G	S239C	missense_variant	.	P	D
GRM3	NM_000840.2:c.971A>T	E324V	missense_variant	.	P	D
HSF5	NM_001080439.2:c.136T>C	F46L	missense_variant	.	P	D
HTATIP2	NM_001098520.1:c.377T>A	L126Q	missense_variant	.	P	D
KCNMA1	NM_001322839.1:c.542C>A	P181H	missense_variant	.	.	.
MRPL47	NM_020409.2:c.340A>T	T114S	missense_variant	.	P	D
MYCBP2	NM_015057.4:c.11137G>T	D3713Y	missense_variant	.	P	.
MYH7	NM_000257.3:c.1748C>T	A583V	missense_variant	.	P	D
MYOF	NM_013451.3:c.782_783dupTC	261-262X	frameshift_variant	.	.	.
NDFIP2	NM_019080.2:c.841-2A>C	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
NNT	NM_182977.2:c.2567A>T	N856I	missense_variant	.	P	D
OLFM4	NM_006418.4:c.1394G>A	G465D	missense_variant	.	P	D
OR6B3	NM_173351.1:c.571G>T	D191Y	missense_variant	.	P	D
PAPPA2	NM_020318.2:c.3637G>T	E1213	stop_gained	.	.	.
PDE1A	NM_005019.4:c.566T>C	L189P	missense_variant	.	P	D
PPEF1	NM_152226.1:c.344C>T	P115L	missense_variant	.	P	D
PREX1	NM_020820.3:c.4240A>T	K1414	stop_gained	.	.	.
PUF60	NM_001271096.1:c.677G>T	S226I	missense_variant	.	.	.
RP1	NM_006269.1:c.3542C>G	A1181G	missense_variant	.	P	D
RUFY3	NM_001291994.1:c.313G>T	A105S	missense_variant	.	.	.
SCN1A	NM_001202435.1:c.4798T>G	F1600V	missense_variant	.	P	D
SCUBE1	NM_173050.3:c.458A>T	Q153L	missense_variant	.	P	D
TAS2R38	NM_176817.4:c.165T>A	C55	stop_gained	.	.	.
THBS2	NM_003247.3:c.2073C>A	C691	stop_gained	COSM1076110	.	.
TMEM55B	NM_144568.3:c.184G>T	G62W	missense_variant	.	P	D

TMEM62	NM_024956.3:c.1381+1G>T	.	splice_donor_variant	.	.	.
TP53	NM_001126115.1:c.92A>G	Y31C	missense_variant	COSM308334, COSM1649381, COSM129854, COSM129855, COSM10808, COSM308333, COSM45025, COSM129853, COSM308331, COSM129852, COSM308332, COSM3388214	P	D
TRMT1L	NM_030934.4:c.1470G>A	W490	stop_gained	.	.	.
UBP1	NM_001128160.1:c.431A>T	D144V	missense_variant	.	P	D
ZBBX	NM_001199202.1:c.441+1G>A	.	splice_donor_variant	COSM5863869, COSM359859, COSM359858, COSM5863870	.	.
ZNF107	NM_001013746.2:c.413G>A	G138E	missense_variant	.	P	D
MECOM	NM_004991.3:c.59A>T	N20I	missense_variant	.	.	.
ALDH1A3	NM_000693.3:c.701C>T	P234L	missense_variant	.	P	D
ATP10A	NM_024490.3:c.3945dupC	1315-1316X	frameshift_variant	.	.	.
CCDC136	NM_022742.4:c.1897G>C	D633H	missense_variant	.	P	D
COL3A1	NM_000090.3:c.1780G>A	G594R	missense_variant	.	N/A	D
CPED1	NM_001105533.1:c.1919A>T	N640I	missense_variant	.	P	D
CST2	NM_001322.2:c.194G>T	R65I	missense_variant	COSM5391706	P	D
DIO1	NM_000792.6:c.676T>C	Y226H	missense_variant	.	.	.
FAM135B	NM_015912.3:c.3440G>T	G1147V	missense_variant	COSM5873960, COSM5873961	P	D
FAP	NM_004460.3:c.1226T>G	F409C	missense_variant&splice_region_variant	COSM1691221	P	D
GALNTL6	NM_001034845.2:c.405T>A	Y135	stop_gained	.	.	.
GATSL2	NM_001145064.2:c.340G>T	V114L	missense_variant	.	P	D
GSPT1	NM_001130006.1:c.1745G>A	R582H	missense_variant	.	P	D
HERC2	NM_004667.5:c.12053G>A	G4018D	missense_variant	.	P	D
HMCN1	NM_031935.2:c.8260G>T	D2754Y	missense_variant	.	P	D
HSPG2	NM_005529.6:c.2736C>G	H912Q	missense_variant	.	P	D
JMJD1C	NM_001322252.1:c.4914G>T	R1638S	missense_variant	COSM5955265, COSM5955264	.	.
KIF20B	NM_001284259.1:c.3055G>C	D1019H	missense_variant	.	P	D
KLHL32	NM_001323264.1:c.1000A>T	N334Y	missense_variant	.	.	.
LOC44115 5	NM_001271675.1:c.297A>T	K99N	missense_variant	.	.	.
MDGA2	NM_001113498.2:c.565T>A	Y189N	missense_variant	.	P	D
MRGPRX1	NM_147199.3:c.274del	H92X	frameshift_variant	COSM3446106, COSM5218188	.	.
MUC19	NM_173600.2:c.19916C>T	S6639F	missense_variant	.	.	.
NAALADL2	NM_207015.2:c.1642C>G	L548V	missense_variant	.	P	D
NLK	NM_016231.4:c.770C>A	S257	stop_gained	.	.	.
NME1	NM_000269.2:c.409_410ins	E137ATCAS	stop_gained&protein_altering_variant	.	.	.

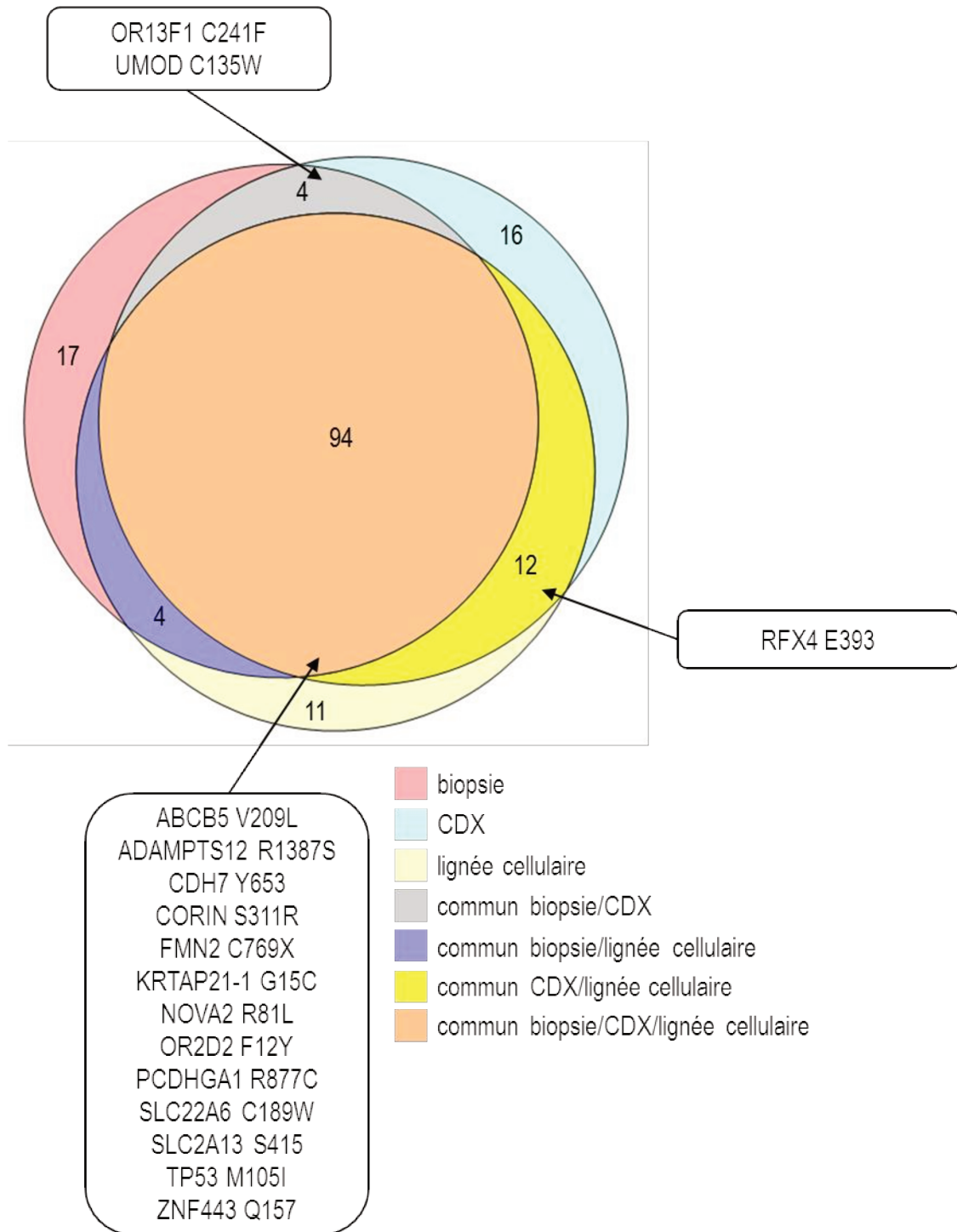
WAQSIL						
NOV	NM_002514.3:c.704G>A	C235Y	missense_variant	.	P	D
NPAP1	NM_018958.2:c.1841del	H613X	frameshift_variant	.	.	.
OR1L8	NM_001004454.1:c.38T>A	F13Y	missense_variant	.	P	D
SPHKAP	NM_030623.3:c.1505G>C	C502S	missense_variant	.	P	D
STYK1	NM_018423.2:c.447A>C	L149F	missense_variant	.	P	D
TRMT61A	NM_152307.2:c.271G>A	D91N	missense_variant	.	P	D
ZNF471	NM_001321768.1:c.613C>T	Q205	stop_gained	.	.	.
ABCA12	NM_015657.3:c.2825A>G	D942G	missense_variant	.	P	D
COL11A1	NM_001854.3:c.133C>A	L45I	missense_variant	.	P	D
SLC8A2	NM_015063.2:c.1585G>T	D529Y	missense_variant	.	P	D
TTN	NM_133379.4:c.238C>A	L80M	missense_variant	.	P	D
CTF1	NM_001330.3:c.512A>T	K171M	missense_variant	.	P	D
CTNNA2	NM_004389.3:c.1345C>T	R449W	missense_variant	COSM4675372, COSM1409702	P	D
DSEL	NM_032160.2:c.1274G>A	W425	stop_gained	COSM709062	.	.
FUT9	NM_006581.3:c.761C>T	T254M	missense_variant	.	P	D
GANAB	NM_198335.3:c.538C>G	H180D	missense_variant	.	P	D
GOLGA6L6	NM_001145004.2:c.602C>A	T201K	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
GYS1	NM_002103.4:c.652G>A	V218M	missense_variant	COSM5570959	P	D
KIF11	NM_004523.3:c.793G>A	D265N	missense_variant	.	P	D
LBX1	NM_006562.4:c.511dupA	T171NX	frameshift_variant	.	.	.
MSL3	NM_078628.1:c.949C>G	P317A	missense_variant	COSM4916504, COSM4916503, COSM4916502	P	D
MSTO1	NM_001256532.1:c.754G>T	E252	stop_gained	.	.	.
RABL6	NM_024718.4:c.1183C>T	P395S	missense_variant	.	P	D
SLC43A1	NM_003627.5:c.198G>T	W66C	missense_variant	.	P	D
TAF3	NM_031923.3:c.2291G>C	R764P	missense_variant	.	P	D
TOR1AIP2	NM_145034.4:c.832C>T	R278W	missense_variant	COSM1336730	P	D
TTN	NM_001256850.1:c.22081del	D7361X	frameshift_variant	.	.	.

**Tableau 23 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL3.**

Les mutations communes à la biopsie, au CDX et à la lignée cellulaire figurent en orange, les mutations communes au CDX et à la lignée cellulaire figurent en jaune, les mutations spécifiques à la biopsie figurent en rose, les mutations spécifiques au CDX figurent en turquoise, les mutations communes à la biopsie et au CDX figurent en gris.

Pour le modèle GR-CDXL4, la comparaison de deux biopsies tumorales, la première réalisée au moment du diagnostic sept mois avant le prélèvement sanguin et la greffe des CTC et la deuxième au moment du prélèvement sanguin, du CDX et de la lignée cellulaire a été possible. Actuellement pour les biopsies, uniquement les résultats de la biopsie réalisée au moment de la xéno greffe des CTC chez la souris sont disponibles. Individuellement les nombre de mutations détectées dans la biopsie tumorale, le CDX et la lignée cellulaire sont respectivement de 119, 126 et 121. Parmi les 119 mutations

détectées dans la biopsie tumorale, 94 sont communes au CDX et à la lignée cellulaire, quatre sont uniquement partagées avec le CDX, quatre sont uniquement partagées avec la lignée cellulaire et les 17 restantes sont spécifiques à la biopsie (**Figure 46**). Parmi les 94 mutations partagées par la biopsie, le CDX et la lignée cellulaire, 13 sont des mutations COSMIC dans les gènes *ABCB5*, *ADAMPTS12*, *CDH7*, *CORIN*, *FMN2*, *KRTAP21-1*, *NOVA2*, *OR2D2*, *PCDHGA1*, *SLC22A6*, *SLC2A13*, *TP53* et *ZNF443*. Parmi les quatre mutations partagées par la biopsie et le CDX, deux sont des mutations COSMIC dans les gènes *OR13F1* et *UMOD*. D'autre part, 12 mutations sont communes uniquement entre le CDX et la lignée cellulaire et parmi celles-ci une mutation COSMIC dans le gène *RFX4*. L'ensemble des mutations sont présentées dans le **Tableau 24**. Le CDX et la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL4 reflètent la biopsie tumorale du patient réalisée au moment de la xénogreffe des CTC puisque 79 % des mutations de la biopsie tumorale sont retrouvées dans le CDX et la lignée cellulaire.



**Figure 46 : Diagramme de Venn des mutations détectées par séquençage total de l'exome dans le modèle GR-CDXL4.**

Le diagramme de Venn de la biopsie au moment de la xéno greffe, du CDX et de la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL4 montre la présence de 94 mutations communes aux trois échantillons. Quatre mutations de la biopsie sont uniquement retrouvées dans le CDX, 12 mutations sont communes entre le CDX et la lignée cellulaire, quatre mutations sont communes entre la biopsie et la lignée cellulaire. 17 mutations sont spécifiques de la biopsie, 16 sont spécifiques du CDX et 11 sont spécifiques de la lignée cellulaire. Les encadrés montrent les mutations COSMIC de chaque intersection.



Gene	HGVSc	Protein variation	Consequences	COSMIC/HGMD	Polyphen2	SIFT
ABCB5	NM_001163941.1:c.625G>T	V209L	missense_variant	COSM5872423	P	D
ABCG5	NM_022436.2:c.31G>T	G11W	missense_variant	.	P	D
ACLY	NM_001303274.1:c.1078del	E360X	frameshift_variant	.	.	.
ACTB	NM_001101.3:c.803-1G>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
ADAM22	NM_001324419.1:c.654A>C	R218S	missense_variant	.	.	.
ADAMTS1 2	NM_030955.2:c.4159C>A	R1387S	missense_variant	COSM278637	P	D
ADAMTS4	NM_001320336.1:c.221G>T	G74V	missense_variant	.	.	.
ADCY4	NM_001198568.1:c.2657A>G	Y886C	missense_variant	.	P	D
ALDH16A1	NM_153329.3:c.868G>T	A290S	missense_variant	.	P	D
ANTXR2	NM_058172.5:c.378+2T>G	.	splice_donor_variant	.	.	.
ARHGAP4 2	NM_152432.2:c.1241G>C	G414A	missense_variant	.	P	D
C4BPA	NM_000715.3:c.1013C>A	P338H	missense_variant	.	P	D
C6orf58	NM_001010905.2:c.165G>T	W55C	missense_variant	.	P	D
CBL	NM_005188.3:c.1563G>T	K521N	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
CDH7	NM_033646.2:c.1959C>A	Y653	stop_gained	COSM5665003, COSM989610, COSM5665004, COSM989611	.	.
CEPT1	NM_001007794.1:c.815G>C	G272A	missense_variant	.	P	D
CFAP46	NM_001200049.2:c.7931G>C	G2644A	missense_variant	.	P	D
CLEC4A	NM_194448.2:c.477G>T	E159D	missense_variant	.	P	D
COL18A1	NM_030582.3:c.1172C>A	A391E	missense_variant	.	N/A	D
COL22A1	NM_152888.2:c.3154C>A	P1052T	missense_variant	.	N/A	D
CORIN	NM_001278585.1:c.933C>G	S311R	missense_variant	COSM1238582	P	D
CSMD1	NM_033225.5:c.152G>T	G51V	missense_variant	.	P	D
DCHS2	NM_001142552.1:c.3416C>T	T1139M	missense_variant	.	P	D
DDX39B	NM_004640.6:c.198G>T	E66D	missense_variant	.	P	D
DIXDC1	NM_033425.4:c.397G>T	D133Y	missense_variant	.	P	D
DLC1	NM_001164271.1:c.2269G>C	A757P	missense_variant	.	P	D
DNAH17	NM_173628.3:c.6485T>C	V2162A	missense_variant	.	P	D
DOCK2	NM_004946.2:c.2976G>A	M992I	missense_variant	.	P	D
EPHA6	NM_001080448.2:c.1480G>A	V494M	missense_variant	.	P	D
FAT4	NM_024582.4:c.9786G>C	Q3262H	missense_variant	.	P	D
FLG	NM_002016.1:c.5266G>T	G1756W	missense_variant	.	P	D
FMN2	NM_020066.4:c.2312del	C769X	frameshift_variant	COSM1340560, COSM2049371	.	.
FRMPD4	NM_014728.3:c.2561C>A	P854H	missense_variant	.	P	D
IL17RD	NM_017563.4:c.394G>T	D132Y	missense_variant	.	P	D
KCNN1	NM_002248.4:c.344T>A	M115K	missense_variant	.	P	D
KIF1A	NM_001320705.1:c.3935C>A	S1312Y	missense_variant	.	.	.
KIF2B	NM_032559.4:c.8G>T	S3I	missense_variant	.	P	D
KRT77	NM_175078.2:c.545T>G	V182G	missense_variant&splice_region_variant	.	P	D
KRTAP21- 1	NM_181619.1:c.43G>T	G15C	missense_variant	COSM32789	N/A	D
LGI1	NM_005097.3:c.1089C>A	N363K	missense_variant	.	P	D
LPA	NM_005577.2:c.2566C>A	H856N	missense_variant	.	P	D
MATN3	NM_002381.4:c.741del	T247X	frameshift_variant	.	.	.
MED26	NM_004831.3:c.418C>T	R140W	missense_variant	.	P	D
MUC2	NM_002457.3:c.11239C>A	P3747T	missense_variant	.	.	.
NBEAL1	NM_001114132.1:c.1524dupT	A508AX	frameshift_variant	.	.	.



NCKAP1L	NM_005337.4:c.3130C>A	L1044I	missense_variant	.	P	D
NCOA3	NM_001174087.1:c.73C>T	P25S	missense_variant	.	.	.
NDUFAF5	NM_024120.4:c.386C>G	S129	stop_gained	.	.	.
NECAP2	NM_001145277.1:c.298+1del	G100X	frameshift_variant&splice_region_variant	.	.	.
NOVA2	NM_002516.3:c.242G>T	R81L	missense_variant	COSM4079495	N/A	D
OR2D2	NM_003700.1:c.35T>A	F12Y	missense_variant	COSM1703528	P	D
OR2G3	NM_001001914.1:c.811G>T	G271W	missense_variant	.	P	D
OR52M1	NM_001004137.1:c.119C>A	A40D	missense_variant	.	P	D
OR7G2	NM_001005193.1:c.299C>A	P100Q	missense_variant	.	P	D
OTOGL	NM_173591.3:c.1952del	V650X	frameshift_variant	.	.	.
OVOS2	XM_017020288.1:c.509C>A	S170	stop_gained	.	.	.
PACS2	NM_001243127.2:c.1513G>T	G505C	missense_variant	.	P	D
PAX5	NM_001280554.1:c.971-1G>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
PAXIP1	NM_007349.3:c.1044G>T	Q348H	missense_variant	.	P	D
PCCA	NM_000282.3:c.1210-2A>T	.	splice_acceptor_variant	.	.	.
PCDHA2	NM_031496.1:c.1628C>A	P543Q	missense_variant	.	P	D
				COSM3208889,		
				COSM3208890,		
				COSM3208875,		
				COSM3208896,		
				COSM3208876,		
				COSM3208882,		
				COSM3208895,		
				COSM3208873,		
				COSM3208878,		
				COSM3208883,		
				COSM3208900,		
				COSM3208880,		
				COSM3208888,		
				COSM3208887,		
				COSM3208892,		
PCDHGA1	NM_018912.2:c.2629C>T	R877C	missense_variant	COSM3208885,	P	D
				COSM3208891,		
				COSM3208886,		
				COSM3208872,		
				COSM3208879,		
				COSM3208881,		
				COSM3208898,		
				COSM3208893,		
				COSM3208897,		
				COSM3208899,		
				COSM3208894,		
				COSM3208901,		
				COSM3208884,		
				COSM3208874,		
				COSM3208877		
PCDHGB6	NM_032100.1:c.1873G>T	E625	stop_gained	.	.	.
PGM5	NM_021965.3:c.1459G>T	G487C	missense_variant	.	P	D
PIGP	NM_153681.2:c.422G>T	S141I	missense_variant	.	P	D
PNLIPRP2	NM_005396.4:c.167dupG	R56RX	frameshift_variant	.	.	.
RASGEF1 B	NM_001300736.1:c.533G>T	R178M	missense_variant	.	P	D
RB1	NM_000321.2:c.1615G>T	E539	stop_gained	.	.	.
RXRA	NM_001291920.1:c.619A>G	R207G	missense_variant	.	.	.
SCAF4	NM_001145444.1:c.3137_314	RD1046-	frameshift_variant	.	.	.

	Odel	1047X				
SCGB3A1	NM_052863.2:c.165C>A	N55K	missense_variant	.	P	D
SETX	NM_015046.5:c.1352G>T	C451F	missense_variant	.	P	D
SH2B3	NM_005475.2:c.32C>G	P11R	missense_variant	.	N/A	D
SH2D4A	NM_001174160.1:c.1019A>G	Y340C	missense_variant	.	P	D
SLC22A6	NM_153277.2:c.567C>G	C189W	missense_variant	COSM1355507	P	D
SLC29A2	NM_001532.2:c.805G>T	E269	stop_gained	.	.	.
SLC2A13	NM_052885.3:c.1244C>G	S415	stop_gained	COSM1676848, COSM1676849	.	.
SLC35E3	NM_018656.2:c.769G>T	G257	stop_gained	.	.	.
SLC45A2	NM_001297417.2:c.368G>C	G123A	missense_variant	.	P	D
SLC4A7	NM_001321104.1:c.3328G>T	A1110S	missense_variant	.	P	D
SP140L	NM_138402.4:c.1648A>T	K550	stop_gained	.	.	.
SSPO	NM_198455.2:c.2754C>G	C918W	missense_variant	.	.	.
STAB2	NM_017564.9:c.4877G>T	G1626V	missense_variant	.	P	D
STK17A	NM_004760.2:c.328G>C	A110P	missense_variant	.	P	D
SYT10	NM_198992.3:c.1208T>C	V403A	missense_variant	.	P	D
TAS2R1	NM_019599.2:c.493A>G	T165A	missense_variant	.	P	D
				COSM301404, COSM1640835, COSM44415, COSM301402, COSM3378444, COSM99646, COSM10834, COSM1189384, COSM1189385, COSM99648, COSM1189386, COSM3378348, COSM301403, COSM1640834, COSM11063, COSM99647		
TP53	NM_001126115.1:c.315G>A	M105I	missense_variant		P	D
TTN	NM_001267550.2:c.35716C>A	P11906T	missense_variant&splice_region_variant	.	.	.
TTN	NM_133379.4:c.11894G>C	C3965S	missense_variant	.	P	D
TUSC2	NM_007275.2:c.4G>T	G2C	missense_variant	.	P	D
WDR64	NM_144625.4:c.3016G>C	G1006R	missense_variant	.	P	D
ZNF443	NM_005815.4:c.469C>T	Q157	stop_gained	COSM4835751	.	.
ZNF521	NM_015461.2:c.2198C>G	S733	stop_gained	.	.	.
ZNF649	NM_023074.3:c.550G>T	G184W	missense_variant	.	P	D
IFNA7	NM_021057.2:c.460C>A	L154I	missense_variant	.	P	D
IL1RL1	NM_003856.3:c.20C>A	A7E	missense_variant	.	P	D
OR13F1	NM_001004485.1:c.722G>T	C241F	missense_variant	COSM4888512	P	D
UMOD	NM_001008389.2:c.405C>G	C135W	missense_variant	COSM3690814, COSM3690815	P	D
ATP1A1	NM_001160234.1:c.1262C>G	S421C	missense_variant	.	P	D
NF1	NM_001042492.2:c.7814del	L2605X	frameshift_variant	.	.	.
ORMDL3	NM_139280.3:c.46del	V16X	frameshift_variant	.	.	.
TENM4	NM_001098816.2:c.1035C>G	S345R	missense_variant	.	P	D
ACVR1	NM_001105.4:c.1383G>T	W461C	missense_variant	.	P	D
BEND6	NM_152731.2:c.334G>T	V112F	missense_variant	.	P	D
CAPN9	NM_006615.2:c.512C>G	A171G	missense_variant	.	P	D
DKK1	NM_012242.2:c.268G>T	E90	stop_gained	.	.	.
E2F4	NM_001950.3:c.451G>T	G151	stop_gained&splice_region_variant	.	.	.

HLA-DPB1	NM_002121.5:c.476T>G	F159C	missense_variant	.	P	D
KRTAP5-7	NM_001012503.1:c.44G>T	G15V	missense_variant	.	N/A	.
OR11H2	NM_001197287.1:c.406G>A	D136N	missense_variant	.	P	D
RFX4	NM_032491.5:c.1177G>T	E393	stop_gained	COSM5727431, COSM5727432, COSM5727430	.	.
TNS3	NM_022748.11:c.2668G>T	E890	stop_gained	.	.	.
VWA1	NM_022834.4:c.760G>T	G254W	missense_variant	.	P	D
ZXDC	NM_001040653.3:c.749C>T	T250I	missense_variant	.	P	D
ARIH2OS	NM_001123040.1:c.112G>A	A38T	missense_variant	.	P	D
C17orf77	NM_001302809.1:c.616C>G	P206A	missense_variant	.	P	D
CCDC51	NM_001256964.1:c.67A>T	R23W	missense_variant	.	P	D
CDR1	NM_004065.2:c.250G>T	D84Y	missense_variant	.	P	D
COPE	NM_199444.1:c.427G>T	G143W	missense_variant	.	P	D
FRMPD1	NM_014907.2:c.4472G>C	R1491P	missense_variant	.	P	D
HOXD11	NM_021192.2:c.173T>A	V58E	missense_variant	.	P	D
KAT6B	NM_001256468.1:c.687_730+ 11dupGAAACCAGAAGAACTC CTCTCTTGTGCAGATTGTGG CAGTAGTGGTAAGTTGTGT	K229KKPEEL LSCADCGSS GKLCX	frameshift_variant	.	.	.
LRRTM1	NM_178839.4:c.1382G>A	R461K	missense_variant	.	P	D
NKX2-4	NM_033176.1:c.655C>A	R219S	missense_variant	.	P	D
PHF3	NM_001290259.1:c.5089A>G	R1697G	missense_variant	.	.	.
PTPRC	NM_002838.4:c.1219C>T	Q407	stop_gained	.	.	.
RPS6KA6	NM_014496.4:c.1165A>T	S389C	missense_variant	COSM3406629	P	D
SYCP1	NM_001282541.1:c.2221G>T	E741	stop_gained	.	.	.
TRPM5	NM_014555.3:c.943G>A	V315M	missense_variant	COSM3359138	P	D
TTN	NM_001256850.1:c.38405G>T	G12802V	missense_variant	COSM3895759, COSM3895760, COSM3895758, COSM3895761	N/A	.
ZFYVE1	NM_021260.3:c.767T>A	V256D	missense_variant	.	P	D
ADH1C	NM_000669.4:c.1066del	I356X	frameshift_variant	.	.	.
AFAP1	NM_001134647.1:c.275G>T	G92V	missense_variant	.	P	D
ATP13A5	NM_198505.2:c.265A>G	K89E	missense_variant	.	P	D
CIC	NM_001304815.1:c.6775C>G	L2259V	missense_variant	.	.	.
FOXN1	NM_003593.2:c.1858T>A	F620I	missense_variant	.	P	D
FPR1	NM_001193306.1:c.891C>A	N297K	missense_variant	.	P	D
HIST1H2B A	NM_170610.2:c.353A>G	K118R	missense_variant	.	P	D
KRT78	NM_173352.3:c.1114C>G	Q372E	missense_variant	.	P	D
MUC19	NM_173600.2:c.18060A>T	K6020N	missense_variant	.	.	.
PKD1L2	NM_052892.3:c.3890G>T	C1297F	missense_variant	.	.	.
PTGS1	NM_001271166.1:c.685G>A	E229K	missense_variant&splice_region_variant	.	.	.
SCN4A	NM_000334.4:c.4937C>A	T1646N	missense_variant	.	P	D
SLC10A1	NM_003049.3:c.943+1G>A	.	splice_donor_variant	.	.	.
TTN	NM_001256850.1:c.31554G>T	K10518N	missense_variant	.	N/A	.
ZBBX	NM_001199202.1:c.367G>T	D123Y	missense_variant	.	P	D
ZNF729	NM_001242680.1:c.886G>T	E296	stop_gained	.	.	.

**Tableau 24 : Liste des mutations du modèle GR-CDXL4**

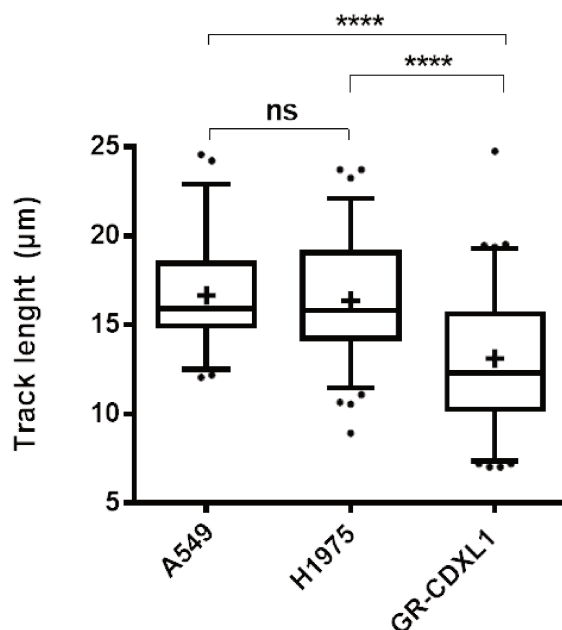
Les mutations communes à la biopsie, au CDX et à la lignée cellulaire figurent en orange, les mutations communes à la biopsie et au CDX figurent en gris, les mutations communes à la biopsie et à la lignée cellulaire

figurent en bleu, les mutations communes au CDX et à la lignée cellulaire figurent en jaune, les mutations spécifiques à la biopsie figurent en rose et les mutations spécifiques au CDX figurent en turquoise.

Globalement, mis à part le modèle GR-CDXL1 pour lequel la biopsie tumorale du patient n'était pas disponible, les CDX des modèles GR-CDXL2, GR-CDXL3 et GR-CDXL4 récapitulent fidèlement les profils mutationnels des biopsies tumorales. Également, les lignées cellulaires établies *in vitro* récapitulent parfaitement les biopsies tumorales dans le cas des modèles GR-CDXL3 et GR-CDXL4. La lignée cellulaire du modèle GR-CDXL1 présente également une forte ressemblance du paysage mutationnel du CDX. Ces quatre modèles de CDX *in vivo* et de lignées cellulaires *in vitro* apparaissent donc comme des outils intéressants pour étudier les caractéristiques biologiques des CTC dotées d'un potentiel tumorigénique et les mécanismes de résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Les résultats du séquençage de l'exome et le profil de CNV de la lignée cellulaire GR-CDXL1 montrent une charge mutationnelle élevée ainsi qu'une importante instabilité génomique. Nous avons voulu caractériser plus en profondeur l'instabilité génomique de cette lignée cellulaire en collaborant avec l'équipe du Docteur Patricia Kannouche, directrice de l'unité de recherche U8200 à Gustave Roussy.

#### **e. Analyse du stress réplcatif de la lignée cellulaire GR-CDXL1**

Les résultats du séquençage de l'exome et le profil CNV de la lignée cellulaire GR-CDXL1 montrent une charge mutationnelle élevée ainsi qu'une instabilité génomique importante avec la présence de nombreux gains et perte de régions chromosomiques. De plus, associé à ces résultats, la prolifération lente de cette lignée cellulaire *in vitro* nous a orienté vers l'étude du stress réplcatif. Nous avons donc commencé par étudier la vitesse de progression des fourches de réplication pendant la phase S du cycle cellulaire. Pour l'ensemble de la caractérisation du stress réplcatif, nous avons comparé la lignée GR-CDXL1 à deux lignées cellulaires de CBNPC, les lignées A549 et NCI-H1975. L'étude de la vitesse de propagation des fourches de réplication pendant la phase S consiste à incuber les cellules 20 minutes avec un premier analogue de la thymidine, le l'IdU, puis 20 minutes avec un second analogue, le Cld. L'incorporation de l'un puis l'autre de ces analogues est ensuite révélée par fluorescence et permet de mesurer l'avancement des fourches de réplication en 20 minutes. Les résultats sur les cellules GR-CDXL1 en comparaison aux cellules A549 et NCI-H1975 montrent que la longueur des fourches est significativement plus courtes pour les cellules GR-CDXL1 que pour les cellules A549 et H1975 (**Figure 47**).

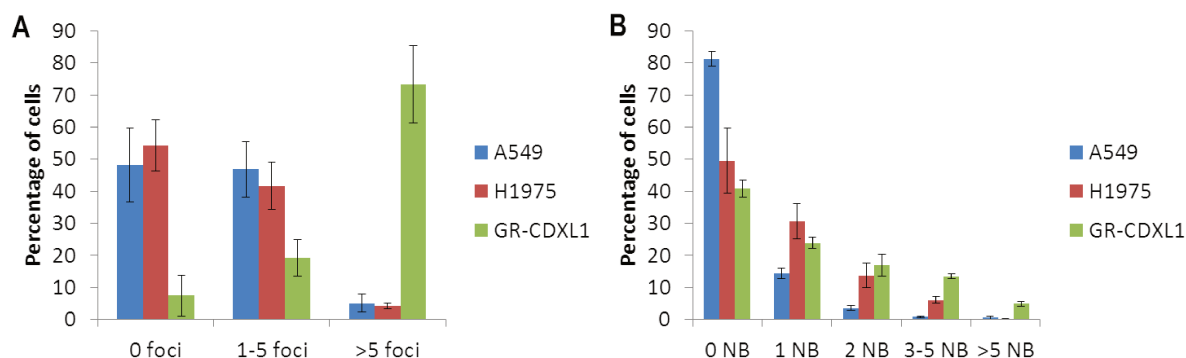


**Figure 47 : Longueur des fourches de réplication des lignées cellulaires A549, NCI-H1975 et GR-CDXL1.**

Box plot de la longueur des fourches de réplication des cellules A549, NCI-H1975 et GR-CDXL1. La moyenne est représentée par la croix à l'intérieur de chaque box plot. Le test statistique de Mann-Whitney a été utilisé pour évaluer si les différences entre les trois types cellulaires étaient significatives. \*\*\*\* représente une significativité avec une probabilité  $p$  inférieure à 0,0001. ns, non significatif.

Ce résultat montre que les cellules GR-CDXL1 présentent un stress réplicatif qui est concordant avec le fait que la croissance de ces cellules *in vitro* est beaucoup plus lente que les cellules A549 et NCI-H1975. La progression plus lente des fourches de réplication des cellules GR-CDXL1 peut notamment s'expliquer par l'existence de dommages de l'ADN pouvant conduire à la génération de cassures double brin (CDB) de l'ADN. Nous avons donc étudié la présence de CDB sur les trois lignées cellulaires en réalisant des co-marquages par immunofluorescence ciblant les protéines cycline A et 53BP1 (53 *Binding Protein*). La protéine 53BP1 est spécifique des CDB de l'ADN. Les cellules en phase S expriment la cycline A et les cellules en phase G1 ne l'expriment pas ainsi nous pouvons discriminer les CDB présentes dans des cellules en phase S et les CDB survenant en fin de mitose qui sont visualisées dans les cellules en phase G1 du cycle suivant. La classification des cellules en fonction du nombre de CDB détectées dans chaque cellule montre que le pourcentage de cellules présentant plus de cinq CDB en phase S est de 75 % dans la lignée cellulaire GR-CDXL1 contre 5 % pour chacune des lignées contrôle A549 et NCI-H1975 (**Figure 48A**). Ceci témoigne d'un stress réplicatif important et explique également la prolifération moins importante des cellules GR-CDXL1 par rapport aux deux lignées cellulaires de référence. Nous avons également recherché la présence de CDB produites en mitose et visualisées dans les cellules en phase G1. Le pourcentage de cellules avec au moins trois CDB est plus

important pour les cellules GR-CDXL1 que pour les deux autres lignées cellulaires et témoigne de cassures provenant en mitose (**Figure 48B**). Ces cassures peuvent être la conséquence d'une réplication imparfaite de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire. Cependant, la différence majeure concerne les CDB se produisant en phase S.

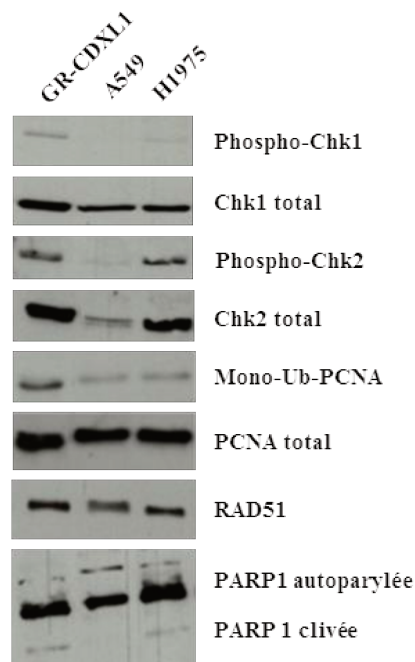


**Figure 48 : Classification des lignées cellulaires en fonction du nombre de CDB.**

A) Classification des cellules en fonction du nombre de CDB (ou *foci*) observées en phase S du cycle cellulaire.

B) Classification de cellules en fonction du nombre de CDB (ou *nuclear bodies*, NB) observées en phase G1 du cycle cellulaire.

La présence d'un stress réplicatif important révélé par une progression lente des fourches de réplication ainsi que le pourcentage de cellules en phase S avec plus de cinq CDB nous a conduit à étudier l'expression de protéines des points de contrôle (*checkpoints*) du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN par *western blot* (**Figure 49**). Les résultats révèlent que les protéines des points de contrôle du cycle cellulaire Chk1 phosphorylée et Chk2 phosphorylée sont plus exprimées dans les cellules GR-CDXL1 que dans les cellules A549 et NCI-H1975. La surexpression de ces deux *checkpoints* du cycle cellulaire qui entraînent un blocage de la phase S et une activation de mécanismes de la réparation de l'ADN est cohérente avec l'observation du nombre important de CDB de l'ADN dans ces cellules. La surexpression des protéines Rad51 et PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) mono-ubiquitinée impliquée dans la réparation de l'ADN est également observée. Du fait du nombre important de cassures majoritairement en phase S mais aussi en mitose, l'étude de protéines des voies de réparation des CDB doit être approfondie.



**Figure 49 : Western blot de protéines des *checkpoints* du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN.**

Western blot sur des extraits protéiques des lignées cellulaires GR-CDXL1, A549 et NCI-H1975. De haut en bas sont présentées les protéines Chk1 phosphorylée et Chk1 total, Chk2 phosphorylée et Chk2 total, PCNA mono-ubiquitinée et PCNA total, Rad51, PARP1 autophosphorylée et PARP1 clivée.

Globalement, les cellules GR-CDXL1 présentent un stress réplicatif important qui aboutit à la formation de CDB de l'ADN de manière plus importante en phase S mais également détectées en phase G1 suite à des cassures survenant en mitose. Cette forte présence de CDB entraîne la surexpression des *checkpoints* Chk1 et Chk2 eux-mêmes activant les protéines de la réparation de l'ADN Rad51 et PCNA mono-ubiquitinée. Nous émettons l'hypothèse que dans la lignée cellulaire GR-CDXL1 l'instabilité génomique, le stress réplicatif et la capacité à réparer les CDB de l'ADN pourraient avoir un rôle central dans le potentiel tumorigénique de ces cellules et être une caractéristique de cellules souches cancéreuses. Ces données et les travaux à venir nous permettront d'identifier les voies d'activation susceptibles d'être des cibles thérapeutiques intéressantes et qui seront évaluées au cours de tests pharmacologiques.

#### **f. Tests pharmacologiques**

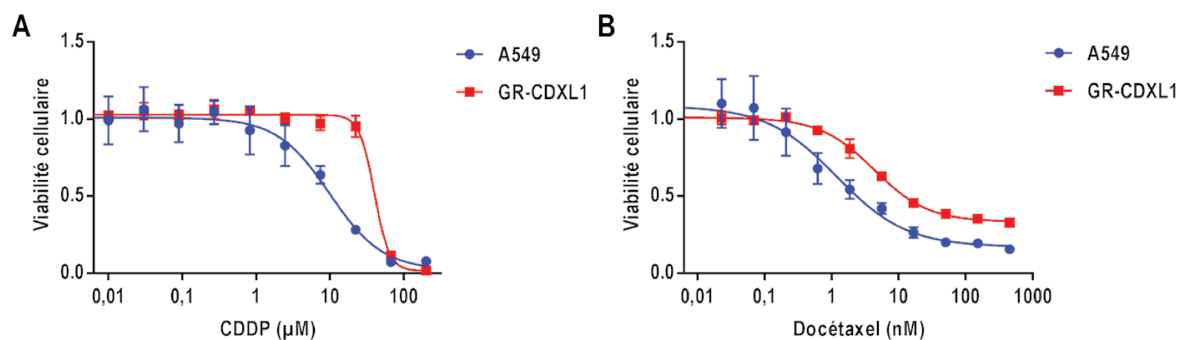
Le premier objectif des tests pharmacologiques est de valider les CDX et les lignées cellulaires en testant les agents thérapeutiques utilisés chez les quatre patients. Chacun des quatre patients a reçu du cisplatine et/ou une chimiothérapie à base de taxanes, docétaxel ou paclitaxel. Ces molécules sont donc testées *in vitro* et *in vivo*. Ensuite, les données de la caractérisation moléculaire et phénotypique



de chacun des modèles ainsi que ceux du stress réplicatif nous permettront de choisir les molécules à tester dans un premier temps *in vitro* puis *in vivo* si les premiers résultats sont encourageants.

### i. *In vitro*

L'établissement des lignées cellulaires GR-CDXL3 et GR-CDXL4 étant récent, les tests pharmacologiques ont uniquement été débutés sur la lignée cellulaire GR-CDXL1. Le traitement de la lignée cellulaire GR-CDXL1 avec du cisplatine et du docétaxel a été réalisé afin d'évaluer si ces cellules miment la résistance observées chez ce patient à ces deux chimiothérapies. Les réponses à ces deux chimiothérapies ont été comparées à celles des cellules A549 qui sont résistantes au cisplatine. Les résultats montrent que la lignée GR-CDXL1 est résistante au cisplatine et au docétaxel (**Figure 50**) et de façon plus importante que la lignée A549. Pour le cisplatine, l'IC50 est de 39,9  $\mu$ M pour la lignée cellulaire GR-CDXL1 et de 9,9  $\mu$ M pour la lignée cellulaire A549. Pour le docétaxel, les IC50 sont atteintes à une concentration de 4,3 nM et 1,2 nM respectivement pour les cellules GR-CDXL1 et A549.



**Figure 50 : Tests pharmacologiques sur les lignées cellulaires GR-CDXL1 et A549.**

A) Courbe de viabilité cellulaire en fonction de la concentration de cisplatine (CDDP) pour les lignées cellulaires GR-CDXL1 et A549. B) Courbe de viabilité cellulaire en fonction de la concentration de docétaxel pour les lignées cellulaires GR-CDXL1 et A549.

Pour cette lignée cellulaire, en accord avec les résultats de la caractérisation du stress réplicatif, les tests pharmacologiques sont en cours afin d'évaluer les inhibiteurs de Chk1, Wee1 et PARP. Ces molécules sont testées individuellement ou en association avec des chimiothérapies.

### ii. *In vivo*

Les tests pharmacologiques sont en cours pour les quatre modèles GR-CDXL1, GR-CDXL2, GR-CDXL3 et GR-CDXL4. Chacun des modèles CDX reçoit les chimiothérapies cisplatine et paclitaxel. Nous rechercherons si les CDX miment la résistance à ces deux chimiothérapies observées chez les



quatre patients. La poursuite des tests pharmacologiques *in vivo* sera décidée en fonction des résultats obtenus *in vitro*.

## 2) Établissement et caractérisation de xénogreffes dérivées de CTC dans le cancer de la prostate

### a. Établissement de CDX

#### i. Caractéristiques de l'ensemble des patients inclus dans l'étude

Les CTC issues de prélèvements sanguins de 17 patients atteints de mCRPC à un stade très avancé et les CTC issues de produits de cytophérèse de sept patients atteints de mCRPC à un stade moins avancé ont été implantées *in vivo* chez des souris NSG. Pour chacune des xénogreffes, des CTC ont en parallèle été enrichies par filtration ISET, par le système CellSearch et par RosetteSep au moment de l'injection afin de pouvoir réaliser des analyses moléculaires à l'échelle de cellule unique. Les comptes de CTC détectées par le CellSearch nous ont également permis d'estimer le nombre de CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup> injectées chez les souris pour chacun des prélèvements (**Tableaux 25 et 26**). Pour les 17 patients, la moyenne du nombre de CTC détectées par le CellSearch dans 7,5 mL de sang est de 534 CTC et la médiane est de 80 (**Figure 51**). La moyenne du nombre de CTC implantées est de 2 205, s'étend de zéro à 18 389 et la médiane est de 230. Bien que les nombres de CTC implantées soient importants, aucun CDX n'a été obtenu à partir des CTC issues de prélèvements sanguins de ces patients.

Afin d'augmenter le nombre de CTC implantées, une cytophérèse a été réalisée chez sept patients atteints de cancer de la prostate métastatique et résistant à la castration. Pour chacun des sept patients, les CTC issues du produit de cytophérèse ont elles aussi été comptées par le CellSearch. Ceci nous a permis d'estimer le nombre de CTC injectées (**Tableau 26**). Pour les sept patients la moyenne du nombre de CTC détectées dans le sang et les produits de cytophérèse est respectivement de 68 et 886 et la médiane est de 11 et 116. En moyenne, les nombres de CTC EpCAM<sup>+</sup>/pan-cytokératines<sup>+</sup> détectées rapportées à 7,5 mL de produit de cytophérèse sont 13 fois plus importants que ceux détectés dans 7,5 mL de sang (**Figure 52**). La réalisation de cytophérèse permet donc de collecter un nombre plus important de CTC. La moyenne du nombre de CTC implantées est de 3 940 et s'étend de zéro à 19 988 et la médiane est de 698. Bien que ces patients soient à un stade moins avancé que ceux pour lesquels des prélèvements sanguins ont été réalisés, la moyenne et la médiane du nombre de CTC implantées *in vivo* pour les CTC issues de produits sont respectivement 1,8 fois et 3 fois supérieures. Un CDX, nommé GR-CDXP1, a été développé à partir des CTC du patient P3 (**Tableau 26 et Figure 52**). Au moment de la xénogreffe, le patient avait 129 CTC et 1 999 EpCAM<sup>+</sup>/pan-

cytokératines<sup>+</sup> respectivement dans 7,5 mL de sang périphérique et 7,5 mL de produit de cytophérèse soit un facteur d'enrichissement de 15,5.

Patients	Nombre de CTC par CellSearch/7,5mL	Estimation du nombre de CTC implantées
P1	4310	18 389
P2	656	2 624
P3	53	212
P4	660	2 640
P5	0	0
P6	229	855
P7	10	37
P8	80	299
P9	0	0
P10	740	3 355
P11	189	655
P12	1972	7 888
P13	43	149
P14	0	0
P15	6	27
P16	96	230
P17	26	128

Tableau 25 : Estimation du nombre de CTC implantées sur la base du compte Cellsearch chez les 17 patients prélevés pour une xénogreffe de CTC à partir de prélèvements sanguins.

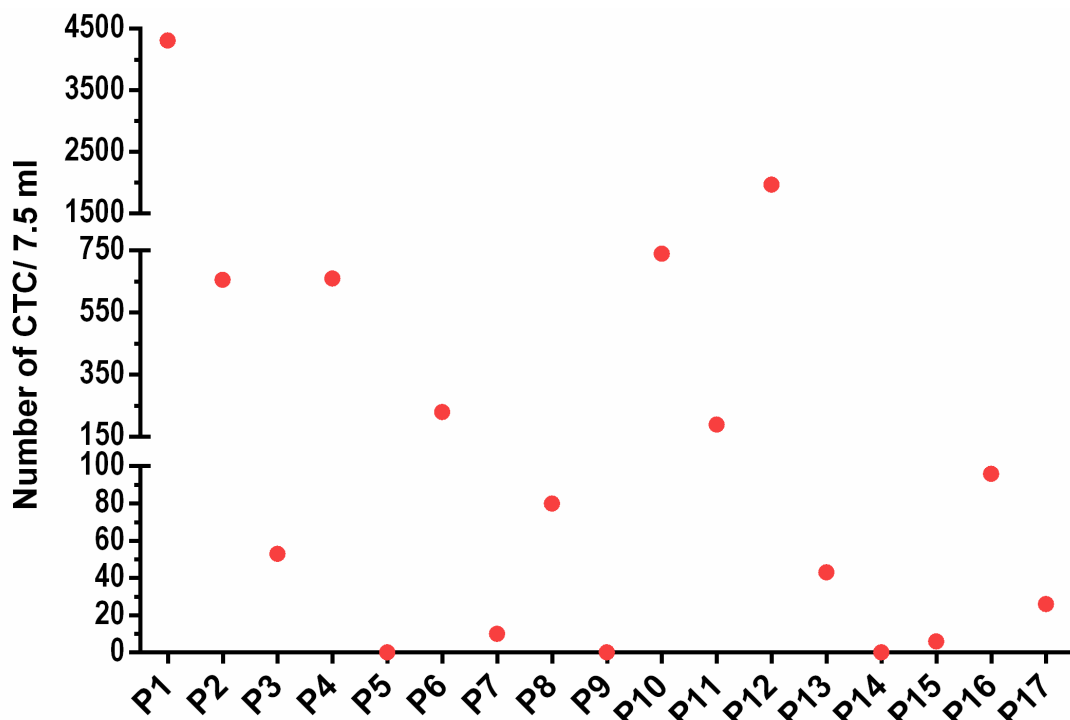


Figure 51 : Nombre de CTC détectées par le CellSearch chez les 17 patients prélevés pour une xénogreffe de CTC à partir de prélèvements sanguins.

Patients	Nombre de CTC par CellSearch/7,5mL de sang	Nombre de CTC par CellSearch/7,5mL de produit de cytophèrese	Estimation du nombre de CTC implantées
P1	81	675	2160
P2	247	3401	4716
P3	129	1999	19988
P4	1	0	0
P5	0	0	0
P6	6	116	698
P7	11	8	16

Tableau 26 : Nombre de CTC présentes dans le sang, la cytophèrese et implantées pour les sept patients ayant subi une cytophèrese.

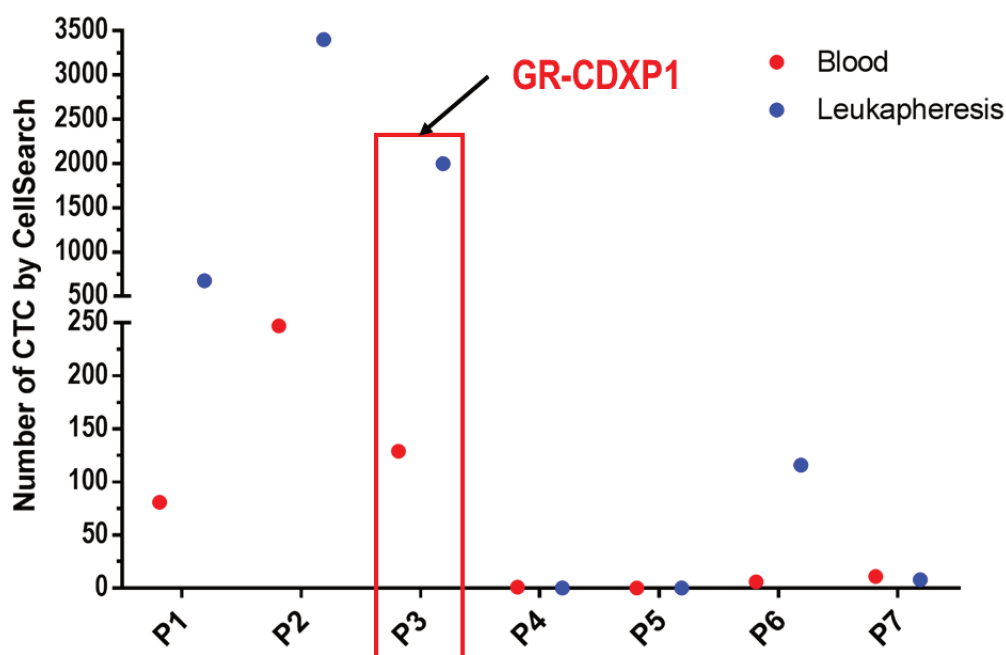


Figure 52 : Comparaison du nombre de CTC détectées par le CellSearch dans le sang et dans les produits de cytophèrese chez les sept patients.

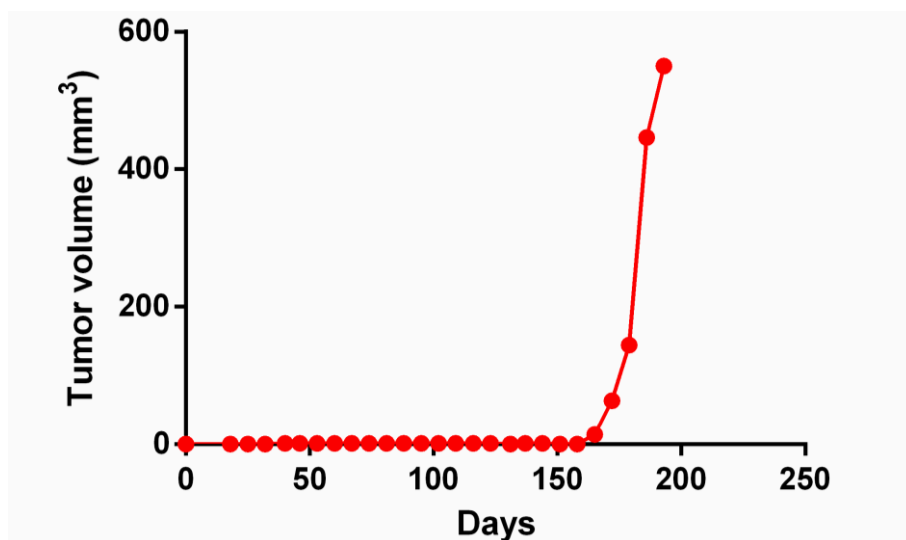
## ii. Caractéristiques du patient à l'origine du CDX et développement du CDX

Les caractéristiques clinico-biologiques du patient ayant permis le développement du CDX ainsi que les nombres de CTC détectées par le CellSearch au moment des xénogreffes et le nombre de CTC implantées sont présentées dans le **Tableau 17**.

Patient	Nom du CDX	Age	Histologie	Score de Gleason	Nombre de CTC par CellSearch / 7,5mL de sang	Nombre de CTC par CellSearch / 7,5mL de produit de cytophèrese	Estimation du nombre de CTC implantées
P3	GR-CDXP1	59	adénocarcinome	4+5	129	1999	19988

Tableau 27 : Caractéristiques clinico-biologiques du patient ayant permis l'établissement du CDX de cancer la prostate métastatique et résistant à la castration.

Le patient P3 était âgé de 59 ans au diagnostic et présentait un adénocarcinome multi-métastatique dès le diagnostic en mars 2014. Le score de Gleason de la tumeur était de 4 + 5. Le patient a reçu une première ligne de traitement par casodex et énantone à partir d'avril 2014. La deuxième ligne thérapeutique a été du cabazitaxel de février à avril 2015 (deux mois). Ensuite le patient a reçu une troisième ligne thérapeutique par docétaxel de mai à juillet 2015 (2 mois). La troisième ligne a consisté en l'administration d'enzalutamide d'octobre 2015 à mars 2016. La cytophérèse a été réalisée le 07 avril 2016, au moment de la résistance à l'enzalutamide. Le patient a ensuite débuté une nouvelle ligne de traitement par docétaxel. Il est décédé fin mai 2016. L'implantation de 19 988 CTC *in vivo* a permis le développement d'une tumeur mesurable 165 jours après la xénogreffe des CTC (**Figure 53**).



**Figure 53 : Courbes de croissance du modèle GR-CDXP1.**

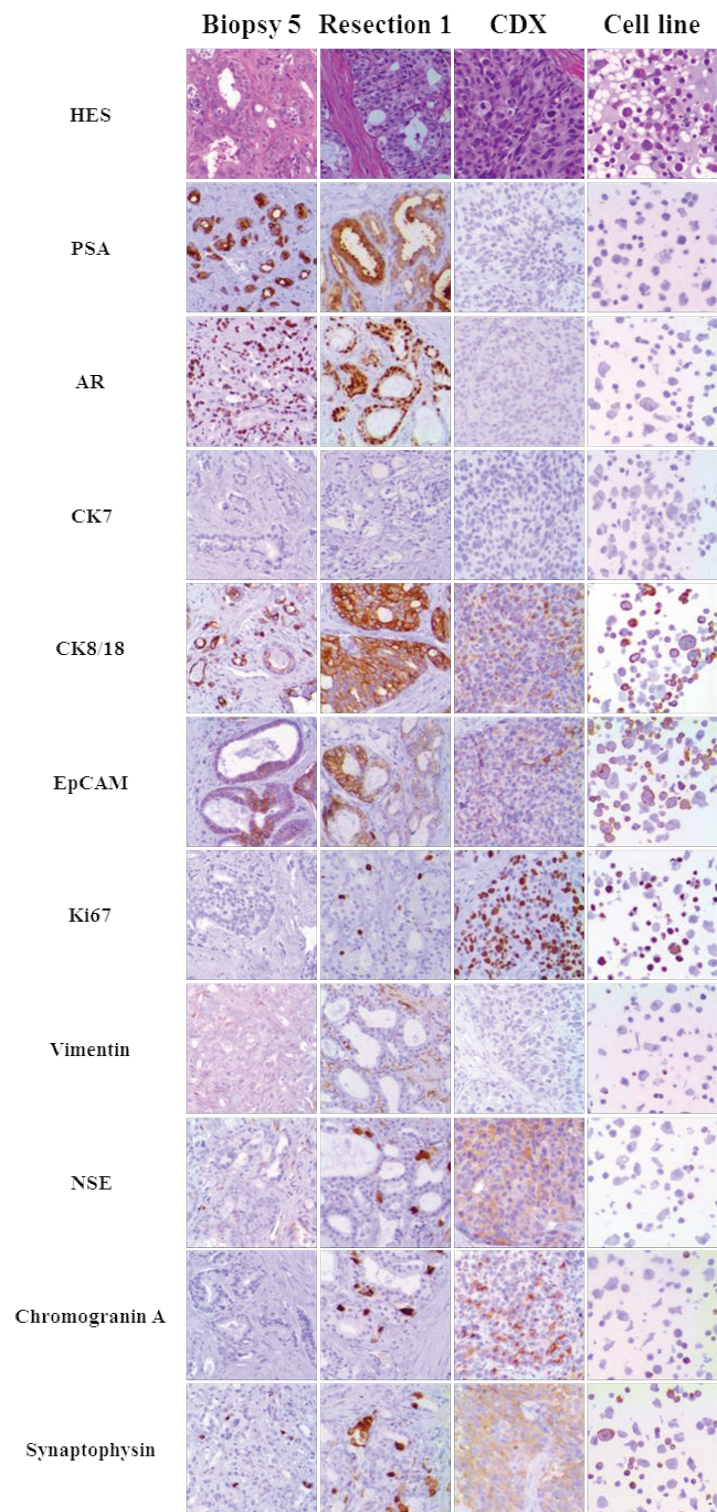
L'origine humaine de la tumeur a été confirmée par une hybridation Alu à l'École Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort. La compatibilité de l'origine prostatique du CDX a également été confirmée le Professeur Jean-Yves Scoazec.

#### **b. Établissement de la lignée cellulaire *in vitro***

Une lignée cellulaire *in vitro* à partir du CDX a été établie. La lignée pousse à la fois sous forme de petites sphères mais également en monocouche de cellules d'aspect épithéliale (**Figure 54**). Les cellules sont repiquées une fois par semaine au quart. La lignée cellulaire a été implantée *in vivo* chez des souris immunodéprimées et est tumorigénique.



perte d'expression peut s'expliquer par l'indépendance des cellules tumorales vis-à-vis de ces deux marqueurs lorsque la maladie a évolué. Le modèle GR-CDXP1 présente un phénotype épithélial sans caractéristique mésenchymateuse. La tumeur du patient, le CDX et la lignée cellulaire présentent des résultats concordants par IHC. Enfin, l'expression de la chromogranine A, augmentée dans le CDX et la lignée cellulaire comparativement à la tumeur du patient, témoigne de l'acquisition d'un phénotype neuroendocrine et pourrait être associée à l'augmentation d'agressivité de la maladie.



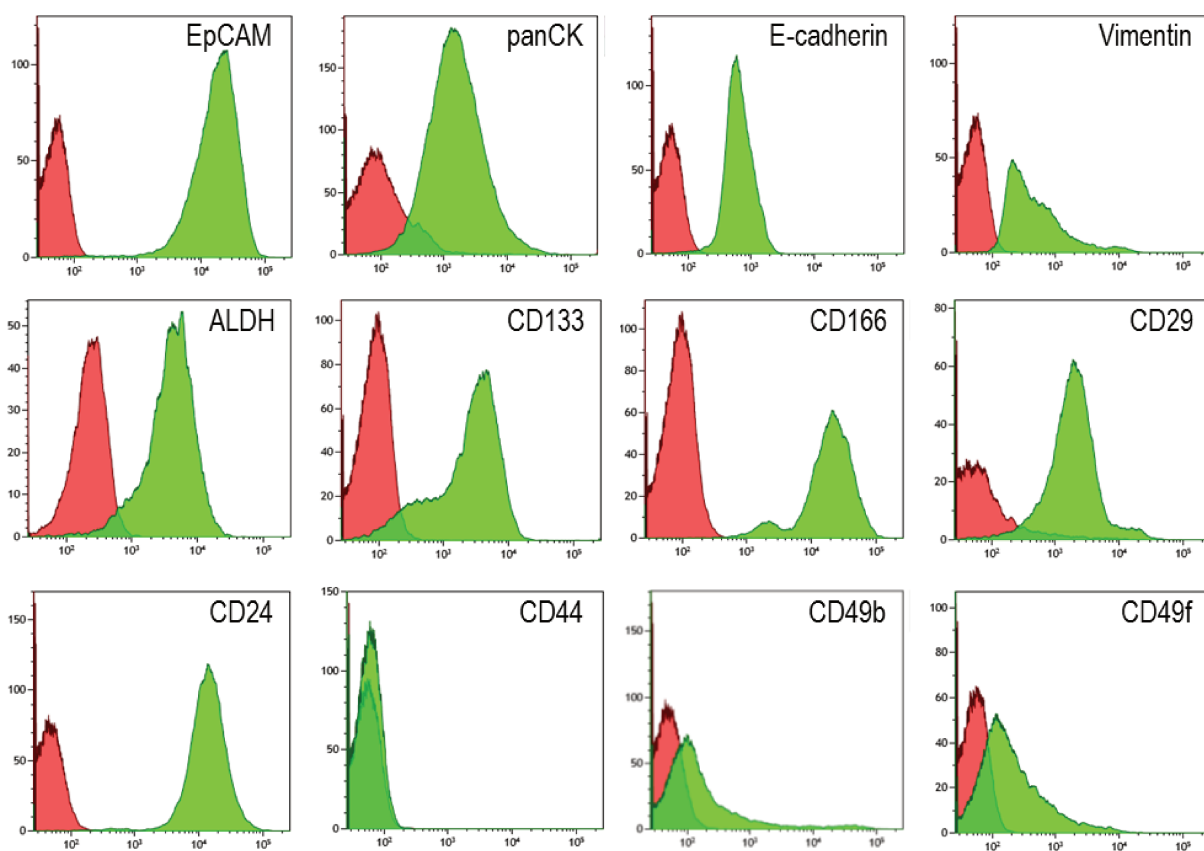
Scale: black bar = 10 µm

**Figure 55 : Caractérisation phénotypique par IHC du modèle GR-CDXP1.**

De haut en bas sont présentés la coloration hématoxyline/éosine/safran puis les marqueurs spécifiques du cancer de la prostate PSA et AR, les marqueurs épithéliaux CK7, CK8/18, EpCAM, le marqueur de prolifération cellulaire Ki67, le marqueur mésenchymateux vimentine et les marqueurs neuroendocrines NSE, chromogranine A et synaptophysine. De gauche à droite sont présentés les différents marquages sur la biopsie 5, la résection 1, le CDX et la lignée cellulaire.



Le phénotypage par cytométrie de flux de la lignée cellulaire a confirmé les résultats de l'IHC. Les trois marqueurs épithéliaux sont bien exprimés par la lignée cellulaire. L'expression faible de la vimentine, alors que les cellules étaient négatives pour ce marqueur par IHC, est probablement explicable du fait de la sensibilité de détection par cytométrie de flux. L'expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses a également été recherchée (**Figure 56**). La lignée cellulaire a une activité ALDH et exprime les marqueurs CD133, CD166 et CD29. Concernant les marqueurs CD24 et CD44, les cellules expriment le marqueur CD24 mais pas le marqueur CD44. Les marqueurs CD49b et CD49f ne sont pas exprimés. La recherche de l'expression de ces marqueurs directement par les CTC pourrait permettre de savoir si les cellules exprimant ces marqueurs ont une tumorigénicité plus élevée.



**Figure 56 : Expression des marqueurs épithéliaux, mésenchymateux et de cellules souches cancéreuses par la lignée cellulaire GR-CDXP1.**

L'expression des antigènes EpCAM, pan-cytokératines, E-cadhérine, vimentine, CD133, CD166, CD29, CD24, CD44, CD49b, CD49f et l'activité ALDH a été recherchée par cytométrie de flux.

### **3) Caractérisation moléculaire par séquençage ciblé et séquençage de l'exome des biopsies tumorales, CTC uniques, CDX et lignée cellulaire**

La caractérisation moléculaire du modèle GR-CDXP1 a été réalisée par séquençage ciblé puis par séquençage de l'exome. Les résultats des biopsies, des CTC, du CDX et de la lignée cellulaire sont

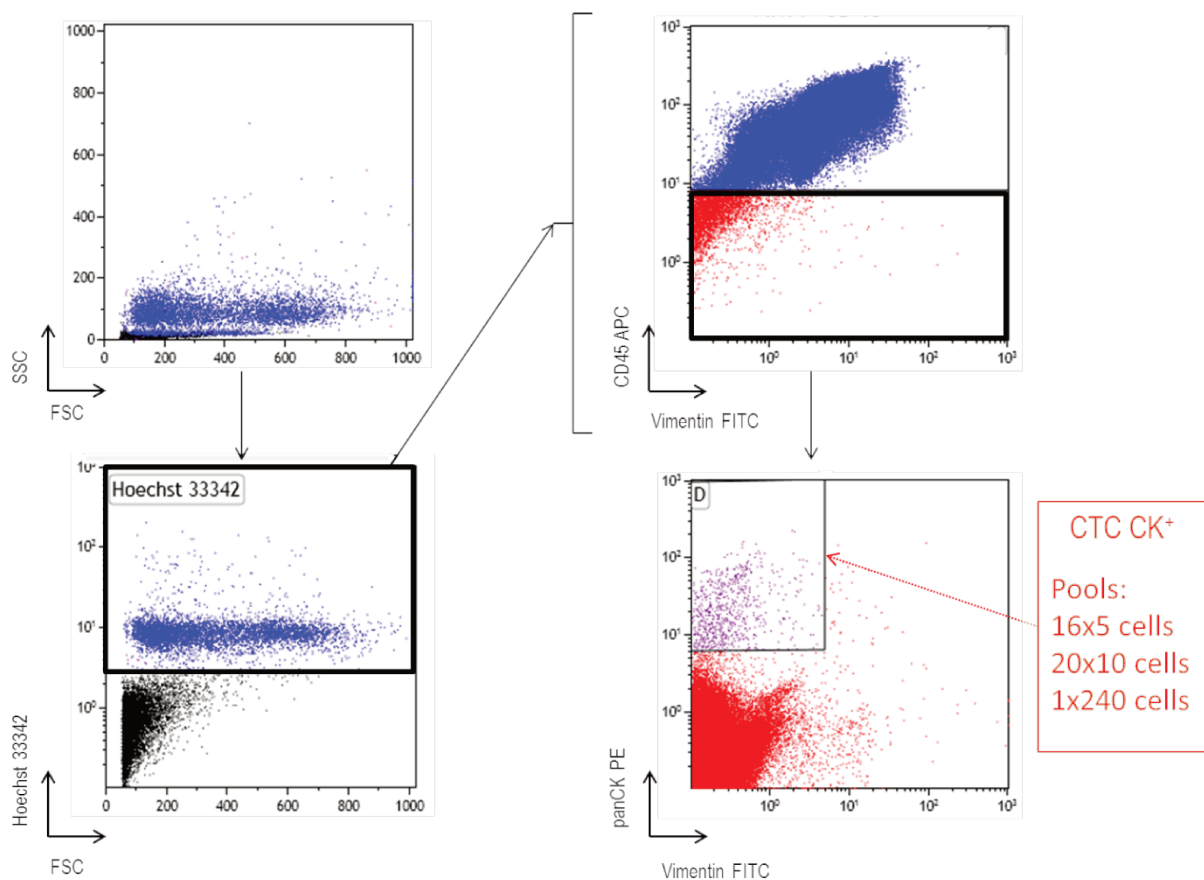


comparés pour valider le modèle puis construire un arbre phylogénique afin d'identifier les anomalies clonales et sous-clonales, ainsi que les mutations associées au potentiel de dissémination et de tumorigénicité des CTC. Cette analyse pourra aussi nous permettre d'identifier des anomalies moléculaires « actionnables » par des agents thérapeutiques.

### a. Isolement de CTC unique

Pour chacun des 24 patients atteints de cancer de la prostate pour lesquels une xénogreffe a été réalisée (17 à partir de CTC issues de prélèvements sanguins et 7 à partir de CTC issues de produits de cytophérèse), des CTC ont été collectées au moment de la xénogreffe et conservées pour leur caractérisation ultérieure.

Pour le prélèvement du patient ayant permis le développement du CDX, 16 échantillons de cinq CTC, 20 échantillons de 10 CTC et un échantillon de 240 CTC épithéliales ont été isolés à partir du produit de cytophérèse par cytométrie de flux après un enrichissement par RosetteSep (**Figure 57**) comme présenté dans le paragraphe Résultats III.



**Figure 57 : Stratégies d'isolement des CTC par cytométrie de flux et caractérisation phénotypique des CTC isolées.**

L'amplification totale du génome a été réalisée pour six échantillons de cinq CTC, sept échantillons de dix CTC, l'échantillon de 240 CTC et pour un échantillon de 200 leucocytes isolés comme contrôle. Tous les échantillons présentent des contrôles de qualité du WGA optimaux et étaient éligibles pour réaliser le séquençage ciblé et le séquençage d'exome.

### b. Séquençage ciblé

Comme décrit pour les modèles de CDX de CBNPC, nous avons souhaité rechercher les mutations en utilisant le panel Ampli1 CHP Custom Beta développé par Silicon Biosystems couplé à la technologie de séquençage Ion AmpliSeq. Le séquençage ciblé a été réalisé sur les deux résections et les six biopsies du patient, l'ADN constitutionnel du patient extrait à partir de sang total, l'échantillon de 240 CTC et les leucocytes après WGA, le CDX et la lignée cellulaire soit au total 13 échantillons.

L'objectif de ce travail était de vérifier la présence de mutations communes entre les résections/biopsies et l'ensemble des autres échantillons cités ci-dessus afin de sélectionner les échantillons pour le séquençage de l'exome. Les contrôles qualité de séquençage de chacun des échantillons sont présentés dans le **Tableau 28**. Tous les échantillons présentent des bons contrôles qualité de séquençage avec un pourcentage d'amplicons à une profondeur de 0X très faible ou nul et au contraire un pourcentage d'amplicons à une profondeur supérieure ou égale à 100X compris entre 71 % et 100 %.

Échantillons	Profondeur moyenne	Profondeur médiane	% d'amplicons avec une profondeur de 0X	% d'amplicons avec une profondeur de 1-99X	% d'amplicons avec une profondeur de ≥100X
240c_sort_E+/M-	1079	687	19%	11%	71%
200c_sort_CD45+	1914	1441	5%	10%	85%
ADN constitutionnel	2030	2118	0%	1%	99%
Résection 1 (17R393-1)	1638	1635	0%	1%	99%
Résection 2 (17R393-2)	1343	1330	0%	1%	99%
Biopsie 1 (17R394-1)	1461	1285	0%	0%	100%
Biopsie 2 (17R394-2)	1012	922	0%	1%	99%
Biopsie 3 (17R394-3)	991	919	0%	2%	98%
Biopsie 4 (17R394-4)	1294	1207	0%	1%	99%
Biopsie 5 (17R394-5)	1660	1494	0%	1%	99%
Biopsie 6 (17R394-6)	2293	2093	0%	1%	99%
CDX	2214	2083	1%	1%	99%
Lignée cellulaire	1395	1318	1%	1%	98%

**Tableau 28 : Contrôle de qualité du séquençage ciblé haut débit de nouvelle génération des échantillons du modèle GR-CDXP1.**

La mutation COSM43714 (p.G279E) dans le gène *TP53* est détectée dans l'ensemble des échantillons tumoraux excepté les deux résections et absente dans l'ADN constitutionnel et les leucocytes ayant subi le WGA. Une seule mutation commune entre la plupart des échantillons tumoraux a été détectée.

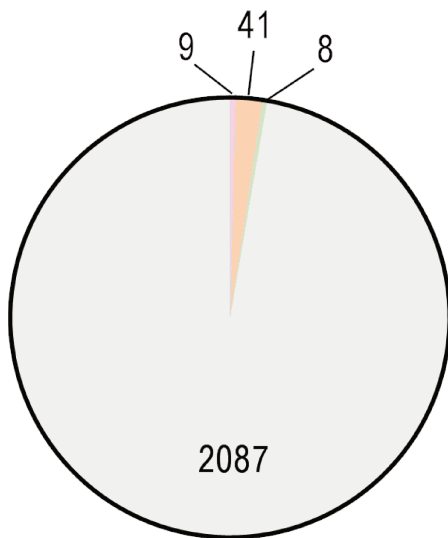
### c. Séquençage de l'exome

Nous avons réalisé le séquençage de l'exome des deux résections du patient ainsi que des six biopsies faites au moment du diagnostic deux ans avant la cytophèrese, de sept échantillons de CTC au moment de la xénogreffe, du CDX et de la lignée cellulaire. Les analyses bio-informatiques ne sont actuellement pas terminées. Les résultats présentés dans ce chapitre concernent uniquement la détection de variants somatiques de type SNV, l'analyse des variants de type INDEL et les variations du nombre de copies étant en cours. Les contrôles de qualité du WES pour chacun des 17 échantillons sont présentés dans le **Tableau 29** et montrent une profondeur moyenne de séquençage satisfaisante, un pourcentage d'alignement sur le génome humain de référence GRCh38/hg38 compris entre 92 % et 99 %, une couverture à 25X comprise entre 37 % et 90 %. Enfin, les nombres de variants sont compris entre 906 et 1 479 pour les CTC (excepté l'échantillon de 240 CTC), entre 98 et 287 pour les résections et biopsies (excepté les biopsies 1 et 4) et de 104 et 123 respectivement pour le CDX et la lignée cellulaire.

Échantillons	Profondeur moyenne	% d'alignement	% de couverture à 25X	Nombre de variants
200c_sort_CD45+	46	98%	44%	93
240c_sort_E+/M-	35	99%	37%	13259
5c_sort_E+/M-	88	99%	51%	906
5c_sort_E+/M-	90	99%	45%	1479
5c_sort_E+/M-	88	98%	53%	1309
5c_sort_E+/M-	87	98%	48%	1020
5c_sort_E+/M-	102	99%	46%	1070
5c_sort_E+/M-	93	99%	45%	1209
ADN constitutionnel	96	99%	89%	-
Résection 1 (17R393-1)	130	95%	89%	105
Résection 2 (17R393-2)	130	95%	90%	98
Biopsie 1 (17R394-1)	81	94%	80%	819
Biopsie 2 (17R394-2)	144	96%	86%	230
Biopsie 3 (17R394-3)	149	98%	86%	180
Biopsie 4 (17R394-4)	98	93%	86%	509
Biopsie 5 (17R394-5)	133	95%	85%	264
Biopsie 6 (17R394-6)	130	96%	85%	287
CDX	109	99%	81%	104
Lignée cellulaire	123	92%	83%	123

**Tableau 29 : Contrôle de qualité du WES des échantillons du modèle GR-CDXP1.**

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux variants communs entre l'ensemble des biopsies et résections du patient, les CTC et le CDX (**Figure 58**). Les biopsies et résections du patient ont révélé la présence de 2 145 variants uniques. Parmi ces 2 145 variants, 41 sont communs aux CTC et au CDX, huit sont communs au CDX mais non détectés dans les CTC du fait d'une couverture insuffisante et neuf sont communs aux CTC mais non présents dans le CDX. Globalement, uniquement 2,3 % des variants des résections et biopsies sont communs au CDX et aux CTC. Cependant, pour l'ensemble des biopsies et surtout les échantillons 1 et 4, les nombres de variants sont élevés du fait de probables faux positifs engendrés par la faible quantité et qualité du matériel de départ. L'analyse bio-informatique est en cours et nous espérons pouvoir éliminer en partie ces artefacts. Le nombre moyen de mutations détectées par séquençage d'exome est de 30 et 140 mutations respectivement dans les tumeurs primitives de la prostate chez des patients non métastatiques et chez des patients atteints de cancers de la prostate métastatiques et résistants à la castration. Le nombre de mutations détectées dans les résections, le CDX et la lignée cellulaire sont parfaitement en adéquation avec les chiffres attendus chez des patients métastatiques. Également, mis à part le nombre de faux positifs détecté, cette représentation met en évidence la grande hétérogénéité moléculaire présente dans les résections et les biopsies de la tumeur primaire du patient. Seulement une faible proportion de cette hétérogénéité est retrouvée dans les CTC. En revanche, 82 % (41/50) des mutations communes entre les CTC et les biopsies et résections sont retrouvées dans le CDX ce qui valide notre modèle de CDX. La liste des mutations communes aux résections et biopsies et retrouvées dans les CTC et/ou le CDX sont présentées dans le **Tableau 30**.



- Variants communs résections/biopsies, CTC et CDX
- Variants communs biopsies/résections et CDX mais non couverts dans les CTC
- Variants communs résections/biopsies, CTC
- Variants uniquement résections/biopsies

**Figure 58 : Nombre de variants partagés entre les résections, biopsies tumorales, CTC et/ou le CDX.**

Ce diagramme montre le nombre de variants détectés dans les résections et biopsies et la proportion de variants partagés avec les CTC et le CDX. Parmi les 2 145 variants détectés dans les résections et biopsies, 41 sont partagés avec les CTC et le CDX, huit sont partagés avec le CDX et non détectés dans les CTC du fait d'un nombre de *reads* insuffisant, et neuf sont partagés uniquement avec CTC.

Gene	Protein variation	Consequence
ADGRB1	G217G	synonymous_variant
ADGRF4	N372N	synonymous_variant
APCS	R76R	synonymous_variant
ARHGEF28	Q1442L	missense_variant
BRD8	P549R	missense_variant
C8B	Y165Y	synonymous_variant
CDS2	V291M	missense_variant
COL28A1	G504R	missense_variant&splice_region_variant
DNAH17	G1815S	missense_variant
DSCAML1	S362L	missense_variant
KRT25	P244P	synonymous_variant
LAMA4	G608R	missense_variant
MAP1A	G2436E	missense_variant
MAP3K19	H316P	missense_variant
MBNL3	P266H	missense_variant
MC2R	D285D	synonymous_variant
MCRS1	R417W	missense_variant
MERTK	V737F	missense_variant
NF1	G631E	missense_variant
PAPLN	R966C	missense_variant
PCDHB2	F311F	synonymous_variant
PCLO	A4922A	synonymous_variant
PDE4B	V75A	missense_variant
PLA2G1B	K143Q	missense_variant
PNPLA1	T90T	synonymous_variant
PPP1R21	Y165C	missense_variant
PRKD3	H656H	synonymous_variant
RFPL4B	P176H	missense_variant
RSPO4	G32G	synonymous_variant
SHOC2	N525I	missense_variant
SLC15A5	N108K	missense_variant
SPATA20	V178L	missense_variant
SYNDIG1	.	splice_acceptor_variant
TFRC	S405F	missense_variant
TLR2	L266F	missense_variant
TMCO1	L18L	synonymous_variant
TMEM169	T123A	missense_variant
TMEM71	A218E	missense_variant
TP53	G147E	missense_variant
UBQLN2	G158D	missense_variant
ZNF843	G265E	missense_variant
CPLX1	V4A	missense_variant
CYP2U1	C233Y	missense_variant
FREM2	E2959D	missense_variant
LRP1B	D1807D	synonymous_variant
PARP4	T1170I	missense_variant
RALGPS1	Y206C	missense_variant
SLC45A4	A392T	missense_variant
TREX2	G161G	synonymous_variant
IL12RB1	R364Q	missense_variant
LAMB1	D956D	synonymous_variant
OSR2	L392L	synonymous_variant
PCDHGA12	A157A	synonymous_variant

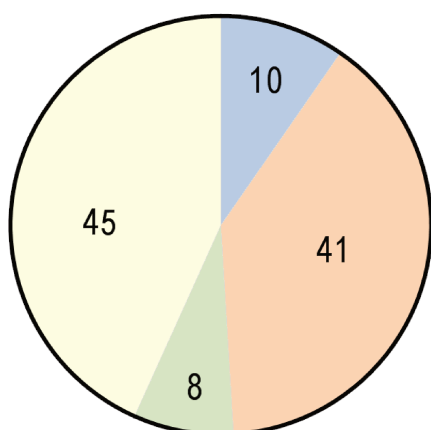
SCN1A	T1250T	synonymous_variant
SHANK2	P1585L	missense_variant
SPHKAP	Y339H	missense_variant
TMEM201	P422L	missense_variant
TTL	L296M	missense_variant

**Tableau 30 : Liste des variants partagés entre les résections/biopsies, les CTC et/ou le CDX.**

En orange saumon figurent les variants partagés entre les résections/biopsies, les CTC et le CDX. En vert figurent les variants partagés entre les résections/biopsies, le CDX et non détectés dans les biopsies du fait d'une mauvaise couverture. En rose figurent les variants partagés entre les résections/biopsies, les CTC et non détectés dans le CDX.

Ce résultat montre le faible niveau d'hétérogénéité des CTC en comparaison aux biopsies et résections de la tumeur primaire. Ceci laisse supposer que seules les mutations capables de conférer aux CTC un potentiel de dissémination et/ou de capacité métastatique pourraient être sélectionnées dans les CTC. Ces mutations sont en grande partie retrouvées dans le CDX.

Ensuite nous nous sommes intéressés au 104 variants détectés dans le CDX. Quarante-neuf pourcents des variants (41+10/104) du CDX sont détectés dans les CTC, et 47 % des variants (41+8/104) du CDX sont partagés par au moins une résection et/ou une biopsie (**Figure 59**). Comme mentionné plus haut, ces 49 variants, conservés au cours de la progression de la maladie et véhiculés par les CTC, pourraient avoir un rôle primordial dans l'évolution tumorale. Dix mutations du CDX sont détectées dans les CTC mais pas dans les résections et biopsies. Ces mutations pourraient provenir de d'autres zones de la tumeur prostatique ou de métastases et avoir comme les autres mutations présentes dans les CTC un rôle dans l'évolution tumorale et la résistance aux drogues chez ce patient. L'ensemble des mutations du CDX communes avec les résections/biopsies et/ou avec les CTC sont également retrouvées dans la lignée cellulaire. La liste des dix mutations du CDX communes avec les CTC et non présentes dans les résections/biopsies est présentée dans le **Tableau 31**.



- Variants communs résections/biopsies, CTC et CDX
- Variants communs résections/biopsies et CDX mais non couverts dans les CTC
- Variants communs CTC et CDX
- Variants uniquement CDX

**Figure 59 : Origine des variants présent dans le CDX.**

Le diagramme montre le nombre de variants du CDX et le nombre de variants du CDX partagés entre les résections/biopsies et les CTC, les variants partagés entre les résections/biopsies mais non détectés dans les CTC du fait d'une couverture trop faible, les variants partagés avec les CTC mais non détectés dans les résections/biopsies et les variants uniquement détectés dans le CDX.

Gene	Protein variation	Consequence
ACBD5	Y479H	missense_variant
ATP11A	T969T	synonymous_variant
CAMSAP2	I945I	synonymous_variant
EPB42	T405M	missense_variant
HARS	V337E	missense_variant
PSG4	L24I	missense_variant
SLAMF6	V247I	missense_variant
WBSCR17	G498E	missense_variant
ZNF99	S857Y	missense_variant
ZNF594	Y624C	missense_variant

**Tableau 31 : Liste des dix variants partagés par le CDX et les CTC et non détectés dans les résections et biopsies.**

En conclusion de l'analyse moléculaire de ce modèle, seulement 2,3 % des variants présents dans les résections et biopsies sont détectés dans les CTC et le CDX. Malgré la présence de faux positifs, ces chiffres mettent en avant la grande hétérogénéité mutationnelle de la tumeur primaire de ce patient. Il est particulièrement intéressant d'observer que l'hétérogénéité tumorale présente dans la tumeur primaire de ce patient deux ans avant le prélèvement des CTC n'est pas retrouvée dans les CTC et le CDX.



Quatre-vingt-deux pourcents des mutations communes entre les résections/biopsies et les CTC sont retrouvées dans le CDX. Ce résultat révèle que le faible nombre de variants communs entre la tumeur primaire et les CTC conservés au cours de l'évolution de la maladie a probablement un rôle prépondérant dans la tumorigénicité des CTC et valide la pertinence de ce modèle *in vivo* et *in vitro* puisque la totalité des variants communs aux résections/biopsie, CTC et CDX sont retrouvés dans la lignée cellulaire. Ce travail nous permet donc d'identifier quelles sont les mutations qui confèrent aux cellules cancéreuses de ce patient un potentiel tumorigénique.

# Discussion et Conclusions

Les deux objectifs de mon Doctorat étaient d'une part de caractériser les CTC à l'échelle de cellule unique par séquençage de l'exome chez des patients atteints de cancers de la prostate et d'autre part d'établir des modèles de xénogreffes de CTC chez des patients atteints de CBNPC ou de cancer de la prostate. Le premier objectif s'inscrit dans la poursuite des travaux du laboratoire sur la caractérisation moléculaire des CTC en tant que biopsie liquide et le développement d'une expertise technologique pour répondre à cette problématique. Bien que le nombre de CTC détectées par le système CellSearch soit un facteur prédictif et pronostique dans différents cancers et notamment dans le cancer de la prostate et le CBNPC [de Bono J. S. *et al.*, Clin Cancer Res, 2008 ; Krebs M. G. *et al.*, J Clin Oncol, 2011 ; Lindsay C. R. *et al.*, Ann Oncol, 2017], cette méthode ne permet pas de capturer l'ensemble des CTC puisque les CTC n'exprimant pas ou peu l'antigène EpCAM à un certain stade d'engagement dans le processus de TEM ne sont pas capturées. Il n'est donc pas possible d'explorer l'hétérogénéité phénotypique et moléculaire des CTC en utilisant exclusivement le système CellSearch. Notre équipe a rapporté en 2011 la supériorité de détection des CTC par la méthode de filtration ISET *versus* la méthode CellSearch dans le CBNPC et le cancer de la prostate métastatique [Farace F. *et al.*, Br J Cancer, 2011]. Sur la base de ces résultats, Pailler E. *et al.* ont montré chez des patients « *ALK* remanié » et également chez des patients « *ROS1* remanié » la possibilité de détecter ces remaniements par FISH dans des CTC enrichies par filtration ISET avec une très bonne concordance entre le statut de la tumeur et des CTC [Pailler E. *et al.*, J Clin Oncol, 2013 ; Pailler E. *et al.*, Ann Oncol, 2015]. Comme nous l'avons observé dans le travail publié dans *Annals of Oncology*, l'absence ou le très faible nombre de CTC détectées par le CellSearch chez les patients *ALK* remanié ne rend pas possible l'utilisation de ce système pour l'identification de ce remaniement dans les CTC. L'analyse des CTC enrichies par filtration ISET est un travail fastidieux mais le développement d'une méthode de microscopie semi-automatisée permet de diminuer le temps d'analyse et les différences inter-opérateurs [Pailler E. *et al.*, BMC Cancer, 2016].

Le premier objectif de mon projet de thèse a concerné le séquençage de l'exome de CTC à l'échelle de cellule unique chez des patients atteints de cancer de la prostate. A ce jour aucune étude publiée de séquençage à haut débit n'a pris en compte l'hétérogénéité phénotypique des CTC. Tous les travaux publiés dans ce domaine ont exclusivement été réalisés à partir de CTC épithéliales EpCAM positives [Heitzer E. *et al.*, Cancer Res, 2013 ; Lohr J. G. *et al.*, Nat Biotechnol, 2014 ; Polzer B. *et al.*, EMBO Mol Med, 2014]. Notre objectif était de réaliser un séquençage de l'exome en couvrant au mieux l'hétérogénéité phénotypique des CTC. Pour répondre à cet objectif, une méthode expérimentale

globale incluant trois approches technologiques permettant d'enrichir et d'isoler des CTC individuelles de différents phénotypes (épithélial, épithélio-mésenchymateux et mésenchymateux), d'amplifier la totalité du génome (*whole genome amplification*, WGA) et de séquencer l'exome (WES) a été développée. Basée sur l'expertise du laboratoire, la première approche a combiné l'enrichissement par filtration ISET, la détection des CTC par microscopie suite à une immunofluorescence et l'isolement des CTC par microdissection laser de cellules individuelles. Cette approche a permis d'isoler l'ensemble des phénotypes de CTC mais le nombre de CTC épithéliales détectées avec cette stratégie a été faible, ce qui nous a amené à mettre en place deux autres stratégies. La deuxième approche comprenait une étape de détection par le système CellSearch puis une étape d'isolement de CTC individuelle par le système Puncher développé par VyCAP. La troisième approche a combiné un enrichissement par RosetteSep et Ficoll puis une détection par cytométrie de flux suite à un marquage par immunofluorescence. Des CTC ont été isolées par ces trois approches chez 11 patients atteints de cancer métastatique de la prostate, inclus dans l'étude clinique MOSCATO 01. Nous avons montré que l'isolement de *pools* de CTC comparé à celui des CTC uniques augmentait les chances d'obtenir un WGA de bonne qualité. Nous avons observé que la qualité de l'exome des CTC, comprenant la couverture à 10X et le pourcentage de régions non couvertes, est entièrement dépendante de l'uniformité du WGA. La moyenne de distorsion allélique était de 40 % et est inférieure à celle observée dans l'étude publiée par Lohr *et al.*. Les échantillons de cellules uniques présentent une distorsion allélique plus grande que les échantillons contenant plusieurs CTC expliquant la différence de résultats avec Lohr *et al.*. Contrairement à l'étude publiée par Polzer *et al.*, nous avons observé que les régions non couvertes ne sont pas identiques ce qui témoigne que toutes les régions du génome peuvent être correctement amplifiées par le WGA. Bien que le séquençage de *pools* de CTC ne permet pas d'étudier finement l'hétérogénéité mutationnelle de chacune des CTC de l'échantillon, cette approche permet d'obtenir des résultats de séquençage de très bonne qualité et de limiter le nombre d'échantillon à séquencer. Cela permet de réduire les coûts et d'être intéressant dans le cadre d'une application clinique.

Chez deux patients analysés plus en profondeur du fait de l'hétérogénéité phénotypique de leur CTC, nous avons observé que cinq et quatre échantillons de CTC épithéliales individuelles suffisaient pour couvrir respectivement 59 % et 33 % des mutations de la biopsie. De plus, pour ces deux patients le pourcentage de mutations communes partagées augmente peu en cumulant l'analyse d'échantillons supplémentaires. Cela signifie que dans les CTC, les mutations retrouvées sont récurrentes et doivent conférer un potentiel de dissémination et un potentiel métastatique aux CTC. Ces résultats diffèrent de ceux publiés par Lohr *et al.* qui ont rapporté la nécessité de réaliser 19 exomes de CTC uniques pour couvrir l'ensemble du génome et détectés les variants présents dans les biopsies des patients. Nous

avons rapporté pour la première fois l'identification de mutations exclusivement présentes dans les CTC par le développement d'une approche bio-informatique permettant de distinguer les véritables mutations des erreurs produites par le WGA. Ces mutations spécifiques aux CTC sont présentes dans tous les phénotypes de CTC et affectent particulièrement les gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette, la réparation de l'ADN, l'invasion et les gènes « *cancer drivers* ». Cependant, ces mutations sont minoritaires et suggèrent qu'elles sont possiblement issues de d'autres métastases ou bien qu'elles sont présentes à une faible fréquence allélique dans la biopsie.

Ce travail montre que le séquençage d'un faible nombre de CTC individuelles peut refléter une partie significative du contenu génomique d'une biopsie et permettre d'identifier des clones tumoraux dominants susceptibles d'avoir un rôle dans la dissémination métastatique. De plus, nous démontrons pour la première fois que les CTC peuvent révéler des aberrations génomiques non diagnostiquées dans la biopsie de métastase étudiée, et sont donc représentatives de l'hétérogénéité tumorale. Sur la base des mutations partagées avec les biopsies et des mutations spécifiques aux CTC, la réalisation d'une classification hiérarchique des CTC a révélé l'existence de mutations partagées entre les CTC de différents phénotypes. Certaines cellules caractérisées par un noyau supérieur à 16  $\mu\text{m}$  mais n'exprimant pas de marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux présentent des mutations communes avec des CTC épithéliales suggérant l'existence d'un ancêtre commun mais une évolution différente pendant le processus métastatique. Ce travail met en évidence l'intérêt des CTC pour identifier des cibles thérapeutiques en médecine de précision pour une sélection optimale des traitements.

La compréhension du potentiel de cellules initiatrices de tumeurs des CTC, de leur biologie et de leurs mécanismes de résistance aux drogues nécessite le développement de modèles de xénogreffes dérivées de CTC ou de lignées cellulaires dérivées de CTC. Actuellement des CDX sont rapportés dans le cancer du sein, dans le CBPC, le CBNPC et dans le mélanome [Baccelli I. *et al.*, Nat Biotechnol, 2013 ; Girotti M. R. *et al.*, Cancer Discov, 2016 ; Hodgkinson C. L. *et al.*, Nat Med, 2014 ; Morrow C. J. *et al.*, Ann Oncol, 2016]. L'établissement et la caractérisation d'une lignée cellulaire dans le cancer du côlon [Cayrefourcq L. *et al.*, Cancer Res, 2015] et d'un modèle d'organoïdes dans le cancer de la prostate [Gao D. *et al.*, Cell, 2014] ont également été rapporté. Le deuxième objectif de ma thèse a été de développer et de caractériser des modèles de CDX dans le CBNPC et dans le cancer de la prostate. Nous rapportons l'établissement et la caractérisation de quatre modèles de CDX chez des patients atteints de CBNPC et le premier modèle de CDX dans le cancer de la prostate. Concernant les modèles de CDX de CBNPC, trois patients sur quatre présentaient des comptes élevés de CTC par le CellSearch et un patient présentait seulement dix CTC détectées par le CellSearch. Le groupe de Caroline Dive a rapporté l'établissement d'un CDX de CBNPC à partir de CTC mésenchymateuses d'un patient car aucune CTC n'avait été détectée par le CellSearch [Morrow C. J. *et al.*, Ann Oncol, 2016].

Nous observons que même si le nombre de CTC épithéliales implantées est important, ce n'est probablement pas le seul facteur nécessaire à l'établissement de CDX. Étant donné que pour chacun des patients, au moment de la xénogreffe, des CTC ont été enrichies et conservées, il serait intéressant de comparer les profils mutationnels ou les profils de CNV des CTC des patients ayant permis le développement des CDX et de ceux n'ayant pas permis de développer un CDX. Carter L. *et al.* ont montré que l'analyse des aberrations du nombre de copies dans les CTC de patients atteints de CBPC avant le début de leur traitement permettait de classer les patients sensibles et les patients réfractaires à la chimiothérapie [Carter L. *et al.*, Nat Med, 2017]. De plus, les patients classés comme des patients résistants à la chimiothérapie par l'étude des CNA dans les CTC présentent une PFS plus courte que ceux classés comme des patients sensibles à la chimiothérapie. L'étude rétrospective des CNA des CTC ayant permis le développement de CDX et de celles n'ayant pas permis le développement de CDX pourrait éventuellement permettre d'identifier des profils spécifiques pour les CTC ayant un potentiel tumorigénique. D'autre part, Baccelli *et al.* ont montré que les CTC de patientes atteintes de cancers du sein ayant ce potentiel de cellules initiatrices de tumeur exprimaient les marqueurs EpCAM, CD44, CD47 et MET [Baccelli I. *et al.*, Nat Biotechnol, 2013]. La lignée cellulaire dérivée de CTC dans le cancer du côlon décrite par Cayrefourcq *et al.* exprime également des marqueurs de cellules souches cancéreuses [Cayrefourcq L. *et al.*, Cancer Res, 2015]. Nos trois lignées cellulaires établies à partir de tumeurs de CDX expriment toutes les marqueurs CD133 et CD166. La recherche de l'expression de ces deux marqueurs dans les CTC pourrait éventuellement permettre d'identifier le phénotype des CTC possédant un potentiel de cellules initiatrices de tumeurs. Pour les CDX de CBNPC, les résultats de la caractérisation phénotypique de ces modèles révèlent que les CDX et les lignées cellulaires « miment » le phénotype des biopsies des patients avec pour certains une acquisition de marqueurs neuroendocrines. La caractérisation moléculaire par séquençage de l'exome des CDX et des lignées cellulaires et leur comparaison avec les biopsies révèlent une grande similarité mutationnelle entre les biopsies, les CDX et les lignées cellulaires. Ces résultats valident les modèles et appuient leur utilité pour étudier la biologie des CTC, les bases mécanistiques de leur capacité à initier des tumeurs et leur résistance aux drogues. Le CDX et la lignée cellulaire du modèle GR-CDXL1 sont caractérisés par une charge mutationnelle importante et de nombreuses anomalies du nombre de copies suggérant une instabilité génomique importante. L'étude du stress réplicatif de cette lignée cellulaire est concordante avec cette observation. Ces cellules sont caractérisées par une progression ralentie des fourches de réplication, par un nombre élevé de cassures double brin pendant la phase S du cycle cellulaire et par la surexpression de protéines des points de contrôle du cycle cellulaire ainsi que de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Nous rechercherons si des profils similaires sont observés dans les autres CDX de CBNPC mais également dans le CDX de cancer de la prostate. Notre hypothèse est

que le stress réplicatif et l'instabilité génomique importante de la lignée cellulaire GR-CDXL1 pourraient avoir un rôle dans son potentiel tumorigénique et sa résistance accrue aux drogues. De façon intéressante, Alix-Panabières *et al.* ont montré que la caractérisation de la lignée cellulaire établie par Cayrefourcq *et al.* présente une expression différentielle de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, dans le métabolisme des cellules ainsi que des gènes connus comme étant exprimés dans les cellules souches cancéreuses [Alix-Panabieres C. *et al.*, Clin Chem, 2017].

La réalisation de tests pharmacologiques *in vitro* sur la lignée GR-CDXL1 « mime » la résistance au cisplatine et au docétaxel observée chez le patient. Les tests pharmacologiques avec des inhibiteurs du cycle cellulaire sont en cours *in vitro*. Les tests pharmacologiques *in vivo* avec les chimiothérapies cisplatine et paclitaxel sont en cours pour les quatre CDX de CBNPC.

Notre CDX de cancer de la prostate est un modèle unique. La caractérisation histologique et moléculaire de l'ensemble des échantillons de la tumeur primaire du patient, des CTC, du CDX et de la lignée cellulaire valide le modèle et montre son utilité pour comprendre la résistance aux traitements dans le cancer de la prostate. La caractérisation phénotypique de la lignée cellulaire révèle l'expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses. La comparaison des immunohistochimies des échantillons de la tumeur primaire du CDX et de la lignée cellulaire révèle la perte d'expression des marqueurs AR et PSA dans le CDX et la lignée cellulaire pouvant témoigner de l'évolution de la maladie et de son indépendance vis-à-vis des androgènes. L'acquisition du marqueur neuroendocrine chromogranine A par le CDX et la lignée cellulaire en témoigne également. La caractérisation moléculaire de ce modèle par séquençage de l'exome montre que l'ensemble des échantillons de la tumeur primaire, mais pas les échantillons de CTC et le CDX, présentent une mutation du gène *FOXA1*. Ce gène est retrouvé muté dans 3 % des tumeurs primaire et 12 % de métastases de cancer de la prostate et constitue un sous-type moléculaire de cancer de la prostate [Cancer Genome Atlas Research Network, Cell, 2015 ; Robinson D. *et al.*, Cell, 2015]. Dans ce modèle, nous remarquons une très grande hétérogénéité moléculaire des différents échantillons de la tumeur primaire. Cependant peu de mutations des échantillons de la tumeur primaire sont retrouvées dans les CTC et le CDX (2,3 %) témoignant de la perte de l'hétérogénéité de la tumeur primaire dans les CTC et le CDX et de la sélection d'anomalies indispensables à l'évolution de la maladie. En revanche, 82 % des mutations communes entre les échantillons de la tumeur primaire et les CTC sont retrouvées dans le CDX. Ceci valide notre CDX d'un point de vue du profil mutationnel. Ce CDX et la lignée cellulaire associée permettront de tester des molécules et d'étudier les mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses de ce modèle. Les résultats du séquençage d'exome des huit échantillons de tumeur primaire, de sept échantillons de CTC, du CDX et de la lignée cellulaire permettront d'établir un arbre de l'évolution mutationnelle de la maladie au diagnostic jusqu'au prélèvement de CTC pour la xénogreffe et

permettra, chez ce patient, d'identifier les mutations clonales et sous-clonales dans les différents échantillons recueillis.

Pour finir, en plus de la caractérisation phénotypique et moléculaire par séquençage d'exome de l'ensemble des CDX de CBNPC et de cancer de la prostate, des collaborations se mettent en place pour la réalisation d'études transcriptomiques et métabolomiques. Les données de transcriptome permettront de détecter la surexpression ou la répression de gènes de la TEM, de mettre en évidence des signatures de cellules souches cancéreuses. Des études de protéomiques permettront d'identifier les processus cellulaires altérés dans l'ensemble de ces modèles. Également des études épigénétiques permettront d'étudier la régulation génique et de relier les profils obtenus avec les réponses aux drogues. A terme ces modèles nous permettront d'aborder l'étude des mécanismes biologiques qui sous-tendent le potentiel tumorigénique et la capacité métastatique de sous-populations de CTC ainsi que leur ciblage pharmacologique.

L'analyse génomique menée dans ce travail montre à la fois un certain degré de similarité entre les CTC et les biopsies tumorales mais aussi l'existence de mutations propres au CTC, non diagnostiquées dans la biopsie tumorale. Il ouvre ainsi des perspectives intéressantes pour l'utilisation de ces cellules en médecine de précision. Les modèles de CDX sont informatifs de la diversité génomique et l'évolution de ces tumeurs dont ils sont issus. Ils pourront être utilisés pour étudier les mécanismes biologiques qui supportent le potentiel métastatique des CTC. Enfin ces modèles sont des outils intéressants qui « miment » la tumeur des patients et offrent la possibilité de réaliser des tests pharmacologiques à haut débit *in vitro* et de confirmer des résultats prometteurs *in vivo*.

# Références

Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC *et al.* Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014; 158: 1110-1122.

Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends Cancer* 2015; 1: 44-52.

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: 137-144.

Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 834-846.

Alix-Panabieres C, Cayrefourcq L, Mazard T, Maudelonde T *et al.* Molecular Portrait of Metastasis-Competent Circulating Tumor Cells in Colon Cancer Reveals the Crucial Role of Genes Regulating Energy Metabolism and DNA Repair. *Clin Chem* 2017; 63: 700-713.

Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 623-631.

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: 1411-1417.

Alix-Panabieres C, Pierga JY. [Circulating tumor cells: liquid biopsy]. *Bull Cancer* 2014; 101: 17-23.

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: 537-539.

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: 6897-6904.

Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP *et al.* Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008; 14: 79-89.

Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B *et al.* AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 1028-1038.

Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. . *Australian Medical Journal*. 1869; 14: 146-147.

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: 2912-2918.



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: 2090-2101.

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: 539-544.

Balic M, Lin H, Young L, Hawes D *et al.* Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5615-5621.

Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW *et al.* The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol* 2013; 64: 567-576.

Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009; 457: 608-611.

Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y *et al.* Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 2014; 371: 424-433.

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: 406-414.

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.

Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S *et al.* TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-R111 and p38alpha/beta signalling. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 1351-1361.

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.

Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P *et al.* An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 279-290.

Byrne AT, Alferez DG, Amant F, Annibaldi D *et al.* Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 254-268.

Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV *et al.* Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000; 60: 2541-2546.

Cancer Genome Atlas Research N. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 2015; 163: 1011-1025.

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.

Carter L, Rothwell DG, Mesquita B, Smowton C *et al.* Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nat Med* 2017; 23: 114-119.

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.

Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E *et al.* International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 2012; 61: 1079-1092.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 563-572.

Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF *et al.* Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 535-546.

Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenias S, Miliuskas S *et al.* Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced, non-small-cell lung cancer with poor prognosis (TITAN): a randomised multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012; 13: 300-308.

Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J *et al.* IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015; 522: 345-348.

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: 3213-3221.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124: 263-266.

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: 781-791.

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: 1420-1430.

Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; 5 Suppl 5: S463-478.

de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K *et al.* Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011; 364: 1995-2005.

de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S *et al.* Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 2010; 376: 1147-1154.

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: 6302-6309.

De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 97-110.

De Luca F, Rotunno G, Salvianti F, Galardi F *et al.* Mutational analysis of single circulating tumor cells by next generation sequencing in metastatic breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 26107-26119.

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: 1384-1392.

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: 427-441.

Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest* 2017; 151: 193-203.

Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 44-46.

Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML *et al.* Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 6169-6177.

Dumont N, Liu B, Defilippis RA, Chang H *et al.* Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia* 2013; 15: 249-262.

Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J *et al.* Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell* 2011; 19: 372-386.

Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL *et al.* The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1228-1242.

Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* 2010; 17: 135-147.

Escriva M, Peiro S, Herranz N, Villagrasa P *et al.* Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 1528-1540.

Ewing J. *Neoplastic Diseases* 1928;

Fabrizi 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: 225-231.

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: 847-853.

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: 403-412.

Fidler IJ, Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 1199-1202.

Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015; 527: 472-476.

Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N *et al.* Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2017; 377: 352-360.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.

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: 662-673.

Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y *et al.* Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94: 715-725.

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 253-268.

Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 2001; 166: 5398-5406.

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; 6: 1118-1133.

Gao D, Vela I, Sboner A, laquinta PJ *et al.* Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014; 159: 176-187.

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: 764-779.

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: 252-260.

Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 123-134.

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: 286-299.

Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T *et al.* IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* 2010; 24: 241-255.

Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S *et al.* Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 149-158.

Gulbahce N, Magbanua MJM, Chin R, Agarwal MR *et al.* Quantitative Whole Genome Sequencing of Circulating Tumor Cells Enables Personalized Combination Therapy of Metastatic Cancer. *Cancer Res* 2017; 77: 4530-4541.

Hall CL, Dubyk CW, Riesenberger TA, Shein D *et al.* Type I collagen receptor (alpha2beta1) signaling promotes prostate cancer invasion through RhoC GTPase. *Neoplasia* 2008; 10: 797-803.

Hart IR, Fidler IJ. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* 1980; 40: 2281-2287.

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: 4218-4224.

Hayward SW, Wang Y, Cao M, Hom YK *et al.* Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res* 2001; 61: 8135-8142.

Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M *et al.* Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res* 2013; 73: 2965-2975.

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.

Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527: 329-335.

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: 525-532.

Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM *et al.* The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol* 2016; 70: 106-119.

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: 2894-2904.

Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, Adachi M *et al.* Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1547-1555.

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: 2907-2913.

James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD *et al.* STAMPEDE trial and patients with non-metastatic prostate cancer - Authors' reply. *Lancet* 2016; 388: 235-236.

James ND, Sydes MR, Mason MD, Clarke NW *et al.* Docetaxel and/or zoledronic acid for hormone-naïve prostate cancer: First overall survival results from STAMPEDE (NCT00268476). *ASCO Annual Meeting* 2015.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.

Jenkins S, Chih-Hsin Yang J, Janne PA, Thress KS *et al.* EGFR Mutation Analysis for Prospective Patient Selection in Two Phase II Registration Studies of Osimertinib. *J Thorac Oncol* 2017; 12: 1247-1256.

Jiang R, Lu YT, Ho H, Li B *et al.* A comparison of isolated circulating tumor cells and tissue biopsies using whole-genome sequencing in prostate cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 44781-44793.

Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-Morse N *et al.* Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004; 5: 443-453.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392-401.

Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 411-422.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-827.

Kim DW, Tiseo M, Ahn MJ, Reckamp KL *et al.* Brigatinib in Patients With Crizotinib-Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol* 2017; 35: 2490-2498.

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: 4494-4499.

Kobayashi A, Okuda H, Xing F, Pandey PR *et al.* Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med* 2011; 208: 2641-2655.

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: 129-144.

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: 1556-1563.

Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014; 14: 275-291.

Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009; 15: 195-206.

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: 576-590.

Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E3053-3061.

Labelle M, Hynes RO. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov* 2012; 2: 1091-1099.

Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 2017; 168: 670-691.

Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E *et al.* The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 5311-5320.

Lawson DA, Bhakta NR, Kessenbrock K, Prummel KD *et al.* Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* 2015; 526: 131-135.

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: 2091-2097.

Li Y, Wang L, Pappan L, Galliher-Beckley A *et al.* IL-1beta promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. *Mol Cancer* 2012; 11: 87.

Lindsay CR, Faugeron V, Michiels S, Pailler E *et al.* A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups. *Ann Oncol* 2017; 28: 1523-1531.

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.

Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J *et al.* Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* 2007; 109: 4336-4342.

Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, Choudhury AD *et al.* Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 479-484.

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: 865-873.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S *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.

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: 366-377.

Malladi S, Macalinao DG, Jin X, He L *et al.* Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* 2016; 165: 45-60.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715.

Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1070-1078.

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 castrationresistant prostate cancer: a report from the PETRUS prospective study. *Oncotarget* 2016;

Matikas A, Voutsina A, Lagoudaki E, Hatzidaki D *et al.* Detection of KRAS Exon 2 Mutations in Circulating Tumor Cells Isolated by the ISET System from Patients with RAS Wild Type Metastatic Colorectal Cancer. *Transl Oncol* 2017; 10: 693-698.

Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH *et al.* Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 168: 689-695.

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S *et al.* Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8152-8162.

Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC *et al.* Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376: 629-640.

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947-957.

Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F *et al.* EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002723.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008; 3: e2888.

Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ *et al.* Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005; 65: 713-718.

Morrow CJ, Trapani F, Metcalf RL, Bertolini G *et al.* Tumourigenic non-small-cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: a clinical case study. *Ann Oncol* 2016; 27: 1155-1160.

Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 839-849.

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: 1235-1239.

Ni X, Zhuo M, Su Z, Duan J *et al.* Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 21083-21088.



Nieminuszczy J, Schwab RA, Niedzwiedz W. The DNA fibre technique - tracking helicases at work. *Methods* 2016; 108: 92-98.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. *Cell* 2016; 166: 21-45.

Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27: v1-v27.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014; 41: 49-61.

Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G *et al.* Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* 2012; 22: 709-724.

Ohlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med* 2014; 211: 1503-1523.

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.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59: 5002-5011.

Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, Vanharanta S *et al.* Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 2011; 17: 867-874.

Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ *et al.* Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1616-1622.

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: 179ra147.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500.

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: 2273-2281.

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: 1408-1415.

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.

Pailler E, Oulhen M, Borget I, Remon J *et al.* Circulating Tumor Cells with Aberrant ALK Copy Number Predict Progression-Free Survival during Crizotinib Treatment in ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Res* 2017; 77: 2222-2230.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM *et al.* Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 2007; 110: 133-141.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM *et al.* Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005; 105: 178-185.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J *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: 13306-13311.

Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A *et al.* Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 Suppl 5: v69-77.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253: 180-204.

Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B *et al.* Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 302-317.

Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S *et al.* Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 377: 829-838.

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: 7004-7010.

Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet PJ *et al.* Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 984-993.

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: 1371-1386.

Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 2014; 16: 488-494.

Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H *et al.* Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One* 2010; 5: e12517.

Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475: 222-225.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010; 141: 39-51.

Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; 19: 1423-1437.

Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR *et al.* Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456: 593-598.

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: 214-221.

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: 777-782.

Reck M, Rabe KF. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 377: 849-861.

Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ *et al.* Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1167-1176.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.

Riethdorf S, Muller V, Loibl S, Nekljudova V *et al.* Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells for Breast Cancer Patients Treated in the Neoadjuvant "Geparquattro" Trial. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 5384-5393.

Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N *et al.* Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell* 2015; 162: 454.

Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 1996; 76: 69-125.

Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A *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.

Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R *et al.* Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 958-967.

Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F *et al.* Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 152-160.

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: 14524-14529.

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: 1241-1250.

Saxena M, Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2011; 2: e179.

Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME *et al.* Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 2012; 367: 1187-1197.

Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B *et al.* Phenotypic Heterogeneity of Circulating Tumor Cells Informs Clinical Decisions between AR Signaling Inhibitors and Taxanes in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res* 2017;

Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL *et al.* Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 2014; 384: 2027-2035.

Seitz AK, Thoene S, Bietenbeck A, Nawroth R *et al.* AR-V7 in Peripheral Whole Blood of Patients with Castration-resistant Prostate Cancer: Association with Treatment-specific Outcome Under Abiraterone and Enzalutamide. *Eur Urol* 2017; 72: 828-834.

Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3: 75ra26.

Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K *et al.* Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3327-3334.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169-181.

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: 1189-1197.

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: 2385-2394.

Shibue T, Brooks MW, Inan MF, Reinhardt F *et al.* The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. *Cancer Discov* 2012; 2: 706-721.

Shibue T, Brooks MW, Weinberg RA. An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization. *Cancer Cell* 2013; 24: 481-498.

Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 611-629.

Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC *et al.* Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev* 2011; 25: 2465-2479.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 531-548.

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: 2167-2177.

Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Bex G *et al*. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2006; 131: 830-840.

Spiegel A, Brooks MW, Houshyar S, Reinhardt F *et al*. Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells. *Cancer Discov* 2016; 6: 630-649.

Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S *et al*. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5145-5151.

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: 18392-18397.

Strati A, Koutsodontis G, Papaxoinis G, Angelidis I *et al*. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2017; 28: 1923-1933.

Su S, Liu Q, Chen J, Chen J *et al*. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 2014; 25: 605-620.

Suardi N, Capitanio U, Chun FK, Graefen M *et al*. Currently used criteria for active surveillance in men with low-risk prostate cancer: an analysis of pathologic features. *Cancer* 2008; 113: 2068-2072.

Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F *et al*. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009; 28: 2940-2947.

Sweeney C, Chen Y, Carducci MA, Liu G *et al*. Impact on overall survival (OS) with chemohormonal therapy versus hormonal therapy for hormone-sensitive newly metastatic prostate cancer (mPrCa): An ECOG-led phase III randomized trial. *ASCO Annual Meeting* 2014.

Talasaz 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: 3970-3975.

Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 739-752.

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: 23251-23262.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J *et al.* Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1502-1512.

Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ *et al.* Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 529-534.

Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC *et al.* Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015; 21: 560-562.

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: 3507-3513.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87-108.

Ulmer A, Schmidt-Kittler O, Fischer J, Ellwanger U *et al.* Immunomagnetic enrichment, genomic characterization, and prognostic impact of circulating melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 531-537.

Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E *et al.* Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004; 6: 625-630.

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: 5955-5960.

Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F *et al.* Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 2004; 18: 1131-1143.

Vogelzang NJ, Fizazi K, Burke JM, De Wit R *et al.* Circulating Tumor Cells in a Phase 3 Study of Docetaxel and Prednisone with or without Lenalidomide in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* 2017; 71: 168-171.

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.

Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S *et al.* Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell* 2012; 22: 91-105.

Wu DW, Lee MC, Hsu NY, Wu TC *et al.* FHIT loss confers cisplatin resistance in lung cancer via the AKT/NF-kappaB/Slug-mediated PUMA reduction. *Oncogene* 2015; 34: 2505-2515.

Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP *et al.* Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 2005; 123: 641-653.

Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M *et al.* Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2177-2184.

Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS *et al.* Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2240-2247.

Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F *et al.* Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014; 345: 216-220.

Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivas V *et al.* Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet* 2012; 44: 852-860.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 2015; 527: 525-530.

Zhu L, Gibson P, Currie DS, Tong Y *et al.* Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 2009; 457: 603-607.

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.

# Annexes

**CHAPITRE DE LIVRE 1. Detection and Characterization of gene rearrangements in Circulating Tumor Cells. Adv Exp Med Biol. 2017;994:169-179**

Publication reproduite avec l'autorisation de Springer Science+Business Media LLC, Advances in Experimental Medicine and Biology, copyright 2017.

**CHAPITRE DE LIVRE 2. Filter-Adaptated-Fluorescent In Situ Hybridization (FA-FISH) for Filtration-Enriched Circulating Tumor Cells. Methods Mol Biol. 2017;1634:133-141.**

Publication reproduite avec l'autorisation de Springer Science+Business Media LLC, Methods in Molecular Biology, copyright 201



# Chapter 9

## Detection of Gene Rearrangements in Circulating Tumor Cells: Examples of *ALK*-, *ROS1*-, *RET*-Rearrangements in Non-Small-Cell Lung Cancer and *ERG*-Rearrangements in Prostate Cancer

Cyril Catelain, Emma Pailler, Marianne Oulhen, Vincent Faugeron, Anne-Laure Pommier, and Françoise Farace

**Abstract** Circulating tumor cells (CTCs) hold promise as biomarkers to aid in patient treatment stratification and disease monitoring. Because the number of cells is a critical parameter for exploiting CTCs for predictive biomarker's detection, we developed a FISH (fluorescent *in situ* hybridization) method for CTCs enriched on filters (filter-adapted FISH [FA-FISH]) that was optimized for high cell recovery. To increase the feasibility and reliability of the analyses, we combined fluorescent staining and FA-FISH and developed a semi-automated microscopy method for optimal FISH signal identification in filtration-enriched CTCs. Here we present

---

Cyril Catelain and Emma Pailler are contributed equally to the manuscript.

C. Catelain • M. Oulhen • A.-L. Pommier

Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, “Circulating Tumor Cells” Translational Platform, AMMICA CNRS UMS3655 – INSERM US23, 114 rue Édouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France

INSERM, U981 “Identification of Molecular Predictors and New Targets for Cancer Treatment”, 114 rue Édouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France

e-mail: [cyril.catelain@gustaveroussy.fr](mailto:cyril.catelain@gustaveroussy.fr); [marianne.oulhen@gustaveroussy.fr](mailto:marianne.oulhen@gustaveroussy.fr); [anne-laure.pommier@gustaveroussy.fr](mailto:anne-laure.pommier@gustaveroussy.fr)

E. Pailler • V. Faugeron • F. Farace (✉)

Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, “Circulating Tumor Cells” Translational Platform, AMMICA CNRS UMS3655 – INSERM US23, 114 rue Édouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France

INSERM, U981 “Identification of Molecular Predictors and New Targets for Cancer Treatment”, 114 rue Édouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France

Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, 114 rue Édouard Vaillant, F-94270 Le Kremlin-Bicetre, France

e-mail: [emma.pailler@gustaveroussy.fr](mailto:emma.pailler@gustaveroussy.fr); [vincent.faugeron@gustaveroussy.fr](mailto:vincent.faugeron@gustaveroussy.fr); [francoise.farace@gustaveroussy.fr](mailto:francoise.farace@gustaveroussy.fr)

© Springer International Publishing AG 2017

M.J.M. Magbanua, J.W. Park (eds.), *Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells*, Advances in Experimental Medicine and Biology 994, DOI 10.1007/978-3-319-55947-6\_9

169

these methods and their use for the detection and characterization of *ALK*-, *ROS1*-, *RET*-rearrangement in CTCs from non-small-cell lung cancer and *ERG*-rearrangements in CTCs from prostate cancer patients.

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

## 9.1 Introduction

Chemotherapy remains an important mode of treatment for many cancers but is slowly being supplemented by a new generation of targeted therapies directed against specific molecular alterations in cancer cells which has proven to be more effective with markedly fewer side effects. In current practice, biomarkers predicting response to therapy could be assessed either in the primitive tumor tissue taken at diagnosis or in tumor biopsy samples (metastasis) collected during the course of the disease. Primitive tumor tissue can be difficult to obtain in patients with certain tumor types such as non-small-cell lung cancer (NSCLC). Subjecting patients to biopsies could be invasive, in some cases challenging, and associated with risk. Even in case such as prostate cancer (PCa) where the primary tissue is available, the samples may not be representative of a patient's metastatic disease which may arise many years after diagnosis. Therefore, a key challenge today is to overcome the hurdle of tumor tissue and single-biopsy sample availability.

NSCLC is the most frequent type of lung cancer and the most common cause of death from cancer (Jemal et al. 2011). Treatment paradigms for NSCLC have considerably evolved toward a stratification of patients in molecularly selected subsets who can be effectively treated by therapies targeting mutant driver oncogenes. Small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) targeting single driver oncogenic pathways essential for tumor cell survival have demonstrated high objective response rates in molecularly defined NSCLC patients harboring *epidermal growth factor receptor (EGFR)* gene mutations or *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* fusion genes (Shames and Wistuba 2014; Oxnard et al. 2013; Sequist et al. 2007; Shaw et al. 2013). The list of NSCLC driver oncogenes includes three fusion genes namely *ALK*, *c-ros oncogene 1 (ROS1)* and *ret proto-oncogene (RET)* (Soda et al. 2007; Kohno et al. 2012; Rikova et al. 2007). The most prevalent *ALK*-rearrangement consists in a fusion gene between the *ALK* gene and *echinoderm microtubule associated protein-like 4 (EML4)* which has been identified in 4% of unselected patients with NSCLC (Chiarle et al. 2008; Pao and Girard 2011), while a range of different *ALK*-gene fusions can occur (Hallberg and Palmer 2016). *ALK* is the only gene rearrangement diagnosed in routine using either fluorescence *in situ* hybridization (FISH) or more recently immunochemistry (Kerr and Lopez-Rios 2016). *ALK*-rearranged patients can benefit from *ALK* inhibitor therapies such as crizotinib, alectinib or ceritinib (Solomon and Soria 2016). 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. To ensure identification of *ALK*-rearranged patients most likely to benefit, the FDA approved crizotinib concurrently with a companion diagnostic test, the Vysis *ALK* Break Apart FISH Probe Kit. *ROS1* fusion genes have been identified in ~1% of NSCLC (Bergethon et al. 2012; Gainor and Shaw 2013). 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 (Davies and Doebele 2013). Patients with *ROS1*-rearranged NSCLC can also benefit from crizotinib therapy. *RET*-rearrangement gene was found in lung adenocarcinoma patients for the first time in 2012 by four independent groups (Kohno et al. 2012; Ju et al. 2012; Lipson et al. 2012; Takeuchi et al. 2012). Approximately 1% of lung adenocarcinomas were reported to harbor a novel gene fusion involving the *RET* tyrosine kinase gene partnered with either *kinesin family member 5B (KIF5B)* or *coiled-coil domain containing 6 (CCDC6)*. Because surgery is frequently not a component of treatment in NSCLC, the diagnosis of molecular biomarkers is usually done in small tumor biopsies or fine needle aspirates which are challenging as mentioned above. Furthermore, the diagnosis of biomarkers is often hindered by the limited tumor tissue quantities available.

PCa is the commonest cancer in men accounting for 10% for all cancer-related death. Androgen-deprivation therapy is a standard of care treatment for PCa and efficiently controls the growth of androgen-dependent tumors. Unfortunately, the majority of these cancers ultimately become refractory to hormone deprivation and emerges as castration resistant (Tannock et al. 2004). The treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients has dramatically changed in the last 5 years thank to the development of active drugs such as the chemotherapy agent cabazitaxel, the androgen receptor (AR) pathway inhibitors abiraterone acetate and enzalutamide, and the immunotherapy sipuleucel-T (Kantoff et al. 2010; Ryan et al. 2013; Scher et al. 2012). However, not all patients benefit from all these agents and predictive biomarkers are needed to assess clinical response and guide treatment. The fusion between the androgen-regulated *transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)* gene promoter and *v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG)* genes, *AR* amplification and alterations in PI3K/AKT/mTOR pathway are used to classify mCRPC patients into molecular subgroups. Although these biomarkers currently have no direct relevance for a therapeutic decision, it is expected that future treatments entering the clinic in mCRPC will be rationally delivered in molecularly selected patient populations, according to the presence of these biomarkers. The molecular characterization of cancer samples is hampered by the availability of metastatic tumor tissue in mCRPC patients. Metastasis biopsy is challenging to perform in daily practice, as the metastatic disease is often located to the bone.

Finding more effective means to identify predictive biomarkers which could aid in treatment decision or patient stratification is a major clinical issue in NSCLC and mCRPC patients. Peripheral blood represents an easily accessible and non-invasive source of spreading tumor cells. Circulating tumor cells (CTCs) which migrate from primitive tumor or metastatic sites are the main route of metastatic

dissemination and may contain clones with tumorigenic potential (Baccelli et al. 2013). In contrast to tumor biopsies, CTCs offer an attractive option to identify molecular biomarkers, which could be easily repeated during treatment providing longitudinal information on the selected biomarker. Moreover CTCs may be released from various metastatic sites and have been reported to reflect the tumor heterogeneity (Heitzer et al. 2013; Massard et al. 2016). In order to identify and characterize biomarkers in CTCs from NSCLC and mCRPC patients, our approach was first to develop a FISH method called FA-FISH to directly detect gene rearrangements in filtration-enriched CTCs. Secondly, to increase the feasibility and reliability of this method, we combined fluorescent staining and FISH and developed a semi-automated microscopy method optimized for FISH signals detection in filtration-enriched CTCs. Using these methods, we examined *ALK*-, *ROS1*- and *RET*-rearrangements in CTCs from NSCLC patients, as well as *ERG*-rearrangements in mCRPC patients. Here, we report our experience in the detection and characterizations of CTCs harboring these gene rearrangements.

## 9.2 Development of the FA-FISH Method and the Semi-automated Analysis of CTCs Captured on Filters

### 9.2.1 *The FA-FISH (Filter Adapted - Fluorescent In Situ Hybridization) Method*

In 2011 we reported a study showing higher CTC recovery in metastatic NSCLC and PCa patients using ISET (isolation by size of epithelial tumor cells) filtration technique (Farace et al. 2011). As the number of CTCs is a critical parameter to identify molecular biomarkers, we decided to develop FISH for CTCs enriched on filters (FA-FISH) (Pailler et al. 2013). A 1-mL sample of blood will typically contain five to ten million leukocytes, five billion erythrocytes, and a very small number of rare circulating cells, including CTCs. The filtration techniques are based on the observation that tumor cells of most types of solid cancers are most often larger than blood cells (leukocytes and erythrocytes). The ISET system uses filters designed to allow the elimination of all erythrocytes and most leukocytes from the sample. ISET filters are composed of ten spots. After filtration, one ISET spot typically retain leucocytes (ranging from 6000 to 20,000, mostly granulocytes) and fifty non-hematopoietic cells among which are found CTCs. Each spot (corresponding to filtration of 1 mL of blood) could be precisely cut out for independent analyzes.

The FA-FISH method required several technical optimizations compared to the FISH method established for tissue or cell slides. The first step was to determinate the optimal incubation time required for the enzymatic digestion of the cell membrane. Two rounds of fixation of the cells present on the filter have been added in order to preserve the cell integrity. Because the filter membrane inevitably

retains fluorescent background signals, we diminished this background by optimizing the temperature of hybridization for each probe and discarding non-specific staining with stringent washes. This direct FA-FISH method was used to detect *ALK*-rearrangement in ISET-enriched CTCs from *ALK*-rearranged patients showing high specificity and sensibility (Pailler et al. 2013).

### ***9.2.2 Semi-automated Microscopy of Combined Fluorescent Staining and FA-FISH in Filtration-Enriched CTCs***

Manual FISH analyses of filtration-enriched CTCs are time-consuming due to the high numbers of white blood cells DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> retained on the filters, laborious and operator-dependent. Scanner software is commonly able to analyze around 100 cells per tumor sample by FISH. Using standard scanning conditions it was therefore not conceivable to scan all the FISH signals present in the cells (6000–20,000, as mentioned above) retained on a 1 mL ISET spot. To decrease the numbers of cells to scan, we limited the FISH analysis to DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells: this option provided the additional advantage of excluding DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> sub-populations which could occasionally harbor unspecific break apart FISH signals when apoptotic or damaged.

While offering important advantages such as sensitivity of CTC capture and flexibility for CTC characterization, filtration systems such as ISET have drawbacks. One problem is the difficulty 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, we established a multi-step process for optimal FISH signal identification in filtration-enriched CTCs where filters were (i) treated by fluorescent staining, (ii) scanned on the Ariol system and analyzed automatically to locate DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells, (iii) treated by FA-FISH, (iv) scanned in the small regions containing the DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells with specific parameters (z-stacking, step i.e. distance between two z-stacks, exposure time), (v) and analyzed for detection, interpretation and validation of FISH signals within DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells (Pailler et al. 2016).

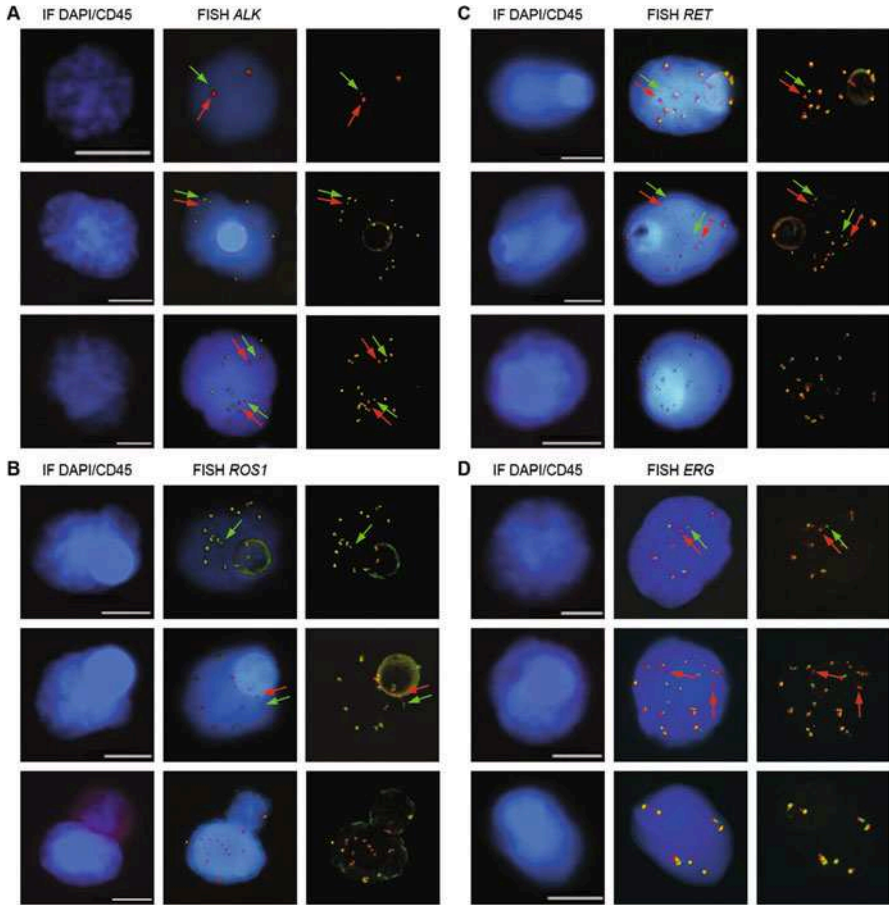
Another advantage of this semi-automated microscopy method is the possibility to combine successive assays on the same filter. Automation allows precise location of cells on filters, thus relocating cell data and images from successive experiments performed on the same filter. The combination of assays increases the amount of available information, contributing to a better characterization of CTCs and reliability of the results. Therefore, data issued from successive experiments may be gathered, further improving and refining CTC characterization.

### 9.3 Detection *ALK*-Rearranged CTCs in NSCLC Patients

After establishing the direct FA-FISH method, we have examined the presence of *ALK*-rearrangement in CTCs of 18 *ALK*-rearranged and 14 *ALK*-negative patients (Pailler et al. 2013). In this report, we showed that the specificity and the sensibility were of 100% at a cutoff value of four *ALK*-rearranged CTCs per 1 mL 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. The concordance between CTCs and tumors were 99.9%. *ALK*-rearrangement patterns were determined in CTCs and compared to those present in tumor biopsies. While heterogeneous patterns (split of the red and green and isolated red signals) were present in tumor biopsies, *ALK*-rearranged CTCs harbored a unique FISH pattern which was associated with either a single copy or a gain of native *ALK* copies consisting in the split of red and green signals (Fig. 9.1a). This unique rearrangement (3'5') was consistently observed in all patient CTCs regardless of the frequency of cells harboring this rearrangement within the tumor specimen, including patients in whom this pattern was not detected in the tumor biopsy. These data suggested that CTCs bearing this unique *ALK*-rearrangement may have acquired invasive and migratory properties that are lacking in tumor cells with other *ALK*-rearrangement patterns. Therefore we tested epithelium-mesenchymal transition (EMT) markers in *ALK*-rearranged CTCs and found that these cells were negative for cytokeratins and E-cadherin and express exclusively mesenchymal markers (vimentin, N-cadherin). When tumor biopsy specimens were analyzed for the epithelial and mesenchymal marker expression, we observed important inter- and intra-tumor heterogeneity for these markers. Interestingly, *ALK* protein expression correlated with a low or absence of epithelial marker expression and higher levels of vimentin expression.

Thus, *ALK*-rearranged CTCs expressed a mesenchymal phenotype contrasting with heterogeneous epithelial and mesenchymal marker expressions in tumors. Overall, our results suggested that CTCs with this unique *ALK*-rearrangement expressing a mesenchymal phenotype may result from the selection of tumor cells that display migratory and higher potential invasive properties. These CTCs may possibly contain highly metastatic cells, such as cancer stem cells or tumor-initiating cells. Although a single tumor biopsy sample might not be representative of the entire tumor, these results suggested that *ALK*-rearranged 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.

Moreover, we detected qualitative and quantitative variations of CTCs bearing abnormal *ALK*-FISH patterns in five patients treated with crizotinib. This result showed that CTCs could possibly help to monitor the impact of *ALK*-inhibitor treatments and guide therapeutic decision during treatment course in *ALK*-rearranged patients.



**Fig. 9.1** 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  $\mu\text{m}$  (Reprinted with permission from Pailler et al. 2016)

#### 9.4 Detection *ROS1*- and *RET*-Rearranged CTCs in NSCLC Patients

Using combined fluorescent staining, and FA-FISH and the semi-automated microscopy method, we evaluated whether *ROS1*-rearrangements could be detected in CTCs from *ROS1*-rearranged NSCLC patients (Pailler et al. 2015). Four *ROS1*-rearranged patients treated by the *ROS1*-inhibitor were examined and CTCs



sampled at two time points (before and during the crizotinib treatment). *ROS1*-rearrangement was in parallel examined in CTCs from four *ROS1*-negative NSCLC patients. 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). The two types of *ROS1* FISH patterns (split of the red and green, isolated green signals) were identified in CTCs (Fig. 9.1b) while only one type was detected in the tumor biopsies. *ROS1*-gene alterations observed in CTCs at baseline from *ROS1*-rearranged patients were compared with those present in tumor biopsies and CTCs during crizotinib treatment. Tumor heterogeneity, assessed by *ROS1* copy number, was significantly higher in baseline CTCs compared with paired tumor biopsies in the three patients experiencing partial response or stable disease. We also observed that the copy number in *ROS1*-rearranged CTCs increased significantly in the two patients who progressed during crizotinib treatment. To further assess the presence of aneuploid CTCs harboring abnormal *ROS1* pattern and their chromosomal instability (CIN) status, we developed two tests: 1/ the measurement of the DNA content by Hoechst 33342 quantification and 2/ a multi-FISH chromosomal method carried out with the AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit (Abbott Molecular, Inc.). Results showed that CTCs from *ROS1*-rearranged patients had high DNA content and high levels of aneuploidy and numerical CIN. Thus, this study provided the first proof-of-concept that CTCs can be used for noninvasive and sensitive detection of *ROS1*-rearrangement in NSCLC patients. Furthermore, CTCs from *ROS1*-rearranged patients showed considerable heterogeneity of *ROS1*-gene abnormalities and elevated numerical CIN, a potential mechanism to escape *ROS1*-inhibitor therapy in *ROS1*-rearranged NSCLC tumors.

More recently, we used the same approach to examine whether *RET*-rearrangements could be detected in CTCs from five NSCLC patients harboring this gene rearrangement in the tumor biopsy. Multiple abnormal FISH patterns including the *RET*-gene rearrangement were observed in CTCs from *RET*-rearranged patients (Fig. 9.1c) (Pailler et al. 2016). Similarly to the results from *ROS1*-rearranged patients, these data indicated a considerable degree of heterogeneity of *RET*-gene abnormalities in CTCs from these patients.

## 9.5 Detection *ERG*-Rearranged CTCs in mCRPC Patients

Recently, our group reported the results of the prospective PETRUS study of biomarker assessment in paired primary prostatic tumors, metastatic biopsies and CTCs from a cohort of 54 mCRPC (Massard et al. 2016). *ERG*-rearrangement was examined in ISET-enriched CTCs using fluorescent staining combined to FA-FISH and the semi-automated microscopy method. Using a negative cohort of ten breast cancer patients, we evaluated the hybridization background of *ERG* probes and found a median value of *ERG*-rearranged cells of 0 cell per 3 mL blood (range 0–6/



3 mL). The median value of *ERG*-rearranged CTCs was 16 per 3 mL (range, 3–57 per 3 mL) in the eight patients exhibiting *ERG*-rearrangement in the metastatic biopsy. The median value of *ERG*-rearranged CTCs was 3 per 3 mL (range, 0–6 per 3 mL) in the nine patients without *ERG*-rearrangement in the metastatic biopsy. At a threshold of seven *ERG*-rearranged CTCs per 3 mL blood, *ERG*-rearrangements were detected in CTCs of seven out of the eight patients exhibiting *ERG*-rearrangements in the metastatic biopsy while all mCRPC patients negative for *ERG*-rearrangements in the biopsy were negative in CTCs. The concordance between CTCs and tumors was of 88%. In contrast to tumor samples, multiple *ERG*-rearrangement patterns were detected in ISET-enriched CTCs indicating a higher heterogeneity of CTCs (Fig. 9.1d). These multiple rearrangement patterns observed in *ERG*-rearranged CTCs were associated with gain of native *ERG* copies far more prevalent than in the tumor samples including metastatic sites.

## 9.6 Conclusion

Although technically challenging, we have established an experimental process and a semi-automated microscopy method allowing to detect gene rearrangements such as *ALK*, *ROS1*, *RET* and *ERG* in filtration-enriched CTCs from NSCLC and mPca patients respectively. By increasing the feasibility and reliability of filtration-enriched CTC assays, this automation method may be helpful to progress towards their standardization and validation. These results are still proofs-of-concept that required to be validated in collaborative efforts with others groups to progress towards to the clinic. These studies also provided information on the biological characteristics of CTCs such as the EMT status of *ALK*-rearranged CTCs and the elevated numerical CIN of *ROS1*-rearranged CTCs. Overall, our results may provide new insights on the role of CTCs in the metastatic progression of these tumors and the mechanism by which tumor cells can escape sensitivity to kinase inhibitor therapy.

**Competing Interests** The authors declare that they have no competing interests.

**Funding** CC is supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-CE17-0006-01). EP is supported by the LabEx LERMIT (grant no ANR-10-LABX-0033-LERMIT) and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no FDT20150532072). VF is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (grants no FDT20160435543). 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 11th 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).

**Author's Contributions** Manuscript drafted by FF and CC. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

## References

- Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S et al (2013) Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 31(6):539–544
- Bergethson K, Shaw AT, Ou SH et al (2012) ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 30(8):863–870
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C et al (2008) The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 8(1):11–23
- Davies KD, Doebele RC (2013) Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 19(15):4040–4045
- Farace F, Massard C, Vimond N et al (2011) A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 105(6):847–853
- Gainor JF, Shaw AT (2013) Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 18(7):865–875
- Hallberg B, Palmer RH (2016) The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol* 27(Suppl 3):iii4–iii15
- Heitzer E, Auer M, Gasch C et al (2013) Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res* 73(10):2965–2975
- Jemal A, Bray F, Center MM et al (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2):69–90
- Ju YS, Lee WC, Shin JY et al (2012) A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res* 22(3):436–445
- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND et al (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363(5):411–422
- Kerr KM, Lopez-Rios F (2016) Precision medicine in NSCLC and pathology: how does ALK fit in the pathway? *Ann Oncol* 27(Suppl 3):iii16–iii24
- Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y et al (2012) KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 18(3):375–377
- Lipson D, Capelletti M, Yelensky R et al (2012) Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 18(3):382–384
- Massard C, Oulhen M, Le Moulec S et al (2016) 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* 7(34):55069–55082
- Oxnard GR, Binder A, Janne PA (2013) New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31(8):1097–1104
- Pailler E, Adam J, Barthelemy A et al (2013) Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31(18):2273–2281
- Pailler E, Auger N, Lindsay CR et al (2015) High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 26(7):1408–1415
- Pailler E, Oulhen M, Billiot F et al (2016) Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells. *BMC Cancer* 16:477
- Pao W, Girard N (2011) New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 12(2):175–180
- Rikova K, Guo A, Zeng Q et al (2007) Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131(6):1190–1203
- Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS et al (2013) Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med* 368(2):138–148
- Scher HI, Fizazi K, Saad F et al (2012) Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 367(13):1187–1197

- Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ et al (2007) Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25(5):587–595
- Shames DS, Wistuba II (2014) The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol* 232(2):121–133
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al (2013) Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 368(25):2385–2394
- Soda M, Choi YL, Enomoto M et al (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448(7153):561–566
- Solomon B, Soria JC (2016) The continuum of care for ALK-positive NSCLC: from diagnosis to new treatment options – an overview. *Ann Oncol* 27(Suppl 3):iii1–iii3
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y et al (2012) RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 18(3):378–381
- Tannock IF, de Wit R, Berry WR et al (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351(15):1502–1512

## Filter-Adapted Fluorescent In Situ Hybridization (FA-FISH) for Filtration-Enriched Circulating Tumor Cells

Marianne Oulhen, Emma Pailler, Vincent Faugeroux, and Françoise Farace

### Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) may represent an easily accessible source of tumor material to assess genetic aberrations such as gene-rearrangements or gene-amplifications and screen cancer patients eligible for targeted therapies. As the number of CTCs is a critical parameter to identify such biomarkers, we developed fluorescent in situ hybridization (FISH) for CTCs enriched on filters (filter-adapted-FISH, FA-FISH). Here, we describe the FA-FISH protocol, the combination of immunofluorescent staining (DAPI/CD45) and FA-FISH techniques, as well as the semi-automated microscopy method that we developed to improve the feasibility and reliability of FISH analyses in filtration-enriched CTC.

**Key words** Circulating tumor cells, FISH, FA-FISH, ISET, Filtration-enrichment

---

### 1 Introduction

Fluorescent in situ hybridization (FISH) is a key technique in routine clinical practice to detect predictive biomarkers and screen cancer patients eligible for targeted therapies. Gene aberrations such as gene-rearrangements or gene-amplifications can be identified by FISH in primary tumors or metastatic biopsies. However, in the case of biopsy samples, material availability in terms of both quantity and quality is often insufficient for patients with advanced/metastatic cancers such as non-small-cell lung cancer (NSCLC) or prostate cancer (mPCa). The molecular analysis of circulating tumor cells (CTCs) is an attractive option to assess predictive biomarkers. CTC methods commonly rely on two steps, a first enrichment step based on either CTC phenotypic or physical properties, and a secondary step for the detection of phenotypic or genetic biomarkers. Our and other groups have reported

---

<sup>S</sup>Marianne Oulhen and Emma Pailler contributed equally to this work.

that higher numbers of CTCs are captured in cancers such as metastatic NSCLC and mPCa using a filtration system such as ISET (isolation by size of epithelial tumor cells) compared to the CellSearch [1–3]. As the number of CTCs is a critical parameter to identify molecular biomarkers, we developed FISH for CTCs enriched on filters (FA-FISH). Using FA-FISH, we reported the detection of *anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*)-rearrangement in ISET-enriched CTCs from *ALK*-rearranged NSCLC patients [4] as well *c-ros oncogene 1* (*ROS1*)-rearrangement in CTCs from *ROS1*-rearranged NSCLC patients [5], and *ETS-related gene* (*ERG*)-rearrangement in CTCs from mPCa patients [6].

The FISH technique is based on the hybridization property of a fluorochrome conjugated-nucleotide probe on a target DNA (deoxyribonucleic acid) sequence. It was developed in the early 1980s to detect the presence or absence of target DNA sequences and precisely locate them on chromosomes. The three critical steps of FISH that need to be particularly controlled are cell-fixation, protein digestion, and DNA denaturation. Here, we describe the specific FA-FISH conditions established to detect gene-rearrangements or gene-amplifications in CTCs enriched by ISET filtration. We also describe the combined immunofluorescent staining (DAPI/CD45) and FA-FISH technique as well as the semi-automated microscopy method we established to improve the feasibility and reliability of molecular biomarker detection by FISH in filtration-enriched CTCs [7].

---

## 2 Materials

### 2.1 Blood Sample Collection and ISET Filtration

1. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes.
2. ISET device (Rarecells).
3. ISET block containing filter (RareCells): ISET filters are composed of ten spots. Each spot corresponds to the filtration of 1 mL of blood.
4. Heating stage.
5. Fume hood.
6. Formaldehyde 37%.
7. Sodium hydroxide 30% (NaOH).
8. ISET buffer reagent (RareCells): dilute the products A, B, and C in 490 mL of sterile water. Add 10 mL of formaldehyde 37% under the fume hood and adjust the pH at 7.2 precisely with NaOH.
9. pH meter.
10. Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 10×, to dilute at 1× in sterile water.

11. Silica gel.
12. Aluminum foil.

## 2.2 FA-FISH

1. Hybridizer.
2. Hybridizer humidity control strips.
3. Fume hood.
4. Heating stage.
5. Vortex mixer.
6. Centrifuge.
7. Water bath.
8. High-temperature resistant plastic jars.
9. High-temperature resistant adhesive tape.
10. Rubber cement (Talens).
11. SuperFrost Plus slides.
12. Circular coverslips Ø12 mm.
13. Coverslips 22 × 22 mm.
14. Methanol.
15. Acetic acid.
16. Ethanol.
17. Sterile water.
18. DPBS 10×, to dilute at 1× in sterile water.
19. Hydrochloric acid (HCl) 1 N to dilute at 0.1 N in sterile water (store at room temperature). Extemporaneously, prepare HCl 0.01 N in sterile water and heat this solution at 37 °C in the water bath.
20. Pepsin from porcine gastric mucosa to dilute at 10% in sterile water (store aliquots at -20 °C). Just before the **item 7** of FA-FISH method, add 100 µL of pepsin 10% in the HCl 0.01 N solution at 37 °C.
21. Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) 1 M: dilute 100 g in 500 mL of sterile water (store at 4 °C).
22. Formaldehyde 37%.
23. Formaldehyde solution: 57.6 mL of sterile water, 7 mL of PBS 1×, 3.5 mL of MgCl<sub>2</sub>, 1.9 mL of formaldehyde 37% (under the fume hood).
24. Stringency Buffer 20× (4 °C) to dilute at 1× in sterile water.
25. Wash Buffer 20× (4 °C) to dilute at 1× in sterile water.
26. Mounting Medium for Fluorescence Vectashield® containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (4 °C).
27. FISH probe kits.

### **2.3 Immuno-fluorescent Staining**

1. High-temperature resistant adhesive tape.
2. High-temperature resistant plastic jars.
3. Water bath.
4. Dark humid chamber.
5. Circular coverslips Ø12 mm.
6. Coverslips 22 × 22 mm.
7. Sterile water.
8. Tris Buffered Saline (TBS, powder): dilute 1 sachet in 1 L of sterile water to prepare TBS 1×.
9. Target Retrieval Solution pH 9 10× to dilute at 1× in TBS 1×; heat this solution at 98 °C in the water bath for approximately 30 min before the experiment.
10. Normal mouse serum (aliquots at –20 °C) to dilute extemporaneously at 5% in TBS 1×.
11. Tween 20 to dilute at 0.05% in TBS 1×.
12. DAPI: stock at 1 mg/mL (–20 °C) to dilute extemporaneously at 1:20,000 in TBS 1×.
13. Antibody: allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD45 (clone HI30).
14. Ibi mounting medium.

### **2.4 Scanning and Image Analysis of Combined Immunofluorescent Staining and FA-FISH**

1. 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 are used.
2. Ariol Review application 4.0.1.5 (Leica Biosystems Richmond Inc.).

---

## **3 Methods**

### **3.1 Blood Sample Collection and ISET Filtration**

CTC enrichment by the ISET filtration system is carried out according to the manufacturer's protocol.

1. Collect the blood (generally 10 mL) in EDTA tubes. Gently homogenize the blood by inverting the tubes ten times.
2. Immediately after blood collection, dilute blood samples at 1:10 in the ISET buffer reagent and incubate for 10 min at room temperature. Gently homogenize the sample every 2 min.
3. Lock the ISET block on the ISET device.
4. Distribute PBS 1× in each compartment of the ISET block. Press "Start" and adjust the pressure as recommended by the

manufacturer. Open the tap and verify that the block is sealed perfectly (no PBS leakage). Close the tap.

5. Distribute 10 mL of diluted blood in each individual one-spot compartment and/or 50 mL of diluted blood in the five-spot compartment and open the tap. Each spot corresponds to 1 mL of blood.
6. After processing, filters are dried, wrapped in an aluminum foil, and stored frozen in plastic bag containing a silica gel desiccant at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### 3.2 FA-FISH

1. Thaw the filters and immobilize individual spots on glass slides using the high-temperature resistant adhesive tape (*see Note 1*).
2. Rehydrate the filters in PBS 1× for 5 min.
3. Incubate the filters in the methanol:acetic acid (9:1) solution for 30 min under the fume hood to fix the cells.
4. Wash the filters in PBS 1× for 5 min.
5. Incubate the filters in the pepsin 10% HCl 0.01 N solution for 6 min.
6. Wash the filters in PBS 1× for 5 min.
7. Incubate the filters in the formaldehyde solution under the fume hood for 2 min.
8. Dehydrate the filters in successive baths containing increasing concentrations of ethanol for 2 min: 70, 85, 100%.
9. Dry the filters on the heating stage at  $37^{\circ}\text{C}$  for 10 min to evaporate ethanol.
10. Add 10  $\mu\text{L}$  of FISH probes on the spots at  $37^{\circ}\text{C}$  and put a circular coverslip  $\text{Ø}12$  mm.
11. Seal the samples with the rubber cement (*see Note 2*).
12. Put the filters in the hybridizer and run the program for co-denaturation and hybridization.
13. The day after, stop the hybridizer and remove the rubber cement from the slides (*see Note 3*).
14. Wash the filters in stringency buffer 1× at room temperature for 7 min.
15. Wash the filters in stringency buffer 1× at  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 min.
16. Wash the filters in wash buffer 1× at room temperature for 5 min.
17. Dehydrate the filters in successive baths containing increasing concentrations of ethanol for 2 min in each bath: 70, 85, 100%.
18. Dry the filters on the heating stage at  $37^{\circ}\text{C}$  for 10 min to evaporate ethanol.
19. Add 10  $\mu\text{L}$  of mounting medium for fluorescence Vectashield containing DAPI and put a coverslip  $22 \times 22$  mm.



20. Seal the samples with the rubber cement.
21. Store the filters at 4 °C before manual analysis.

### 3.3 Combination of Immunofluorescent Staining and FA-FISH

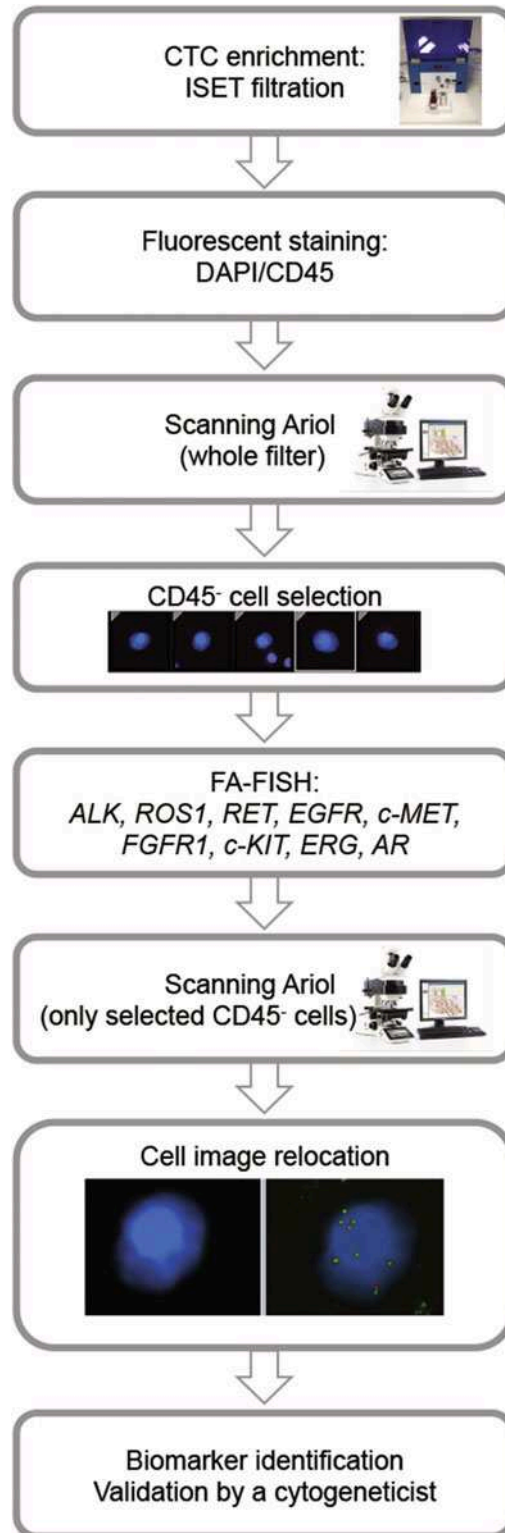
The experimental process is shown in Fig. 1.

#### 3.3.1 Immunofluorescent Staining

1. Thaw the filters and immobilize individual spots on glass slides using the high-temperature resistant adhesive tape (*see Note 1*).
2. Make a snick on each spot for precise DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cell relocation for FA-FISH scanning (cf. Subheading 3.3.4).
3. Rehydrate the filters in TBS 1× for 5 min.
4. Incubate the filters in the target retrieval solution pH 9 1× at 98 °C for 5 min (*see Note 4*).
5. Wash the filters in TBS 1× for 5 min.
6. Add 100 µL of normal mouse serum 5%-TBS 1× on each spot, put a circular coverslip Ø12 mm and incubate for 30 min in the dark humid chamber at room temperature.
7. Wash the filters in TBS 1× for 5 min.
8. Add 100 µL of CD45-APC antibody diluted in TBS 1× on each spot, put a circular coverslip Ø12 mm, and incubate overnight in the dark humid chamber at 4 °C.
9. The day after, wash two times the filters in TBS 1×-Tween 0.05% for 5 min.
10. Wash the filters in TBS 1× for 5 min.
11. Add 100 µL of DAPI at 1:20,000 on each spot, put a circular coverslip Ø12 mm and incubate in the dark humid chamber at room temperature for 15 min.
12. Wash two times the filters in TBS 1×-Tween 0.05% for 5 min.
13. Wash the filters in TBS 1× for 5 min.
14. Add 10 µL of Ibbidi mounting medium for fluorescence on each spot and put a coverslip 22 × 22 mm.
15. Seal the samples with the rubber cement.
16. Store the filters at 4 °C before scanning.

#### 3.3.2 Scanning and Image Analysis of Immunofluorescent Staining

1. Define the scanning area (the ISET spot including the snick) at 5× magnification in the DAPI channel.
2. Set gain at maximum.
3. Calibrate exposure time and focus for DAPI and Cy5 channels at 20× magnification (*see Note 5*).
4. Calibrate offset as high as possible in the DAPI channel to individualize at best the nuclei.
5. Start the scan. Select and locate DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells.



**Fig. 1** Schematic workflow for detection of molecular biomarkers in filtration-enriched CTCs by combined fluorescent staining and fluorescent in situ hybridization (FISH). Reprinted with permission from [7]

3.3.3 *Combined Immunofluorescent Staining and FA-FISH*

1. Wash the filters in TBS 1×–Tween 0.05% and TBS 1× for 5 min.
2. Follow the protocol described in Subheading 3.2 from **step 3**.

3.3.4 *Scanning and Image Analysis of Combined Immunofluorescent Staining and FA-FISH*

1. Scanning and image analysis of fluorescent staining is carried out as described above.
2. Start FA-FISH scanning by a prescan at 5× magnification of the whole ISET spot in DAPI channel to precisely relocate cells.
3. Calibrate DAPI channel at 10× magnification for adjustment of focus.
4. Calibrate DAPI, FITC, and Texas Red (for green and red FISH signals) channels at 63× magnification (immersion objective) in three different regions of the ISET spot: focus, offset, exposure times.
5. FISH capture is performed at ×63 magnification in the small regions containing the preselected DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells. Optimal FISH scanning parameters should be established for each scanner. For the Ariol, the optimal FISH scanning parameters are: 30 zstacks spaced 0.6 μm apart and a multi exposure protocol to optimize the analysis of FISH signal intensity, size, and thickness [7].
6. Analyze FISH images in DAPI<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells.

---

## 4 Notes

1. Make sure that the spots are very well immobilized on the glass slides. If the spots move during the combined immunofluorescence and FA-FISH experiment, the relocation will not be possible.
2. If the sample is not correctly sealed, the FISH probes can evaporate during the co-denaturation and hybridization steps.
3. Pay attention not to remove the coverslip with the rubber cement. This will damage cells. The coverslip will leave in the next wash bath.
4. This step is useful to fix the cells to the filters and to avoid cell loss during the combined fluorescent staining and FA-FISH process.
5. Using only one parameter (i.e., exposure time for adjusting fluorochrome exposure) allowed comparison of settings between scans done at different times or by different users.

## References

1. Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F et al (2011) A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 105(6):847–853
2. Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T et al (2011) 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(7):1651–1660
3. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D et al (2012) Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 7(2):306–315
4. Pailler E, Adam J, Barthelemy A, Oulhen M, Auger N, Valent A et al (2013) Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31(18):2273–2281
5. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I et al (2015) High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 26(7):1408–1415
6. Massard C, Oulhen M, Le Moulec S, Auger N, Foulon S, Abou-Lovergne A et al (2016) Phenotypic and genetic heterogeneity of tumor tissue and circulating tumor cells in patients with metastatic castrationresistant prostate cancer: a report from the PETRUS prospective study. *Oncotarget* 7(34):55069–55082
7. Pailler E, Oulhen M, Billiot F, Galland A, Auger N, Faugeroux V et al (2016) Method for semi-automated microscopy of filtration-enriched circulating tumor cells. *BMC Cancer* 16:477

## Title

Molecular and functional characterization of circulating tumor cells in prostate and non-small-cell lung cancers

## Key words

Circulating tumor cells, non-small-cell lung cancer, prostate cancer, circulating tumor cells-derived xenografts, whole-exome sequencing

## Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) represents a non-invasive source of tumor material which may provide both clinical and basic information. Issued from primary tumors or metastases, CTCs are a very rare and heterogeneous cell population transiting in the blood. To select optimal therapy, precision medicine currently relies on the molecular profiling of tumor biopsy samples although tissue adequacy, both in terms of quantity and quality, is often insufficient for patients with metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) or prostate cancer (PCa). Thereby molecular and functional characterization of CTCs presents a double interest, clinical to identify biomarkers of treatment sensitivity and basic to study mechanisms underlying their tumor initiating cell (TIC) potential. The two goals of my thesis were (i) to characterize by whole-exome sequencing (WES) at the single cell level CTCs from patients with metastatic prostate cancers (mPCa), and (ii) to establish and characterize CTC-derived xenografts (CDX) from patients with NSCLC or mPCa. Regarding the first goal we developed a global workflow which included three technological approaches to enrich and isolate individual CTCs from different phenotype (epithelial, epithelial and mesenchymal, mesenchymal), whole genome amplification (WGA) and WES and quality controls. WES was performed on 34 CTC samples selected according to WGA quality and on corresponding metastasis-biopsies from seven patients. Two patients with phenotypic heterogeneity of CTCs were analyzed more deeply. Our results showed the presence of both shared mutations between CTCs and matched metastasis-biopsies, and mutations exclusively detected in CTCs. These CTC-private mutations were detected in all phenotypes and particularly affected genes involved in cytoskeleton remodeling, DNA repair or invasion. The existence of common mutations between CTCs from various phenotypes suggested a phylogenic link between these cells but a divergent evolution during the metastatic process. Regarding the second objective, CTCs from 67 NSCLC patients and 28 mPCa patients were implanted in immunocompromised mice. Four NSCLC CDXs and one mPCa CDX were established. Starting from CDX tumors, three NSCLC and one prostate cancer *in vitro* cell lines were established which expressed an epithelial phenotype and CSC-markers. The characterization of tumor-biopsies, CTCs collected at the time of their implantation, CDX and CDX-derived cell lines revealed that CTCs, CDX and cell lines mirrored the phenotype and mutational landscape of tumor-biopsies. The more in depth characterization of one NSCLC CDX-derived cell line showed the existence of spontaneous replicative stress eliciting DNA double-strand breaks and genomic instability. This result led us to the hypothesis of a possible role of genomic instability and specific aberrations in DNA replication and repair pathways in CTC tumorigenicity.

In this work we observed important similarities between the mutational landscape of CTCs and that of corresponding metastasis-biopsies in mPCa. Furthermore we demonstrated that CTC can reveal undiagnosed genomic aberrations in matched-metastasis biopsies. Also we have established NSCLC and mPCa CDX that are representative of patient tumor-biopsies which demonstrated the tumorigenicity of CTCs in these diseases. These mouse models are unique tools for identifying new therapeutic targets, testing anti-tumoral strategies and understanding mechanisms underlying the TIC potential of CTCs.

## Titre

Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de cellules tumorales circulantes dans le cancer de la prostate et le cancer bronchique non à petites cellules

## Mots clés

cellules tumorales circulantes, cancer bronchique non à petites cellules, cancer de la prostate, xénogreffes dérivées de cellules tumorales circulantes, séquençage de l'exome

## Résumé

Les cellules tumorales circulantes (CTC) représentent une source de matériel tumoral accessible de manière non invasive, susceptible de fournir des informations cliniques et fondamentales. Ces cellules issues de tumeurs primitives ou métastatiques représentent une population hétérogène d'éléments très rares circulant dans le sang. La personnalisation des traitements en oncologie repose sur la caractérisation moléculaire de biopsies tumorales mais celles-ci peuvent être difficiles à réaliser ou peu informatives. De ce fait, la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des CTC présente un double intérêt, clinique pour identifier des biomarqueurs de sensibilité à des traitements, et fondamental pour étudier les mécanismes qui sous-tendent leur potentiel à initier des tumeurs.

Les objectifs de ma thèse ont été d'une part de caractériser par séquençage de l'exome (WES) les CTC à l'échelle de cellule unique de patients atteints de cancers de la prostate (PCa) métastatiques et d'autre part d'établir puis caractériser des modèles de xénogreffes dérivés de CTC (CDX) chez des patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) ou de PCa.

Pour répondre au premier objectif, nous avons développé une méthode expérimentale globale incluant trois approches technologiques permettant d'enrichir et d'isoler des CTC individuelles de différents phénotypes (épithélial, épithélio-mésenchymateux et mésenchymateux), d'amplifier la totalité du génome (WGA) et de le séquencer. Le WES a été réalisé pour 34 échantillons de CTC sélectionnés sur des critères de qualité du WGA, ainsi que pour les biopsies de métastases correspondantes chez sept patients. Deux patients présentant une hétérogénéité phénotypique de leurs CTC, ont été analysés en profondeur. Nous avons mis en évidence des mutations partagées entre les CTC et les biopsies tumorales correspondantes ainsi que des mutations uniquement retrouvées dans les CTC. Ces mutations spécifiques aux CTC sont présentes dans tous les phénotypes et affectent particulièrement les gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette, la réparation de l'ADN ou l'invasion. L'existence de mutations communes entre les CTC de différents phénotypes suggère une relation phylogénique entre ces cellules mais une évolution divergente pendant le processus métastatique. Ce travail est soumis pour publication.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons implantés les CTC de 67 patients atteints de CBNPC et 24 patients atteints de PCa chez des souris immunodéprimées. Nous avons établis quatre CDX de CBNPC et un CDX de PCa. La caractérisation de ces modèles, des biopsies tumorales, des CTC collectées au moment de la xénogreffe, des CDX et des lignées cellulaires établies à partir du CDX, ont révélé que les CTC, le CDX et les lignées cellulaires « miment » le phénotype et le profil mutationnel des biopsies tumorales. La caractérisation plus approfondie de l'une des lignées cellulaires montre la présence d'un stress réplicatif et d'une instabilité génomique élevée. Ce résultat nous oriente sur l'hypothèse d'un rôle éventuel de l'instabilité génomique dans la tumorigénicité des CTC.

Dans ce travail, nous avons montré que le profil mutationnel des CTC présente de fortes similitudes avec les biopsies tumorales des patients atteints de PCa. De plus, nous avons observé l'existence de mutations spécifiques aux CTC, non détectées dans les biopsies tumorales. Également, nous montrons que des CTC issues de CBNPC et de PCa sont tumorigéniques *in vivo* et qu'elles reflètent le profil mutationnel des biopsies tumorales des patients. Ces modèles constituent des outils originaux et intéressants pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et stratégies anti-cancéreuses, et comprendre les mécanismes qui supportent le potentiel des CTC à initier des tumeurs.