



HAL
open science

Détection et pertinence clinique des Cellules Tumorales Circulantes (CTC) dans le Carcinome à Cellules de Merkel: Détermination du statut viral MCPyV des CTC vs biopsies tissulaires

Magali Boyer

► **To cite this version:**

Magali Boyer. Détection et pertinence clinique des Cellules Tumorales Circulantes (CTC) dans le Carcinome à Cellules de Merkel: Détermination du statut viral MCPyV des CTC vs biopsies tissulaires. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT069 . tel-03655127

HAL Id: tel-03655127

<https://theses.hal.science/tel-03655127>

Submitted on 29 Apr 2022

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé (CBS2)

CREEC/CANECEV, MIVEGEC (CREES) Université de Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

Détection et pertinence clinique des Cellules Tumorales Circulantes (CTC) dans le Carcinome à Cellules de Merkel - Détermination du statut viral MCPyV des CTC vs biopsies tissulaires

Présentée par Magali BOYER

Le 13 Décembre 2021

Sous la direction de Catherine ALIX-PANABIÈRES
et de Olivier DEREURE

Devant le jury composé de

Pr Céleste LEBBE, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Hôpital Saint Louis, AP-HP

Dr Françoise FARACE, Responsable de la plateforme Cellules circulantes rares, Institut Gustave Roussy, Villejuif

Pr Christophe HIRTZ, Professeur des Universités, CHU de Montpellier

Pr Mahtab SAMIMI Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHRU de Tours

Pr Olivier DEREURE, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU de Montpellier

Dr Catherine ALIX-PANABIÈRES, Maître de Conférence Universitaire – Praticien Hospitalier, CHU Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur-Président

Examineur

Co-directeur de thèse

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

« C'est de la force des convictions que dépend la réussite »

R.J. Lupin, 1998

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier le Dr Françoise Farace, le Pr Céleste Lebbe, le Pr Christophe Hirtz ainsi que le Pr Mahtab Samimi d'avoir accepté d'être les membres de mon jury, et d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit. Merci pour votre implication dans mon travail.

Je tenais ensuite à remercier le Dr Catherine Alix-Panabières, pour sa présence et son soutien durant ces trois années. Merci au Pr. Olivier Dereure pour ses conseils, son aiguillage et sa vision qui m'ont apporté un nouvel angle de réflexion sur la recherche.

Merci au Pr. Vincent Foulongne pour ses nombreux conseils et sa patience malgré ses obligations en temps de crise. Merci au Dr Ondine Becquart pour son aide et son implication dans ce projet.

Je voudrais aussi remercier le personnel de Menarini, avec qui j'ai pu beaucoup échanger durant ces trois années, tout particulièrement je voudrais remercier Hichem Gallala. Merci pour tes conseils et ton expertise. Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité.

Viens ensuite le LCCRH,

Merci Laure, déjà de m'avoir choisi pour ce stage de master 2, après tout si j'en suis là aujourd'hui, c'est que ça a commencé avec toi ! Merci pour les nouveaux coins promenades, les discussions canines, et les meilleures vacances d'Izzi. Merci Martine d'avoir échangé la place sous la clim, tu m'as rendu la vie meilleure, merci pour tes tips scientifiques, et aromazoniques ; merci du soutien dans les moments moins sympas de la vie ! Merci Zahra, you're such a sunshine in this lab, thank you to be you, to have such energy and positivity, thank for your advices and your support. This friendship just begin! Merci Keerthi to be always positive, and for the really good food !

Alexe, merci pour ton soutien sans failles et ta présence, on est dans le même bateau, pour tes notifications Facebook, La bouffe c'est la vie ! Et pour tes claquages de souris qui m'ont manqué dès le jour où tu es partie !

En continuant à l'IURC,

Merci aussi à Florin et Corinne, merci pour votre aide si précieuse, votre temps passé à m'aider. La petite vous est redevable pour beaucoup. Mélanie, merci pour ces concerts qui nous auront fait

voyager, crier, pleurer, chanter. Merci à Aurélien, Emma, Anne, Luke, Corinne, Florielle, et tous les autres pour ces minutes quotidiennes de discussion. Vos conseils si gentiment donnés et votre soutien.

A mes amis,

Mamie, merci d'avoir partagée ma vie durant 3 ans et demi, merci de m'avoir poussé dans tout ce que j'ai fait. Cucq & Fluck, Tic & Tac, et je ne sais quels autres surnoms, je ne te remercierai jamais assez d'avoir été là dans tous les moments de la vie qu'on a partagé pendant 3 ans, les pleurs, les maladies, les fou-rires, les footings plus ou moins faciles, la neige, les apéros, les estivales, les restos... haaaa le trinque fougasse... N'est pas mamie qui veut !

Et il y a la troisième drôle de dame, mon rayon de soleil, boucle d'or, Sandra. Merci d'avoir été toujours là, merci pour tes appels hebdomadaires, ta motivation et ton soutien. Merci de m'avoir prêté ta maison, merci pour les barbecues, les verres de vins autour de la piscine, merci pour le soleil que tu as apporté dans nos vies. Comme pourrait dire Johnny « Ohhhh Sandra ». De toute façon, vous deux, c'est pas tout de suite que je vous laisse tranquilles !

Marion et Charles, merci de m'avoir accepté dans vos vies si simplement, merci pour les week-ends de vieux, les projets de sociétés, les soirées jusqu'à 6h du mat' (ou 22h), et tous ces moments de détente, même en semaine ! Sarah, merci pour ta bonne humeur, ton rire, ton sourire, merci d'être cette personne si positive chaque jour. Merci aussi à Nena, Henri, pour les soirées qui font du bien, de près ou de loin.

Un petit mot pour monsieur Marotte, sans qui je ne serais pas là, qui m'a donné l'envie de poursuivre dans cette voie et m'a donné le gout de la biologie.

Je voudrais ensuite remercier mes amis, Amélie, Lucie, Aurélie, Arnaud, Sébastien, Priscilla, Julie et Jules, merci pour les FNA, les séjours parisiens, ou les discussions de groupes, votre présence fait toujours un bien fou. Merci pour votre soutien indéfectible. Merci Sarah et Madeleine, vos mots, vos rires, votre bonne humeur de chaque jour, comme si rien n'avait changé en 10 ans.

Et puis, merci à Cindy, Thomas et Adeline, mes trois piliers. Merci pour votre soutien, vos mots d'encouragement, merci d'être là tout simplement depuis de nombreuses années. Merci d'être ma bouffée d'oxygène, que je vous voie toutes les semaines ou que je sois à l'autre bout du monde. Merci d'être vous, et de m'avoir fait connaître cet amour d'amitié dans ma vie. Et merci à Guillaume, Hoël et

Dany de nous supporter. Un petit mot pour les deux plus beaux, Batiste et Hank, ma dose d'endorphine.

Merci ensuite à ma famille,

Patrick, merci pour ta folie et ta bonne humeur, ton rhum et tes bières. Annie, merci pour tes mots doux et tes encouragements. Jen, merci de rendre mon frère heureux, et de partager la vie Montpelliéraine avec nous.

Mon frère, mon modèle dans la vie, merci de toujours me montrer la voie vers l'épanouissement, de me prouver que quand on veut vivre des choses folles, il suffit de s'en donner les moyens. J'espère que tu es fier de moi. Je suis si heureuse que tu sois de nouveau là.

Papa, Maman, merci pour votre soutien de toujours, merci de me supporter, et de m'avoir toujours soutenue dans ces 8 années d'études. Merci d'avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui, de m'avoir transmis vos valeurs, et l'envie d'aller au bout de ses rêves. Merci de toujours nous porter pour que l'on vive notre vie comme on l'entend. Je suis heureuse, fière et reconnaissante de vous avoir comme parents. J'espère vous rendre fiers, si je suis là c'est grâce à vous.

Un petit mot pour mon grand-père. Où que tu sois, cette thèse je veux te la dédier. Tu es ma force et j'espère que tu aurais été fier de nous.

Et enfin, Boubou. Merci d'être là, de me pousser et me bouger, même parfois trop. Merci de m'aimer chaque jour et de te battre pour que je sois heureuse. Merci de me supporter aussi, je sais que c'est pas toujours facile. Merci de n'être jamais en phase avec moi, d'aimer Izzi, de détester le canapé, d'adorer la brandade, de vouloir un potager, d'aimer courir sous la pluie. Merci d'être toi, tout simplement, et de faire partie de ma vie. Cette thèse est arrivée à son terme et c'est aussi grâce à toi.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux	12
Introduction	13
I. Le Carcinome à Cellules de Merkel	14
a) Description du Carcinome à Cellules de Merkel	14
1. Présentation clinique du CCM	15
2. Épidémiologie	16
3. Aspects moléculaires	17
4. Les traitements du CCM	18
b) Le polyomavirus impliqué dans le CCM : MCPyV	20
1. Description du MCPyV	20
2. Le MCPyV dans les populations humaines	22
3. Le MCPyV dans le CCM	22
II. Le processus métastatique	25
1. Invasion et angiogenèse	26
2. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un mécanisme important	28
3. Intravasation	31
4. La circulation des cellules tumorales dans le sang	33
5. Arrêt des cellules tumorales dans le système vasculaire et extravasation	36
6. La colonisation des sites métastatiques	39
7. Développement des métastases	44
8. Les cellules souches cancéreuses et hétérogénéité clonale	47
III. La biopsie liquide	49
a) Les origines de la biopsie liquide	49
b) Intérêt clinique	51
c) Les différents biomarqueurs circulants	53
1. Les Cellules tumorales circulantes	53
2. L'ADN tumoral circulant	54
3. Les exosomes : un sous-groupe des vésicules extracellulaires	56

4. Les miARN.....	57
5. Les plaquettes éduquées par les tumeurs	59
IV. Les cellules tumorales circulantes	62
a) Méthodes d'enrichissement des CTC	62
1. Propriétés physiques	64
2. Propriétés biologiques.....	66
b) Méthodes de détection des CTC	70
c) La caractérisation des CTC.....	72
1. Caractérisation moléculaire	72
2. Caractérisation fonctionnelle - Culture des CTC	75
d) Pertinence clinique.....	80
V. Les CTC dans le CCM	84
Objectifs de la thèse	86
Résultats.....	89
I. Mise en place d'une nouvelle méthode de détection des CTC	90
a) Détermination des marqueurs des CTC CCM	91
b) Evaluation de la sensibilité de la méthode R-D.....	96
1. Rendement de l'étape d'enrichissement	96
2. Rendement de l'étape du marquage	98
3. Rendement global de la méthode R-D	98
4. Taux de récupération des cellules avec le CellSearch	100
II. Pertinence Clinique de la détection des CTC dans le CCM	103
1. Caractéristiques de la cohorte de patients	107
2. Détection des CTC dans le CCM avec CellSearch et R-D workflow	109
3. Détermination de la valeur seuil de détection des CTC	111
4. Concordance de la détection de CTC et des paramètres cliniques chez les patients CCM.	114
III. Détection du MCPyV dans les CTC et les cellules tumorales issues de la biopsie tissulaire	118
a) Recherche du MCPyV dans les lignées cellulaires cancéreuses de Merkel.....	118
b) Recherche du MCPyV dans les CTC de patients	123
c) Recherche du MCPyV dans les cellules tumorales de biopsies tissulaires.....	125
1. Statut viral global des tissus tumoraux	125
2. Statut viral des cellules uniques tumorales issues de biopsies tissulaires	126

IV. Culture <i>in-vitro</i> des CTC issues de patients CCM	131
Discussion et Conclusion	142
Matériels et Méthodes	147
Inclusion des patients.....	148
Cultures cellulaires	148
Marquage des cellules par anticorps immuno-fluorescents.....	149
Cytométrie en flux.....	150
Immunocytochimie.....	151
Détection des CTC par le système CellSearch®	151
Enrichissement des CTC par la méthode RosetteSep™	153
Le système de tri à la cellule unique DEPArray™	155
Amplification du génome total des cellules uniques	157
Détection du virus MCPyV dans les cellules tumorales	158
Détection des aberrations génomiques	159
Dissociation de coupes fixées au formol et inclus dans la paraffine (FFPE).....	160
Extraction d'ADN	161
Analyses statistiques	161
ANNEXES	164
Article: Circulating Tumor Cell Detection and Polyomavirus Status in Merkel Cell Carcinoma	165
Revue : Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma.....	178
Consentement éclairé :	204
BIBLIOGRAPHIE	205

Liste des abréviations

AB3	Anticorps anti-antigène grand T du MCPyV_gp3
Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	AKT Sérine/Thréonine Kinase 1
ATM	ATM sérine/thréonine kinase
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messager
BRCA1/2	Gène 'BreastCancer' 1 et 2
CCM	Carcinome à Cellules de Merkel
CDX	Xénogreffe dérivée de CTC
CD56	Cluster de différenciation 56 – Molécule d'adhésion des cellules neurales
CD117	Récepteur de facteur de croissance des cellules souches/mastocyte
CK	Cytokératine
CK20	Cytokératine 20
cfDNA	<i>Cell-free DNA</i>
CM2B4	Clone d'anticorps anti-antigène grand T du MCPyV
CTC	Cellule Tumorale Circulante
CNA	<i>Copy Number Aberration</i>
CS	Cellule Souche
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CSF1	<i>Colony Stimulating Factor</i>
ctDNA	<i>circulating tumor DNA</i>
C>T	Mutation de Cytosine à Tyrosine
DTC	<i>Disseminated Tumor Cell</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
EMT	<i>Epithelial to mesenchymal Transition</i>
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFPE	<i>Formalin fixed paraffin embedded</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
kb	kilobase
LT	<i>Large T antigen</i>
LSD	<i>LT Stabilization Domain</i>
MCPyV	<i>Merkel Cell Polyomavirus</i>
MET	<i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProteinases</i>
MSH2	Protéine homologue MutS2
MTOR	Cible mécanistique de la rapamycine
MYCL	Protéine L-Myc
NK	<i>Natural Killer</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>

nm	nanomètre
NSE	<i>Neuro-Specific Enolase</i>
PanCK	Panel de Cytokératine
pb	Paires de bases
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PD-1/PD-L1	<i>Protein Death 1/ Protein Death Ligand 1</i>
PI3K	Phosphoinositide-3-OH-kinase
PSA	<i>Prostate-Specific Antigen</i>
PTEN	Homologue de Phosphatase et TENSin
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RB1	Rétinoblastome 1
sT	<i>Short T antigen</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
SV40	<i>Simien Virus 40</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TTF1	<i>Thyroid transcription factor 1</i>
UV	Ultraviolet
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i>
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
VP	<i>Viral protein</i>

Liste des figures

Figure 1: Immunothérapie bloquant l'interaction PD-1/PD-L1	19
Figure 2: Cartographie de l'ADN du MCPyV	21
Figure 3: Taux de mutation UV-induite dans les CCM MCPyV- vs MCPyV+	23
Figure 4: Voies de signalisation de la migration cellulaire	27
Figure 5: Plasticité des cellules entre EMT et MET	29
Figure 6: Intravasation des cellules tumorales à l'aide de macrophages.....	32
Figure 7: Accroche des CTC et extravasation	38
Figure 8: Formation des niches pré-métastatiques	41
Figure 9: Facteurs tissulaires pour la croissance tumorale	43
Figure 10: Activation des voies de survie et de croissance par les DTC.....	46
Figure 11: Représentation schématique des cellules d'un patient métastatique.	50
Figure 12 : Applications cliniques des CTC et du ctDNA comme biopsie liquide	52
Figure 13: Méthodes d'enrichissement, de détection et de caractérisation des CTC et du ctDNA.....	63
Figure 14: Enrichissement et expansion des CTCs	78
Figure 15: RosetteSep-DEPArray (R-D) workflow.....	91
Figure 16: Caractérisation phénotypique des lignées CCM en cytométrie – Marqueurs non retenus. 93	
Figure 17: Caractérisation phénotypique des lignées CCM en cytométrie – Marqueurs retenus.....	94
Figure 18: Test de différents kits de fixation/perméabilisation sur les MCCL-11.	95
Figure 19: Illustration du R-D workflow et de la combinaison CellSearch-DEPArray.....	97
Figure 20: R-D workflow : taux de récupération et illustrations des cellules spikées.....	99
Figure 21: CellSearch : taux de récupération et illustrations des lignées cellulaires mélangées au sang de donneur sain.....	101
Figure 22: CTC du premier prélèvement chez un patient CCM.....	103
Figure 23: Illustrations de leucocytes au DEPArray.....	104
Figure 24: Illustrations de CTCs avec le DEPArray et le système CellSearch	104
Figure 25: Aberrations chromosomique des CTC.....	106
Figure 26: Courbe ROC du workflow R-D et du CellSearch	112
Figure 27: Comparaison des courbes ROC : R-D vs CellSearch.....	113
Figure 28: Procédure de kit WGA Ampli1.....	119
Figure 29: Contrôle qualité du WGA Ampli1	120
Figure 30: Détection du MCPyV dans les CTC de patients	124
Figure 31: Dissociation et tri des cellules de tumeur	127
Figure 32: Pourcentage de cellules tumorales MCPyV+.....	128
Figure 33: Comparaison des status viraux des CTC vs cellules tumorales	129
Figure 34: Mise en culture des CTC - Patient 25	132
Figure 35: Culture in-vitro des CTC du patient 27	133
Figure 36: Illustrations de cellules en culture in-vitro du patient 27	134
Figure 37: Culture in-vitro des CTC du patient 16	135
Figure 38: Illustrations de cellules en culture in-vitro du patient 16	135
Figure 39: Marquage immunologique de PBMC, lignée CTC-MCC-41 et patient 16	136
Figure 40: Culture in-vitro des CTC du patient 28	137

Figure 41: Illustrations de cellules en culture in-vitro du patient 28	138
Figure 42: Marquage immunologique des cellules du patient 28.....	138
Figure 43: Illustrations de cellules en culture in-vitro de sang de donneur sain	139
Figure 44: Marquage immunologique des cellules de patient sain	140
Figure 45: Enrichissement et marquage des CTC avec le système CellSearch	152
Figure 46: Illustration de l'affichage du CellTrack Analyseur II	153
Figure 47: RosetteSep.....	154
Figure 48: DEPArray.....	156
Figure 49: Amplification du génome total (WGA)	157
Figure 50: Protocole de DEPArray pour analyse d'échantillons FFPE	160
Figure 51: Courbe ROC	162

Liste des tableaux

Tableau 1: Anticorps utilisés pour la caractérisation des lignées CCM.....	92
Tableau 2: Réactifs et anticorps utilisés pour la détection des cellules tumorales dans le CCM	96
Tableau 3: Caractéristiques de la cohorte des patients CCM	107
Tableau 4: Résultats de la détection des CTC chez les patients CCM	109
Tableau 5: Caractéristiques cliniques des patients et détection des CTC.....	114
Tableau 6: Détection du MCPyV - Comparaison des cibles VP2/3 et Lt dans les lignées MKL-1 et MCCL-9.....	121
Tableau 7: Détection du MCPyV - Comparaison des cibles VP2/3 et sT dans les lignées MKL-1 et MCCL-9	121
Tableau 8: Statut viral des tumeurs et métastases	126
Tableau 9: Cibles du MCPyV	158
Tableau 10: Marquage pour le protocole DEPArray FFPE.....	160

Introduction

I. Le Carcinome à Cellules de Merkel

a) Description du Carcinome à Cellules de Merkel

Les carcinomes cutanés sont des tumeurs cutanées malignes qui se développent à partir des cellules épithéliales de la peau. Le facteur de risque principal est l'exposition aiguë ou chronique aux UV. Ils s'opposent aux mélanomes dérivés des mélanocytes et qui ont aussi pour facteur de risque principal l'exposition aux UV. Il existe deux grands types de carcinomes cutanés: basocellulaires, les plus fréquents qui ne métastasent pas dans la très grande majorité des cas et épidermoïdes, plus rares mais plus agressifs, qui peuvent entraîner des métastases locales ou à distance (Rees 1997).

Le Carcinome à cellules de Merkel (CCM), aussi appelé carcinome trabéculaire ou carcinome cutané neuroendocrine primitif, est une tumeur cutanée primitive neuroendocrine décrite pour la première fois en 1972 par Toker (Toker 1972). Sa dénomination est liée à la similarité de ses cellules avec les cellules de Merkel de l'épiderme, proches des follicules pileux et à proximité des nerfs sensoriels. Ces dernières qui représentent moins de 1% des cellules cutanées, ont été décrites pour la première fois en 1875 par Friedrich Merkel. Ce sont des mécano-senseurs qui transmettent l'information d'un toucher léger sur la peau via les nerfs sensitifs mais qui ont aussi probablement des fonctions neuroendocrines, ce qui justifie le nom de la tumeur qui en est peut-être dérivée. Les cellules du CCM ont un noyau basophile large et un cytoplasme restreint ; de nombreuses mitoses ainsi que des cellules en nécrose au sein de la tumeur sont souvent visibles.

L'origine des cellules du CCM est cependant encore incertaine. Plusieurs hypothèses histogénétiques ont été suggérées : un ancêtre commun avec les lymphocytes B (Sauer et al. 2017) ou dérivé des cellules de Merkel (Maricich et al. 2009) avec lesquelles elles partagent, comme mentionné, de nombreuses caractéristiques physiologiques et de nombreux marqueurs. En effet, les cellules du CCM expriment comme les cellules de Merkel la Neuroendocrine-Specific Enolase (NSE)(Yang et al. 2019), et la cytokératine 20 (CK20)(Kervarrec et al. 2019). De même la cytokératine est présente sous forme de points (dots) paranucléaires dans ces deux types de cellules, contrairement aux autres cellules épithéliales où les cytokératines forment un réseau de filaments. Cependant, les cellules de Merkel ont une localisation épidermique alors que les cellules du CCM sont situées dans le derme. De plus, les cellules de Merkel sont des cellules différenciées et ne se divisent plus alors que les cellules du CCM se

multiplie de manière importante. Malgré ces différentes hypothèses, l'histogénèse précise des cellules du CCM reste donc à établir.

1. Présentation clinique du CCM

Le CCM se présente en général sous forme d'un nodule indolore rose/violacé en dôme, le plus souvent situé sur les zones exposées aux UV, comme la tête, la nuque ou les membres supérieurs. Il est caractérisé par un développement rapide, souvent en l'espace de quelques mois, et près d'un tiers des patients présentent déjà des métastases régionales et/ou à distance lors du diagnostic (Becker et al. 2017) sans site préférentiel pour ces dernières. La survie globale est courte, de l'ordre de 64% à 18% à 5 ans en fonction du stade au diagnostic et le taux de mortalité est élevé, avec 33% à 46% de décès à 5 ans (Schadendorf et al. 2017).

Le diagnostic du CCM est établi après biopsie ou biopsie-exérèse de la tumeur par l'examen histologique conventionnel. Il est complété de l'identification par immunomarquage de l'expression de certains marqueurs épithéliaux comme EpCAM, de différentes cytokératines légères (CK5/6 ; PanCK : 8-18-19), de CK20, mais aussi de marqueurs neuroendocrines comme la NSE (Neuro-specific enolase), la Synaptophysine, la Chromogranine A, la Somatostatine, la Calcitonine ou encore de la molécule CD56. La CK7 et le facteur de transcription thyroïdien (TTF-1), négatifs dans le CCM, sont utilisés pour différencier le CCM d'autres tumeurs neuroendocrines extra-cutanées métastatiques pouvant présenter des caractéristiques histologiques semblables (Cogshall et al. 2018). L'utilisation de nouveaux marqueurs a été suggérée comme les neurofilaments ou encore la protéine 2 qui lit les séquences riches en AT quand par exemple la CK20 est négative (Del Marmol and Lebbe 2019). La présence du polyomavirus de Merkel (MCPyV), qui sera défini plus tard, peut aussi être recherchée, même s'il n'existe pas encore de détection de routine.

Le stade du CCM est formalisé selon le système décrit par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), qui définit les stades I et II comme localisés au site de la tumeur primaire (stade I avec une tumeur inférieure ou égale à 2cm de diamètre ; stade II supérieure à 2 cm), stade III avec une atteinte ganglionnaire régionale, avec deux sous-groupes : IIIA où la tumeur primaire n'est pas connue, et IIIB où la tumeur primaire est connue, et stade IV avec métastases à distance (Del Marmol and Lebbe 2019).

Le pronostic des patients est évalué en fonction de la taille de la tumeur primaire, mais aussi du stade de la maladie au moment du diagnostic (présence de métastases régionales ou à distance). Pour cela une étude du ganglion sentinelle est recommandée, car on estime que près d'un tiers des métastases ganglionnaires sont inapparentes à l'examen clinique (Coggshall et al. 2018). L'âge, le sexe, des facteurs de comorbidité et certaines caractéristiques de la tumeur participent également à l'évaluation du pronostic. Le suivi des patients suit des recommandations précises et doit être au mieux multidisciplinaire.

Rarement, certains patients se présentent d'emblée au stade métastatique sans tumeur primaire connue et/ou retrouvée, ce qui est souvent associé à une meilleure survie que chez les patients avec une lésion primaire identifiée (Vandeven et al. 2018). Une réponse immunitaire anti-tumorale serait à l'origine de cette régression spontanée, démontrant ainsi l'importance de l'immunité dans l'évolution du CCM. Ces cas restent rares, mais ils sont plus fréquents que dans d'autres cancers cutanés (Wooff et al. 2010).

2. Épidémiologie

Le CCM est un cancer rare, avec une incidence de l'ordre de 0.7 pour 100 000 (Paulson et al. 2018) mais qui ne cesse d'augmenter aux États-Unis comme en Europe, jusqu'à tripler au cours des 20 dernières années (Hodgson 2005; Reichgelt and Visser 2011). Le CCM touche principalement des populations âgées et/ou immuno-supprimées, avec une moyenne d'âge au-delà de 70 ans, et une légère prédominance chez les hommes. L'augmentation importante de l'incidence de ce cancer peut s'expliquer en partie par une amélioration du diagnostic du CCM, notamment liée à l'utilisation du marquage CK20. Une autre raison pourrait être l'accroissement numérique des populations à risque, principalement dû au vieillissement global de la population. De même que l'augmentation du nombre de personnes immunodéprimées, notamment suite à l'augmentation du nombre de patients recevant une transplantation d'organe solide et par conséquent de l'exposition aux traitements d'immunosuppresseurs. La répartition du CCM à l'échelle mondiale n'est pas homogène, elle touche en effet principalement les populations à la peau claire, et il y a donc très peu de CCM chez les populations non caucasiennes (Stang et al. 2018). En Australie, le nombre de CCM est plus important, avec une incidence plus de deux fois supérieure à celle des États-Unis (Abbasi, Ahmed, and Qureshi 2019) en raison d'une forte exposition aux UV. A noter aussi qu'en Australie la présence du MCPyV

dans le CCM semble beaucoup moins importante qu'ailleurs dans le monde (Garneski et al. 2009) avec près de 30% CCM MCPyV⁺ vs au moins 80% ailleurs dans le monde.

Les facteurs de risques du CCM sont donc bien connus : exposition aux UV, âge, immunodépression spontanée et/ou thérapeutique notamment après transplantation ou liée au VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine). Pour ces deux dernières populations, l'incidence du CCM est respectivement 5 à 10 fois et 10 à 13 fois plus importante que pour des populations immunocompétentes (Abbasi, Ahmed, and Qureshi 2019). Les antécédents de néoplasie et notamment d'hémopathie peuvent aussi apparaître comme des facteurs de risque, comme par exemple la présence d'une leucémie lymphocytaire chronique (Schadendorf et al. 2017). A l'inverse, le CCM peut aussi augmenter le risque de développer d'autres tumeurs, comme les mélanomes où le risque est doublé par rapport aux populations témoins, peut-être par un partage de certains facteurs de risque comme les UV (Saxena et al. 2014).

3. Aspects moléculaires

Dans le CCM deux circonstances étiologiques distinctes ont été identifiées : une origine virale liée à la présence du MCPyV, et une origine mutationnelle liée à une exposition prolongée aux UV. Les UV sont en effet un facteur essentiel à l'apparition du CCM, notamment attesté par le fait que les tumeurs apparaissent sur les zones les plus exposées aux UV (tête, cou, mains). De plus, de nombreuses aberrations chromosomiques et mutations UV-induites (dont la signature est majoritairement une modification d'une cytosine en thymine ; C>T) sont présentes dans l'ADN somatique des CCM MCPyV⁺. L'irradiation aux UV serait également à l'origine d'une réduction locale de l'immunité. Ces modifications génomiques avec notamment des duplications ou délétions chromosomiques entraînent des pertes de fonctions de certains gènes suppresseurs de tumeurs (*RB1*), des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN (*ATM*, *MSH2*, *BRCA1/2*, etc.) mais aussi des gains de fonctions de certains oncogènes (*PI3K*, *AKT*, *MTOR*)(Becker et al. 2017). Des duplications chromosomiques impliquant *MYCL* ont été observées, ce qui augmente l'agressivité de la tumeur, mais également de gènes qui vont déréguler *p53*, un gène qui contrôle le cycle cellulaire et de multiples voies de signalisations intracellulaires (Starrett et al. 2020). Des délétions récurrentes dans le chromosome 10 ont également été identifiées avec diminution de l'activité de *PTEN* et augmentation de l'activité de la voie de signalisation dépendante de *PI3K*, régulatrice du cycle cellulaire. Une surexpression des gènes

tels *PI3K*, *CD117* ou encore *PDGF* a par ailleurs été identifiée dans certains cas et associée à un plus mauvais pronostic (Starrett et al. 2020)

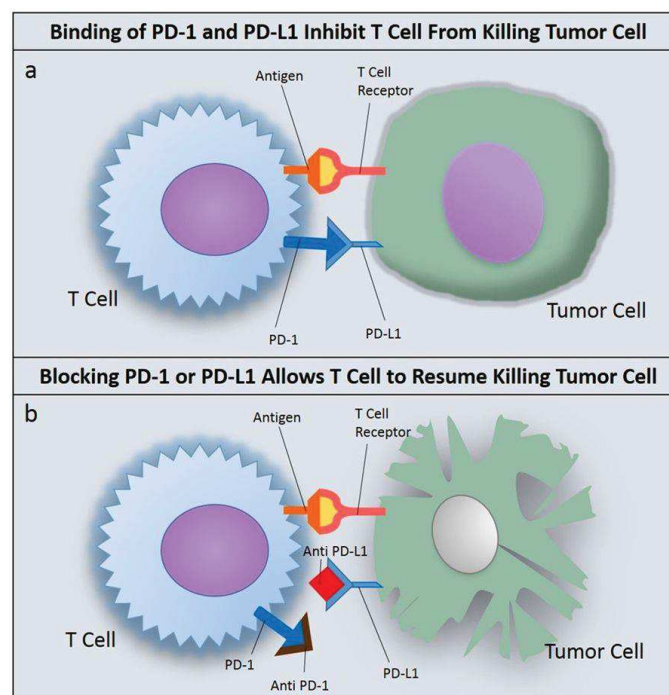
La seconde circonstance étiologique du CCM est liée à la présence d'un polyomavirus, le MCPyV ce qui peut expliquer en grande partie les liens avec l'immunosuppression. Même s'il est ubiquitaire, ce virus semble bien jouer un rôle déterminant dans le développement de cette tumeur, sans que les mécanismes sous-jacents soient encore totalement connus. Actuellement, il a été établi que le MCPyV est retrouvé sous forme d'épisome (ADN double brin circulaire) dans les cellules saines, alors qu'il est intégré à l'ADN dans les cellules de CCM. Il a été suggéré que l'intégration se faisait lors des phases de réparation de l'ADN cellulaire, à des sites de micro-homologie entre la séquence virale et la séquence cellulaire (Starrett et al. 2020). Une description plus détaillée de ce polyomavirus sera présentée par la suite.

4. Les traitements du CCM

Les patients atteints du CCM aux stades précoces (stades I et II, non-métastatiques) doivent bénéficier d'une exérèse chirurgicale large de la tumeur primaire avec des marges de sécurité de 1 à 2 cm pour les tumeurs ≤ 2 cm et de 2 à 3 cm pour des tumeurs > 2 cm autour de la zone initialement excisée. L'exérèse est associée à une radiothérapie post-opératoire systématique du lit tumoral à titre adjuvant pour contrôler la dispersion locale. L'irradiation de la zone ganglionnaire de drainage, associée ou non à un curage ganglionnaire est discutée selon les résultats de l'étude du ganglion sentinelle et selon la taille de la tumeur initiale (Del Marmol and Lebbe 2019; Petrelli et al. 2019). La surveillance est ensuite très étroite.

La prise en charge des patients au stade métastatique (stades III et IV) est basée sur différentes lignes de chimiothérapie associant carboplatine et l'étoposide ou cyclophosphamide, vincristine et adriamycine mais les rechutes sont fréquentes et la toxicité non négligeable chez des patients souvent fragiles (Schadendorf et al. 2017). Récemment, une immunothérapie utilisant des anticorps anti-PD-1 (pembrolizumab) ou anti-PD-L1 (avelumab) a été validée aux États-Unis par la Food Drug Administration (FDA) et par l'European Medicines Agency (EMA) en Europe, ainsi qu'en Australie et au Japon. Ce traitement consiste à bloquer l'interaction entre PD-1 (à la surface des cellules immunitaires) et PD-L1 (à la surface des cellules cancéreuses), interaction qui empêche la mise en place d'une réaction immunitaire anti-tumorale efficace (**Figure 1**). Cette immunothérapie a déjà prouvé son

efficacité dans d'autres tumeurs notamment cutanées comme le mélanome ou certains lymphomes (Gong et al. 2018; Zou, Wolchok, and Chen 2016). Dans le CCM, cette immunothérapie, d'abord évaluée chez les patients réfractaires à la chimiothérapie, a démontré une réponse durable indépendamment du statut du MCPyV (Becker et al. 2017). Cependant près de 50% des patients sont résistants à l'immunothérapie par anti-PD-L1 (Zhao et al. 2020). Une vingtaine d'essais cliniques étudiant l'efficacité de différentes immunothérapies sont actuellement en cours. De nouvelles études ont démontré l'efficacité des immunothérapies en première ligne de thérapie, en lieu et place de la chimiothérapie, avec une amélioration globale de la survie globale (Nghiem et al. 2019).



Caldwell et al. Sci Rep. 2017

Figure 1: Immunothérapie bloquant l'interaction PD-1/PD-L1

a) La liaison PD-L1 et PD-1 bloque la reconnaissance de la cellule tumorale par la cellule T de l'hôte. Cette liaison prévient la mort de la cellule tumorale. b) L'immunothérapie ciblant PD-1 ou PD-L1 inhibe la liaison ligand-récepteur. La cellule T peut retrouver ses fonctions d'induction de mort cellulaire.

D'autres traitements sont également actuellement évalués dans des essais cliniques, notamment le blocage de l'interleukine-2, l'inhibition de certaines kinases ou encore des analogues de la somatostatine (Schadendorf et al. 2017). Une meilleure compréhension des mécanismes oncogénétiques sous-jacents, probablement multiples, et une caractérisation moléculaire individuelle

plus approfondie concernant les mutations oncogéniques permettraient de choisir au mieux le traitement de chaque patient sur une base plus « ciblée ». En effet, des études ont mis en évidence des sous-types de CCM en fonction des profils moléculaires et des signatures de gènes, l'implication possible voire probable de différentes voies de signalisation dans la carcinogénèse. Il serait ainsi possible de choisir plus spécifiquement pour un patient donné les traitements en fonction des voies de signalisation impliquée et des profils mutationnels (Saddozai et al. 2020).

b) Le polyomavirus impliqué dans le CCM : MCPyV

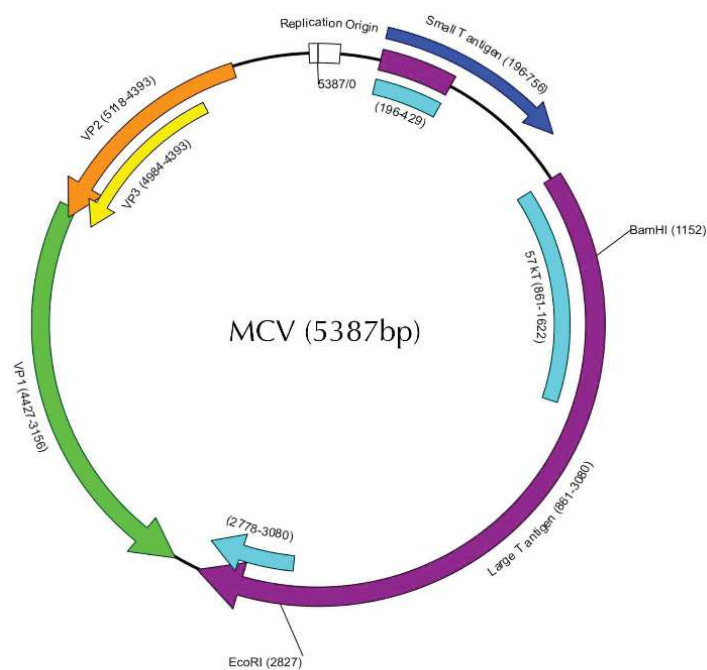
1. Description du MCPyV

Les polyomavirus sont des petits virus (40-60nm) qui font partie de la famille des *Polyomaviridae*. Il existe à l'heure actuelle plus de 80 polyomavirus décrits. Ils infectent majoritairement les mammifères et les oiseaux. Un polyomavirus est un virus nu, sans enveloppe, constitué d'une capsidie icosaédrique et d'un ADN circulaire double brin. Certains de ces virus peuvent avoir une activité oncogénique, tout comme les PapillomaVirus Humains (HPV). Ils expriment tous communément deux antigènes à activité potentiellement oncogène : l'antigène « grand T » (Large T antigen : LT), et l'antigène « petit T » (short T antigen : sT) ainsi que trois protéines de capsides : VP1, VP2 et VP3 (où VP1 étant la protéine majeure de capsidie capable d'auto-assemblage). L'ADN des polyomavirus est constitué de 5 à 5,3 kb et est organisé structurellement par des histones (Margaret Hun 2013).

Le MCPyV a été découvert en 2008 par Feng *et al.* (Feng *et al.* 2008) en utilisant des techniques de métagénomique fonctionnelle. Faisant partie du sous-groupe SV40 des polyomavirus, c'est actuellement le seul polyomavirus humain ayant été directement impliqué dans l'oncogénèse humaine. Son ADN est constitué de 5387pb avec une région codante précoce et une région codante tardive. La région codante précoce va permettre la transcription rapide d'un unique pré-ARNm après l'infection de la cellule-cible. Ce pré-ARNm va ensuite subir un épissage alternatif qui va engendrer deux ARNm matures différents : un ARNm court constitué d'un seul exon, codant pour le sT et un ARNm long de 2 exons, codant pour le LT. Le LT synthétisé va pouvoir ensuite être transloqué dans le noyau cellulaire où il va intervenir dans la régulation de la réplication virale notamment en inhibant sa propre expression afin d'activer la transcription tardive.

La région codante tardive va permettre la synthèse des protéines de capsides VP1, VP2 et VP3 : un premier promoteur va entrainer la transcription d'un ARNm codant pour VP1, et deux autres promoteurs, dans un cadre de lecture différent, vont entrainer la transcription puis la synthèse de VP2 et VP3 (Figure 2).

Le LT va ensuite détourner la machinerie cellulaire de la cellule infectée afin de répliquer le génome viral. Il joue donc un rôle primordial dans le processus d'infection mais surtout de multiplication du MCPyV. D'un point de vue fonctionnel, la partie N-terminale du LT est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire tandis que la partie C-terminale intervient dans la réplication et la transcription du génome viral. Le sT quant à lui joue un rôle accessoire dans la réplication virale (White, Safak, and Khalili 2009) ; il participe également à la survie et la prolifération cellulaire mais les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus (Tabachnick-Cherny et al. 2020).



Feng et al. Science. 2008

Figure 2: Cartographie de l'ADN du MCPyV

Le MCPyV code pour le grand antigène T (violet), le petit antigène T (bleu) qui sont des propriétés caractéristiques des polyomavirus. Les protéines virales sont codées par les gènes VP1 (vert), ainsi que VP2 (orange) et VP3 (jaune) qui se chevauchent.

2. Le MCPyV dans les populations humaines

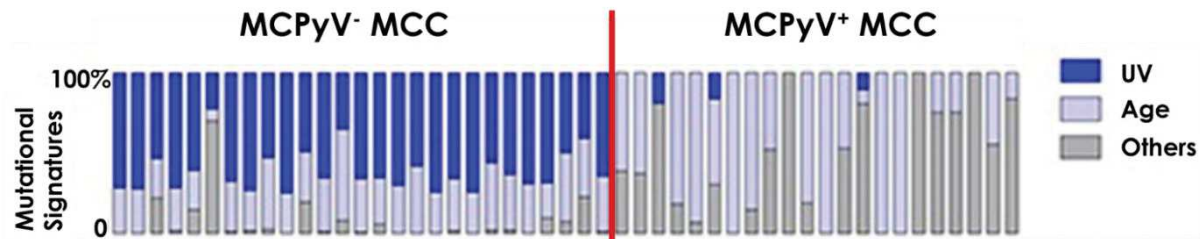
Ce polyomavirus est présent sur la surface cutanée de près de 80% de la population saine, et sa présence augmente en fréquence avec l'âge. On estime que, suivant la méthode de détection, il est retrouvé sur la peau de 9 à 40% des enfants âgés de 1 à 4 ans vs plus de 90% des adultes. De plus, le MCPyV est présent tout au long de la vie d'un individu (Sourvinos, Mammas, and Spandidos 2015). Dans les populations saines, le MCPyV se présente sous forme d'épisome, c'est-à-dire sous forme d'ADN circulaire, dans la peau mais aussi dans d'autres tissus comme les voies respiratoires (Bialasiewicz et al. 2009). La très grande majorité des individus colonisés par le MCPyV ne développeront jamais de CCM, ce qui sous-entend l'existence de cofacteurs oncogènes qui restent à déterminer (UV, immunosuppression, ou encore d'autres agents infectieux, notamment viraux).

Lors de la transformation des cellules saines en cellules tumorales, le matériel génétique du MCPyV s'intègre à l'ADN de la cellule. Cette intégration s'effectue de manière sporadique et aléatoire, cependant des études ont montré des sites d'intégration dans 12 chromosomes différents mais avec une certaine récurrence observée dans le chromosome 5 (Arora et al. 2020). Lors du processus d'intégration dans l'ADN cellulaire une partie de la séquence codante pour le LT est tronquée mais le sT permet sa stabilisation grâce au domaine LSD (LT Stabilization Domain). Il en résulte une protéine LT tronquée sur la région C-terminale, perdant ainsi sa capacité répliquative mais conservant l'activité oncogénique. Les mécanismes ainsi que les événements amenant à cette intégration restent encore à déterminer. Le sT semble également jouer un rôle dans le développement tumoral ; en effet son expression dans des modèles murins, couplée à l'expression d'autres protéines oncogéniques, induit la formation de tumeur semblable au CCM ; par ailleurs il augmente la mobilité cellulaire et donc l'agressivité locale et à distance (Del Marmol and Lebbe 2019).

3. Le MCPyV dans le CCM

Dans le CCM, la présence du MCPyV est identifiée dans 80% des cas, avec une prévalence très nettement plus forte dans les pays nordiques alors qu'en Australie (où l'exposition aux UV est importante) il n'est retrouvé que chez environ 30% des patients (Stang et al. 2018). De plus, il semble que dans les CCM MCPyV⁻ le taux de mutations induites par les UV (C>T) est nettement plus élevé que dans les formes MCPyV⁺ (**Figure 3**), ce qui est corrélé avec un risque de progression et de décès plus élevé que dans les cancers MCPyV⁺, montrant donc la quasi-exclusivité mutuelle des deux facteurs étiologiques principaux du CCM (UV et virus). Ces différences notables entre les CCM MCPyV⁺ et les

MCPyV⁻ ont de plus soulevé l'hypothèse de deux origines cellulaires différentes (Del Marmol and Lebbe 2019).



Goh G et al. Oncotarget. 2016

Figure 3: Taux de mutation UV-induite dans les CCM MCPyV⁻ vs MCPyV⁺

Fréquence relative de la présence des mutations induite par les UV, l'âge ou d'une autre origine.

La présence du MCPyV dans les CCM peut être testée par différentes techniques : par immunomarquage sur lame avec des anticorps anti-CM2B4 ou AB3 ou par qPCR ciblant différentes parties de l'ADN du MCPyV. Cette détection peut être utilisée comme marqueur diagnostique ou pronostique. Par ailleurs, les individus simplement « colonisés » par le MCPyV mais sans CCM n'ont que des anticorps dirigés contre les protéines de capsides, alors que les patients ayant développé un CCM possèdent également des anticorps dirigés contre l'antigène T (Ac-T). La présence d'Ac anti-LT serait corrélée avec l'évolution de la tumeur et pourrait être un marqueur précoce de récurrence (Schadendorf et al. 2017).

Le MCPyV pourrait constituer une cible pertinente dans le traitement des CCM, à condition que la détection soit réalisée de manière systématique. En effet, le MCPyV semble jouer un rôle dans l'activation de la voie de signalisation NF-κB qui régule l'immunité et l'inflammation en inhibant la voie canonique de NF-κB et en activant la voie non-canonique, qui joue un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire. L'inhibition de la voie non-canonique de NF-κB pourrait donc se révéler une cible thérapeutique intéressante dans les CCM MCPyV⁺ (Zhao et al. 2020). Par ailleurs un vaccin thérapeutique contre le MCPyV pourrait être envisagé. L'idée d'un vaccin préventif, comparable à ce qui est disponible pour les HPV n'a en revanche pas d'intérêt particulier car la majorité de la population, certes déjà colonisée par ce virus, ne développera jamais de tumeur. Cependant, un tel vaccin pourrait permettre de prévenir les rechutes dans les CCM MCPyV⁺ au stade primaire

(Tabachnick-Cherny et al. 2020). Dans cette perspective, une étude a développé un vaccin à ADN contre le LT chez la souris, mais l'application clinique chez l'Homme est encore lointaine (Zeng et al. 2012).

En résumé, le CCM est une tumeur agressive, considérée comme rare mais dont l'incidence ne cesse d'augmenter, notamment au cours des dernières années. La compréhension des mécanismes sous-jacents reste insuffisante et les traitements restent donc « généraux », peu spécifiques. Une connaissance approfondie des mécanismes en cause permettrait d'orienter les traitements sur une base individuelle et d'améliorer le devenir des patients dont la survie globale est actuellement limitée. La découverte de nouveaux biomarqueurs permettra de suivre au plus près l'évolution de la maladie et pourra aider à traiter très précocement d'éventuelles rechutes avant même que l'imagerie haute définition et les méthodes de médecine nucléaire (Tomographie par émission de positons - TEP) ne le permettent. Mais l'étude de nouveaux biomarqueurs permettra aussi de comprendre au mieux les mécanismes de ce cancer, notamment la dissémination métastatique, fortement impliquée dans la survie globale particulièrement courte pour les patients atteints de CCM.

II. Le processus métastatique

Le cancer est responsable de près de 10 millions de morts chaque année et est la deuxième cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires (Global Cancer Facts & Figures 4th Edition – American Cancer Society). Cependant, plus que le cancer lui-même, c'est la dissémination du cancer et l'atteinte de plusieurs organes par des métastases qui est responsable de la mort des patients. En effet, la présence de métastases chez les patients est associée à un moins bon pronostic que pour les patients qui sont uniquement atteints régionalement (Robert 2013; Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017). Le terme de métastase provient du grec *metastasis* qui signifie « je change de place », et se définit par le transfert du cancer d'un organe à un autre, sans connexion directe entre les deux (Dudjak 1992; Fidler and Balch 1987). Actuellement, les métastases sont responsables de 90% des décès par cancer (Lambert, Pattabiraman, and Weinberg 2017).

La formation d'une tumeur cancéreuse, dite maligne, résulte de l'augmentation du ratio entre prolifération et mort cellulaire, induisant ainsi l'augmentation du nombre de cellules dans un site donné et donc la formation d'une masse à haute densité cellulaire (Norton and Massague 2006; Robert 2013). Les tumeurs cancéreuses à la différence des tumeurs bénignes, vont être vascularisées et vont se disséminer dans le tissu. Les tumeurs sont constituées de cellules cancéreuses, dont l'ADN est muté, et de stroma, une association de composants cellulaires ou non (fibroblastes, macrophages, mastocytes, adipocytes, endothéliums vasculaire et lymphatique, cellules immunitaires, réseau cytokinique, protéines de la matrice extracellulaire, etc.) qui constitue le microenvironnement tumoral (Loizzi et al. 2017). Les cellules tumorales ont la capacité de motilité, elles peuvent aussi s'adapter métaboliquement pour augmenter leur survie, et subir des modifications épigénétiques qui leur confèrent la possibilité de se disséminer (Moyret-Lalle et al. 2016; Nicolson 1976). Ainsi les tumeurs sont invasives, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de diffuser dans le système lymphatique ou sanguin afin de coloniser des ganglions à proximité ainsi que des organes à distance de la tumeur primaire (Welch 2006) : c'est le processus de dissémination métastatique. Cependant ce processus aussi appelé cascade métastatique, est le résultat de nombreuses étapes. Les mécanismes précis, du détachement de la tumeur primaire à la prolifération de la métastase dans l'organe cible, sont encore mal compris. La compréhension de ces mécanismes permettrait cependant de pouvoir cibler les étapes clés du processus pour prévenir et/ou traiter au mieux la dissémination métastatique, et ainsi améliorer la survie globale des patients atteints de cancer.

La cascade métastatique se déroule en étapes successives qui vont permettre aux cellules de la tumeur primaire de se détacher du site initial, d'envahir le microenvironnement tumoral, de se disséminer dans le système sanguin, d'y circuler, et enfin d'en sortir et de coloniser de nouveaux organes, avec comme objectif final la formation de métastases. Cependant, on sait que ce processus est très inefficace : moins de 0,01% des cellules se détachant de la tumeur primaire vont former des métastases (Tayoun et al. 2019; Fidler 1970; Massague and Obenauf 2016). En effet, les cellules tumorales vont devoir s'adapter à des contraintes environnementales variables lors des nombreuses étapes de la progression métastatique, décrites ci-dessous.

1. Invasion et angiogenèse

Le processus de dissémination métastatique débute donc par l'invasion du tissu adjacent par les cellules tumorales. Lors de la croissance tumorale, les cellules cancéreuses vont proliférer et subir des remaniements, notamment au niveau des intégrines, qui vont perturber les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire existantes. Les cellules cancéreuses vont donc perdre l'ancrage dont elles disposaient au sein de la tumeur primaire. Un de ces mécanismes est l'activation par différentes voies de signalisation de la voie PI3K qui entraîne la migration des cellules vers le tissu environnant (**Figure 4**) (Friedl and Alexander 2011; Claesson-Welsh and Welsh 2013). Les cellules tumorales peuvent également synthétiser des protéines, les métalloprotéases de matrice (MMP) et les cathepsines, afin de dégrader et percer la membrane basale et leur permettre d'envahir le stroma à proximité de la tumeur initiale (Valastyan and Weinberg 2011; Kessenbrock, Plaks, and Werb 2010; Gocheva et al. 2010). Il peut alors se mettre en place une communication entre cellules tumorales et fibroblastes, constituants majoritaires du stroma tumoral. Par exemple, les cellules tumorales vont sécréter des facteurs de croissance comme le TGF- β (*transforming growth factor β*) ou le FGF (*fibroblast growth factor*). En réponse, les fibroblastes associés vont synthétiser d'autres facteurs de croissance dont vont se servir les cellules tumorales pour proliférer et se disséminer. C'est le cas notamment du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), un facteur pro-angiogénique essentiel à la dissémination métastatique. Ces modifications vont les rendre aptes à traverser la barrière vasculaire et entrer dans le système sanguin. Dans un même temps, les adipocytes du stroma environnant vont pouvoir jouer un rôle primordial en fournissant l'énergie nécessaire aux cellules tumorales pour se diviser de manière importante, et vont synthétiser des facteurs de l'EMT (Transition Epithélio-

Mésenchymateuse) tels que le TGF- β (Zamani and Brown 2011), Twist (Pettersson et al. 2011) ou Slug (Perez-Mancera et al. 2007), mais aussi des MMP pour aider à l'invasion cellulaire (Figure 4) (Park, Euhus, and Scherer 2011).

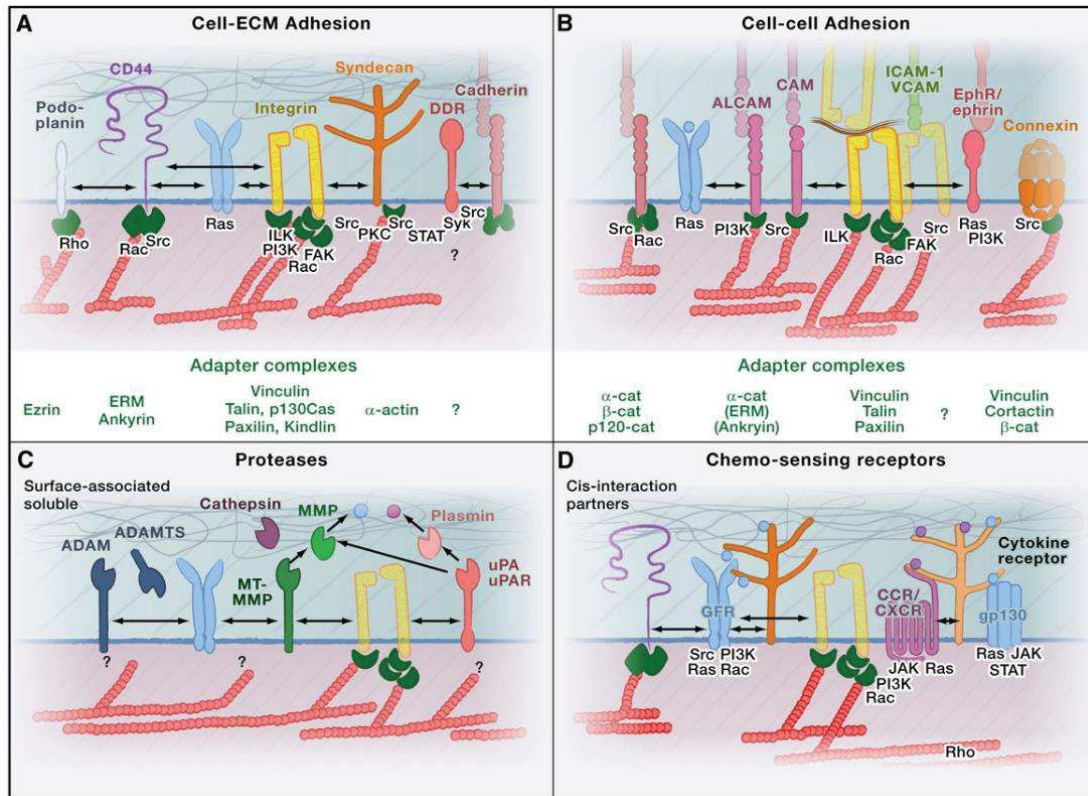


Figure 4: Voies de signalisation de la migration cellulaire

A : Voies de signalisation pro-migratoire entre cytosquelette d'actine et matrice extracellulaire (ECM). B : Protéines de surface et interactions cellules-cellules, avec des interactions plus homotypiques lors de l'invasion collective, et plus hétérotypiques avec les cellules environnantes lors de l'invasion tissulaire. C : Système des protéases suractivé lors de la progression et l'invasion cellulaire. D : Récepteurs des chimiokines, cytokines et facteurs de croissance. Les symboles verts représentent les adaptateurs au cytosquelette d'actine.

Friedl et al. Cell. 2011

La croissance tumorale puis la communication cellule tumorale / stroma vont permettre au processus d'angiogenèse de se mettre en place : des néo-vaisseaux se forment depuis le réseau vasculaire existant, permettant la vascularisation du lit tumoral et donc la progression de la tumeur (Loizzi et al. 2017; Claesson-Welsh and Welsh 2013; Carmeliet and Jain 2000). L'angiogenèse est principalement induite en état d'hypoxie du microenvironnement tumoral (Loizzi et al. 2017) lorsque la croissance cellulaire de la tumeur a provoqué une hypoxie en son centre. Ainsi, les cellules tumorales vont

sécréter des molécules pro-angiogéniques (dont le VEGF et le FGF) en formant un gradient décroissant depuis le centre jusqu'à la périphérie de la tumeur. Les nombreux échanges moléculaires entre cellules tumorales, cellules stromales et cellules sanguines va conduire au développement de nouveaux vaisseaux entre la tumeur et la circulation sanguine générale. A l'inverse des vaisseaux physiologiques, ce néo-réseau vasculaire est désorganisé, particulièrement poreux et en constante reconfiguration. Ce processus d'angiogenèse alimente la tumeur en nutriments et en oxygène grâce aux néovaisseaux qui pénètrent au sein même de la tumeur. Ainsi, plus une tumeur sera vascularisée, plus elle aura de chances de métastaser (Dudjak 1992; Liotta, Kleinerman, and Saidel 1974; Liotta, Saidel, and Kleinerman 1976), c'est donc un processus essentiel à la dissémination métastatique (Taylor et al. 2010; Kerbel 2008). En effet, les cellules tumorales détachées de la matrice extracellulaire peuvent emprunter ces néovaisseaux poreux depuis la tumeur ou depuis le stroma tumoral afin de rejoindre et de se disséminer dans la circulation sanguine générale (Loizzi et al. 2017), c'est l'étape d'intravasation.

2. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un mécanisme important

La dissémination métastatique peut être possible grâce au décrochage d'une partie des cellules de la tumeur primaire qui fait suite à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) par les cellules tumorales. Ce phénomène est d'abord connu pour être physiologique au cours de l'embryogenèse, pour le développement des organes mais aussi lors de cicatrifications. Il consiste en une diminution de l'expression des protéines épithéliales au bénéfice de protéines mésenchymateuses. Les cellules épithéliales, attachées à une matrice extracellulaire vont subir un remaniement de leur cytosquelette qui va entraîner la perte des propriétés épithéliales (adhésion cellule-cellule, polarité cellulaire, manque de mobilité). Elles vont gagner en propriétés de cellules mésenchymateuses, qui sont mobiles, ont la capacité d'invasion du microenvironnement, mais aussi des attributs de cellules souches (auto-renouvellement, différenciation, invasion)(Tam and Weinberg 2013). Ainsi, les cellules tumorales qui seront dans un état mésenchymateux plus avancé ne seront plus attachées à une matrice, seront non polarisées, elles ne constitueront plus un tissu et seront capables de migration et d'invasion. En effet, dans certains cas, la comparaison des signatures moléculaires des tumeurs primaires à celles des métastases a révélé la perte de marqueurs épithéliaux (E-Cadhérine, Cytokératines) et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (N-Cadhérine, Vimentine) (**Figure 5**) (Li and Kang 2016; Thiery and Sleeman 2006). Les cellules tumorales de la tumeur primaire, perdant ainsi leurs propriétés

épithéliales, vont pouvoir se détacher les unes des autres, ainsi que de la matrice extracellulaire pour envahir le microenvironnement tumoral.

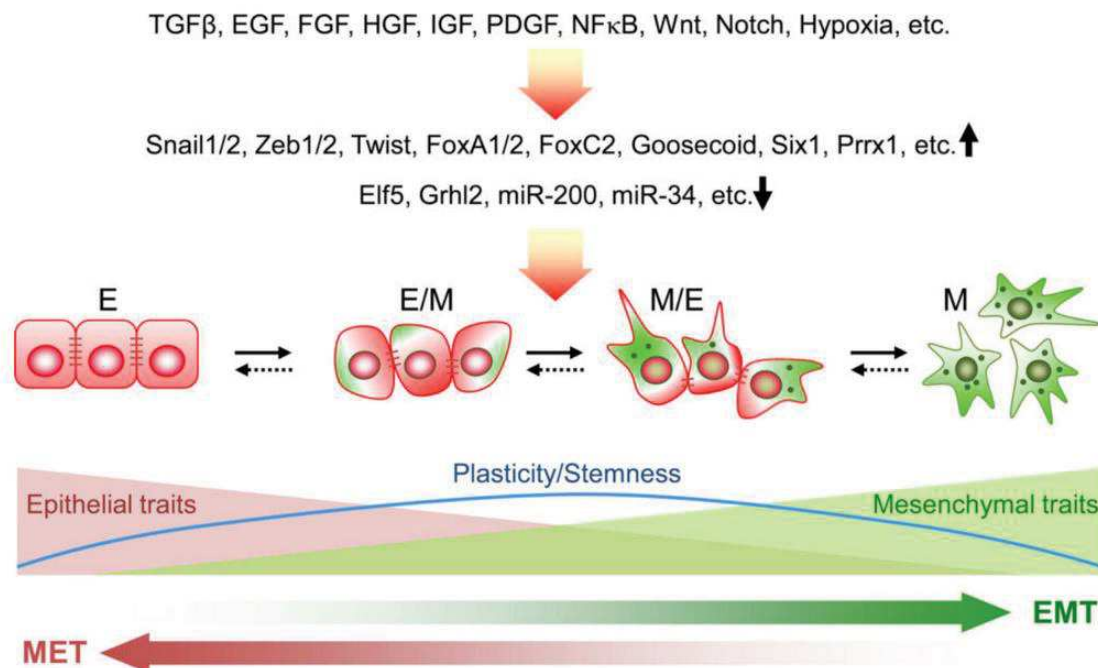


Figure 5: Plasticité des cellules entre EMT et MET

L'EMT peut être induite par de nombreux signaux initiateurs et des régulateurs. La transition vers un phénotype mésenchymal entraîne une perte des propriétés épithéliales. Les cellules dans un état transitoire ou partiel de l'EMT possèdent une plus grande plasticité et plus de propriétés de cellules souches. Les lignes marrons représentent la E-cadhérine (molécule d'adhésion épithéliale), les points vers représentent la Fsp1 et la vimentine (molécules mésenchymateuses).

Li et al. Trends Cancer. 2016

Lors du processus métastatique, l'EMT est activée par la réception de nombreux signaux paracrines, notamment la voie de signalisation TGF-β, un inducteur majeur de l'EMT souvent hyper-activé dans de nombreux cancers. La voie TGF-β est connue pour promouvoir l'invasion tumorale car elle va permettre l'expression de facteurs de transcription liés à la prolifération, la différenciation et la survie des cellules. Les modifications épigénétiques induites par cette voie, notamment des changements de la méthylation de l'ADN, de la configuration des histones, ou encore l'implication de miRNA (Moyret-Lalle et al. 2016) vont permettre l'expression de gènes de motilité cellulaire (Tam and Weinberg 2013). Ces modifications vont entraîner la surexpression de différents facteurs de transcription, notamment

Snail, Twist ou Zeb1 (**Figure 5**). Ces facteurs vont permettre aux cellules tumorales d'acquies des propriétés de cellules souches, ce qui va entraîner une augmentation de l'invasivité, de l'auto-renouvellement, et des capacités d'adaptation au microenvironnement et de survie des cellules. Mais ces facteurs vont aussi induire une diminution des voies onco-suppressives telles que p53 ou Rb. L'EMT dépend de plusieurs voies de signalisation, la voie Wnt joue un rôle dans le maintien des cellules souches cancéreuses, et les voies des récepteurs aux tyrosine-kinases (EGF, FGF, PDGF) vont, elles, stimuler la transition des cellules épithéliales vers l'état mésenchymateux (**Figure 5**) (Tam and Weinberg 2013).

L'EMT joue également un rôle dans la survie des cellules tumorales dans le système circulatoire. En effet, les analyses des Cellules tumorales circulantes (CTC) isolées ainsi que des clusters de CTC enrichis depuis le système vasculaire ont révélé des phénotypes hybrides de l'EMT (Lecharpentier et al. 2011), reflétant l'hétérogénéité des marqueurs de l'EMT dans les CTC (Hou et al. 2012) (Lecharpentier et al. 2011). De même que des études ont associé l'expression de marqueurs de l'EMT avec la progression de la maladie (Kallergi et al. 2011). Dans le cancer du sein par exemple, la présence de marqueurs de l'EMT corrèle avec les cancers du sein triple négatifs ou Her2+, qui sont les plus invasifs (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017).

Ce processus d'EMT, d'abord décrit comme un changement d'état en un autre, dit phénomène de « tout ou rien », reflète en réalité une grande plasticité des cellules et est donc maintenant décrit comme une transition entre les deux états (Nieto et al. 2016). La réversibilité de ce phénomène est appelé la transition mésenchymateuse-épithéliale (*Mesenchymal-Epithelial Transition* – MET). Elle a lieu pendant le développement embryonnaire pour former les différents tissus grâce à la formation des jonctions cellules-cellules ou l'accroche de ces cellules à une matrice extracellulaire. La MET lors de la progression métastatique va permettre aux CTC de coloniser les sites métastatiques.

Les cellules, dans un état partiel et transitoire de l'EMT, gardent souvent des propriétés épithéliales telles que l'expression d'EpCAM ou de cytokératines qui leur permettent de former les agrégats, tout en ayant la capacité des cellules mésenchymateuses de migration (Tam and Weinberg 2013). La coexistence des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux chez les cellules tumorales hybrides leur confèrent une capacité d'invasion et de dissémination plus grande, et crée une grande hétérogénéité phénotypique et moléculaire. Elle va leur apporter un avantage fonctionnel, notamment pour s'adapter au microenvironnement lors de leur sortie du système vasculaire, dans les étapes suivantes

de la dissémination métastatique (Tayoun et al. 2019). Cet état transitoire dans lequel se trouve les cellules tumorales est souvent une explication de la résistance aux traitements et des thérapies conservant la balance EMT/MET permettraient de bloquer la dissémination métastatique, en inhibant les étapes d'invasion, d'intravasation comme d'extravasation (Ye and Weinberg 2015).

3. Intravasation

L'intravasation se définit comme le phénomène d'entrée des cellules dans le système sanguin grâce à leur passage à travers la barrière endothéliale. Cette étape existe en conditions physiologiques, notamment lors de réponses immunitaires où les cellules dendritiques vont migrer de la peau vers les ganglions lymphatiques ou lorsque les leucocytes vont retourner dans la circulation sanguine depuis un site d'inflammation (Zavyalova et al. 2019). Lors de la progression du cancer, les cellules tumorales ayant perdues leurs propriétés adhésives et épithéliales vont être plus sensibles à l'EGF et vont pouvoir migrer selon le gradient EGF depuis la tumeur jusqu'à la barrière endothéliale (Zervantonakis et al. 2012). L'intravasation se déclenche par une collaboration paracrine entre les cellules cancéreuses et les macrophages associés aux tumeurs (TAM). Elle va nécessiter des propriétés invasives de la part des cellules tumorales, et une synthèse de chimio-attractants par les TAM. En effet, les TAM vont synthétiser l'EGF (Wyckoff et al. 2007) qui va agir comme un attractant pour les cellules tumorales. En réponse, les cellules tumorales possédant les récepteurs à l'EGF vont synthétiser le CSF1 (*Colony stimulating factor 1*) qui va agir comme un chimio-attracteur des TAM qui synthétisent l'EGF (**Figure 6**). Ainsi, une boucle paracrine se met en place et stimule l'invasion des cellules tumorales du site tumoral primaire vers les parois du réseau vasculaire en longeant les fibres de collagène (Zavyalova et al. 2019; Borriello et al. 2020). Parallèlement, les macrophages périvasculaires vont synthétiser le VEGFA, entraînant l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, et par conséquent la dissémination tumorale. En effet le taux de macrophages périvasculaires a été corrélé avec l'angiogenèse, ainsi qu'avec un moins bon pronostic des patients (Wyckoff et al. 2007). Ces macrophages périvasculaires sont, à l'inverse des TAM, immobiles, associés à la paroi du système vasculaire et sont impliqués dans la formation d'invadopodes.

Puis les cellules tumorales vont passer dans le compartiment sanguin en traversant la barrière endothéliale des micro-vaisseaux formés lors de l'angiogenèse, c'est la seconde étape de l'intravasation.

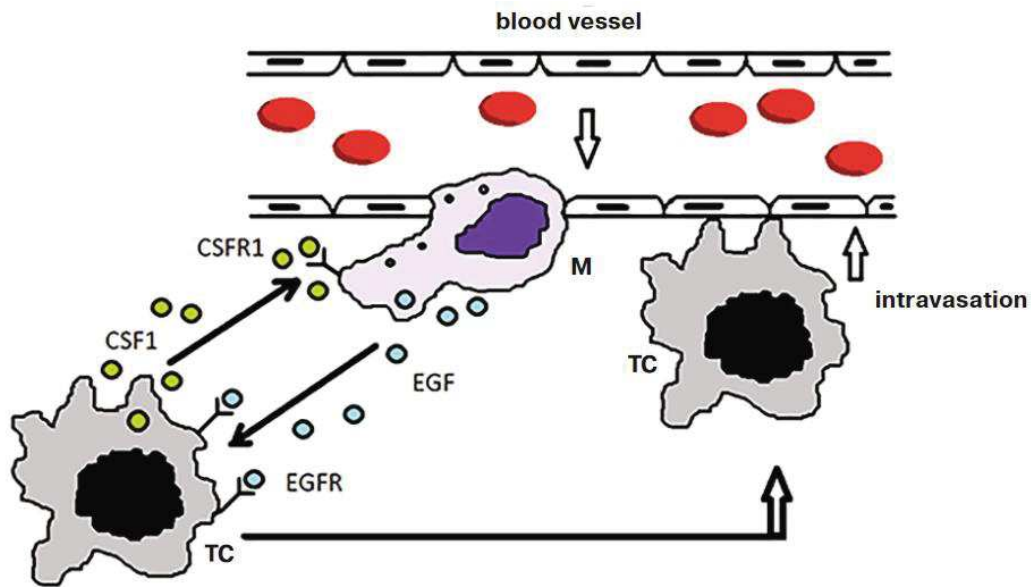


Figure 6: Intravasation des cellules tumorales à l'aide de macrophages

Mise en place d'une boucle paracrine entre macrophage (synthèse d'EGF) et cellule tumorale (synthèse de CSF1) qui stimule l'intravasation de la cellule tumorale. Abréviations : TC = Cellule Tumorale, M = Macrophage.

Zavyalova et al. Biochemistry. 2019

Les invadopodes sont des structures riches en actine et en Fascin-1, et se forment dans les cellules tumorales suite à un stimulus moléculaire. La synthèse d'EGF, l'activation de la voie Wnt, ou la présence de protéines ou N-WASP résulte en une modification du cytosquelette cellulaire. Ils sont essentiels à l'invasion des cellules tumorales, notamment à la mobilité cellulaire, au passage à travers la membrane basale, ainsi qu'à la migration transendothéliale (Zavyalova et al. 2019). Leur formation va recruter les MMP pour la dégradation de la membrane basale et permettre aux cellules de rejoindre la circulation. De plus, une fois les cellules tumorales arrivées au niveau des parois vasculaires, elles vont pouvoir, grâce aux invadopodes, traverser la barrière du système sanguin qui va dépendre de la perturbation des jonctions inter-endothéliales. C'est l'interaction entre cellules tumorales, macrophages, cellules endothéliales, et la synthèse du VEGF par les macrophages périvasculaires qui va permettre une ouverture sur le système vasculaire. Cette communication intracellulaire va activer la voie de signalisation Notch, mais aussi la synthèse de MMP1 ou de Cox2, ainsi l'invadopode va permettre de conserver cette porte d'entrée ouverte sur le système vasculaire (Borriello et al. 2020; Massague and Obenauf 2016). Ces ouvertures transendothéliales et la perméabilité vasculaire vont permettre aux cellules d'intravaser à travers l'endothélium vers le système vasculaire. Ce mécanisme

d'ouverture est possible depuis le microenvironnement tumoral primaire tout comme des sites secondaires, les métastases. On parle alors de re-dissémination ou de re-intravasation vers le site primaire ou vers des sites tertiaires. Ce phénomène induit une dissémination métastatique multidirectionnelle.

Cependant, le site exact de l'intravasation reste à préciser. En effet, deux hypothèses ont été émises ; une première où les cellules tumorales s'accumulent d'abord dans le système lymphatique à proximité de la tumeur avant de traverser la barrière endothéliale et pénétrer ainsi dans le système veineux. La seconde, récemment discutée par Zavyalova *et al.*, suggère une intravasation directe depuis le cœur même de la tumeur grâce aux néovaisseaux résultants de l'angiogenèse (Zavyalova et al. 2019).

4. La circulation des cellules tumorales dans le sang

Pour réussir leur entrée dans le système vasculaire, et y survivre, les cellules tumorales vont devoir mettre en place des mécanismes afin de pallier aux contraintes qu'elles vont rencontrer (vitesse des fluides, immunité, etc). Les cellules tumorales peuvent s'organiser, au site de la tumeur primaire, sous forme de groupes (cluster) qui les rendent plus résistantes dans la circulation et favorisent leur capacité pro-métastatique (Aceto et al. 2014). La formation de ces clusters, facilitée par la synthèse de VEGF (Zavyalova et al. 2019) se fait dans la tumeur, avec un détachement d'un groupe cellulaire tumoral, conservant ainsi des jonctions inter-cellulaires, on parle alors de cluster homotypique. Ces agrégats cellulaires possèdent des jonctions cellules-cellules notamment grâce aux protéines plakoglobine, claudine 3, claudine 4 ou la cytokératine 14, qui vont entraîner une modification de la compaction de l'ADN des cellules constituant le cluster (Aceto 2020; Gkountela et al. 2019). La plakoglobine, une composante des desmosomes et des jonctions adhérentes permet l'agrégation cellulaire, elle est synthétisée de manière hétérogène au sein de la tumeur et peut prédire les clusters qui vont se détacher là où elle est surexprimée (Aceto et al. 2014), l'expression de cytokératine 14 est elle, directement liée au potentiel métastatique (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017). Ces changements moléculaires vont activer les facteurs de transcription liés à la prolifération ou les propriétés de cellules souches (Sox2, Nanog) des cellules tumorales.

Il est également possible que les cellules tumorales recrutent au site de la tumeur d'autres types cellulaires, notamment des cellules sanguines comme les neutrophiles, les plaquettes. Duda *et al.*

décrivent l'association des cellules tumorales à des cellules non sanguines telles que les fibroblastes dans les modèles murins (Duda 2010). Elles formeront alors des clusters qualifiés d'hétérotypiques. En effet, les cellules tumorales peuvent recruter les neutrophiles par sécrétion de chimio-attractants, notamment la forte concentration de TGF- β , qui va permettre leur infiltration au site tumoral. Ces neutrophiles ont un rôle pro-angiogénique (Claesson-Welsh and Welsh 2013) et les jonctions VCAM-dépendantes formées entre cellules tumorales et neutrophiles vont permettre le détachement de ce cluster de la tumeur primaire ainsi que son intravasation (Aceto 2020). Globalement, les clusters sont formés de cellules tumorales aux propriétés majoritairement mésenchymateuses sur la partie frontale du cluster ; en aval, elles ont majoritairement des propriétés épithéliales et assurent le maintien du cluster (Dongre and Weinberg 2019) sous l'influence de facteurs tissulaires (Strilic and Offermanns 2017). Qu'ils soient homotypiques ou hétérotypiques, en augmentant leurs propriétés de cellules souches et d'invasion, et en suractivant les voies de signalisation apoptotiques, les clusters permettent aux cellules tumorales d'augmenter leurs chances de survivre aux contraintes du système sanguin (Cortes-Hernandez, Eslami, and Alix-Panabieres 2020).

Une fois dans le système sanguin, les cellules tumorales, appelées alors Cellules Tumorales Circulantes (CTC), doivent survivre à différentes contraintes physiques et biologiques. Les CTC peuvent pénétrer dans le sang sous forme de cellules uniques dans 90% des cas, ou de façon groupée (en cluster) dans les 10% de cas restants (Aceto et al. 2014). La durée de la présence dans la circulation des CTC isolées est d'environ 2,5 heures, alors que la durée de circulation d'un cluster est trois fois moins élevée (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017). En effet, de par leur plus grande taille, les clusters sont capturés plus rapidement dans les capillaires et donc retenus de manière plus importante dans les organes à distance (Aceto 2020). Ils sont donc associés à un moins bon pronostic lorsqu'ils sont retrouvés chez les patients (Gkountela et al. 2019), avec un taux de formation de métastase nettement supérieur pour les clusters par rapport au CTC isolées (Aceto et al. 2014), et on sait que leur nombre augmente avec la progression de la maladie (Aceto 2020; Suo et al. 2017).

Afin de pallier aux contraintes physiques (force des fluides, perte d'adhérence à une matrice) ou aux contraintes biologiques (système immunitaire, augmentation du stress oxydatif), les CTC vont subir de nombreuses modifications phénotypiques et moléculaires, dans l'expression de certaines de protéines, ou de perte de populations, comme dans l'expression de certains transcrits (Strilic and Offermanns 2017) ou encore des remaniements de la compaction de l'ADN. Ces remaniements vont

augmenter l'expression de facteurs de transcription des voies de signalisation pro-métastatique, comme la voie PI3K/Akt (Strilic and Offermanns 2017), et diminuer les facteurs de transcription des voies de mort cellulaire dont la mort induite par perte d'ancrage à une matrice extracellulaire, appelée l'anoïkis et qui est physiologiquement présente pour le maintien de l'homéostasie tissulaire (Kim et al. 2012). La résistance des CTC à l'anoïkis leur permet de survivre sans attache à une membrane extracellulaire afin de se disséminer dans les organes à distance. Les CTC peuvent également diminuer les voies de l'apoptose, par exemple en synthétisant de manière autocrine l'ATP afin d'activer les voies de signalisations d'inhibition de l'apoptose, la voie de signalisation du folate pour résister au stress oxydatif, ou encore la voie Wnt dans les CTC isolées qui réduit elle aussi l'apoptose. Ces modifications diffèrent en fonction du type cellulaire et de la protéine oncogénique exprimée (Tam and Weinberg 2013).

Les CTC doivent aussi résister aux attaques nouvelles du système immunitaire (Strilic and Offermanns 2017). En effet, l'immunosuppression présente dans le microenvironnement tumoral ne les protège plus du système immunitaire lorsqu'elles arrivent dans le sang et la majorité des CTC vont être éliminées par l'immunité (Strilic and Offermanns 2017). De manière générale, que ce soit isolées ou en cluster, les CTC peuvent potentiellement s'entourer de plaquettes rapidement lors de leur pénétration dans le système vasculaire, et forment ainsi des clusters appelés micro-embolies, cette association va les protéger des attaques du système immunitaire ainsi que des forces mécaniques présentes dans le sang.

Les CTC doivent en effet développer des mécanismes moléculaires pour inhiber leur reconnaissance par les cellules de l'immunité innée, principalement les Natural Killer (NK). Les NK, dans l'immunité, jouent le rôle de surveillance tumorale et ont une activité antitumorale. Pour leur échapper, les CTC vont diminuer la présence des ligands à leur surface membranaire reconnus par les récepteurs NKG2D à la surface des NK en sécrétant des métalloprotéases qui vont les dégrader, ou encore s'entourer de plaquettes qui vont les masquer de la reconnaissance par les NK (Strilic and Offermanns 2017; Palumbo et al. 2005). Les plaquettes vont être activées par les facteurs tissulaires synthétisés par les CTC et vont synthétiser le TGF- β qui va entraîner une augmentation des marqueurs mésenchymateux des CTC et donc leur potentiel métastatique (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017; Strilic and Offermanns 2017; Morvan and Lanier 2016). Cette interaction entre plaquettes et CTC se fait grâce à l'implication de protéines de liaisons telles que les P-selectines, les fibrines ou encore le fibrogène, et augmente le

potentiel métastatique des CTC (Strilic and Offermanns 2017; Erpenbeck and Schon 2010; Palumbo et al. 2008). De plus, la synthèse de TGF- β par les CTC va diminuer l'activité des NK. Ainsi, les récepteurs NKG2D des NK vont être moins stimulés, par conséquent la surveillance tumorale par les NK sera moins active. Un autre système d'échappement des CTC au système immunitaire est l'expression de la molécule PD-L1 à leur surface, qui va se lier au récepteur PD-1 à la surface des lymphocytes T. Cette liaison PD-1 / PD-L1 va inhiber la reconnaissance de la cellule tumorale par la cellule T et donc permettre aux CTC d'échapper à leur élimination par le système immunitaire (Caldwell et al. 2017). De plus, il a été observé que les CTC pouvaient diminuer l'expression des molécules MHC de classe I afin d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T.

Enfin, les CTC peuvent recruter d'autres cellules afin de se protéger des contraintes rencontrées dans le sang. Ainsi, les macrophages qui se fixent aux CTC par la synthèse des protéines VCAM et VAP vont être essentiels à la survie des CTC et à la formation des clusters CTC-cellules immunitaire. Les interactions entre CTC et neutrophiles par exemple sont, elles, plus complexes et restent à éclaircir (Strilic and Offermanns 2017). Cependant, ces clusters ont été associés à un plus grand potentiel métastatique que les clusters homotypiques de CTC, avec une surexpression des marqueurs associés au cycle cellulaire ou de réplication de l'ADN (Ki67) par rapport aux CTC isolées, avec un taux mutationnel identique (Szczerba et al. 2019). Enfin, on sait que, dans des modèles murins, les CTC peuvent aussi s'associer avec d'autres types cellulaires, par exemple l'association avec les fibroblastes du microenvironnement tumoral qui a été corrélé avec une augmentation de la dissémination métastatique dans le cancer du poumon, ou encore avec des cellules endothéliales, qui vont permettre aux CTC de s'accrocher aux parois du système vasculaire et d'extravaser vers les sites métastatiques (Aceto 2020; Duda et al. 2010).

5. Arrêt des cellules tumorales dans le système vasculaire et extravasation

L'accroche et l'arrêt des CTC aux parois du système vasculaire, la modulation de la barrière endothéliale, puis leur extravasation vers le microenvironnement de l'organe cible vont permettre aux CTC de potentiellement former des métastases.

La première étape est donc l'arrêt des CTC sur les parois vasculaires. Cette accroche, d'abord instable, se fait par capture mécanique et/ou chimique grâce à la synthèse de molécules dans le tissu cible à

distance. L'accroche mécanique se fait par la capture des CTC dans les capillaires ou dans les points de ramifications des vaisseaux, notamment des clusters, de plus grand diamètre que les CTC isolées, qui vont être capturés rapidement dans ces capillaires fins. Cette capture semble être le mécanisme majeur d'arrêt des CTC dans le système vasculaire. Le foie et les poumons qui présentent des petits capillaires, tout comme la moelle osseuse où les capillaires sont sinusoidaux et discontinus sont en effet les sites de nombreuses métastases (Massague and Obenauf 2016). Mais les CTC peuvent également être attirées chimiquement vers des organes cibles grâce à la synthèse de chimiokines : c'est le chimiotactisme. Les chimiokines en conditions physiologiques sont les médiateurs de l'immunité car elles vont recruter les cellules immunitaires aux sites d'infection. En conditions tumorales, ces chimiokines vont permettre aux cellules tumorales de coloniser les organes cibles. Elles vont également permettre la communication entre cellules tumorales et microenvironnement (Liu et al. 2017). L'adhérence entre cellules tumorales et endothélium est hétérotypique car elle se fait grâce à l'expression de nombreuses protéines, notamment les sélectines, cadhérines, intégrines ou le CD44 (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017), mais des interactions homotypiques peuvent aussi se faire entre cellules tumorales et endothéliales avec des jonctions JAM-c, comme mis en évidence dans le cancer du poumon, ou MCAM dans le mélanome (Strilic and Offermanns 2017; Melnikova et al. 2009).

Les clusters hétérotypiques formés avec les CTC dans le sang peuvent faciliter cette accroche. En effet, les plaquettes vont aider à l'accroche des CTC aux parois vasculaires, notamment avec la synthèse de sélectines à leur surface. Les CTC, elles, fixent la barrière endothéliale via les E-selectine (**Figure 7**). De plus, le TGF- β synthétisé par les plaquettes va modifier les propriétés des CTC en les rendant plus mésenchymateuses. Les granules d'ATP des plaquettes, la synthèse de fibrine et le TGF- β vont rendre la barrière endothéliale plus perméable en relaxant les jonctions cellulaires et faciliter ainsi l'extravasation des CTC (Strilic and Offermanns 2017; Massague and Obenauf 2016). De même les macrophages, par synthèse du VEGF et de TNF- α , vont augmenter la perméabilité vasculaire en modifiant les interactions cellulaires endothéliales (Strilic and Offermanns 2017; Qian et al. 2011) et aider les CTC à se fixer à l'endothélium, notamment dans le cancer du sein (Liu et al. 2017).

En plus de l'influence des facteurs sécrétés, la liaison des CTC va être facilitée par la synthèse de protéines d'adhésion. En effet, aux sites tumoraux secondaires, des chimiokines vont être synthétisées par les cellules stromales du microenvironnement et se lier aux récepteurs à la surface des CTC. Cette liaison va entraîner une activation de voies de signalisation qui vont augmenter l'invasivité des CTC

(Chambers, Groom, and MacDonald 2002). Dans le cancer du sein, la synthèse de CXCL12, une chimiokine sécrétée par les cellules stromales, va lier le récepteur CXCR4 à la surface des cellules tumorales et entraîner leur extravasation (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017). Cette liaison va entraîner l'activation de voies de signalisation de survie et de prolifération (Teicher and Fricker 2010). Mais la synthèse de VEGF et des MMP par la tumeur primaire va aussi modifier la perméabilité vasculaire en dégradant la matrice extracellulaire et modifiant les jonctions cellulaires (Valastyan and Weinberg 2011). Une fois accrochées à la paroi du système vasculaire, les cellules tumorales peuvent proliférer dans la lumière des vaisseaux avant de migrer à travers les parois des vaisseaux sanguins, ou migrer directement de façon isolée.

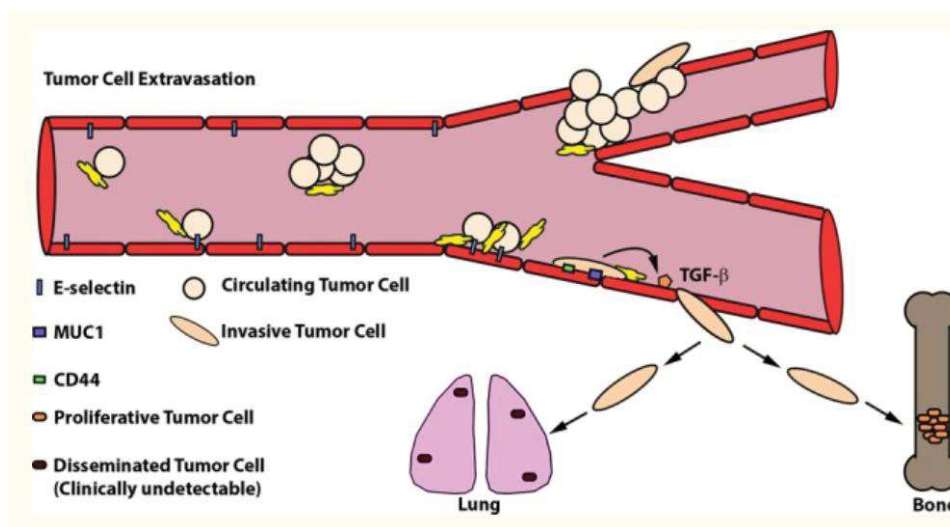


Figure 7: Accroche des CTC et extravasation

Les CTC peuvent s'accrocher aux parois des vaisseaux de manière active ou être capturées par les capillaires. L'attache active peut se faire grâce à la liaison des CTC sur les E-selectines des cellules endothéliales, puis des interactions plus stables se font avec MUC1, CD44 ou encore les intégrines. Le TGF-β synthétisé par les plaquettes ou les CTC va augmenter la perméabilité vasculaire et permettre l'extravasation des CTC.

(Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017)

Cette sortie du système sanguin vers les tissus cibles est appelée extravasation. L'extravasation se fait grâce à des modifications des cellules tumorales avec notamment une augmentation de l'expression de leurs intégrines, mais également une modification de la constitution de l'endothélium qui va permettre aux cellules tumorales de traverser du système vasculaire vers l'organe. Les cellules tumorales peuvent également dégrader l'endothélium en induisant sa nécrose. Les cellules tumorales vont promouvoir leur extravasation en synthétisant la protéine ANGPTL4, mais aussi avec l'activation

par la liaison EGF récepteur-ligand de la synthèse de Cox2 ou MMP1. Grâce à ces nombreux mécanismes, les cellules tumorales vont passer au travers de l'endothélium. De manière générale, l'extravasation se fait grâce à la perturbation des jonctions inter-endothéliales, préférentiellement au niveau d'ouvertures se formant à des jonctions de plusieurs cellules endothéliales (Escribano et al. 2019), mais peut aussi se faire de façon plus rare au travers des cellules endothéliales, on l'appelle alors extravasation transcellulaire (Strilic and Offermanns 2017). La rapidité d'extravasation des cellules va directement être liée au potentiel de formation des métastases. A ce moment de la cascade métastatique, les cellules vont effectuer la transition inverse à l'EMT : la MET afin de se disséminer jusqu'au stroma du microenvironnement dans l'organe à distance par des modifications épigénétiques et des voies de signalisations (Dongre and Weinberg 2019). Elles vont ensuite migrer vers l'organe cible grâce à des forces mécaniques par le phénomène de tropisme. La cascade métastatique est donc médiée par des facteurs mécaniques et moléculaires. Cependant leur capacité à former des métastases dans l'organe à distance reste faible, car parmi les CTC, 80% vont subir l'extravasation (Valastyan and Weinberg 2011) mais seulement 0,02% des CTC survivront dans le microenvironnement de tissu secondaire (Hen and Barkan 2020).

6. La colonisation des sites métastatiques

Les cellules qui vont extravaser depuis la circulation peuvent provenir du site tumoral primaire ou des sites secondaires. Longtemps les études ont amené à penser que seules les cellules tumorales intervenaient dans le processus de dissémination métastatique, c'est le cas de Ewig en 1928 qui émet l'hypothèse que seule la circulation des cellules cancéreuses dans le sang suffit à expliquer la formation de métastases.

Cependant, d'autres théories existent, notamment la théorie du 'Seed and Soil' soutenue par Paget en 1889, qui suggère que les cellules tumorales (les graines : seed) ne se développent que si le tissu (le sol : soil) est compatible et favorable à leur croissance. Cette théorie soulève aussi la question du sens de dissémination. En effet, on observe des coopérations entre différents clones de cellules tumorales dans certains cancers dans la constitution des sites métastatiques, mais on sait aussi que différentes métastases peuvent être formées à partir d'un même clone, c'est ce qu'on appelle le 'polyclonal seeding'. De même, il a été observé que souvent, notamment dans le cancer de la prostate, les

métastases sont formées de clones provenant d'autres métastases, on parle alors de 'cross-seeding' (Hong et al. 2015). Enfin, certains clones de cellules tumorales peuvent recoloniser le site primaire, même après suppression de la tumeur initiale, on parle de 'self-seeding' (Gudem et al. 2015) qui ne nécessite pas d'adaptation des CTC à un nouveau microenvironnement. Ce processus induit la sélection et l'amplification des clones de CTC les plus agressifs car ils auront eu la capacité à survivre aux conditions de circulation dans le sang, à résister aux traitements, et à recoloniser le site initial. Cette théorie du Seed and Soil met donc en lumière différentes voies des CTC pour coloniser des organes à distance et créer des métastases.

Toutefois, le développement des métastases dépend aussi des facteurs du 'soil' dans ce que l'on appelle des niches pré-métastatiques. La mise en place des niches pré-métastatiques débute par la formation de la matrice extracellulaire qui permet de recruter et adhérer les cellules tumorales, puis la formation d'un néo-réseau vasculaire pour apporter oxygène et nutriments aux cellules tumorales, et enfin, par la mise en place d'un environnement protégé de l'immunité de l'hôte pour permettre à la métastase en formation de se développer (Gkolfinopoulos, Jones, and Constantinidou 2020). Majoritairement, ces niches pré-métastatiques se mettent en place en condition d'hypoxie (**Figure 8**). Les cellules constituant la niche, mais aussi des signaux émis par la tumeur primaire, vont maintenir l'angiogenèse, l'auto-renouvellement des cellules et le recrutement de cellules stromales qui sécrètent des facteurs d'invasion métastatique (Plaks, Kong, and Werb 2015). Ces niches auront été « préparées » pour accueillir les cellules tumorales grâce à la synthèse de facteurs systémiques tumoraux relargués par la tumeur primaire dans la circulation, telles que les vésicules extracellulaires, sécrétées de manière importante par les cellules tumorales. Ces vésicules vont synthétiser notamment le TGF- β et le VEGF qui vont augmenter le potentiel métastatique et la mobilité cellulaire des cellules cancéreuses (Liu et al. 2017). De même, les exosomes vont jouer un rôle dans la formation des niches, par exemple dans le cancer du foie, ces vésicules vont contenir de l'EGFR, remodeler le microenvironnement primaire et induire des métastases gastriques. De plus, ils vont sécréter des chimiokines qui vont entraîner l'infiltration de neutrophiles dans le microenvironnement de la niche pré-métastatique, et leurs intégrines les amèneront vers les organes cibles et contribueront ainsi à l'organotropisme des métastases (Massague and Obenauf 2016). Les exosomes ont donc un rôle important dans l'éducation des niches tumorales (Liu et al. 2017; Hoshino et al. 2015). Les oncosomes, vésicules plus larges, vont eux pouvoir transporter des MMP, de l'ARN tumoral, et beaucoup de

composants de la tumeur primaire qui vont aider à la formation de la niche pré-métastatique (Liu et al. 2017; Di Vizio et al. 2012). Enfin, des protéines relarguées par la tumeur primaire vont aider à la dissémination métastatique, comme l'ostéopontine qui promeut la prolifération cellulaire, ou la ténascine C qui va permettre la survie des métastases du sein dans les poumons (Liu et al. 2017; Oskarsson et al. 2011).

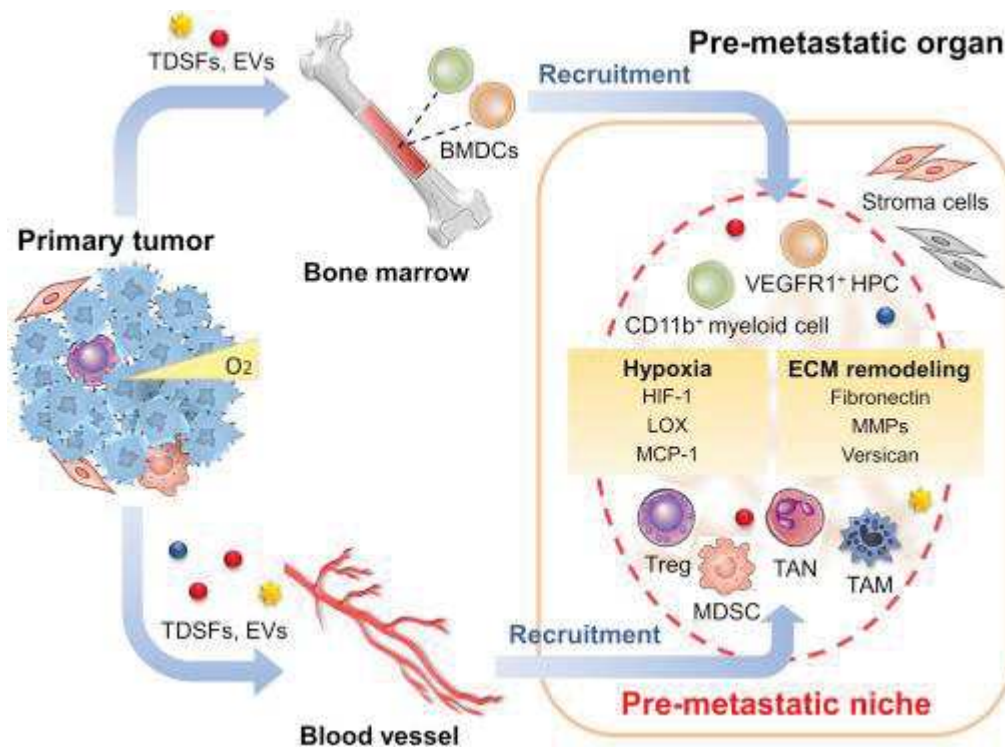


Figure 8: Formation des niches pré-métastatiques

Les vésicules extracellulaires (EVs) et les TDSFs mobilisent et recrutent plusieurs populations de cellules au site secondaire, dont les cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC) : cellules myéloïdes et immunitaires (cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), cellules Treg, TAM), et neutrophiles associés aux tumeurs (TAN). L'interaction entre les facteurs sécrétés par les tumeurs (TDSF), les cellules recrutées et le stroma local crée un microenvironnement pour la colonisation métastatique des cellules tumorales. L'hypoxie et le remodelage de la matrice extra-cellulaire aide également à la formation de la niche pré-métastatique.

Liu et al. Cancer cell. 2016

Cette préparation de la niche pré-métastatique va permettre le relargage de chimiokines responsables du chimiotactisme des cellules tumorales vers l'organe cible (Valastyan and Weinberg 2011). Certains organes vont être préférentiellement colonisés par les cellules tumorales de par leur microenvironnement plus favorable, et leurs caractéristiques moléculaires communes avec le microenvironnement tumoral primaire. En effet, la composition du microenvironnement cible va jouer

directement sur l'invasion des cellules. Par exemple, certains organes vont avoir un microenvironnement riche en cellules immunitaires, comme le foie où le taux de NK est important, dans le cerveau ce sont les astrocytes qui vont synthétiser eux-mêmes les facteurs d'élimination tumorale. Cependant, les cellules tumorales vont développer des mécanismes de défense, comme le masquage de leur reconnaissance par les NK, ou la synthèse de molécules inhibitrices des facteurs d'astrocytes (Massague and Obenauf 2016). Dans les poumons, lorsque les cellules cancéreuses métastasent, les macrophages fortement présents vont adhérer aux cellules cancéreuses. Cette liaison va entraîner la synthèse de signaux de survie. De même dans le foie, les macrophages vont synthétiser la granuline qui va permettre de modifier le microenvironnement et induire la croissance métastatique. Dans la moelle osseuse, les progéniteurs hématopoïétiques vont pouvoir former des clusters et remodeler le microenvironnement pour créer des niches permissives. De même les ostéocytes vont induire l'invasion et la croissance métastatique par la synthèse de CCL5, MMP ou encore d'ATP, c'est le cas dans les cancers du sein et de la prostate. Enfin, dans le cerveau, les astrocytes vont synthétiser des IL-23 qui vont augmenter la synthèse de MMP2 et par conséquent le potentiel métastatique des cellules du mélanome (Liu et al. 2017) (**Figure 9**).

Lors de leur arrivée au niveau du site métastatique, les cellules vont interagir avec le microenvironnement de la niche et vont être soumises aux voies de signalisation présentes dans les niches, par exemple les voies Wnt, TGF- β ou Hedgehog impliquées notamment dans le développement ou l'auto-renouvellement cellulaire. C'est pourquoi certains organes sont plus sujets à être des sites de métastases. En effet, dans la moelle osseuse par exemple, ces voies sont très actives, et vont permettre aux cellules cancéreuses de se développer. Mais les cellules peuvent aussi ralentir leur fonctionnement afin de ne pas se multiplier et entrer en dormance jusqu'à ce que le microenvironnement soit favorable. Ainsi, les cellules tumorales qui s'infiltreront dans les tissus secondaires devront survivre dans ces niches, constituant un nouvel microenvironnement avant de pouvoir potentiellement former des métastases.

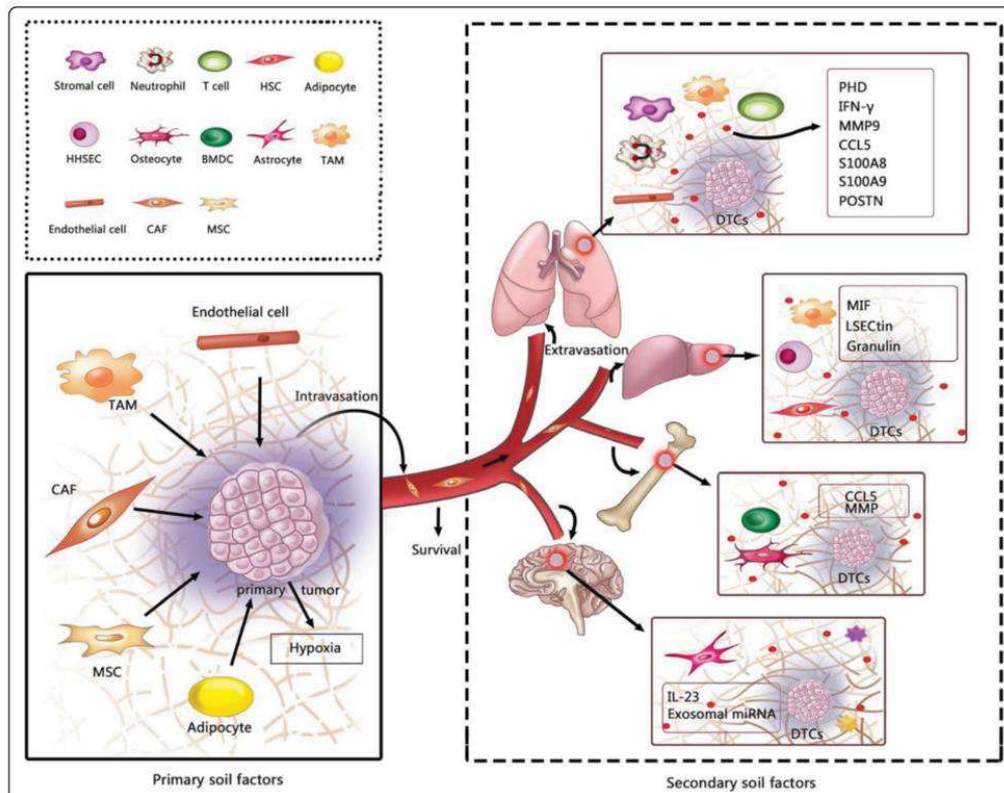


Figure 9: Facteurs tissulaires pour la croissance tumorale

Les facteurs des tissus primaires augmentent le potentiel métastatique des cellules. Les cellules stromales et les facteurs environnants de la tumeur primaire vont échanger des signaux moléculaires avec la tumeur primaire pour induire l'invasion des cellules cancéreuses. L'hypoxie de la tumeur primaire accélère la progression métastatique. Les tissus secondaires sont composés de facteurs et de types cellulaires divers dépendant de l'organe. Certains organes possèdent des composants cellulaires et moléculaires qui vont induire l'invasion, la colonisation et la croissance tumorale à distance.

Liu et al. Mol Cancer. 2017

La colonisation des organes cibles est donc le résultat d'une collaboration entre CTC et microenvironnement des organes, entre les 'seed' et le 'soil', mais des interactions complexes entrent en jeu avec une préparation en amont du soil receveur par la tumeur primaire et les nombreux facteurs qu'elle sécrète. C'est donc un mécanisme complexe qui va permettre aux CTC de coloniser les sites métastatiques et potentiellement former des tumeurs secondaires.

7. Développement des métastases

Une fois dans l'organe cible, les cellules tumorales disséminées (*Disseminated Tumor Cell - DTC*) vont synthétiser des intégrines pour se fixer de nouveau à la matrice extracellulaire et vont devoir survivre dans le parenchyme de l'organe distant. Seulement 0,02% des CTC vont devenir DTC car la plupart seront éliminées par le tissu lors de l'invasion (Hen and Barkan 2020). Si le microenvironnement est favorable, elles colonisent et fertilisent l'organe en se multipliant pour augmenter leurs chances de former des micro ou macro-métastases. Dans le cas contraire, elles entrent en dormance, à l'échelle de DTC isolées, de clusters ou même de micro-métastases (Goddard et al. 2018) ce qui les protégera des traitements conventionnels basés sur un arrêt de la prolifération cellulaire.

La quiescence des cellules tumorales en tant que cellules individuelles, c'est-à-dire le ralentissement de leur métabolisme, induit un arrêt des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Davis et al. 2019). Dans des modèles murins, elle est maintenue par la sécrétion des facteurs de la famille du TGF- β qui activent la quiescence cellulaire et inhibent l'auto-renouvellement des DTC, (Massague and Obenauf 2016; Malanchi et al. 2011). Il existe aussi la dormance de masse tumorale, où les cellules se divisent de façon importante mais où l'apoptose des cellules crée une balance, ainsi la taille de la micro-métastase ne bouge pas et elle reste indétectable lors des examens cliniques (Davis et al. 2019). Ces masses cellulaires ne peuvent pas se développer (Massague and Obenauf 2016; Sosa, Bragado, and Aguirre-Ghiso 2014) car la vascularisation est insuffisante et ne se développe pas car la taille de la métastase est inchangée (Hen and Barkan 2020), et l'immunité y est très présente. L'immunité a, en effet, un rôle important dans la régulation du développement métastatique comme il a pu être observé chez des patients immunodéprimés ayant reçus une transplantation de donneurs avec antécédents de mélanome et qui ont développé des métastases (Massague and Obenauf 2016; Strauss and Thomas 2010). Cependant, dans certains tissus où l'homéostasie est forte, comme les poumons, le foie ou encore la moelle osseuse, la prolifération cellulaire physiologique y est importante et peut permettre aux DTC de sortir de leur état de latence jusqu'à la formation de métastases (Goddard et al. 2018). Les DTC du sein et de la prostate par exemple peuvent résider dans la moelle osseuse pour de longues périodes. Cette quiescence prolongée est possible grâce à la présence de nombreux signaux de quiescence ou de prolifération dans la moelle osseuse qui sont physiologiquement présents pour l'hématopoïèse, notamment Notch2 et Wnt5 α présents dans les niches ostéoblastiques pour le maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques qui maintiennent en état de

dormance les DTC du cancer du sein et de la prostate respectivement (Hen and Barkan 2020). La sortie de l'état de quiescence peut également se faire suite à des changements de dynamique dans la niche pré-métastatique. Cette sortie de l'état de dormance des cellules cancéreuses, grâce à la réactivation des facteurs de transcription de l'EMT (Snail, Twist ou Zeb1) va activer le potentiel initiateur de métastase des DTC ainsi que les voies de signalisation qui permettent aux cellules de s'auto-renouveler (Valastyan and Weinberg 2011). Les DTC vont pouvoir recruter ou stimuler les cellules du stroma environnant qui vont activer les voies de signalisation des cellules souches (Wnt, Nanog) (Hen and Barkan 2020). C'est le cas par exemple des cellules du cancer du sein dans la moelle osseuse qui vont activer la voie PI3K par les cellules stromales, ou synthétiser le CSF-1 pour activer la voie MAPK. Dans les poumons, les cellules cancéreuses du sein vont synthétiser à leur surface VCAM pour interagir avec les macrophages et activer la voie PI3K, de même que l'expression de VCAM dans la moelle osseuse va différencier les cellules en ostéoclastes, qui vont dégrader la matrice extracellulaire et créer des métastases osseuses (Massague and Obenauf 2016). La survie et la prolifération des DTC est donc en partie déterminée par les facteurs du microenvironnement métastatique, le dialogue avec les cellules environnantes, et leur capacité à initier des métastases (**Figure 10**) qui surviennent par modifications épigénétiques ou mutations géniques par exemple (Gao et al. 2012; Bragado et al. 2013).

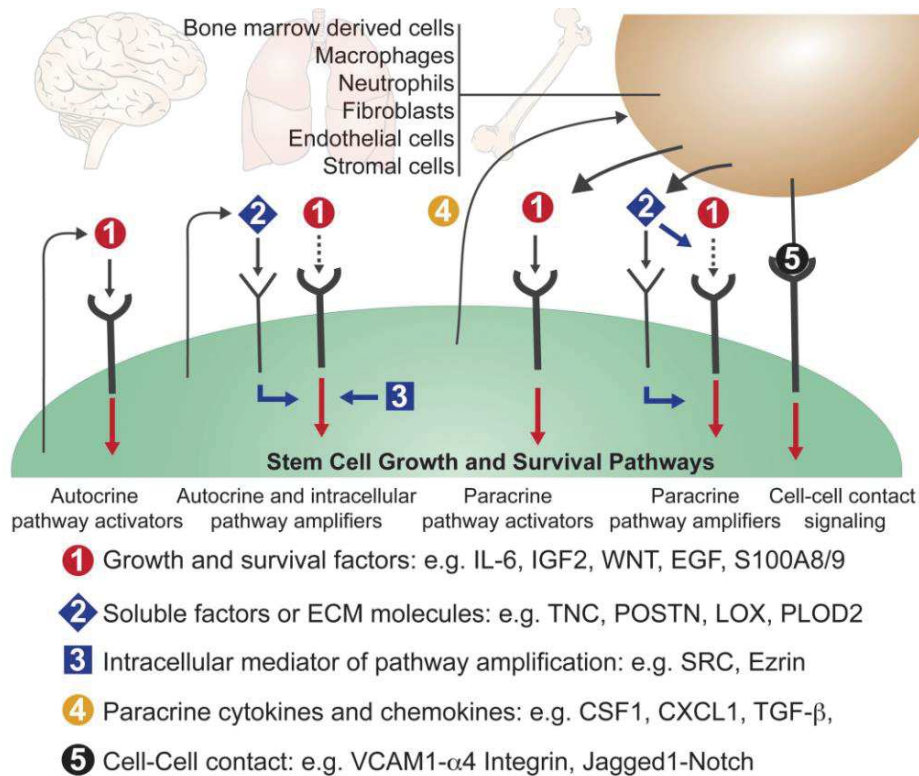


Figure 10: Activation des voies de survie et de croissance par les DTC

Les cellules initiateuses de métastases ont besoin de plusieurs voies de signalisation pour survivre et maintenir leurs propriétés de cellules souches. Les cellules progénitrices maintiennent les voies de signalisation par sécrétion de médiateurs autocrine et paracrine (1), augmentent les voies des activateurs stromaux (2, 3). Les cellules cancéreuses expriment les activateurs et amplificateurs de manière autocrine (1,2) ou intracellulaire (3). Elles peuvent aussi sécréter des facteurs de façon paracrine (4) pour obtenir des activateurs ou amplificateurs depuis les cellules stromales ou par contact cellule-cellule.

Massague et al. Nature. 2016

Ces DTC ne provoquent aucun signe clinique, elles sont asymptomatiques, par conséquent indétectables. De plus, leur biologie est différente des cellules de la tumeur primaire car elles ont subi des modifications pour arriver au site distal, et qu'elles sont en dormance. Ces différences les rendent difficiles à éliminer lors des traitements (Sosa, Bragado, and Aguirre-Ghiso 2014). En effet, certaines chimiothérapies se basent sur un blocage de la mitose des cellules, or les cellules dormantes ne se divisent pas. A l'origine de la formation des métastases, ces cellules peuvent être responsables de rechutes plusieurs années après la fin des traitements, que l'on appelle maladies résiduelles. Les DTC vont pouvoir se diviser de nouveau et de manière importante, et ainsi former des métastases alors même que la tumeur primaire a été éliminée et que le cancer est considéré comme étant « en rémission ».

En effet, lorsque le microenvironnement devient favorable, elles vont pouvoir sortir de cet état de latence et être à l'origine des récurrences des cancers (Davis et al. 2019). Cependant, les conditions environnementales ne suffisent pas et les DTC doivent avoir la capacité à créer des métastases, étroitement liée avec des caractéristiques de cellules souches cancéreuses, dont il est parfois difficile de les distinguer des DTC.

8. Les cellules souches cancéreuses et hétérogénéité clonale

Les cellules souches (CS) normales sont des cellules qui se trouvent dans des niches qui les protègent des facteurs extérieurs (Scadden 2006) et conserve une homéostasie tissulaire grâce à un équilibre très régulé entre prolifération, quiescence, auto-renouvellement et différenciation. Ainsi les CS sont protégées de la différenciation, de l'apoptose ou d'une expansion excessive non contrôlée.

Dans un contexte tumoral, il se forme des niches où l'expansion des cellules est rapide et où elles vont s'auto-renouveler de manière importante. Les cellules cancéreuses ont la capacité de s'auto-renouveler et d'évoluer en une lignée hétérogène. Deux hypothèses ont été émises quant à l'origine de ces CSC : d'une part les cellules souches normales adultes ont subi des modifications et sont devenues malignes (modèle hiérarchique), d'autre part des cellules différenciées, par des mutations génétiques, ont acquis la capacité de s'auto-renouveler (modèle stochastique). En réalité, il semblerait que la tumeur soit une résultante de la combinaison de ces deux modèles (Plaks, Kong, and Werb 2015). Les CSC expriment des facteurs de l'EMT et inversement : l'EMT peut contribuer au maintien des CSC (Mani et al. 2008) et aident les cellules tumorales à acquérir des propriétés de cellules souches (Liu et al. 2017). Les propriétés de cellules souches, dont la capacité d'auto-renouvellement, sont essentielles pour la réussite de la dissémination métastatique. Cependant ce processus, et donc le développement de la métastase, va dépendre de la survie des cellules tumorales possédant des propriétés de cellules souches et d'initiation de tumeur ainsi que capacité d'adaptation de chaque clone tumoral à son nouvel environnement.

La caractérisation phénotypique des CTC ayant un potentiel métastatique a mis en évidence des marqueurs de cellules souches (CD44, CD47, ALDH1) mais également des marqueurs de l'EMT (Tinhofer et al. 2014). Un des marqueurs communément utilisé pour évaluer le potentiel de cellules souches des CTC est la forte l'expression du marqueur CD44 avec une absence ou une faible expression

de CD24 (CD44^{high}/CD24^{low/-}) : ce ratio a été associé à un fort potentiel métastatique dans les xénogreffes du cancer du sein et de la prostate (Tinhofer et al. 2014), mais également chez des patients atteints de cancer colorectal (Pilati et al. 2012). Dans les cancers du sein, CD44^{high}/CD24^{low/-} est associé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein BRCA1 muté, CD133 est associé avec l'identification des CSC du cancer triple négatif et ALDH1 est associé avec l'issue clinique dans cancer du sein où HER2 est surexprimé (Savelieva et al. 2020). Mais ce ratio est également utilisé comme indicateur de la présence de métastases dans d'autres cancers comme le cancer colorectal, de l'ovaire, de la prostate, etc. (Savelieva et al. 2020). L'étude des marqueurs de cellules souches dans les CTC a mis en évidence l'hétérogénéité des populations de CTC. Cependant elles doivent avoir la capacité à former le microenvironnement tumoral des métastases, mais également être capables d'intravaser, grâce notamment à l'EMT pour être à l'origine de métastases.

Tout comme les CTC, les DTC ont des caractéristiques des CSC. Elles ont la capacité de s'auto-renouveler, de se différencier, elles sont chimio-résistantes, et ont la capacité à donner des métastases (cancer du sein, du pancréas, du colon). Elles résident dans des niches, avec une préférence pour certains tissus comme la moelle osseuse. De plus, elles utilisent des voies de signalisation communes, comme la voie mTOR ou le TGFβ2 qui permettent aux CSC d'être quiescentes, et au DTC de survivre. Les voies Notch et Wnt permettent le maintien du pool de CSC et de l'équilibre entre prolifération et quiescence des DTC. Ces similitudes laissent à penser que les DTC sont des CSC ou ont acquis des caractéristiques de cellules souches (Hen and Barkan 2020). De plus, ces observations suggèrent que ces voies de signalisation sont importantes pour la survie à long terme et la quiescence des CSC et ce dans de nombreux cancers. Les DTC a caractéristiques de CS sont donc les premiers effecteurs des rechutes dans de nombreux cancers, et leur élimination est essentielle pour éviter les cancers résiduels qui peuvent survenir des années après la fin des traitements.

A terme, la compréhension des mécanismes du processus métastatique va permettre d'identifier les acteurs et les étapes clés de cette dissémination. Ainsi, il sera possible de prévenir au mieux la formation des métastases, responsables de la majorité des décès liés au cancer. La compréhension des différentes étapes de la cascade métastatique est donc essentielle, notamment dans les cancers les plus agressifs, qui diffusent rapidement. C'est le cas du Carcinome à Cellule de Merkel, où les mécanismes de dissémination sont très peu compris et la mortalité associée est très élevée.

III. La biopsie liquide

a) Les origines de la biopsie liquide

Actuellement, le diagnostic d'un cancer est établi après imagerie et caractérisation de la masse cellulaire, il se fait de manière classique grâce à une biopsie du tissu tumoral, c'est-à-dire à un prélèvement d'une partie ou de la totalité d'une tumeur. La biopsie tissulaire, qui conserve la constitution spatiale de la tumeur, reflète et permet d'analyser uniquement un échantillon de la tumeur, au site de prélèvement, à un temps T donné. Elle n'est donc représentative que d'une partie de la tumeur et ne reflète pas l'hétérogénéité intra et inter-tumorale (Freitas et al. 2021). C'est un acte lourd qui nécessite une hospitalisation du patient. Cette méthode invasive dépend de l'état général du patient et de l'accessibilité des tumeurs. De plus, il a été démontré que des actes de chirurgie lourds pouvaient entraîner une augmentation des formations de métastases (Demicheli et al. 2008). Généralement, elle ne peut pas être faite de manière séquentielle et ne permet donc pas de suivre l'évolution du cancer, notamment l'apparition de nouvelles altérations génétiques dans les cellules tumorales. Afin de pallier à ces contraintes une nouvelle approche moins invasive a été développée, permettant un suivi régulier du patient. Cette méthode, appelée biopsie liquide, consiste en l'analyse du matériel biologique tumoral relargué par la tumeur dans les fluides corporels. Elle se fait généralement grâce à un prélèvement de sang et peut être faite de façon séquentielle. Elle peut donc informer en temps réel sur l'évolution de l'état du patient.

La biopsie liquide débute avec la découverte en 1869 d'Ashworth (**Figure 11**)(TR 1869) qui note la présence de cellules non-sanguines dans le sang de patients atteints de cancers métastatiques. Ces cellules ont des caractéristiques similaires aux cellules des tumeurs de patient. Il émet alors l'hypothèse qu'elles puissent en être dérivées.

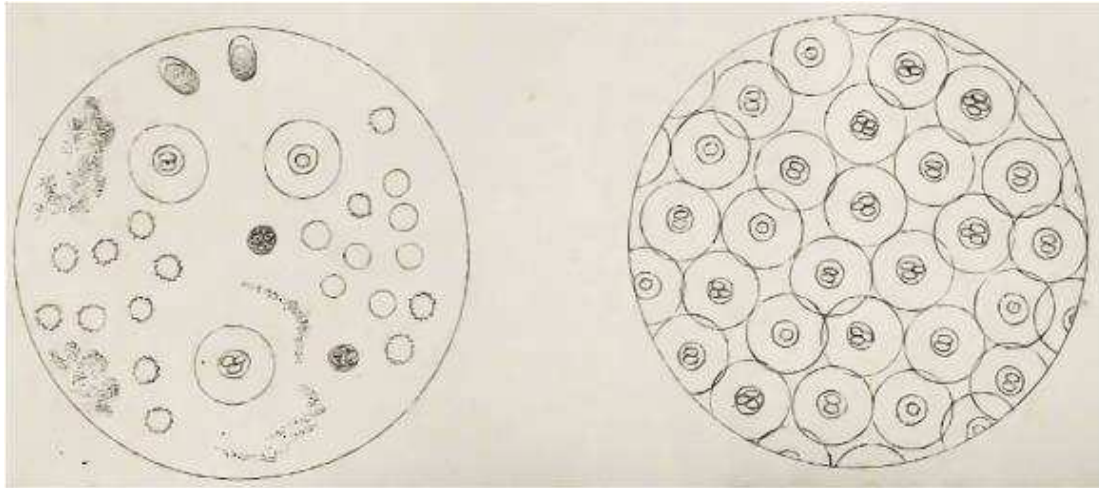


Figure 11: Représentation schématique des cellules d'un patient métastatique.

Dessin d'Ashworth. Similarités microscopiques des cellules tumorales dans le sang du patient (à gauche) et dans une tumeur (à droite). Ashworth, 1869

L'évolution des technologies ces dernières décennies a notamment permis de relancer l'étude des biomarqueurs circulants, notamment ces cellules tumorales circulantes, les CTC. En effet, ces composants tumoraux sont à des concentrations très faibles dans le sang et leur enrichissement et détection est un challenge technologique. En 2004, Immunicon (maintenant Menarini Silicon Biosystem) commercialise un nouvel automate : le CellSearch®. Il permet le dénombrement des CTC grâce à un enrichissement magnétique des cellules épithéliales (EpCAM+) depuis le sang et leur détection grâce au marquage immunologique des cytokératines épithéliales (CK8, 18, 19) spécifiques, et des cellules sanguines résiduelles (CD45).

D'abord utilisé pour parler de la détection des CTC par Alix-Panabières et Pantel en 2010 (Pantel and Alix-Panabieres 2010), le terme de biopsie liquide comprend maintenant la détection et l'analyse de nombreux composants tumoraux relargués par la tumeur primaire et/ou les métastases. Ce matériel tumoral se retrouve dans les fluides corporels. C'est majoritairement dans le sang que ce matériel est recherché, mais il peut l'être dans les urines, le liquide céphalo-rachidien ou encore la salive. La biopsie liquide permet de caractériser en temps réel l'état de la tumeur et donc de détecter les changements de quantité et de composition des biomarqueurs tumoraux qui peuvent apparaître au cours de la progression de la maladie et des traitements. De nombreux biomarqueurs ont pu être identifiés et sont maintenant compris dans le terme de biopsie liquide, c'est le cas de l'ADN tumoral circulant (ctDNA),

des vésicules extracellulaires comme les exosomes, des microARN ou encore des plaquettes. L'étude moléculaire de ces biomarqueurs parmi lesquels l'étude du génome, du transcriptome, de l'épigénome, du protéome, ainsi que du sécrétome aide ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes du processus métastatique, notamment par l'identification de propriétés initiatrices de tumeur. La caractérisation des cancers était jusqu'alors concentrée sur l'étude des tumeurs et des métastases, sans connaître les étapes intermédiaires. Ces biomarqueurs peuvent à terme amener à une application clinique pour la prise en charge personnalisée des patients (Fernandez-Lazaro et al. 2020).

b) Intérêt clinique

La biopsie liquide peut apporter de nombreuses informations tant pour la détection que pour la prise en charge clinique de patients atteints de cancer avec l'utilisation des CTC et l'ADN tumoral circulant (ctDNA) comme biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic, le suivi ou encore le choix des traitements pour les patients (**Figure 12**).

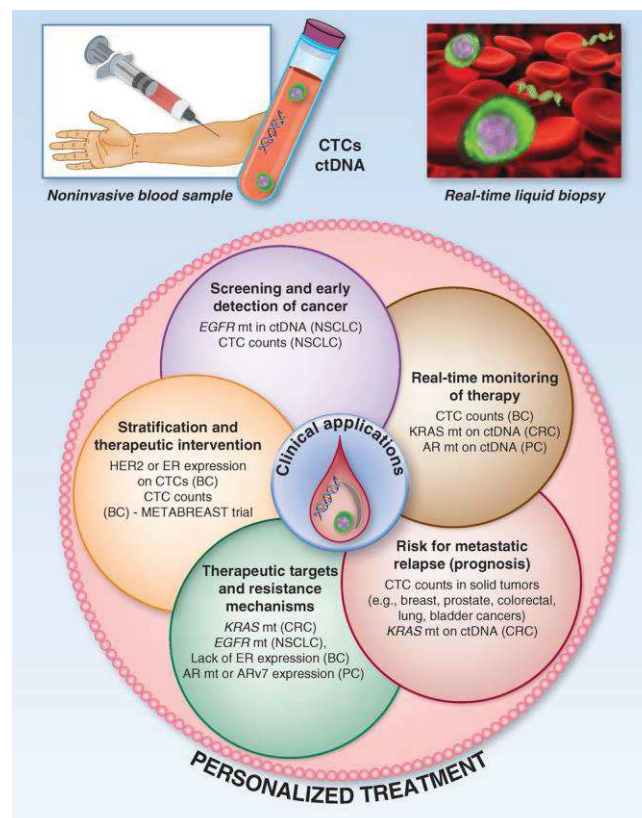


Figure 12 : Applications cliniques des CTC et du ctDNA comme biopsie liquide

La biopsie liquide par prélèvement de sang permet de prédire les risques de rechutes ou de progression métastatique, de suivre l'efficacité des thérapies, et d'identifier et comprendre les mécanismes de résistances potentiels. Elle permet aussi de stratifier les patients pour choisir le traitement le plus approprié. Pendant le traitement, l'augmentation des taux de CTC/ctDNA indique une résistance à la thérapie, et peut permettre de changer plus rapidement le traitement avant que la progression métastatique soit incurable. Mt : mutations, BC : breast cancer, PC : prostate cancer, CRC : colorectal cancer.

Alix-Panabières et Pantel, Cancer Disc. 2016

Un des plus grands challenges de la biopsie liquide est la détection précoce du cancer pour une prise en charge rapide des patients. L'analyse de biomarqueurs circulants, les CTC ou le ctDNA dans le sang par exemple, à terme pourraient servir d'outil de dépistage et de détection précoce des cancers (Alix-Panabieres and Pantel 2021a). De par sa faible invasivité, la biopsie liquide peut être faite de manière séquentielle dans des populations à risque. Mais la biopsie liquide peut également être un outil pour le pronostic et un outil prédictif de la maladie. En effet, il a été démontré que le nombre de CTC, chez des patients atteintes de cancer métastatique du sein est corrélé à la survie sans progression et à la survie globale (Cristofanilli et al. 2004). De nombreuses études cliniques ont validé l'intérêt pronostic des CTC dans les cancers du sein, de la prostate, du poumon ou du colon (Alix-Panabieres and Pantel 2021a), et permettent ainsi de déterminer le stade du cancer de façon plus fine et d'identifier les populations où le risque de rechute est important (Janni et al. 2016; Rack et al. 2014). L'évaluation de ces biomarqueurs circulants a donc un intérêt clinique comme outil de diagnostic et de pronostic et permet d'adapter le choix des traitements et du suivi nécessaire (Alix-Panabieres and Pantel 2021a).

En effet, une augmentation de CTC ou de ctDNA dans le sang indique une progression du cancer, notamment dans le cancer du sein ou de la prostate (Alix-Panabieres and Pantel 2016). De même que la détection de CTC ou de ctDNA 5 ans après initiation de la thérapie est identifiée comme marqueur de rechute dans le cancer du sein (Alix-Panabieres and Pantel 2021a; Trapp et al. 2019; Garcia-Murillas et al. 2015). Ce nombre de CTC associé de manière statistique reflète l'efficacité ou la résistance aux traitements. Ainsi, il est possible d'anticiper la modification d'un traitement lorsque celui-ci n'est pas efficace ou qu'une rechute apparaît.

La biopsie liquide permet également d'analyser l'hétérogénéité tumorale grâce à la caractérisation moléculaire des différents biomarqueurs. Cette caractérisation va apporter de nombreuses informations pour la prise en charge clinique des patients. La détection de mutations pouvant être de potentielles cibles thérapeutiques peut aider au choix du traitement, par exemple, des mutations dans les gènes EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), BRAF, ou des réarrangement dans les gènes ROS

(*Reactive oxygen species*) et ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*) ou pour le cancer du poumon non à petites cellules (*Non Small Cell Lung Cancer - NSCLC*), ou EGFR pour le cancer colorectal (Alix-Panabieres and Pantel 2021a). De même l'identification de certaines altérations épigénétiques dans l'ADN circulant permettrait de poser le diagnostic dans le cancer colorectal (Luo et al. 2020; Junqueira-Neto et al. 2019). La présence de certaines mutations ou l'émergence de nouvelles mutations qui peuvent être responsables de la résistance aux traitements et vont aider à choix des traitements, c'est le cas de mutation dans le gène KRAS pour le cancer colorectal, PI3K pour le cancer du sein ou BRAF pour le mélanome (Alix-Panabieres and Pantel 2021a). La caractérisation moléculaire des biomarqueurs circulants aide à la prise en charge personnalisée des patients grâce à l'analyse du ctDNA (Fernandez-Lazaro et al. 2020).

La biopsie liquide est donc un outil important dans le développement d'une médecine qui tend aujourd'hui à être personnalisée, pour une meilleure efficacité de prise en charge du patient. Bien que la biopsie liquide soit prometteuse de par ses nombreuses applications cliniques, la faible concentration des biomarqueurs dans le sang reste un challenge technique, notamment pour la détection précoce des cancers. De nouvelles perspectives s'ouvrent maintenant avec le nombre grandissant de biomarqueurs circulants qui sont étudiés et dont l'intérêt clinique tend à être validé.

c) Les différents biomarqueurs circulants

La biopsie liquide englobe désormais différents biomarqueurs dérivés des tumeurs et des métastases c'est le cas notamment du ctDNA, des vésicules extracellulaires, dont les exosomes, des microARN ou encore des plaquettes sanguines dont la biologie a été modifiée au contact de la tumeur. Chacun de ces biomarqueurs nécessite le développement de méthodes d'enrichissement spécifiques et standardisées. Bien qu'ils ne soient pas encore utilisés en routine dans le suivi clinique des patients, ils semblent tous apporter des informations sur l'évolution du cancer et pourraient aider à la compréhension du processus métastatique.

1. Les Cellules tumorales circulantes

Le biomarqueur le plus étudié et le plus couramment utilisé sont les CTC, elles feront l'objet d'un chapitre complet et détaillé de ce manuscrit.

2. L'ADN tumoral circulant

L'ADN circulant sans cellule (*cell-free DNA* – cfDNA) est présent dans le plasma sanguin, dans le liquide céphalorachidien, la salive, le liquide pleural, dans les urines et autres fluides corporels. C'est un ADN double brin d'une taille variant de 50pb à des fragments de 21kb. Il est étudié dans de nombreuses pathologies (diabète, septicémie, infarctus, etc.) mais semble aussi jouer un rôle dans des processus non pathogènes comme la grossesse ou l'activité physique. Chez des patients atteints de cancer, la concentration en cfDNA est significativement supérieure à celle chez des sujets sains (Soda et al. 2019). Parmi le cfDNA, on retrouve l'ADN tumoral circulant (*circulating tumor DNA* - ctDNA) à de très faibles quantités (de 0,05% à 5% du cfDNA total) (Heidrich et al. 2020). Ce ctDNA peut être relargué par les cellules tumorales en apoptose ou en nécrose, ou de manière active par des cellules tumorales viables. Il est transporté dans des complexes protéiques ou dans des vésicules extracellulaires. Le challenge technique de l'étude du ctDNA est de le différencier du cfDNA. Il est extrait du plasma grâce à de nombreuses méthodes, notamment la centrifugation, l'immuno-magnétisme, les colonnes de silice, etc. Puis il est analysé par *Next Generation Sequencing* (NGS), PCR, qPCR, spectrométrie de masse, etc. en fonction du nombre de gènes à analyser, le taux et la qualité du ctDNA (Eslami et al. 2020). C'est la détection des mutations et aberrations chromosomiques spécifiques des tumeurs par NGS ou par ddPCR (*droplet digital PCR*) qui va permettre de différencier le ctDNA du cfDNA (Poulet, Massias, and Taly 2019).

Le ctDNA est un petit ADN, d'une taille inférieure à 180pb, avec une durée de vie courte (moins de 2 heures), ce qui en fait un biomarqueur représentatif de la dynamique du cancer en temps réel. Il peut être enrichi grâce à une pré-sélection par taille, augmentant ainsi la sensibilité et la spécificité du NGS (Freitas et al. 2021). Étant relargué par les cellules de la tumeur primaire comme celles des métastases, le ctDNA permet de visualiser l'hétérogénéité clonale du cancer (Eslami et al. 2020). Sa quantité est corrélée avec l'avancée de la maladie : la concentration en ctDNA augmente avec la taille de la tumeur. Chez un patient atteint d'un cancer métastasé, sa concentration sera être plus élevée que chez un patient atteint d'un cancer en stade précoce. Dans le NSCLC, l'analyse du ctDNA par RT-qPCR, de même que la quantification des mutations par *Whole Exome Sequencing* (WES) permettent de différencier les patients atteints de cancer de ceux ayant des maladies respiratoires chroniques (Freitas et al. 2021). De plus, le profil génomique du ctDNA peut porter des marques de modifications moléculaires de

résistance aux traitements (mutations génétiques, épigénétiques, variants de copies) survenues dans la tumeur ou les métastases au cours des traitements et donc pas toujours détectables lors des biopsies tissulaires. Cette caractérisation peut donc aider à la personnalisation de la prise en charge du patient (Macias et al. 2018) et des PCR ciblées sur des panels de gènes associés aux cancers sont utilisés en routine. Par exemple, des mutations du gène EGFR (T790M ou L858R) sont décrites comme responsables de la résistance aux thérapies inhibitrices de tyrosine kinase de première et seconde génération. Des thérapies de troisième génération ciblant ces mutations ont été validées par la Haute Autorité de Santé (HAS) et la FDA et ont obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour le NSCLC avancé ou métastatique (Papadimitrakopoulou et al. 2020; Abbosh, Birkbak, and Swanton 2018; Rolfo et al. 2018). De même pour d'autres altérations génomiques comme des réarrangements du gène ALK ou des mutations des gènes BRAF ou KRAS (Rolfo et al. 2018). Dans le cancer de la prostate, des aberrations chromosomiques comme le nombre de copies de PTEN, CHD1, ou encore des altérations de TP53 ont un intérêt clinique et sont utilisés pour le choix des thérapies (Vandekerkhove et al. 2019; Wyatt et al. 2017). D'autres mutations ont été définies comme cible thérapeutique, c'est le cas de la mutation F1174C du gène ALK pour le cancer de la prostate (Carneiro et al. 2018). L'étude des marques épigénétiques, principalement de la méthylation des gènes va pouvoir informer sur les gènes qui seront réprimés, notamment les gènes suppresseurs de tumeurs, comme la méthylation du gène SEPT9 pour le dépistage du cancer colorectal (Sun et al. 2019). Dans une sous-catégorie du cancer du sein, la présence de la protéine HER2 surexprimée dans ce cancer et corrélée à une progression rapide, va aider à orienter les traitements (anti-HER2)(Fernandez-Lazaro et al. 2020; Otsuji et al. 2017).

Le ctDNA est donc un biomarqueur circulant qui se retrouve dans de nombreux fluides corporels, facilitant son accessibilité. Il est utilisé la prédiction et la détection des marqueurs de sensibilité et de résistance aux traitements ainsi que l'orientation des choix des traitements dans différents cancers. Cependant, son utilisation a nécessité une standardisation des méthodes de détection et d'analyse pour que le ctDNA puisse être inclus dans le suivi clinique des patients et pour que son utilisable et significativement reproductible entre les différents patients et les différents cancers (Eslami et al. 2020).

3. Les exosomes : un sous-groupe des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires sont des particules de 20nm à 10µm sécrétées par les cellules et formées d'une bicouche lipidique. Elles résultent du bourgeonnement de la membrane cellulaire et n'ont pas la capacité de se répliquer. Parmi les vésicules extracellulaires se trouvent les exosomes, les microvésicules, les microparticules, les corps apoptotiques ou encore les oncosomes. Les exosomes sont des vésicules extracellulaires de 40 à 150nm (Eslami et al. 2020), résultant de la fusion entre la membrane plasmique et les vésicules intraluminales. Ils sont les médiateurs de la communication intracellulaire. Ils vont aider à la régulation de la prolifération, de la migration cellulaire et ont donc un rôle lors de la formation métastatique, notamment dans la formation des niches pré-métastatiques (Junqueira-Neto et al. 2019). Relargués de manière plus importante par les cellules tumorales que les cellules saines, leur constitution, notamment en intégrines, dépend de leur cellule d'origine et ils sont donc le reflet de la composition des cellules tumorales (Alix-Panabieres and Pantel 2021b; Hoshino et al. 2015). ADN, ARN et protéines transportées par les exosomes proviennent directement des cellules tumorales, ils possèdent les mêmes profils mutationnels, ce sont donc des biomarqueurs potentiels pour la prise en charge clinique des patients. Par exemple, pour l'identification de cibles thérapeutiques comme les mutations EGFR dans le cancer du poumon, le diagnostic avec les exosomes exprimant CA125, EpCAM et CD24 pour le diagnostic du cancer de l'ovaire, ou l'expression de MIF (*macrophage migration inhibitory-factor*) pour le diagnostic des cancers colorectal et pancréatique. Ce biomarqueur pourrait également permettre d'établir le pronostic des patients, notamment les exosomes exprimant le GSPT1 associé à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes du cancer de sein, ou la présence du mi19 qui est marqueur de récurrence après chirurgie dans le cancer colorectal. Certaines études ont déjà associé la concentration d'exosomes dans le plasma sanguin avec le pronostic des patients atteints de cancer colorectal (Junqueira-Neto et al. 2019).

Cependant, la définition des exosomes reste débattue dans la littérature, et elle se confond parfois avec la définition des microvésicules. Pour certains les exosomes sont seulement les vésicules d'origine endosomale, tandis que pour d'autres, et pour des raisons techniques d'enrichissement, les exosomes sont l'ensemble des vésicules entre 40 et 150 nm (Eslami et al. 2020). Une définition claire et acceptée de tous est donc nécessaire pour pouvoir utiliser les exosomes comme biomarqueur dans la biopsie liquide. De plus, les méthodes d'enrichissement et d'études des exosomes doivent être optimisées pour permettre d'obtenir des fractions pures et non modifiées par les contraintes extérieures. Ce

biomarqueur est donc prometteur dans l'avenir de la biopsie liquide mais nécessite d'être clairement défini par la communauté scientifique ainsi qu'une standardisation des méthodes d'enrichissement, de détection et d'analyse afin de pouvoir l'utiliser dans des démarches cliniques et confirmer son utilité en tant que biomarqueur dans la prédiction du pronostic et du choix des traitements.

4. Les miARN

Les miARN (ou micro-ARN) sont de petites molécules d'acide ribonucléique (ARN) simple brin, non codant, d'une taille de 19 à 25nt. Les miARN matures forment des complexes multiprotéiques qui sont des modulateurs de l'expression génique : ils se fixent sur l'ARNm (ARN messager) cible pour en inhiber la traduction ou induire leur dégradation. Les miARN endogènes ont souvent pour cible des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur (Poulet, Massias, and Taly 2019), et leur biologie peut être modifiée par des modifications épigénétiques, l'apparition de SNP, des mutations ou des CNV somatiques, etc (Bottani, Banfi, and Lombardi 2019). En effet, 50% d'entre eux sont situés sur des régions chromosomiques fragiles, qui subissent souvent des modifications (amplification, délétion, translocation) lors de cancers (Schwarzenbach, Hoon, and Pantel 2011; Croce 2009). Dans la circulation, les miARN sont transportés par des vésicules extracellulaires : les exosomes, les corps apoptotiques, par les plaquettes ou au sein de complexes protéiques qui leur permettent d'être protégés de la dégradation par les composants de l'environnement circulatoire. Ils ont un rôle post-transcriptionnel dans la croissance tumorale et la résistance aux traitements, avec une implication dans l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'EMT ou encore la capacité à former des métastases (Schwarzenbach, Hoon, and Pantel 2011; Kosaka, Iguchi, and Ochiya 2010; Asaga et al. 2011). En effet, la perte ou le gain de gènes de miARN a été lié à de nombreux cancers (Freitas et al. 2021).

Les miRNA, majoritairement transportés dans les exosomes, sont très stables dans la circulation à l'inverse du cfDNA (Schwarzenbach, Hoon, and Pantel 2011), ils résistent ainsi à des conditions très variables de pH comme à la congélation (Bottani, Banfi, and Lombardi 2019), ce qui en fait de bons candidats pour l'étude de la biopsie liquide (Mazumder et al. 2019). Ils sont détectés et caractérisés principalement par RT-qPCR, mais de nouvelles méthodes utilisent des biopuces et le NGS afin de comparer le profil de composition des miRNA avec les bases de données et détecter les potentielles

dérégulations (Schwarzenbach, Hoon, and Pantel 2011). L'étude des miRNA comme biopsie liquide semble avoir un intérêt potentiel dans la prise en charge clinique des patients. Lorsqu'on caractérise les miRNA, on s'aperçoit que leur profil génomique est différent entre individus sains et patients atteints de cancer. De plus, leur profil mutationnel est similaire à celui de la tumeur solide associée (Fernandez-Lazaro et al. 2020), faisant des miARN un biomarqueur circulant représentatif de la tumeur.

Dans les cancers du sein, du poumon ou de la prostate, ils sont retrouvés précocement dans le plasma et le sérum des patients, et peuvent ainsi servir au diagnostic de ces cancers (Mitchell et al. 2008; Bottani, Banfi, and Lombardi 2019). L'altération des niveaux globaux de miRNA a été associée à la croissance tumorale, la progression du cancer ainsi qu'à la résistance aux traitements (Bottani, Banfi, and Lombardi 2019). Lorsqu'on s'intéresse à la composition des miRNA, c'est-à-dire à la concentration de chacun des miRNA connus, on remarque que la composition en miRNA dans les fluides diffère en cas de cancer. C'est le cas notamment de certains miRNA où la concentration augmente dans certains carcinomes épidermoïdes oraux, alors qu'elle diminue dans d'autres cancers oraux (Mazumder et al. 2019; Yan et al. 2017; Ayaz et al. 2013). Dans le cancer de la vessie par exemple, la concentration des miR-126 et miR-182 est modifiée lors de l'apparition du cancer, la détection de ces modifications pourrait donc servir comme biomarqueur de diagnostic (Weber et al. 2010). Le miR-21 impliqué dans le développement de nombreux cancers, notamment dans les cancers du sein et le NSCLC, où il a été associé à un mauvais pronostic (Bottani, Banfi, and Lombardi 2019) et est recherché pour la prédiction de la survie (Schwarzenbach, Hoon, and Pantel 2011; Asaga et al. 2011; Hu et al. 2010). De plus, dans le NSCLC les miR-1254 et miR-574-5p ont été associés avec des stades précoces du cancer (Bottani, Banfi, and Lombardi 2019). L'évaluation des compositions de miRNA chez les patients pourrait être un outil du monitoring dans différents cancers.

Les miARN apparaissent donc comme de biomarqueurs candidats de biopsie liquide pour monitoring ainsi que comme marqueur prédictif (Poulet, Massias, and Taly 2019). Cependant, la concentration et la composition des miRNA diffèrent suivant le fluide étudié et l'hygiène de vie du patient (Weber et al. 2010). De plus, la qualité du prélèvement, la méthode et les conditions d'analyses vont influencer sur les résultats (Bottani, Banfi, and Lombardi 2019). Cette variabilité restreint pour l'heure l'utilisation de miRNA comme biomarqueur pour la biopsie liquide (Junqueira-Neto et al. 2019), des standardisations

de protocole d'étude sont nécessaires, ainsi que la mise au point d'une méthode de normalisation des concentrations de miRNA entre les différents fluides (Zaalishvili et al. 1990).

5. Les plaquettes éduquées par les tumeurs

Les plaquettes, ou thrombocytes, sont des cellules anucléées dérivées de mégacaryocytes. Ce sont le plus petit (2 à 4µm) et le second composant le plus abondant dans le sang, avec une durée de vie de 7 à 10 jours. Elles jouent un rôle central dans l'homéostasie primaire pour la réparation de l'endothélium vasculaire, la coagulation ou l'inflammation ainsi que dans la formation de thromboses (Freitas et al. 2021). Mais les plaquettes ont aussi un rôle dans la carcinogénèse, la formation de métastases ou l'efficacité des chimiothérapies comme expliqué dans le Chapitre II) Processus Métastatique. En effet, il existe une interaction complexe entre plaquettes et cellules tumorales où les plaquettes vont séquestrer des biomolécules relarguées par les cellules cancéreuses, on peut alors dire que les plaquettes sont éduquées par la tumeur (*Tumor-educated platelets* - TEP)(Eslami et al. 2020). Cette activation par les cellules tumorales va permettre aux plaquettes de relarguer des biomolécules dans des microparticules (PMP), dont des facteurs de croissance et des cytokines, qui peuvent induire la progression des cellules tumorales, et vont aider à la formation des niches pré-métastatiques. Mais les TEP ont aussi un rôle dans l'extravasation des CTC, où les PMP vont transporter des facteurs de croissance et angiogéniques (PDGF, TGF-β) qui aident l'extravasation des CTC, l'extravasation, l'invasion du tissu secondaire et à la résistance à certains traitements (Strilic and Offermanns 2017; In 't Veld and Wurdinger 2019). En plus de contribuer l'environnement tumoral secondaire, les TEP jouent un rôle central protecteur dans la survie des CTC dans la circulation. Cet englobement par les TEP protège également les CTC du système immunitaire, notamment des NK.

D'un point de vue clinique, elles sont présentes en grande quantité dans le sang (200 à 500 millions/mL) et leur isolement depuis le sang est aisée, par simple centrifugation par exemple. De plus elles possèdent des ARNm de grande qualité. Cependant la méthode d'échantillonnage et le temps avant analyse peuvent activer les plaquettes et modifier leur composition morphologique et moléculaire (Eslami et al. 2020). Le taux de plaquettes a été associé avec la progression métastatique et un mauvais pronostic (Best, Wesseling, and Wurdinger 2018). De plus, des molécules anti-plaquettes, comme l'aspirine, ont été associées à la régression des métastases (Junqueira-Neto et al. 2019). Lors des

études de caractérisations moléculaires des ARNm des plaquettes, il a été proposé que le profil mutationnel des TEP pourrait permettre d'identifier la localisation du cancer, de différencier les patients sains de patients atteints de cancers (NSCLC, cancers colorectal, du sein, pancréatique, etc.) (In 't Veld and Wurdinger 2019), mais aussi de distinguer les patients en stades précoces de ceux en stade avancés, notamment les patients atteints de myélome multiple (Best, Wesseling, and Wurdinger 2018). Le profil génétique des TEP reflète celui de la tumeur et peuvent informer en temps réel de l'évolution de la tumeur. Elles sont donc des potentiels biomarqueurs de prédiction et pronostic dans les cancers de la prostate et du NSCLC. Leur intérêt a aussi été démontré comme marqueur prédictif et de suivi de la réponse au traitement, notamment une forte concentration de TEP a été liée avec une mauvaise efficacité de l'immunothérapie anti-PDL1 (Best, Wesseling, and Wurdinger 2018). La présence de variants de gènes PCA3, KRAS, EGFR ou encore PIK1CA pourrait également permettre d'orienter le choix des traitements (In 't Veld and Wurdinger 2019).

Il est maintenant nécessaire de développer l'intérêt clinique des TEP, seule ou en combinaison avec d'autres biomarqueurs de la biopsie liquide. De plus, leur implication dans de nombreuses étapes du processus métastatiques font des TEP de cibles thérapeutiques. En effet la diminution du taux de TEP et l'activation des NK pourrait permettre une meilleure reconnaissance immunitaire des CTC et conduire à leur élimination (Strilic and Offermanns 2017).

De manière générale, les différents biomarqueurs de la biopsie liquide sont prometteurs pour la compréhension de la biologie du cancer et la prise en charge clinique des patients. En effet, ils peuvent être utilisés pour le pronostic, la prédiction de la sensibilité et de la résistance aux traitements, le suivi de l'évolution de la maladie. La biopsie liquide est donc est un outil complémentaire à la biopsie tissulaire ainsi que la prédiction de la sensibilité et de la résistance aux traitements pour la caractérisation moléculaire du cancer. Chacun des biomarqueurs apporte des informations différentes sur l'état du cancer, ils sont donc complémentaires. Bien que les CTC et le ctDNA soient les biomarqueurs les plus étudiés, les exosomes, les miRNA et les plaquettes sont tout aussi prometteurs pour la biopsie liquide.

Pour l'heure, de nombreuses techniques d'enrichissement et de détection sont utilisées, présentant toutes des avantages et inconvénients divers. Le développement de méthodes sensibles et spécifiques est un challenge constant dans l'étude de la biopsie liquide, notamment pour la détection des biomarqueurs très peu présents aux stades précoces des cancers (Alix-Panabieres and Pantel 2021a, 2021b). Une standardisation des méthodes de détection et d'analyse des biomarqueurs est nécessaire pour pouvoir utiliser des protocoles reproductibles et valider leur pertinence clinique à grande échelle. Aujourd'hui, peu de méthodes sont approuvées par la Food Drug Administration (FDA). Dans le cas des CTC, seul l'utilisation du système CellSearch validé comme une aide pronostic dans les cancers du sein, de la prostate et du colon. Dans l'étude des ctDNA la détection de la mutation T790M du gène EGFR a été validé comme cible thérapeutique pour le cancer NSCLC avancé ou métastatique (Papadimitrakopoulou et al. 2020) et la méthylation du gène STEP9 dans le cancer du côlon (Alix-Panabieres and Pantel 2021a).

L'utilisation de différents biomarqueurs ouvre de nouvelles perspectives dans le management clinique. Appliquée au Carcinome à Cellules de Merkel, la biopsie liquide permettrait d'analyser précocement la dissémination métastatique et donc d'adapter la prise en charge des patients. Il est en effet primordial de détecter au plus tôt les biomarqueurs circulants, reflets de l'évolution du cancer, pour améliorer la survie des patients atteints de CCM.

Pour l'heure, la biopsie liquide dans le CCM reste très limitée, comme détaillé dans notre revue Boyer *et al.* (Boyer, Cayrefourcq, Dereure, et al. 2020). L'étude du miRNome du CCM est pour l'instant limitée aux coupes de tumeurs. Les recherches sur le ctDNA n'est rapportée que dans une seule publication (Ning et al. 2014), quant aux exosomes ils sont étudiés uniquement sur lignées cellulaires du CCM (Konstantinell et al. 2016). La titration d'anticorps anti-VP1 et sT de MCPyV dans le sang de patients CCM a été corrélée avec une évolution favorable (Paulson et al. 2017), et les anticorps anti-LT ont été décrits comme biomarqueurs pronostiques de la récurrence du CCM (Samimi et al. 2016). Les recherches sur la détection des CTC dans le CCM sont majoritaires, mais seulement 4 études ont été publiées à ce jour (Blom et al. 2014; Gaiser et al. 2015; Riethdorf et al. 2019; Boyer, Cayrefourcq, Garima, et al. 2020). On peut ainsi dire que la biopsie liquide dans le CCM semble prometteuse mais les recherches doivent se poursuivre, notamment avec des cohortes de patients plus larges qui permettraient de valider cliniquement les biomarqueurs testés (Boyer, Cayrefourcq, Dereure, et al. 2020).

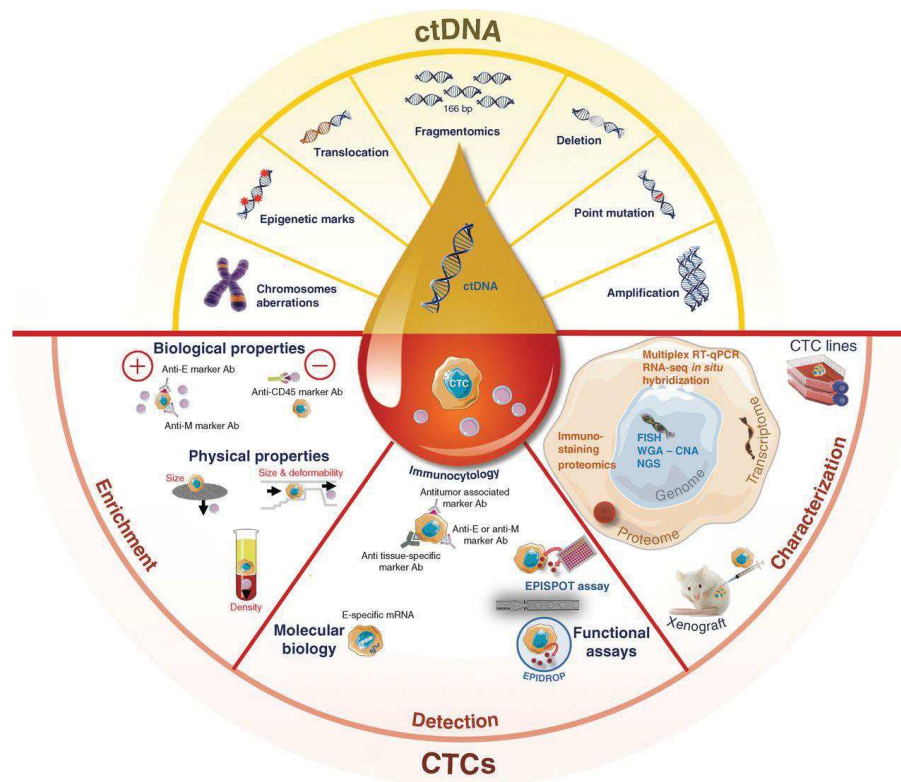
IV. Les cellules tumorales circulantes

Les CTC, qui se détachent des tumeurs primaires et/ou des métastases et passent dans le sang, ont un rôle majeur dans la dissémination métastatique (Pantel and Alix-Panabieres 2010). Le rôle des CTC dans la formation de métastases a été développé dans le chapitre « Processus Métastatique » et a mis en lumière l'hétérogénéité clonale des CTC. En effet, elles peuvent migrer du site primaire ou de sites secondaires vers des sites secondaires ou tertiaires, mais elles n'ont pas toutes pas la capacité à former des métastases. De plus, leur dynamique et plasticité phénotypique contribuent à la progression de la maladie, notamment en leur donnant une meilleure adaptabilité aux conditions environnementales multiples qu'elles rencontrent lors des différentes étapes du processus métastatique (Tayoun et al. 2019). De par leur rôle principal dans la progression et la dissémination du cancer, l'étude des CTC est important pour la compréhension de la dissémination métastatique.

a) Méthodes d'enrichissement des CTC

La première étape pour l'utilisation des CTC comme biopsie liquide est l'étape d'enrichissement. Les CTC se trouvent à de très faible concentration dans le sang : environ 1 cellule pour 1 millions de lymphocytes par millilitre de sang (Pantel and Alix-Panabieres 2010). Leur étude nécessite donc des technologies d'enrichissement sensibles et spécifiques. De plus, leur hétérogénéité phénotypique au sein d'un même patient restreint l'utilisation de technologies basées sur la détection d'un unique marqueur, l'enrichissement des CTC est donc un challenge technique. Cette étape d'enrichissement peut se reposer sur les différences physiques et/ou les différences biologiques entre CTC et cellules sanguines (Boya et al. 2020). L'enrichissement physique différencie les CTC des cellules sanguines en fonction de leurs différences de taille, de déformabilité, de charges, de granulosité, de densité, etc. L'enrichissement biologique se base sur les marqueurs, principalement de surface, avec l'utilisation d'anticorps, il peut être un enrichissement positif, ou négatif. L'enrichissement positif sélectionne les CTC parmi les cellules sanguines en se basant sur une propriété propre aux CTC, mais cette méthode induit un biais de sélection car elle suppose que toutes les CTC possèdent les mêmes propriétés (Lustberg et al. 2012). L'enrichissement négatif élimine les cellules sanguines de l'échantillon, ce qui supprime le biais de sélection, mais qui résulte en une fraction de CTC moins pure car elle contient

beaucoup de cellules sanguines résiduelles (**Figure 13**) (Alix-Panabieres and Pantel 2021a). Ce chapitre est une liste non-exhaustive des méthodes d'enrichissement des CTC utilisées à ce jour.



Alix-Panabières, Pantel, Cancer Discov. 2021

Figure 13: Méthodes d'enrichissement, de détection et de caractérisation des CTC et du ctDNA.

Enrichissement des CTC : pour discriminer les CTC des cellules sanguines, elles peuvent être enrichies en utilisant leurs propriétés biologiques, de manière positive avec des anticorps ciblant des protéines épithéliales et/ou mésenchymateuses (EpCAM/cytokératines, Vimentine/N(cadhérine), ou de manière négative en éliminant les leucocytes par des anticorps anti-CD45. Par les propriétés physiques : de manière positive en utilisant les caractéristiques des CTC (taille, déformabilité, densité, charge électriques). Détection des CTC : après l'enrichissement, les CTC isolées peuvent être identifiées en utilisant des tests immunocytologiques, moléculaires, ou fonctionnels. i) plateformes immunocytologiques : les CTC sont identifiées par des membranes et/ou des marquages intracytoplasmiques grâce à des anticorps contre les marqueurs épithéliaux, mésenchymaux, tissus-spécifiques ou associés aux tumeurs. ii) Biologie moléculaire : les technologies moléculaires permettent d'identifier les CTC en utilisant des tests basés sur l'ARN, comme les RT-qPCR, RNA-seq ou par hybridation d'ARN in-situ. iii) Tests fonctionnels : ils permettent la détection de CTC viables sur la base de leurs activités biologiques (sécrétion par exemple). Caractérisation des CTC : les caractéristiques moléculaires des CTC peuvent être explorés à des niveaux d'ADN, d'ARN, ou de protéines. Les caractéristiques fonctionnelles peuvent être recherchées in-vivo en injectant les cellules dans des souris immunodéficientes pour former des modèles de xénotreffes dérivés de patients. Enfin, les CTC possédant des capacités initiatrices de tumeurs peuvent être isolées pour être cultivées in-vitro et établir des lignées CTC (primaires et à long terme).

1. Propriétés physiques

L'enrichissement se basant sur les propriétés physiques des CTC permet de les enrichir sans l'utilisation de marquage immunologique. Cette méthode a en théorie l'avantage d'enrichir les différentes sous-populations de CTC quel que soit leur état dans l'EMT, qu'elles soient phénotypiquement épithéliales ou mésenchymateuses. Elle sélectionne principalement les CTC par leur taille, mais la densité, la déformabilité ou encore les charges électriques des cellules permettent aussi d'enrichir les CTC depuis un échantillon sanguin (Heymann and Tellez-Gabriel 2018). Les techniques de sélection des CTC par la taille consistent en des systèmes de filtrations de l'échantillon sanguin, lysé ou non, laissant filtrer les cellules sanguines plus petites (d'une taille de 8 à 14 μm) et retenant les CTC (entre 12 et 25 μm) ainsi que les clusters de CTC. Plusieurs méthodes de filtration existent, dont la méthode ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell*) (Rarecell) (Vona et al. 2000) combinant filtre et membrane, et qui détecte plus de CTC que le CellSearch[®] chez des patients métastatiques dans le cancer de la prostate et du NSCLC (Farace et al. 2011) et le filtre ScreenCell (ScreenCell) (Desitter et al. 2011) qui est basé sur le même principe, mais aussi les micro-filtres CellSieve (Creatv MicroTech)(Adams et al. 2015), ou encore le micro « tamis » VyCAP (VyCAP BV)(de Wit et al. 2015). D'autres méthodes visant à diminuer les potentiels bouchons de cellules sanguines qui peuvent se former dans ces filtres se développent mais restent pour l'heure en phase de tests sur des lignées cellulaires (Boya et al. 2020). Toutes ces méthodes de microfiltration ou filtrations se différencient par les types de matériaux utilisés et les tailles des pores des filtres. Elles ont l'avantage d'être rapide à fabriquer et peu coûteuses, mais elles manquent de pureté, ce qui peut altérer les analyses moléculaires.

D'autres méthodes utilisent les forces hydrodynamiques dans des puces de microfluidiques pour enrichir les CTC. Le Parsortix (Angle) par exemple, combine la sélection par la taille et la déformabilité. Les CTC sont en effet plus rigides que les cellules sanguines. Ce système va capturer les CTC fixées ou vivantes isolées ou les clusters par leur taille. Les CTC vont être retenues dans les zones de captures des circuits microfluidique (Hvichia et al. 2016; Xu et al. 2015). Un autre système de microfluidique qui capture par la taille est le système DLD (*deterministic lateral displacement*) (Huang et al. 2004) où les CTC sont dérivées par les piliers de la puce tandis que les petites cellules sanguines sont capturées dans ces piliers (Boya et al. 2020). Le système ClearCell (Biolidics Limited)(Tan et al. 2010) utilise lui le poids des CTC. Cet automate qui utilise une puce de CTChip (Clearbridge Biomedics) sépare dans un système microfluidique les CTC grâce aux forces appliquée par un circuit en spirale (Banko et al. 2019;

Lee, Guan, and Bhagat 2018). Mais la microfluidique permet de développer d'autres méthodes d'enrichissement, c'est le cas de Antfolk *et al.* qui ont développé un système de séparation des cellules grâce aux ondes acoustiques (Antfolk *et al.* 2015). Ces systèmes de microfluidique donnent la possibilité de visualiser chacune des cellules, et ainsi obtenir une haute sensibilité de l'enrichissement (Boya *et al.* 2020). De plus, le flux continu dans la puce réduit le risque de formation de caillots comme ça peut être le cas avec les filtres. Cependant, les rendements de ces méthodes de microfluidique restent faibles.

Certaines méthodes se basent sur la densité des cellules, comme le Ficoll-Paque (Cytiva) ou l'Oncoquick (Greiner Bio One) (Rosenberg *et al.* 2002) qui forment des gradients de densité qui séparent les CTC des cellules sanguines par les forces de centrifugation. Ces méthodes, faciles d'utilisation, présentent cependant des limitations sur la pureté des échantillons. De plus, les forces de centrifugation peuvent impacter la viabilité des cellules et par conséquent les résultats des analyses de caractérisation.

Enfin, il existe des systèmes d'enrichissement des CTC basés sur les charges électriques. Ces systèmes de diélectrophorèse (DEP) sont constitués de champs électriques irréguliers. Les champs électriques séparent les cellules par la différence de leur charge électrique en les déplaçant dans des directions opposées (Dianat-Moghadam *et al.* 2020; Boya *et al.* 2020). ApoStream, développée par Cheng *et al.* (Cheng *et al.* 2007) permet d'enrichir des CTC viables grâce à un flux électrique continu. Par la suite, cette même équipe a développé le V-shaped channel, un système de DEP en 3D qui semble prometteur avec des taux de récupération de 80% et de pureté supérieure à 90% (Cheng *et al.* 2015).

Ces systèmes d'enrichissement permettent de séparer les CTC des cellules sanguines sans nécessiter de les marquer. Cependant ils sont basés sur le principe que les caractéristiques physiques des CTC sont totalement différentes de celles des cellules du sang : les CTC sont plus grosses, plus rigides, avec une densité différente des cellules sanguines. Or, les CTC sont très hétérogènes, par exemple certaines peuvent être de petite taille, et les leucocytes peuvent être retenus par leur grande taille. La pureté des échantillons est donc limitée. De plus, certaines sous-populations de CTC peuvent être perdues, or identifier toutes les populations de CTC est essentiel pour la prise en charge clinique des patients.

2. Propriétés biologiques

a. Enrichissement positif

La méthode d'enrichissement positif des CTC est basée sur leurs propriétés biologiques, avec la sélection de marqueurs spécifiques des tumeurs. Les CTC sont alors enrichies grâce à une liaison hautement spécifique avec les anticorps utilisés, qui sont souvent fixés sur une membrane ou à des microbilles. En effet, selon les cancers étudiés, des marqueurs ont été déterminés comme étant présents sur la majorité des CTC, comme par exemple les marqueurs épithéliaux de surface. La molécule EpCAM est la molécule épithéliale la plus utilisée pour la détection positive par immunocapture des CTC. Elle est notamment utilisée dans la technologie CellSearch®, seule méthode de détection des CTC approuvée par la FDA, notamment dû à sa reproductibilité. Des anticorps anti-EpCAM couplés à des billes magnétiques fixent les CTC, ils sont ensuite enrichis grâce à un aimant. Les CTC sont ensuite marquées avec des anticorps anti-CK, DAPI et anti-CD45 pour discriminer les cellules sanguines résiduelles avant d'être analysées par l'automate. Cette méthode d'enrichissement a prouvé son efficacité dans la détection des CTC et est utilisée comme marqueur pronostic dans les cancers du côlon, du sein, de la prostate (Miller, Doyle, and Terstappen 2010; Liang, Hall, and Lucci 2020; de Bono et al. 2008; Bastos and Antonarakis 2018; Krebs et al. 2011). La méthode MACS (*Magnetic activated cell sorting*) (Miltenyi) utilise aussi des anticorps couplés à des billes immunomagnétiques et enrichit les CTC grâce à une colonne dans un champ magnétique (Banko et al. 2019; Miltenyi et al. 1990).

D'autre part, l'enrichissement positif des CTC peut également utiliser des méthodes de microfluidique. Des anticorps sont fixés sur les parois d'une puce de microfluidique par lequel le sang circule. Ces anticorps capturent alors les CTC lors de leur passage. La première méthode à avoir appliqué ce principe est la CTC-Chip (Nagrath et al. 2007) qui fixe les CTC indirectement, mais cette méthode reste controversée de par la difficulté à reproduire les résultats de l'étude. En effet, ce sont des IgG secondaires qui sont fixés à la puce, et des anticorps primaires en suspension qui fixent les CTC. Les anticorps secondaires fixés aux parois de la puce peuvent alors capturer les anticorps primaires, et donc de façon indirecte, les CTC (Chikaishi et al. 2017). De nombreuses autres méthodes d'enrichissement positif en microfluidique ont ensuite été développées dont MagSweeper (Talasaz et al. 2009) qui capture les anticorps anti-EpCAM par magnétisme sur le fond de la puce (Siewerts and Jeffrey 2012), NanoVelcro qui utilise des anticorps anti-EpCAM biotinylés et des micropiliers pour

augmenter les contacts entre CTC et anticorps fixés aux parois de la puce, et donc augmenter les chances de captures des CTC (Lu et al. 2013; Boya et al. 2020) ou plus récemment une puce en 3D développée par Cheng *et al.* pour augmenter encore la surface de contact entre anticorps de capture et CTC (Cheng et al. 2016). Ces méthodes sont toutes basées sur une capture des cellules par des anticorps anti-EpCAM (Dianat-Moghadam et al. 2020; Alix-Panabieres and Pantel 2014). Enfin, le système Gilupi (CellCollector) capture les CTC in-vivo par des anticorps anti-EpCAM également (Saucedo-Zeni et al. 2012). Cette méthode permet d'analyser de grand volume de sang. Certains travaux ont prouvé son efficacité comme méthode de détection dans le cancer de la prostate (Cieslikowski et al. 2020) et dans le NSCLC (Duan et al. 2020).

Il existe également des technologies hybrides d'enrichissement, qui combinent enrichissement physique et biologique dans le but d'augmenter la sensibilité et la spécificité de l'enrichissement. La méthode CTC-iChip (Ozkumur et al. 2013) par exemple, combine la sélection des cellules par la taille et l'expression d'EpCAM pour une sélection positive, ou de CD45 et CD15 pour une sélection négative. Cette méthode va d'abord séparer les petites cellules (globules rouges, plaquettes) des grosses cellules. L'incubation avec les anticorps d'intérêt va ensuite permettre de différencier les CTC des globules blancs grâce à un enrichissement magnétique (Ozkumur et al. 2013; Karabacak et al. 2014).

L'enrichissement positif a pour avantage l'obtention d'une fraction de CTC plutôt pure, mais nécessite le choix d'un marqueur de sélection qui induit un biais de sélection. Dans la majorité des cas, cet enrichissement positif est basé sur la détection du marqueur épithélial (EpCAM). Cependant, les sous-populations de CTC sont hétérogènes et sont capables de plasticité au cours de la dissémination du cancer (processus de l'EMT par exemple), qui amène à la diminution d'expression des molécules épithéliales. La sélection positive induit donc une perte de certaines sous-populations de CTC et une faible sensibilité de détection dans certains cancers. De plus, des cellules EpCAM⁺ ont été observées chez des patients atteints de maladies bénignes, induisant des faux positifs (Heymann and Tellez-Gabriel 2018).

Actuellement la seule méthode approuvée par la FDA pour la détection des CTC est le système CellSearch[®], basé sur l'enrichissement des cellules EpCAM⁺. Par conséquent, il ne détecte pas ou très peu les sous-populations de CTC plus mésenchymateuses (EpCAM⁻ ou EpCAM^{low}). Cette incapacité à

détecter une fraction de CTC pourrait notamment expliquer que dans certains cancers, comme le cancer du sein métastatique, on ne détecte des CTC que dans 60 à 80% du temps (Eslami, Cortes-Hernandez, and Alix-Panabieres 2020). Ce biais de sélection peut exclure certaines sous-populations qui pourraient être des clones essentiels. En effet, ces cellules ont des propriétés mésenchymateuses. Les CTC mésenchymateuses ont été décrites comme associées avec un moins bon diagnostic dans les cancers de la prostate (Lindsay et al. 2016) ou du sein (Bulfony et al. 2016; Kitz et al. 2021). Il est donc important de pouvoir les enrichir et les détecter. Des cocktails d'anticorps membranaires ciblant les populations épithéliales et mésenchymateuses pourraient pallier à ces contraintes (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017).

L'enrichissement positif offre donc la possibilité d'obtenir des fractions de cellules enrichies plutôt pure, mais le choix de marqueur de sélection peut biaiser l'enrichissement et donc *a posteriori* la détection de certaines sous-populations de CTC.

b. Enrichissement négatif

Par opposition à l'enrichissement positif, l'enrichissement négatif n'utilise pas de marqueur de sélection des CTC : il consiste à sélectionner les cellules sanguines afin de les éliminer de l'échantillon. Pour cela, les cellules sanguines sont marquées avec des marqueurs hématopoïétiques communs, comme le CD45 qui est un marqueur des cellules leucocytaires, ou le CD61 marqueur des cellules plaquettaires. Cette méthode d'enrichissement offre la possibilité d'utiliser des cocktails d'anticorps dirigés contre différents marqueurs des cellules sanguines afin d'en éliminer un maximum et obtenir une fraction enrichie de CTC plus pure. De plus, l'enrichissement négatif permet d'obtenir une population hétérogène de CTC non-marquées, ce qui permet de les étudier sans qu'elles aient subi de modifications dû au marquage par les anticorps (Dianat-Moghadam et al. 2020). La méthode EasySep (StemCell) par exemple, utilise des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques. Les cellules sanguines vont ainsi être retenues par un aimant et les CTC vont pouvoir être récupérées. Cependant, la pureté des fractions obtenues de cellules enrichies est très faible (Banko et al. 2019).

Pour pallier à ces contraintes, l'enrichissement négatif peut être combiné avec l'enrichissement physique des CTC. Par exemple la méthode de RosetteSep (StemCell) s'utilise en combinaison avec le Ficoll pour une sélection par gradient de densité : les RosetteSep (un cocktail d'anticorps dirigés contre

les cellules sanguines) vont former des réseaux de ces cellules sanguines. Ainsi, lorsque le sang incubé avec les RosetteSep est déposé sur le Ficoll puis centrifugé, les réseaux de cellules sanguines sédimentent et les CTC restent en suspension sur le milieu de densité. Récemment, Chu *et al.* ont développé une méthode combinant déplétion immunologique et sélection par taille. Le prélèvement sanguin passe à travers une puce 3D où sont fixés des anticorps dirigés contre les globules blancs, puis un filtre élimine les globules rouges et ne conserve que les cellules plus grosses (Chu et al. 2019). Ces méthodes combinent les méthodes d'enrichissement afin d'obtenir une fraction de CTC non-marquées.

L'utilisation de l'enrichissement négatif est limitée par la pureté de l'échantillon obtenu. Une étape de pré-enrichissement des CTC peut être réalisée, avec la dilution du sang, la fixation des cellules, ou encore la lyse des globules rouges. Cependant ces étapes supplémentaires peuvent augmenter la perte des CTC lors des nombreuses étapes et interférer dans les analyses ultérieures des CTC (Boya et al. 2020).

L'étape d'enrichissement est une étape essentielle dans l'étude des CTC. Cependant, il n'existe pour l'heure aucune méthode de référence qui garantisse une sensibilité et une spécificité de l'enrichissement. Chaque méthode présente avantages et inconvénients. L'enrichissement qui se base sur les propriétés physiques des cellules induit la perte des petites CTC, et dépend de la formation de bulle d'air ou de caillot sanguin. Ces méthodes sont peu sensibles et peu spécifiques. L'enrichissement sur les propriétés biologiques peut se faire de deux façons ; l'enrichissement positif induit un biais de sélection et n'est donc pas représentatif de toutes les sous-populations de CTC. Cette méthode pourrait s'améliorer en utilisant des cocktails d'anticorps pour capturer un plus large spectre de clones de CTC, au détriment de la pureté de l'échantillon. Quant à l'enrichissement négatif, il permet de récupérer les différents clones de CTC au détriment de la pureté de l'échantillon. La forte concentration en cellules sanguines résiduelles peut alors restreindre les analyses moléculaires (Lara et al. 2004). Le choix de la méthode d'enrichissement va donc dépendre de l'analyse ultérieure qui sera faite sur les CTC.

b) Méthodes de détection des CTC

L'étape d'enrichissement est suivie par une étape de détection des CTC afin de les compter et/ou caractériser. Différentes méthodes d'identification existent comprenant le marquage immunologique avec une identification par immunohistochimie, immunofluorescence, ou encore hybridation in-situ fluorescente (*Fluorescence in situ hybridization* - FISH) mais également l'identification moléculaire par RT-qPCR (Sun et al. 2011).

La majorité des techniques d'identification immunologique consistent à marquer les cellules après les avoir enrichies. Elles peuvent être marquées par des anticorps fluorescents pour être détectées par immunofluorescence, immunocytochimie ou encore par des techniques de cytométrie (Krebs et al. 2014). Ces méthodes se basent majoritairement sur le même principe de détection que le CellSearch®, c'est-à-dire l'utilisation d'anticorps anti-cytokératines épithéliales (marqueur d'inclusion) et anti-CD45 (marqueur d'exclusion) pour discriminer les CTC des leucocytes résiduels (Pantel and Alix-Panabieres 2019; Agarwal et al. 2018). De manière général, ce sont des marqueurs épithéliaux qui sont utilisés pour la détection des CTC, et fréquemment ce sont des anticorps anti-EpCAM (Eslami, Cortes-Hernandez, and Alix-Panabieres 2020). En plus de ces marqueurs épithéliaux, les CTC peuvent être détectées par immunomarquage d'autres antigènes communs aux CTC, tels que Mucin1, HER2 ou EGFR (Pantel and Alix-Panabieres 2016). En fonction du cancer, il est également possible d'utiliser des marqueurs spécifiques aux différents tissus, comme l'expression du PSA (*Prostate specific antigen*) par les CTC pour le cancer de la prostate, de la mammaglobine (Benoy et al. 2006) et/ou du récepteur ER dans le cancer du sein, ou plus largement de PD-L1 dans différents types de cancers (Cortes-Hernandez et al. 2020) mais ces marqueurs ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et doivent être associés à des marqueurs tumoraux.

La méthode FISH permet également de détecter, mais aussi de compter les CTC dans l'échantillon donné, grâce aux réarrangements chromosomiques spécifiques des cellules tumorales, le plus souvent en détectant l'aneuploidie du centrosome du chromosome 8, une caractéristique commune des cancers solides et utilisés dans les cancers colorectal (Wu et al. 2017), du pancréas (Gregory, Williamson, and Feder 2017) ou encore gastrique (Li et al. 2014). L'utilisation de la cytométrie en flux permet d'identifier les CTC de façon hautement spécifique grâce à l'analyse de divers paramètres simultanément : le marquage, la taille, la granulosité, le contenu en ADN des cellules, etc (Sun et al. 2011). La méthode *Fiber-optic array scanning technology* (FAST) basée sur l'identification des CTC par

cytométrie a été développée avec un laser de haute résolution. Elle permet d'identifier les CTC dans un échantillon sanguin sans nécessiter d'enrichissement préalable (Krivacic et al. 2004; Hsieh et al. 2006), mais doit être validée sur de plus larges cohortes et dans différents cancers. Cependant, ces méthodes sont très peu sensibles et requièrent une forte concentration en CTC de l'échantillon. L'identification des CTC par les technologies immunofluorescence est facile à réaliser et peu coûteuse. Cependant l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence nécessitent une amélioration de la sensibilité notamment en termes de détection du signal fluorescent. Quant à la cytométrie en flux elle requiert une amélioration de la détection des événements rares.

L'identification des CTC par l'analyse moléculaire recherche des séquences d'ARNm spécifique, par RT-qPCR, pour les différencier des cellules sanguines. Cette méthode d'identification des CTC est très sensible grâce à l'utilisation de sondes de qPCR spécifiques des ARNm recherchés, notamment des marqueurs épithéliaux, de transcrits tissu-spécifiques ou spécifiques de métastases (Sun et al. 2011). Plusieurs transcrits ont été identifiés comme marqueurs d'identification des CTC dans différents cancers, notamment KRT19 et ERBB2 pour le cancer du sein (Guo et al. 2015), CK19 pour les cancers du sein et de l'œsophage, ou encore EGFR pour les cancers de la tête et du cou (Sun et al. 2011). La PCR en temps réel permet de suivre du signal d'amplification, il est ainsi plus facile de détecter et d'éliminer les signaux non-spécifiques, ce qui rend cette méthode spécifique. Cependant, les ARNm peuvent provenir de CTC en apoptose ou nécrose, les résultats de la RT-qPCR ne reflètent donc pas uniquement les CTC viables dans la circulation (Boya et al. 2020). De plus l'identification par qPCR ne permet pas de compter les cellules, et les méthodes de fixations des cellules peuvent entraîner des modifications de l'ARN.

En plus des méthodes d'immunomarquage et de RT-qPCR, des méthodes de détection des CTC basées leur sécrétion ont été développées. L'EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT) utilise un système d'immuno-spots permettant une étude fonctionnelle directe. Dans cette méthode les CTC sont enrichies par RosetteSep puis mises en culture *in-vitro* (Soler et al. 2017). Dans la plaque de culture, des anticorps ont été préalablement fixés au fond des puits. Les CTC sont cultivées 48h où les protéines sécrétées sont reconnues par ces anticorps fixés dans les puits, puis les CTC sont retirées et un anticorps secondaire immunofluorescent va générer des spots de fluorescence (Soler et al. 2017). Chaque spot est alors attribué à la présence d'une CTC. Cette détection permet un dosage quantitatif, pour le nombre de CTC, mais aussi qualitatif de la sécrétion cellulaire. Cette méthode a prouvé son intérêt

comme marqueur pronostic de la survie globale des patientes atteintes de cancer du sein (Ramirez et al. 2014). Basé sur cette technologie, la nouvelle méthode de l'EPIDROP est en développement au laboratoire. Elle consiste en une détection des protéines sécrétées par les CTC à un niveau de cellule unique.

Plusieurs méthodes d'identification des CTC sont donc possibles et peuvent être choisies en fonction des données que l'on veut obtenir. L'immunofluorescence permet de dénombrer rapidement les CTC, et peut être alliée à un tri pour une caractérisation en aval. La qPCR elle permet une meilleure sensibilité et peut fournir des caractéristiques moléculaires des CTC. Ces méthodes apportent des informations utiles à la prise en charge clinique des patients. Certaines d'entre elles permettront de récupérer les CTC pour les caractériser et obtenir de nouvelles données pour la compréhension et la prise en charge des cancers.

c) La caractérisation des CTC

1. Caractérisation moléculaire

Afin de permettre la caractérisation moléculaire des CTC, il est nécessaire de les isoler des cellules sanguines résiduelles. Cette sélection peut se faire par micromanipulation mais cette méthode est longue et difficile ; par microdissection laser des filtres, ainsi que par des méthodes de cytométrie en flux (*fluorescence activated cell sorting* - FACS). Enfin, une méthode permettant la détection et l'isolement des CTC, qui combine microfluidique et diélectrophorèse, le DEPArray (Menarini Silicon Biosystems), permet le tri à la cellule unique des cellules (Di Trapani, Manaresi, and Medoro 2018). La suspension de CTC enrichies et marquées par immunofluorescence est chargée dans une cassette constituée de cages diélectrophorétiques. Les cellules sont alors capturées dans ces cages. Le microscope du DEPArray scanne ensuite la cassette et l'opérateur sélectionne visuellement les cellules. Elles sont ensuite déplacées par inversion des charges de cage en cage jusqu'au site de tri où elles peuvent être triées de façon pure à raison d'une CTC par goutte (Fabbri et al. 2013). Cette technologie permet de trier des cellules fixées comme des cellules viables dans des supports variables (microtube, plaque de culture, etc.). Cette méthode offre la possibilité de caractériser les cellules unes à unes. La caractérisation moléculaire des CTC peut se faire sur une fraction enrichie ou sur des cellules uniques. Elle permet d'étudier le génome, le transcriptome, l'exome ou encore le protéome des CTC, apportant de nombreuses informations sur le fonctionnement de ces cellules ou des caractéristiques du cancer. Cependant l'étude moléculaire de fractions enrichies de CTC est limitée par la présence de cellules

sanguines résiduelles. L'étude des CTC à un niveau de cellule unique permet d'analyser l'hétérogénéité clonale présente au sein d'un même échantillon de patient et d'identifier les caractéristiques des différentes sous-populations, sans contamination de l'échantillon par des cellules sanguines. Cependant, une cellule ne représente que 6,6pg d'ADN, pour pouvoir l'analyser il est donc nécessaire d'effectuer une étape d'amplification génomique, par l'utilisation de WGA (*Whole Genome Amplification*) ou WTA (*Whole Transcriptome Amplification*). Les méthodes d'amplification doivent être robustes et sensibles car l'amplification du génome peut induire des biais dans l'intégrité du génome et donc dans l'analyse moléculaire.

Les nouvelles technologies d'analyse génomique ainsi que l'utilisation d'outils bio-informatiques doivent ensuite permettre d'obtenir des résultats robustes afin de discriminer des altérations génomiques, le polymorphisme, du biais induit par le WGA. La qualité de l'échantillon après WGA est donc importante, mais l'amélioration rapide des technologies permet aujourd'hui le séquençage du génome et de l'exome. En 2013, Heitzer *et al.* comparent pour la première fois le profil mutationnel de CTC de colon avec celui des tumeurs colorectales grâce à des technologies d'hybridation génomique (CGH) ou de séquençage nouvelle génération (NGS)(Heitzer et al. 2013). Ils prouvent alors que des mutations dans les gènes PIK3CA, APC ou KRAS sont détectées dans les CTC ainsi que dans les tissus tumoraux correspondants. Ces mutations sont connues pour être responsables de l'évolution de cancers colorectaux (Guedes et al. 2013). De plus, ces méthodes ont identifié certaines mutations dans les CTC qui se sont révélées être des mutations de clones minoritaires de la tumeur. C'est le cas de la mutation T790M dans le gène EGFR dans le NSCLC qui est associé à une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase de première et seconde génération au traitement (Maheswaran et al. 2008). Ainsi, lorsque des clones de CTC portant ces mutations sont identifiés, les patients pourraient être pris en charge différemment pour réajuster le traitement, notamment en les traitant avec des thérapies d'inhibiteurs de tyrosine kinase de troisième génération plus rapidement. Il est également possible d'utiliser des méthodes de FISH afin de détecter des amplifications ou des translocations de gènes d'intérêt dans les cancers, comme c'est le cas du réarrangement du gène ALK dans le NSCLC où l'étude des CTC complète l'analyse de la tumeur et met en évidence les clones minoritaires (Tan et al. 2016; Pailler et al. 2013). De même pour l'amplification du gène HER2 chez les patientes atteintes de cancer du sein, où l'analyse FISH des CTC peut aider au choix du traitement (Frithiof, Aaltonen, and Ryden 2016), ou encore la perte de PTEN et le gain du gène MYC dans le cancer de la prostate (Sun et

al. 2011). L'étude génomique des CTC à un niveau de cellule unique permet d'identifier les altérations génomiques de clones minoritaires. Ces mutations peuvent être de potentielles cibles thérapeutiques ou être à l'origine des résistances à certains traitements. Mais les CTC peuvent également être étudiées au niveau de l'exome, par WES. En 2020, Faugeroux *et al.* analysent les CTC de patients atteints de cancer de la prostate métastatique, résistant à la castration. Ils mettent en évidence une concordance entre les altérations de l'exome des CTC et celles des métastases (Faugeroux, Lefebvre, et al. 2020). Au-delà des mutations de l'ADN, des modifications épigénétiques peuvent être étudiées et apporter des informations sur l'expression génique par rapport à la méthylation de l'ADN (Agarwal et al. 2018). Benezeder *et al.* rapportent en 2017 une multiméthylation génique dans le cancer de sein métastatique (Benezeder et al. 2017). Cependant les études épigénétiques des CTC sont encore peu nombreuses et nécessitent des technologies appropriées.

L'étude du transcriptome est le plus souvent réalisée sur une fraction enrichie de CTC et la conservation des ARN, peu stables, est un challenge technologique de l'étape d'enrichissement jusqu'à la caractérisation. Mais ces dernières années ont vu l'émergence de nombreuses méthodes de séquençage de l'ARN à un niveau de cellule unique. Ziegenhain *et al.* ont comparé 6 méthodes de ces méthodes de séquençage sur des cellules souches uniques d'embryon de souris (CEL-seq2, Drop-seq, MARS-seq, SCRB-seq, Smart-seq, et Smart-seq2) (Ziegenhain et al. 2017). Ils mettent en évidence une précision similaire à chacune des méthodes, mais une sensibilité plus grande pour le SmartSeq2 (Picelli et al. 2013). Mais le Drop-seq est la méthode la moins coûteuse pour l'étude de nombreuses cellules à faible profondeur de séquençage. Le choix de la méthode se fait donc en fonction des analyses moléculaires voulues.

L'étude des ARN des CTC a en effet prouvé à plusieurs reprises leur hétérogénéité, mais aussi la concordance des profils transcriptomiques des CTC avec celui des tumeurs correspondantes (Gasch et al. 2013). De plus, le profil transcriptomique indique l'état de multiplication ou de mort cellulaire des CTC, indiquant la viabilité de ces cellules (Cann et al. 2012). De même la présence de certains ARNm, notamment des cytokératines, a été corrélée avec une diminution de la survie globale chez des patients atteints de cancers colorectaux (Iinuma et al. 2011) ou cancers du sein (Xenidis et al. 2009). En 2019, Cheng *et al.* développent une nouvelle méthode, le HydroSeq dans les CTC de cancer du sein. Ils détectent des marqueurs de cellules souches dans la majorité des CTC analysées et identifient de nouvelles cibles thérapeutiques (Cheng et al. 2019). Lang *et al.* dans le cancer du sein non-

métastatique identifient eux aussi dans l'ARN des CTC des mutations cibles non présentes dans les tumeurs (Lang et al. 2018). Dans le cancer de la prostate, chez des patients sensibles et résistants à la castration, le séquençage à la cellule unique des CTC identifie les variants de AR avec une hétérogénéité intra-patient. Cette étude rétrospective nécessite une validation sur de plus larges cohortes mais l'identification de ces variants pourrait à terme permettre d'orienter les traitements (Miyamoto et al. 2015; Rantalainen 2018). Le séquençage des ARN des CTC, bien que rare pour le moment au niveau de cellule unique, apporte des informations transcriptionnelles, et peut identifier les différents clones de CTC pouvant avoir un intérêt dans le monitoring de la maladie.

Les CTC peuvent également être caractérisées phénotypiquement, avec l'expression de molécules d'intérêt. Par exemple, la surexpression d'EGFR ou la co-expression de VEGF et VEGFR2 dans le cancer du sein indiquent un état de prolifération cellulaire (Kallergi et al. 2009). Cette caractérisation phénotypique peut identifier des cibles potentielles pour les thérapies et permettre d'orienter les traitements (Sun et al. 2011).

La caractérisation moléculaire des CTC permet de détecter de manière plus précise des altérations génomiques présentes dans les cellules cancéreuses ainsi qu'un suivi de l'évolution de la maladie, avec l'identification de l'émergence de mutations de résistances au cours des traitements ou les voies de signalisation surexprimées. Mais les études au niveau de cellule unique permettent également de détecter l'hétérogénéité tumorale, donc de détecter des sous-populations minoritaires pouvant être à l'origine de la progression métastatique. A terme, elles pourront aider au choix des traitements des patients, pour une médecine personnalisée. Ces caractérisations ont donc un impact clinique important, avec la validation de l'intérêt clinique de la détection des variants AR-v7 dans le cancer de la prostate et de la surexpression de HER2 du sein. Mais la majorité restent pour l'heure à l'étape d'étude et nécessitent des méthodes reproductibles et robustes pour être cliniquement valides.

2. Caractérisation fonctionnelle - Culture des CTC

Enfin, dans le but d'étudier la physiologie des CTC, des méthodes de caractérisation fonctionnelles ont été développées. Ces études nécessitent la mise en culture à plus ou moins long terme d'un nombre

suffisant de CTC viables. Elles peuvent se faire *in vitro* ou passer par l'intermédiaire de xénogreffes *ex-vivo* afin de former des lignées CTC (Pantel and Alix-Panabieres 2016). L'établissement de lignée permettrait d'obtenir le matériel biologique suffisant, à partir d'évènements rares que sont les CTC, pour les caractériser, identifier leurs mécanismes d'action et de potentielles cibles thérapeutiques ou encore tester des traitements. Cependant, elle nécessite de préserver les CTC viables et non marquées durant l'enrichissement. De plus, la perte doit être minimisée au maximum, car la culture requiert un nombre important de cellules, et des clones minoritaires pourraient être éliminés.

1. Culture *in vitro*

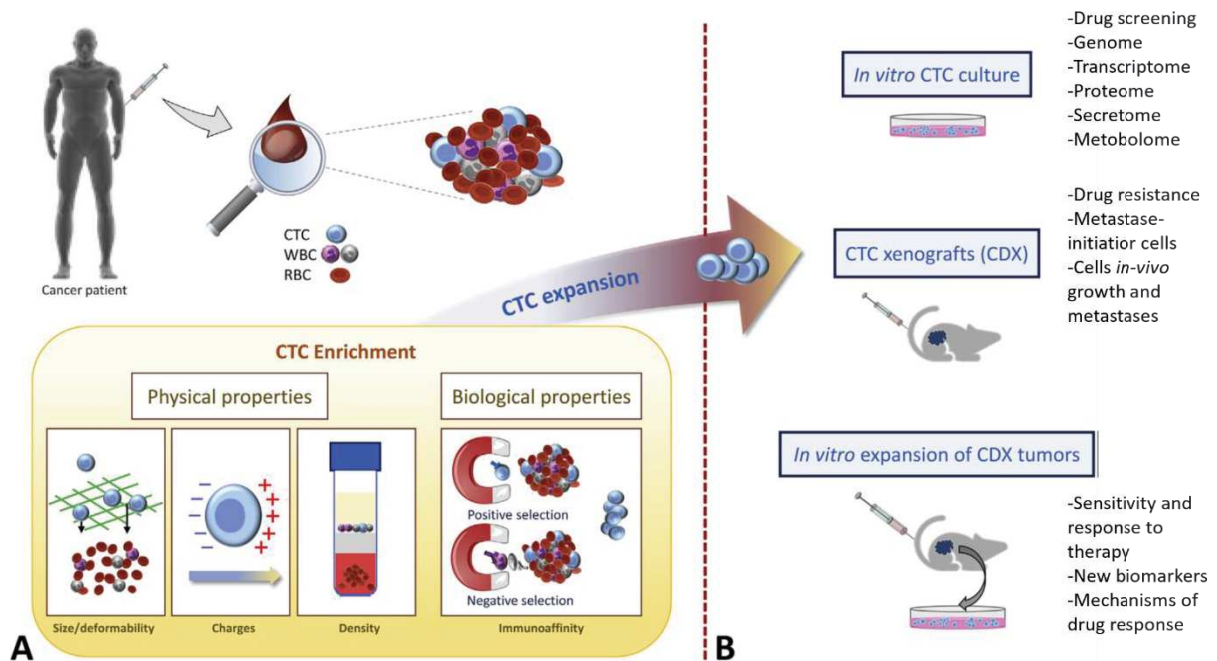
La mise en culture *in vitro* des CTC permet une expansion des cellules dans des conditions expérimentales simples et avec un contrôle de tous les paramètres. En 2013, Zhang *et al.* rapportent la mise en culture de CTC du sein. Les CTC, enrichies par FACS, présentaient un phénotype EpCAM⁺ et des caractéristiques de cellules souches. Cependant, cette lignée n'est pas établie sur le long terme (Zhang et al. 2013). Plusieurs équipes ont par la suite essayé d'établir des lignées CTC dans différents cancers, notamment la prostate (Kolostova, Broul, et al. 2014), l'œsophage (Kolostova, Zhang, et al. 2014), l'ovaire ou encore l'endomètre (Kolostova et al. 2015; Sharma et al. 2018). Lim *et al.* ont eux établi une lignée *ex-vivo* à partir de cluster de CTC de la prostate, dans laquelle ils ont mis en évidence des caractéristiques de cellules souches et des marqueurs de pertinence clinique comme l'expression de PD-L1 (Lim et al. 2016). La plupart des équipes ont maintenu ces cultures de CTC sur de courts termes (7 à 14 jours) (Cortes-Hernandez, Eslami, and Alix-Panabieres 2020).

En 2015, notre équipe a rapporté l'établissement d'une lignée cellulaire à long terme à partir de CTC d'un patient atteint d'un cancer du côlon métastatique (Cayrefourcq et al. 2015). L'étude COLOSPOT (NCT01596790) englobait 168 patients atteints de cancer du côlon. Dans cette étude, les CTC étaient recherchées grâce à la méthode CellSearch[®], en parallèle de la mise en culture à partir de 10mL de sang. Pour mettre en culture ces CTC, les cellules ont été enrichies grâce à la combinaison des RosetteSep (enrichissement négatif) et du milieu de densité Ficoll puis mises en culture en conditions d'hypoxie (2% d'O₂). Le premier prélèvement à avoir permis d'établir une lignée comptabilisait 516 CTC au CellSearch[®]. Par la suite, d'autres prélèvements de ce même patient ont permis d'établir huit autres lignées CTC immortalisées à différentes étapes de l'évolution de sa maladie. La caractérisation de ces lignées a prouvé la concordance de leurs caractéristiques moléculaires avec celles de la tumeur, notamment la mutation BRAF. De plus, les CTC possèdent des propriétés de cellules souches avec un

profil phénotypique intermédiaire de l'EMT (Soler et al. 2018). L'étude fonctionnelle de ces lignées a prouvé sa capacité à induire l'angiogenèse, mais aussi leur potentiel métastatique *in vivo*. Puis, les études moléculaires de ces lignées ont révélé une pression de sélection des clones résistants au traitement et aux caractéristiques de cellules souches au cours des traitements (Cayrefourcq et al. 2021).

D'autres groupes ont essayé de mettre en culture des CTC avec la même méthode d'enrichissement que celle qui est utilisée au sein de notre laboratoire. C'est le cas de Gao *et al.* qui ont essayé avec des prélèvements de patients atteints de cancer de la prostate et ayant plus de 100 CTC dans 8mL de sang (Gao et al. 2014), ou encore de Yu *et al.* qui ont établi plusieurs lignées à partir de prélèvements de patientes atteintes de cancer du sein et ont pu les maintenir plus de 6 mois en culture (Yu et al. 2014). A partir de CTC du NSCLC, Kaperleris *et al.* ont identifiés des mutations spécifiques de ce cancer ainsi qu'un réarrangement chromosomique de la région contenant le gène ALK (Kapeleris et al. 2020). Plus récemment, Koch *et al.* ont pu obtenir une lignée depuis un prélèvement d'une patiente atteinte de cancer du sein et présentant plus de 1500 CTC au CellSearch®. Ils ont pu caractériser ces CTC comment étant ER⁺ de manière similaire à la tumeur, avec des caractéristiques de cellules souches également (Koch et al. 2020). Que *et al.* ont quant à eux établi une lignée permanente à partir de CTC d'un patient atteint de cancer du poumon grâce à un enrichissement positif magnétique. Ces CTC se trouvent dans un état intermédiaire de l'EMT et possèdent la capacité à induire des métastases *in-vivo* (Que et al. 2019).

La culture des CTC permet de nombreuses explorations fonctionnelles (**Figure 14**) ; il est possible d'évaluer leur capacité à former des métastases, tout comme de tester leur résistance à des traitements, mais aussi leurs propriétés de cellules souches, leur invasivité ou encore les mécanismes utilisés pour la dissémination métastatique. Elles peuvent également être utilisées pour le développement de nouvelles drogues. La culture *in vitro* permet donc de nombreuses expériences, de manière rapide et avec un contrôle précis des paramètres d'expérience. Cependant la culture *in vitro* ne permet pas de mimer et prédire de façon robuste les conditions *in vivo*, notamment l'implication du microenvironnement et les mécanismes de dissémination, et elle entraîne une sélection clonale des CTC les plus agressives. Certaines mutations *de-novo* peuvent apparaître au cours du temps dans les lignées *in-vitro* à long terme (Tayoun et al. 2019).



Adapté de Cortes-Hernandez *et al.* Mol Aspects Med.2020

Figure 14: Enrichissement et expansion des CTCs

A) Méthodes d'enrichissement des CTC basées sur les propriétés physiques (taille/déformabilité pour les filtrations, les charges pour les systèmes de diélectrophorèse, et les milieux de densité), ou les propriétés biologiques (ciblant des marqueurs de surface, comme EpCAM pour un enrichissement positif ou CD45 pour un enrichissement négatif) B) Expansion des CTC. Culture de CTC *in-vitro* pour des études fonctionnelles, du génome, du transcriptome, protéome, sécrétome et métabolome des cellules initiateurs de tumeurs. Les modèles de xénogreffes dérivées de CTC (CDX) en conditions *in-vivo* pour comprendre les mécanismes de résistance aux traitements, identifier les propriétés des cellules initiateurs de tumeurs, la capacité des CTC à induire la croissance tumorale et métastatique. Expansion *in-vitro* des CDX peuvent être utilisées pour contrôler la réponse aux thérapies anticancer et identifier des nouveaux biomarqueurs.

2. Études fonctionnelles des CTC *in vivo* par Xénogreffe

A l'inverse de la culture *in-vitro*, les lignées obtenues *in-vivo* après xénogreffe de cellules tumorales sont obtenues sans contrôle total des paramètres. Ce modèle est plus long à mettre en place mais permet de nombreuses expérimentations non applicables *in-vitro* (Alix-Panabieres, Bartkowiak, and Pantel 2016). Beaucoup de lignées cancéreuses utilisées couramment dans les laboratoires aujourd'hui ont été obtenues à partir de cellules de tissus tumoraux des patients (*patients-derived xenograft* – *PDX*) directement injectés dans des souris immunodéprimées. Cependant, cette technique nécessite un accès à la tumeur, ainsi qu'une quantité de tissu tumoral suffisant.

Pour pallier à ces contraintes, l'utilisation des CTC comme source de cellules tumorales pour l'établissement de lignées est alors apparue. Lorsqu'elles sont inoculées chez des souris

immunodéprimées (xénogreffe), elles peuvent être à l'origine de l'établissement de lignée cellulaire. Ces xénogreffes dérivées de CTC (CDX) pourraient aider à la compréhension du processus de dissémination métastatique, mais aussi aux mécanismes de résistance aux traitements ou à l'efficacité d'une thérapie, par exemple. La première étude fonctionnelle de CTC utilisant des CDX a été publiée en 2013 par Baccelli *et al.* à partir de CTC de patientes atteintes de cancer du sein, enrichies avec la méthode de RosetteSep et injectées dans le tibia de souris immunodéprimées. Les CDX formées provenaient de prélèvements où plus de 1000 CTC étaient dénombrées avec la méthode CellSearch® (Baccelli *et al.* 2013). La formation de métastases *in-vivo* confirmait la capacité d'initiation de métastases des CTC. Les études de caractérisation de ces lignées CDX ont mis en lumière des propriétés métastatiques des CTC mais aussi la présence de propriétés de cellules souches. Des phénotypes hybrides ont été observés avec des caractéristiques de l'EMT, se révélant identiques aux caractéristiques de la tumeur primaire et des métastases ganglionnaires. Dans le cancer du poumon à petite cellule (*Small-Cell Lung Cancer – SCLC*), Hodgkinson *et al.* révèlent que le profil moléculaire des CDX diffère selon l'évolution clinique des patients (Hodgkinson *et al.* 2014). Ces résultats sont confirmés par Drapkin *et al.* qui comparent les CDX avec les PDX. Les CDX en série au cours des traitements ont confirmé l'évolution de la sensibilité à ces traitements (Drapkin *et al.* 2018). Dans le NSCLC, où les CTC sont bien moins présentes que dans le SCLC, Morrow *et al.* ont enrichies les CTC avec la méthode ISET. Ils révèlent que la formation de métastases peut se faire avec des populations de CTC EpCAM⁻ et possédant des traits mésenchymateux (Morrow *et al.* 2016). Enfin, dans le cancer de la prostate, Faugeroux *et al.* en 2020 établissent des CDX résistantes aux traitements de manière similaire aux patients et détectent des mutations dans les gènes impliqués dans l'oncogénèse comme *PTEN* ou *RB1*. Ils montrent enfin que la progression du cancer de la prostate résistant à la castration implique des capacités tumorigéniques des CTC (Faugeroux, Pailler, *et al.* 2020).

Le modèle CDX mime au mieux les conditions *in-vivo* de la tumeur. Il indique facilement les propriétés initiatrices de métastases des CTC, ainsi que la réponse aux traitements, notamment la sensibilité des cellules aux chimiothérapies (**Figure 14**). Cependant, cette méthode est très peu efficace dans l'établissement de lignées cellulaires et nécessite, comme les cultures *in-vitro*, beaucoup de CTC (Cortes-Hernandez, Eslami, and Alix-Panabieres 2020). Elle ne peut donc s'appliquer qu'à des patients en stade avancé. De plus, il est nécessaire de vérifier l'origine des tumeurs développées par le modèle murin (Tayoun *et al.* 2019). A ce jour, les populations EpCAM⁻ sont très peu étudiées dans ces modèles

mais elles pourraient apporter des informations importantes sur leur capacité à induire des métastases, leurs propriétés de cellules souches, ou encore la résistance aux traitements pour une prise en charge clinique personnalisée. Pour l'heure elles ne sont pas utilisées pour le choix des traitements car elles sont longues à mettre en place mais informent sur les mécanismes de dissémination métastatique.

Une autre méthode de croissance *in-vivo* des cellules est de mettre les lignées obtenues avec les CDX en culture *in vitro* afin de faciliter les analyses fonctionnelles. On peut ainsi identifier de nouveaux biomarqueurs, tester la sensibilité à des thérapies anti-cancéreuses ou encore étudier les mécanismes de la réponse aux thérapies de manière rapide par rapport aux tests *in-vivo* (**Figure 14**) (Tayoun et al. 2019). Lallo *et al.* rapportent dans le cancer du poumon l'utilisation de cette méthode pour tester plus rapidement les réponses aux traitements (Lallo et al. 2017).

De manière générale, les études fonctionnelles ont pour but d'identifier les potentielles cibles thérapeutiques. Cependant, la difficulté à obtenir assez des lignées suffisantes restreint leur application clinique pour l'heure et nécessite de développement de méthodes plus efficaces, par exemple par le développement de méthodes *in-vitro* en 3D combinés avec la microfluidique afin de mimer le microenvironnement tumoral (Tayoun et al. 2019). L'étude fonctionnelle des CTC permet néanmoins d'identifier les propriétés souches et initiatrices de métastases des cellules et de mieux comprendre les mécanismes de la dissémination métastatique. Leur intérêt clinique grandissant avec le développement des méthodes d'analyses.

d) Pertinence clinique

Les CTC ne sont pour l'heure, pas recherchées de façon routinière dans la prise en charge des patients atteints de cancer, malgré leur rôle primordial dans la dissémination métastatique. En effet, dans le diagnostic des maladies pulmonaires obstructives chroniques, les cellules épithéliales peuvent être détectées dans le sang de 1 à 4 ans avant la détection de la maladie par les technologies d'imagerie, et sont donc utilisées comme un outil de dépistage, suggérant la sensibilité de détection des cellules épithéliales (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017). Etudier les CTC comme biopsie liquide

permettrait d'adapter le suivi ainsi que les thérapies des patients, mais aussi prédire les réponses aux thérapies pour amener à une médecine personnalisée de précision. Mais elle permettrait également de comprendre les mécanismes de dissémination métastatique.

La présence des CTC et leur nombre est d'abord un fort biomarqueur pronostic. En effet, l'énumération des CTC grâce à la technologie du CellSearch®, par exemple, a démontré la valeur pronostic des CTC notamment dans le cancer du sein (Cristofanilli et al. 2005). Que ce soit dans le cancer du sein localisé mais aussi, plus souvent, dans le cancer du sein métastatique, la présence des CTC est associée avec un risque de rechute précoce (Pierga et al. 2008; Bidard et al. 2014). Au-delà de 5 CTC/7,5mL de sang, leur présence a également été associée avec une diminution significative de la survie globale et la survie sans progression (*progression-free survival – PFS*). De plus, les patientes présentant moins de 5 CTC au diagnostic semblent plus sensibles aux thérapies (Hayes et al. 2006). L'énumération des CTC dans le cancer métastatique du sein a prouvé son intérêt clinique jusqu'à son inclusion dans la classification clinique de ce cancer, avec la création d'un stade de cancer cM0(i+) où il n'existe pas de signes cliniques de métastases mais où des CTC sont détectées au CellSearch®. Mais le dénombrement des CTC au cours des traitements apparaît aussi comme un marqueur pronostic, avec une corrélation entre l'augmentation du nombre de CTC et rechute clinique (Poulet, Massias, and Taly 2019). De même, si plus de 5 CTC sont détectées après les premières lignes de traitements, le risque de rechute est significativement plus important (Liu et al. 2009). De façon similaire, pour les patients atteints de cancer colorectal, le dénombrement de plus de 3 CTC est associé avec une survie globale et une PFS plus courtes. Cependant ce seuil n'est pour l'heure pas validé cliniquement. En effet les patients atteints de cancer colorectal présentent globalement moins de CTC que dans les autres cancers. Cette observation suggère une filtration des CTC colorectales lors de leur passage dans le foie. Dans le cancer de la prostate, la présence de CTC possède également un intérêt prédictif, avec un seuil déterminé à 5 CTC qui est significativement lié à la survie globale (Moreno et al. 2005) même si ce seuil a pu être controversé avec des propositions à 4 CTC (Goodman et al. 2009) ou encore à 2 CTC (Chen et al. 2005) suivant les études. Pour les patients atteints de cancer de la prostate mais résistants à la castration, la présence de CTC reste prédictive de la survie globale des patients (Danila et al. 2007). En effet, la présence de CTC est définie comme un biomarqueur prédictif plus pertinent que la concentration en PSA chez ces patients (de Bono et al. 2008; Sun et al. 2011). Cependant, dans ce type de cancer, le nombre de CTC n'est pas corrélé avec la taille de la tumeur (Sun et al. 2011). A l'inverse, dans le cancer

du poumon, le seuil à 1 CTC permet de différencier maladies bénignes des poumons des cancers, et le nombre de CTC est corrélé avec la réponse aux thérapies (Hou et al. 2009). Les patients avec plus de 5 CTC dénombrées avec le CellSearch® auront une évolution clinique non favorable, à l'inverse, si une diminution du nombre de CTC après la thérapie est observée, la survie globale et la PFS associée sont meilleures (Krebs et al. 2011). Lorsque plus de 50 CTC sont détectées avec la technologie ISET dans le NSCLC, l'évolution de la maladie associée est mauvaise. Les CTC ont donc également avoir une valeur pronostique avec la méthode ISET (Hofman et al. 2011). On peut finalement dire que les CTC ont une valeur pronostic claire dans différents cancers mais elles peuvent aussi être des biomarqueurs pharmacodynamiques, bien que les analyses prospectives n'aient pas obtenus des résultats concordants (Zahra Eslami-S 2020). Les CTC ont également démontré leur intérêt dans l'évaluation de l'utilité des chimiothérapies, avec le suivi du nombre de CTC chez des patients atteints de cancer du sein, qui reflète l'efficacité de la thérapie, ou qui peut indiquer précocement la résistance à une chimiothérapie (Bidard et al. 2013). Récemment, il a été montré que le nombre de CTC pouvait aider à la décision du choix de traitement dans le cancer du sein métastatique (Bidard et al. 2020). La pertinence clinique de la détection des CTC a également été déterminée dans d'autres cancers comme le cancer de la vessie, du foie ou de l'œsophage, pour une corrélation entre le nombre de CTC et les risques de rechutes métastatiques (Agashe and Kurzrock 2020).

Outre l'énumération des CTC, leur caractérisation peut servir de biomarqueur clinique et apporter des informations moléculaires. En effet, les altérations génomiques des CTC identifiées lors du diagnostic ou apparaissant au cours de l'évolution de la maladie, peuvent orienter le choix des traitements, de même que l'expression de certaines molécules spécifiques. La caractérisation séquentielle des CTC par la biopsie liquide permet donc un suivi en temps réel des modifications moléculaires du cancer (Alix-Panabieres and Pantel 2021a) et pourrait donc servir à terme au choix des traitements et à la prise en charge des patients.

Les CTC sont donc prometteuse pour une application clinique par leur grande valeur pronostique observée dans de nombreux cancers. Leur détection et caractérisation pourra à terme permettre d'adapter la prise en charge clinique, avec un choix de traitement et un suivi adéquat. La biopsie liquide avec les CTC pourrait permettre une médecine personnalisée pour chaque patient. Pour l'heure, elle nécessite l'amélioration de la sensibilité et la spécificité des méthodes. A terme, l'analyse moléculaire pourra aider à la compréhension des mécanismes de dissémination métastatique, mais également à

comprendre la résistance aux traitements notamment par la présence de cellules souches. A l'avenir, les nouvelles études des CTC seront utiles pour la recherche sur le cancer mais également en clinique pour le développement d'une médecine personnalisée, essentielle dans la prise en charge de cancers rares dont les mécanismes restent encore peu étudiés.

V. Les CTC dans le CCM

Le Carcinome à cellules de Merkel, de par sa rareté, a très peu été étudié jusqu'à récemment. (Moins de 100 publications par an jusqu'en 2007 - Source PubMed). Il atteint maintenant en moyenne 296 publications par an sur les cinq dernières années (2014 – 2019). La majorité de ces publications étudient différents traitements proposés aux patients. Malgré de nombreuses découvertes récentes sur l'implication du MCPyV ou de l'immunosuppression dans ce cancer, la compréhension des mécanismes de sa carcinogénèse reste encore très faible.

La biopsie liquide dans le CCM a été jusqu'ici très peu étudiée. Malgré la haute mortalité associée à ce cancer et la nécessité de nouveaux biomarqueurs, il n'existe pour l'heure que 6 publications s'intéressant à la biopsie liquide dans le CCM (**Revue** : Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma). Les biomarqueurs circulants comme les CTC, le ctDNA ou encore les mi-RNA sont des candidats pour le diagnostic précoce du CCM, mais également et surtout pour le suivi de l'évolution clinique des patients de façon précise et personnalisée. En effet, un des objectifs de la biopsie liquide est d'obtenir des biomarqueurs spécifiques pour la détection précoce de la progression des cancers afin de la stopper rapidement. La biopsie liquide permet également de surveiller l'évolution de la maladie en temps réel. Parmi les 6 publications sorties à ce jour, 4 s'intéressent aux CTC dans le CCM, dont une étude découlant des résultats de cette thèse (**Article**: Circulating Tumor Cell Detection and Polyomavirus Status in Merkel Cell Carcinoma). Deux d'entre elles ont évalué la faisabilité de la détection des CTC dans le but de les compter, les deux suivantes ont également étudié la présence du MCPyV dans les CTC. Parmi ces 4 études, deux ont utilisé uniquement le CellSearch® comme méthode de détection, une troisième (notre étude) a comparé le CellSearch® et la méthode de RosetteSep-DEPArray et enfin la dernière a utilisé le système Maintrac. Quelle que soit la méthode de détection, les résultats ont tous convergé vers des résultats similaires : les CTC sont détectables chez les patients atteints de CCM. Concernant la pertinence clinique, les résultats divergent, avec une corrélation entre CTC et la survie globale(Blom et al. 2014), CTC et évolution de la maladie(Gaiser et al. 2015), nombre de CTC et agressivité(Riethdorf et al. 2019), ou encore CTC et stade du cancer(Boyer, Cayrefourcq, Garima, et al. 2020). Globalement les CTC semblent avoir un intérêt clinique mais les études doivent se poursuivre à plus grande échelle, sur des cohortes plus grandes. Pour les études concernant le miRNA(Fan et al. 2018) et la concentration des anticorps anti-MCPyV(Samimi et al.

2016), ces biomarqueurs semblent intéressants dans le monitoring et la prédiction de l'évolution de la maladie mais de nouvelles investigations sont nécessaires pour confirmer cliniquement ces résultats.

La rareté de ce cancer limite les études car les cohortes de patients sont réduites et des analyses multicentriques pourraient aider à pallier ce problème. De ce fait, la recherche sur les CTC dans le CCM, et plus largement la biopsie dans le CCM n'en est qu'à ses débuts. Elle pourrait aider à comprendre les mécanismes sous-jacents de cette maladie encore mal comprise, mais aussi servir de marqueur en temps réel de l'évolution de la tumeur.

Dans ce projet, nous avons voulu développer une nouvelle méthode de détection des CTC dans le CCM basée sur un enrichissement négatif et utilisant des technologies de pointe afin de compter et caractériser ces CTC avec un haut niveau de pureté. La détection s'est d'abord faite chez des patients atteints de CCM métastatiques, où nous avons détecté des CTC avec notre méthode ainsi qu'avec le CellSearch®, nous avons donc ensuite recherché les CTC chez des patients en stades plus précoces. La détection de CTC a été corrélée avec le stade des cancers des patients, que ce soit avec notre méthode de détection ou avec le CellSearch®. Nous avons aussi pu déterminer de nouveaux seuils pour la corrélation de la détection des CTC dans le CCM et le stade des patients.

A partir des cellules détectées et triées, nous avons recherché la présence du MCPyV, et nous avons comparé le statut viral à celui des biopsies tissulaires de ces mêmes patients. Ces analyses nous ont révélé une hétérogénéité de la présence de ce virus au sein des CTC d'un même patient, alors même que la biopsie correspondante était positive au MCPyV. Cette observation a soulevé la question de l'origine de cette hétérogénéité : est-elle présente au sein des tumeurs ?, ou les CTC perdent-elles le MCPyV lors de leur passage dans le sang ? Pour répondre à cette question, nous avons optimisé une méthode de dissociation et d'isolation à la cellule unique des cellules de biopsies tissulaires. Nous avons donc pu ainsi comparer les statuts viraux de chaque CTC à ceux des cellules tumorales. Ainsi, nous avons observé une hétérogénéité du statut viral au sein même de la tumeur, sans corrélation évidente avec le statut viral des CTC. L'origine de cette hétérogénéité est donc toujours inconnue.

Objectifs de la thèse

La recherche sur la biopsie liquide est aujourd'hui en pleine expansion grâce notamment à l'évolution des technologies et à la découverte de nouveaux biomarqueurs. Elle ouvre de larges perspectives pour la prise en charge clinique des patients, tant comme marqueur pronostique que comme outil de développement de la médecine personnalisée avec le choix des traitements. Cependant, la détection du matériel biologique tumoral à très faible concentration dans le sang reste un défi technique et nécessite de multiples étapes avant de pouvoir quantifier et/ou caractériser ces biomarqueurs. De nombreuses méthodes ont été développées, notamment le système CellSearch® pour la détection des CTC, approuvé comme biomarqueur de pronostic par la Food-Drug Administration dans les cancers de sein, de la prostate et du côlon métastatiques. Par exemple dans le cancer du sein, la détection de CTC par le CellSearch® est établie comme étant un stade du cancer à part entière. La prise en charge des patientes présentant des CTC ≥ 5 sera différente de celles qui n'ont pas de CTC ou < 5 CTC dans leurs prélèvements sanguins. De plus, la caractérisation des CTC avec l'identification de mutations moléculaires ou encore la détection de marqueurs tels que Her2 ou PD-L1, pourrait permettre d'orienter les traitements des patients vers des thérapies ciblées (trastuzumab et immunothérapie anti-PD-L1, respectivement). C'est pourquoi la biopsie liquide apparaît comme un outil prometteur pour la prise en charge personnalisée des patients atteints de cancer, ainsi que dans la compréhension des mécanismes de dissémination des cancers agressifs.

Nous avons ainsi voulu appliquer les connaissances en matière de biopsie liquide au Carcinome à Cellules de Merkel (CCM), où les recherches sur les biomarqueurs circulants sont à ce jour très peu répandues. Ce cancer particulièrement agressif nécessite une prise en charge et un suivi régulier car il peut se disséminer de façon très rapide. La biopsie liquide pourrait permettre d'affiner la prise en charge de ce cancer mais aussi de déterminer les mécanismes de ce cancer encore mal compris. Notre choix s'est porté sur l'étude des CTC car elles peuvent apporter de nombreuses informations : leur dénombrement peut informer sur l'état d'avancement du cancer et elles peuvent être caractérisées à un niveau phénotypique mais également moléculaire (étude de l'ADN, de l'ARN, des protéines). La caractérisation des CTC permettrait de visualiser leur hétérogénéité mais aussi détecter de potentielles cibles thérapeutiques ou des informations sur les résistances à certains traitements.

Afin d'évaluer l'intérêt clinique de la détection des CTC dans le CCM, nous avons développé une nouvelle méthode de détection de ces cellules et l'avons comparé au système CellSearch®. Cette

nouvelle méthode, appelée R-D, combine un tri négatif des CTC (par la technique RosetteSep) avec la détection des CTC grâce au DEPArray, une technologie de pointe qui permet de visualiser, sélectionner et de trier les cellules à la cellule unique (ici grâce aux marqueurs épithéliaux EpCAM et PanCK (8, 18, 19) et aux marqueurs de CCM (CK20 et NSE)). En parallèle, nous avons recherché les CTC du CCM par le système CellSearch® qui combine un tri positif des CTC (via l'expression de la molécule épithéliale EpCAM) et leur dénombrement grâce au marquage de cytokératines (PanCK), du DAPI et de CD45. L'optimisation de la méthode R-D s'est d'abord faite avec l'utilisation de lignées cellulaires du CCM, puis afin d'évaluer la faisabilité de la détection des CTC avec cette méthode, et visualiser une éventuelle corrélation avec le statut clinique, des patients atteints du CCM suivis au département de Dermatologie du CHU de Montpellier ont été inclus dans cette étude.

La seconde partie de cette thèse a été de caractériser le statut viral des CTC à la cellule unique pour la présence du Polyomavirus de Merkel (MCPyV). Ce virus, seul polyomavirus humain lié à la carcinogénèse d'un cancer humain, est présent chez 80% des patients atteints de CCM. Bien que l'on sache que ce polyomavirus exprime des antigènes tumoraux qui peuvent influencer le cycle cellulaire, expliquant son association au tissu tumoral, son rôle exact et les mécanismes utilisés dans le développement du CCM restent à déterminer. En effet, ce virus est lié au développement tumoral du CCM. Cependant, les patients qui ne sont pas infectés par le MCPyV ont une moins bonne survie associée et un risque plus élevé à développer des métastases rapidement que ceux infectés par le MCPyV. Cette observation permet de poser l'hypothèse d'une théorie de 'hit and run' où les cellules cancéreuses pourraient perdre le virus en conservant l'agressivité du cancer. Nous avons donc recherché la présence de ce MCPyV, grâce à la collaboration du laboratoire de virologie du CHU de Montpellier, dans les CTC mais aussi dans les cellules des biopsies tissulaires pour tenter d'éclairer cette théorie.

Enfin, afin de permettre des études plus poussées sur les caractéristiques et le fonctionnement des CTC dans le CCM, nous avons tenté de mettre en culture *in vitro* des CTC d'après l'expertise du laboratoire. Ces CTC provenaient de prélèvements de patients où plus de 300 CTC étaient détectées par le système CellSearch®.

Ce projet de thèse a donc permis de développer une nouvelle méthode de détection des CTC dans le CCM, ainsi que la caractérisation de leur statut viral à la cellule unique. Le but étant d'aider à la prise en charge des patients CCM avec le monitoring de la maladie chez des patients en stades avancés

comme précoces, mais aussi tenter de comprendre au mieux le processus métastatique de ce cancer à travers la présence du MCPyV dans les CTC et les tumeurs des patients inclus dans l'étude.

Résultats

I. Mise en place d'une nouvelle méthode de détection des CTC

La première partie de ma thèse a consisté à développer une nouvelle méthode de détection des CTC dans le CCM. En effet, seulement trois études s'y intéressant avaient été publiées en janvier 2019 et il n'existe pour l'heure aucun essai clinique se basant sur l'étude de la biopsie liquide dans le CCM. Nous avons voulu mettre en place une méthode qui se veut complémentaire à celle du système CellSearch®, approuvée par la FDA pour les cancers du sein, de la prostate et du côlon métastatique. Le système CellSearch® est basé sur un enrichissement positif des cellules épithéliales (EpCAM⁺) depuis le sang total, avec une détection des CTC par l'expression de cytokératines et du DAPI dans les cellules. N'ayant que très peu d'informations sur le comportement et la biologie des CTC dans le CCM, nous avons voulu développer une méthode basée sur un enrichissement négatif avec la méthode des RosetteSep, pour éviter tout biais de sélection dès la première étape, c'est-à-dire une méthode qui élimine les cellules sanguines normales, et conserve toutes les autres, afin de limiter au maximum la perte des cellules du CCM (**Figure 15**, ligne du haut). Les RosetteSep sont un cocktail d'anticorps dirigés contre les marqueurs de cellules sanguines qui, lorsqu'ils sont ajoutés dans du sang, vont former des agrégats dits 'rosettes' de cellules sanguines. Une fois ces agrégats formés, le sang est déposé sur un milieu de densité et centrifugé. Ainsi les réseaux de cellules sanguines sédimentent au fond du tube et les cellules non-sanguines restent en suspension au-dessus du milieu de densité. Cette méthode d'enrichissement est combinée à une méthode de détection, le DEPArray, une technologie de pointe pour une analyse à la cellule unique. Le DEPArray permet, par un système de microfluidique, d'injecter les cellules dans une cassette composée de plusieurs milliers de cages de diélectrophorèses (DEP) qui vont capturer les cellules grâce à leurs charges magnétiques. On peut ainsi visualiser les cellules unes à unes dans les cages DEP, les sélectionner en fonction de leur phénotype et les trier à un niveau de pureté de cellule unique (**Figure 15**, ligne centrale) pour permettre la caractérisation moléculaire de ces CTC après amplification génomique (**Figure 15**, ligne du bas).

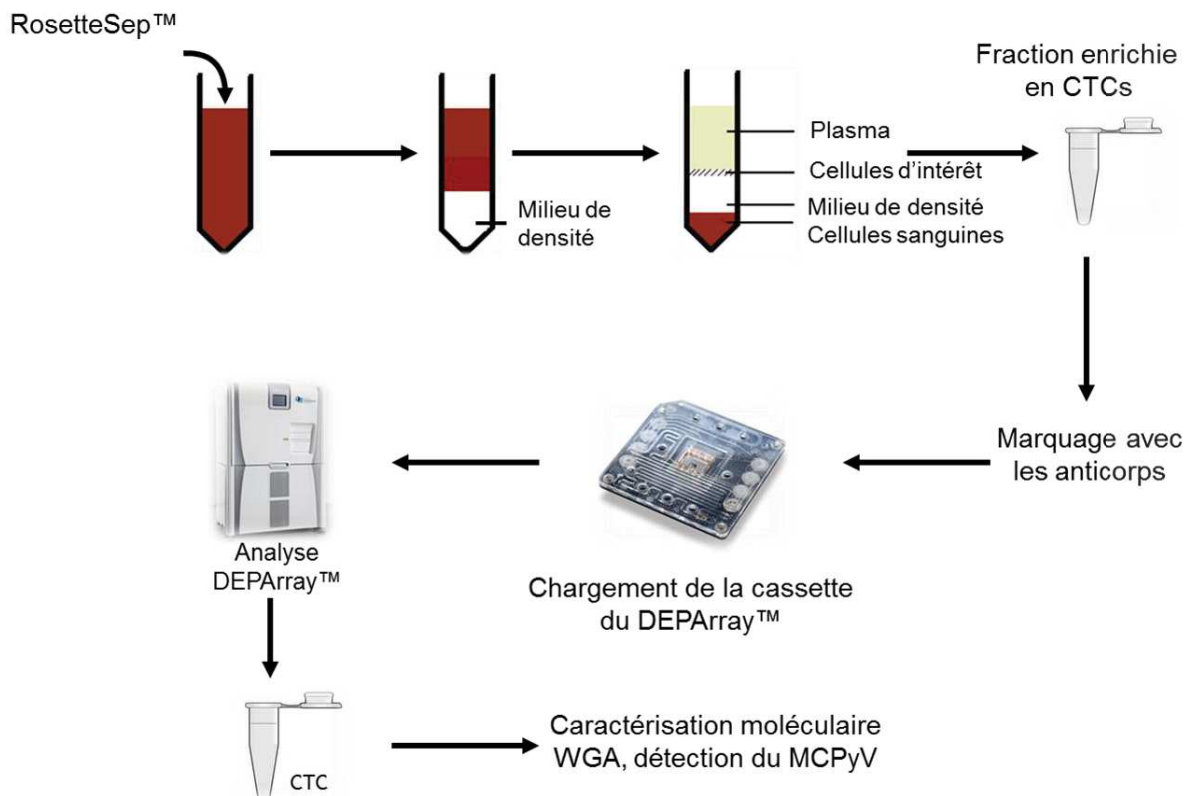


Figure 15: RosetteSep-DEPArray (R-D) workflow

Différentes étapes du workflow RosetteSep-DEPArray. Ligne du haut : enrichissement négatif avec les RosetteSep depuis le sang total jusqu'à la fraction enrichies. Ligne du milieu : Détection des CTC par marquage immunologique et analyse au DEPArray. Ligne du bas : Analyse moléculaire de la cellule unique à la détection du MCPyV après WGA. Abréviations : CTC : cellule tumorale circulante, WGA : whole genome amplification, MCPyV : Polyomavirus de Merkel.

a) Détermination des marqueurs des CTC CCM

La première étape de l'optimisation de cette nouvelle méthode a été de déterminer les marqueurs spécifiques du CCM qui nous serviront pour la détection des CTC au DEPArray. Pour cela, nous avons testés différents anticorps sur 3 lignées cellulaires dérivées de tumeur de CCM. La lignée MKL-1 se multiplie en suspension, en amas qui ressemblent à des lambeaux de peaux, et les lignées MCCL-9 et MCCL-11 se multiplie en suspension sur une monocouche de fibroblastes inactivés, de façon isolées. Toutes trois ont été dérivées de tumeurs de patients atteints de CCM. Ces trois lignées sont donc biologiquement différentes et nous permettent de tester un large panel biologique de marqueurs en conditions CCM.

Les cellules ont d'abord été marquées avec le kit de fixation/perméabilisation IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter), en suivant le protocole du fournisseur c'est-à-dire sur 200uL de suspension cellulaire, contenant environ 100 000 cellules par échantillon. Les marquages ont ensuite été analysés en cytométrie en flux (Cyan9 – Beckman Coulter) sur chacune des lignées ainsi que sur des PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*) en tant que contrôle négatif ; en effet, le but de notre méthode est de différencier les CTC du CCM des cellules sanguines normales contaminantes. Chacun des anticorps a été testé individuellement sur chaque lignée cellulaire avec des anticorps dirigés contre des marqueurs utilisés couramment pour détecter les CTC, notamment des marqueurs épithéliaux comme EpCAM, cytokératine 19 ou les cytokératines 8, 18, 19 (PanCK) ainsi que des marqueurs mésenchymateux (Vimentine) ou de cellules souches (CD24/CD44). D'autre part, des marqueurs utilisés pour la détection du CCM en immunohistochimie ont été testés, avec des marqueurs spécifiques des cancers neuroendocrines (Synaptophysine, chromogranine A), des neurones (NSE, CD56) et spécifiques du CCM avec CK20 (Tableau 1).

Tableau 1: Anticorps utilisés pour la caractérisation des lignées CCM

Anticorps	Fluorescence	Références	Fournisseurs	Dilutions
<i>Chromogranin A</i>	FITC	FCMAB329F	Millipore	1/20
<i>CD24</i>	PE	130-095-953	Miltenyi	1/50
<i>CD44</i>	FITC	J.173	Bekman Coulter	1/20
<i>CD45</i>	PE	130-113-118	Miltenyi	1/14
<i>CD56</i>	APC	130-113-867	Miltenyi	1/20
<i>CK19</i>	FITC	61029	Progen	1/50
<i>CK20</i>	FITC	ab189087	Abcam	1/14
<i>PanCK (8,18,19)</i>	FITC	130-080-101	Miltenyi	1/20
<i>EpCAM</i>	FITC	130-080-301	Miltenyi	1/33
<i>Neuro-Specific Enolase (NSE)</i>	Alexa 647	ab199829	Abcam	1/14
<i>Synaptophysine</i>	Alexa 647	bs-0121R-AF647	Bioss	1/100
<i>Vimentine</i>	PE	562337	BD Bioscience	1/50

Ces tests cytométriques nous ont permis de déterminer les marqueurs positifs pour les lignées CCM et négatifs pour les PBMC. Ainsi, la vimentine et la synaptophysine sont négatifs sur les trois lignées CCM ainsi que sur les PBMC et donc non retenus (**Figure 16**). De plus, les CD24, CD44 et la chromogranine

A, bien que positifs chez certaines lignées, sont aussi positifs sur les PBMC. Le CD56 lui présente une population minoritaire de cellules positives chez les PBMC, correspondant aux NK (Figure 16) et le CD45 n'est positif que chez les PBMC (Figure 17). Ces marqueurs ne permettent donc pas de détecter les CTC du CCM parmi les PBMC. Parmi les marqueurs épithéliaux EpCAM, CK19 et PanCK (CK 8, 18, 19) sont positifs sur les trois lignées cellulaires et négatifs sur les PBMC, de même pour CK20 et NSE comme marqueurs spécifiques du CCM (Figure 17).

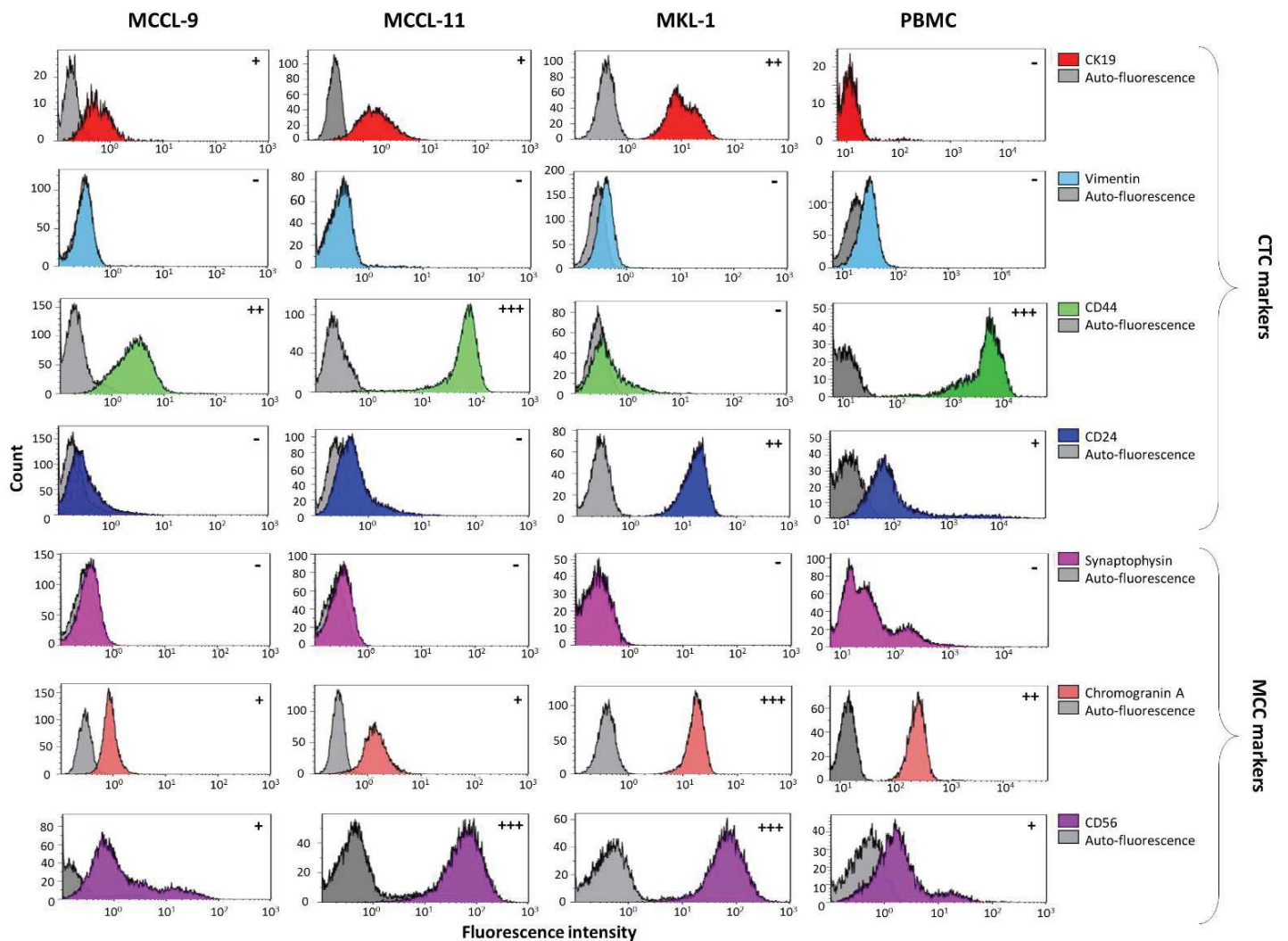


Figure 16: Caractérisation phénotypique des lignées CCM en cytométrie – Marqueurs non retenus

+ : marqueur positif, le nombre de + représente l'intensité de signal, - : marqueur négatif. Les pics gris représentent l'auto-fluorescence des cellules. Abréviations : EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule ; CK : cytokératine, PanCK : panel de cytokératines, NSE : neuro-specific enolase, CD : Cluster Differentiation.

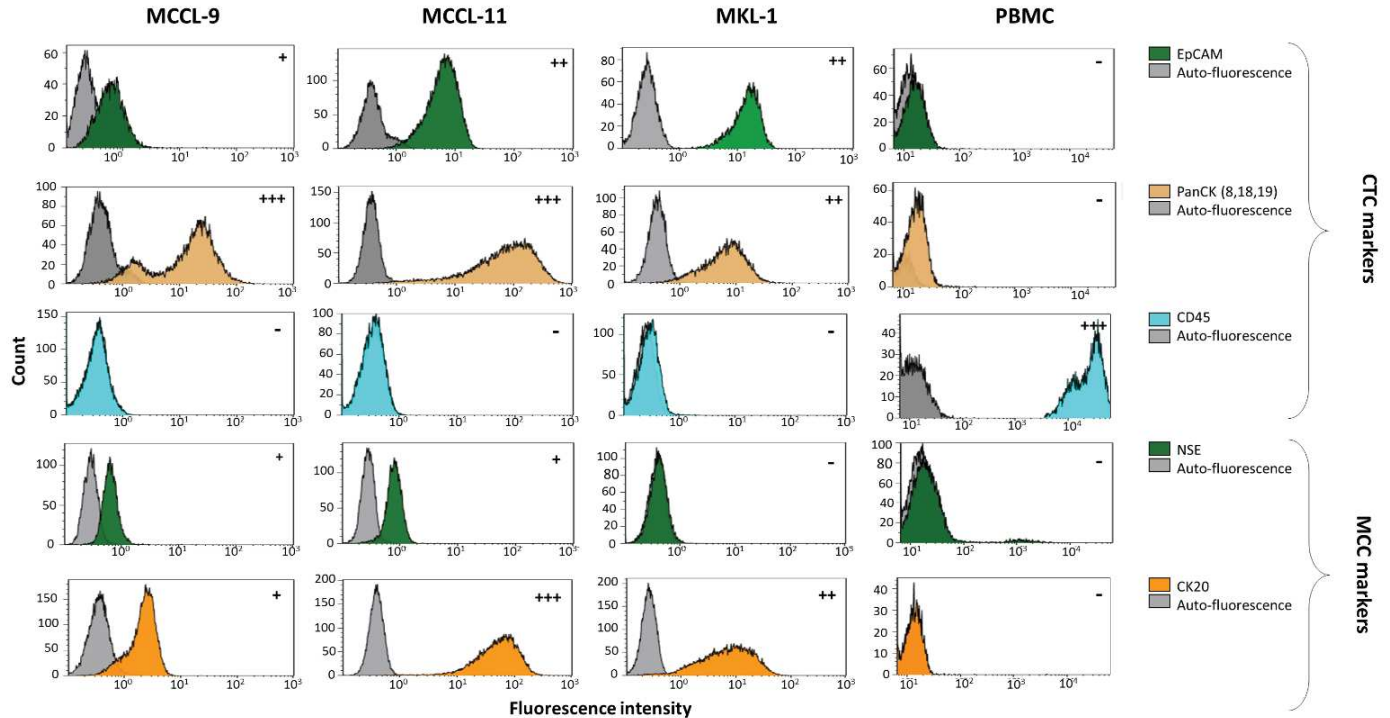


Figure 17: Caractérisation phénotypique des lignées CCM en cytométrie – Marqueurs retenus

+ : marqueur positif, le nombre de + représente l'intensité de signal, - : marqueur négatif. Les pics gris représentent l'auto-fluorescence des cellules. Abréviations : EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule ; CK : cytokératine, PanCK : panel de cytokératines, NSE : neuro-specific enolase, CD : Cluster Differentiation.

Nous avons donc sélectionné comme marqueurs pour la détection des CTC du CCM : EpCAM, PanCK, CK20 et NSE, et nous avons conservé le CD45 comme marqueur d'exclusion des PBMC. Afin de s'assurer qu'il n'y ait aucune gêne stérique entre tous les anticorps utilisés, nous avons ensuite testé le marquage des lignées avec les différents marqueurs simultanément, et nous avons ainsi confirmé la faisabilité de l'utilisation combinée des marqueurs sélectionnés.

Enfin, nous avons testé la détection des lignées CCM au DEPArray grâce aux marqueurs choisis. Nous avons pour cela chargé directement dans les cassettes DEPArray des cellules de lignées pures, c'est-à-dire, diluées dans du PBS, et marquées comme déterminé précédemment. Ce test nous a permis

d'optimiser le marquage des cellules afin de les visualiser au mieux au DEPArray, notamment en changeant de kit de fixation/perméabilisation (**Figure 18**) et le volume d'anticorps utilisé.

① IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter)							② Kit CTC - CellSearch© (Menarini Silicon Biosystems)								
brightfiel d_0	pe_1	apc_2	fitsb_3	apc_fits b_4	mean_int ensity_pe	mean_int ensity_ap c	mean_int ensity_fit csb	brightfiel d_0	pe_1	apc_2	fitsb_3	apc_fits b_4	mean_int ensity_pe	mean_int ensity_ap c	mean_int ensity_fit csb
					227.9	323.88	832.74						235.91	384.98	1107.81
					233.21	344.41	1415.06						234.53	320.53	695.18
					221.69	303.55	989.12						289.62	808.79	570.06
					217.34	261.5	718.21						251.0	338.51	1259.59

Figure 18: Test de différents kits de fixation/perméabilisation sur les MCCL-11.

Brightfield : Lumière blanche, PE : CD45, APC : NSE, FITCsb : EpCAM, CK20. Intensité de fluorescence >400 = positive, <400 = négative.

Les instructions du DEPArray indiquent qu'une intensité de fluorescence inférieure à 400 est considérée comme bruit de fond. Nous avons considéré comme cellule tumorale les cellules positives pour EpCAM/CK20 (FITCsb), négatives pour le CD45 (PE), et positives ou négatives pour le NSE (APC). L'utilisation des réactifs du kit CTC du CellSearch® pour fixer et perméabiliser les cellules a permis une amélioration, notamment visuelle, des marquages avec une diminution du bruit de fond et l'augmentation globale de l'intensité de fluorescence des marqueurs d'intérêt.

Ces résultats préliminaires nous ont permis de déterminer la méthode idéale de fixation, de perméabilisation et de marquage ainsi que les différents anticorps utilisés, leur concentration optimale pour la détection au DEPArray des cellules tumorales du CCM parmi les cellules sanguines (Tableau 2).

Tableau 2: Réactifs et anticorps utilisés pour la détection des cellules tumorales dans le CCM

Réactif	Références		Fournisseurs	Volume
Fixative Reagent	7900001		Menarini Silicon Biosystems	50µL
Permeabilization Reagent	7900001			50µL
Anticorps	Fluorescence	Références	Fournisseurs	Dilutions
<i>CD45</i>	PE	130-113-118	Miltenyi	1/14
<i>CK20</i>	FITC	ab189087	Abcam	1/14
<i>PanCK (8,18,19)</i>	FITC	130-080-101	Miltenyi	1/20
<i>EpCAM</i>	FITC	130-080-301	Miltenyi	1/33
<i>Neuro-Specific Enolase (NSE)</i>	Alexa 647	ab199829	Abcam	1/14

Marquage : 30 minutes, température ambiante, obscurité

b) Evaluation de la sensibilité de la méthode R-D

Comme la méthode R-D utilise une méthode d'enrichissement qui n'a pas encore été validée cliniquement, nous avons voulu connaître le rendement de chaque étape de notre workflow (**Figure 19 A**). Pour cela, nous avons réalisé des expériences de spiking : ces expériences consistent à injecter des cellules tumorales (ici nos lignées cellulaires) dans des échantillons sanguins de donneurs sains afin de mimer un prélèvement d'un patient atteint de cancer et ayant des CTC dans le sang. Pour chaque test, nous avons compté le nombre de cellules injectées dans 10mL d'un échantillon sanguin sain, puis nous avons compté le nombre de cellules retrouvées à chaque étape du processus (**Figure 19 A**).

1. Rendement de l'étape d'enrichissement

Pour l'étape d'enrichissement avec les RosetteSep, nous avons marqué les différentes lignées cellulaires à la calcéine, un marqueur fluorescent de viabilité des cellules, que nous avons mélangées avec du sang de donneur sain, puis nous avons testé notre capacité à enrichir les cellules tumorales depuis du sang total avec les RosetteSep. Nous avons testé différentes dilutions du nombre de cellules mélangées dans le sang de donneur sain (100, 50 et 25), puis nous avons compté le nombre de cellules retrouvées sur la fraction enrichies de cellules après les RosetteSep (**Figure 19 A (1)**).

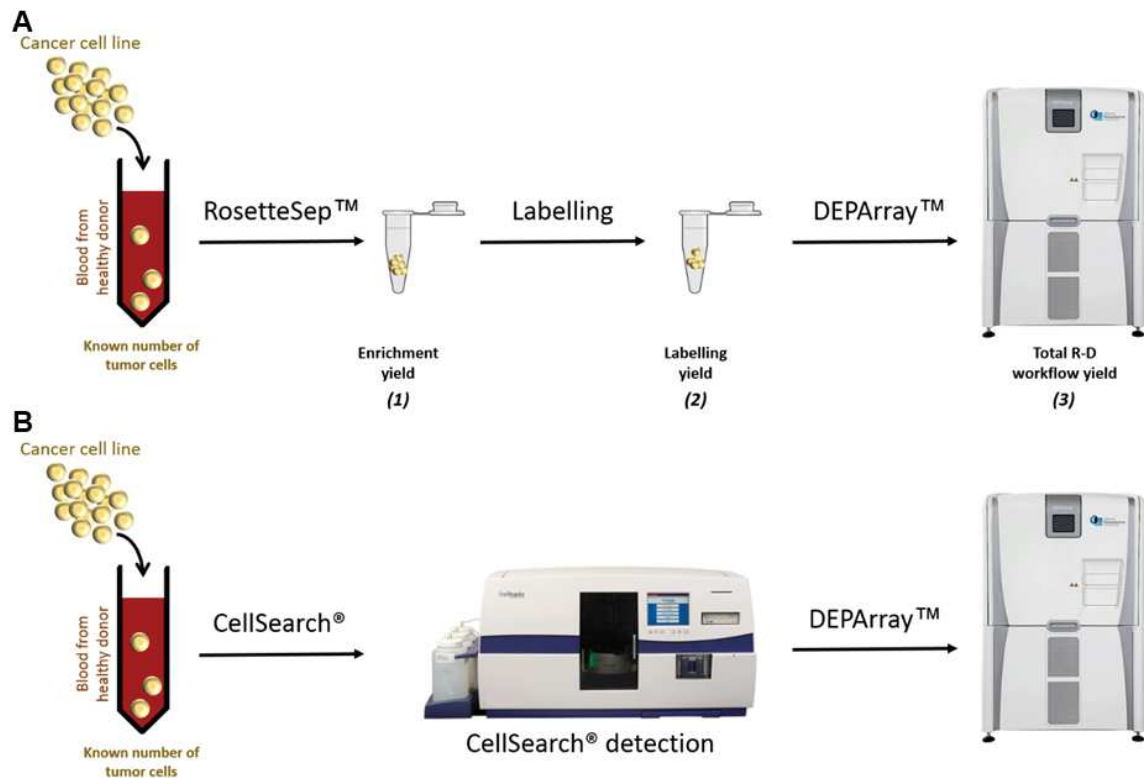


Figure 19: Illustration du R-D workflow et de la combinaison CellSearch-DEPArray

Ainsi, nous avons pu noter que nous retrouvions 63% des MCCL-9, 74% des MCCL-11 et 53% des MKL-1 après la seule étape d'enrichissement (**Figure 19 A (1)**). Cette différence peut s'expliquer par l'hétérogénéité des lignées ; en effet, il est possible que les cellules de la lignée MKL-1 expriment à leur surface des marqueurs captés par les RosetteSep. De plus, pour que cette lignée cellulaire puisse être utilisée dans les expériences de tests de rendement de la méthode R-D, elle doit être dissociée avec une solution d'Accumax. Ce traitement peut induire une fragilisation de la lignée et donc expliquer que les cellules résistent moins bien que les autres lignées aux différentes centrifugations induites par l'enrichissement avec les RosetteSep.

2. Rendement de l'étape du marquage

Pour connaître le rendement de l'étape de marquage, nous avons marqué les cellules après l'enrichissement aux RosetteSep avec la méthode optimisée et décrite précédemment, et nous avons compté le nombre de cellules marquées par rapport au nombre initial pour déterminer le taux de marquage des cellules pour chacune des lignées (**Figure 19 A (2)**). Ainsi, nous avons observé que 43,6% des MCCL-9, 58% des MCCL-11 et 60% des MKL-1 étaient marquées. Ici encore, le rendement observé pour cette étape est faible. On peut une fois de plus soulever l'hypothèse de l'état des cellules. En effet, les lignées ont été injectées dans du sang de donneurs sains, elles ont donc été contraintes aux défenses immunitaires qui ont pu les endommager et ainsi, soit modifier l'expression protéique des cellules, soit induire une mort cellulaire lors de la perméabilisation des cellules ou lors des différents lavages qui suivent le marquage.

3. Rendement global de la méthode R-D

Afin d'évaluer la sensibilité globale de notre méthode, nous avons injecté pour chacune des lignées un nombre connu de cellules dans les différents échantillons sanguins et noté le nombre de cellules retrouvées au DEPArray. Nous avons ici aussi testé différentes dilutions (100, 50 et 25) de cellules mélangées dans 10mL de sang afin de connaître la valeur seuil de détection des CTCs avec notre méthode R-D (**Figure 19 A (3)**).

Le rendement de la méthode R-D est globalement de 8,3% pour les MCCL-9, 13,3% pour les MCCL-11 et 5,3% pour les MKL-1. Plus précisément, pour les MCCL-9 on retrouve 5,8% de cellules des 100, 8,8% des 50 et 10,3% des 25 cellules mélangées au sang de donneur sain. Pour les MCCL-11 22% de 100, 10,9% de 50 et 6,2% de 25, et enfin 7,1% pour 100, 6,5% de 50 et 2,4% de 25 MKL-1 (**Figure 20 A**). Nous avons tenté d'optimiser encore le marquage ainsi que les étapes successives entre le sang total jusqu'à la détection au DEPArray, sans amélioration notable des rendements de récupération des cellules. Ici encore on peut suggérer que ce sont les nombreuses étapes induites par le R-D workflow qui sont à l'origine de ces taux de récupérations des cellules, avec l'ajout des cellules dans le sang, les différentes centrifugations pour l'enrichissement, le marquage et les centrifugations de lavage après le marquage, et enfin, le chargement dans la cassette DEPArray où on sait que l'on perd 1/3 de l'échantillon dans le

volume mort. Toutes ces étapes peuvent induire une perte de cellules et expliquer le rendement faible de détection des cellules au DEPArray.

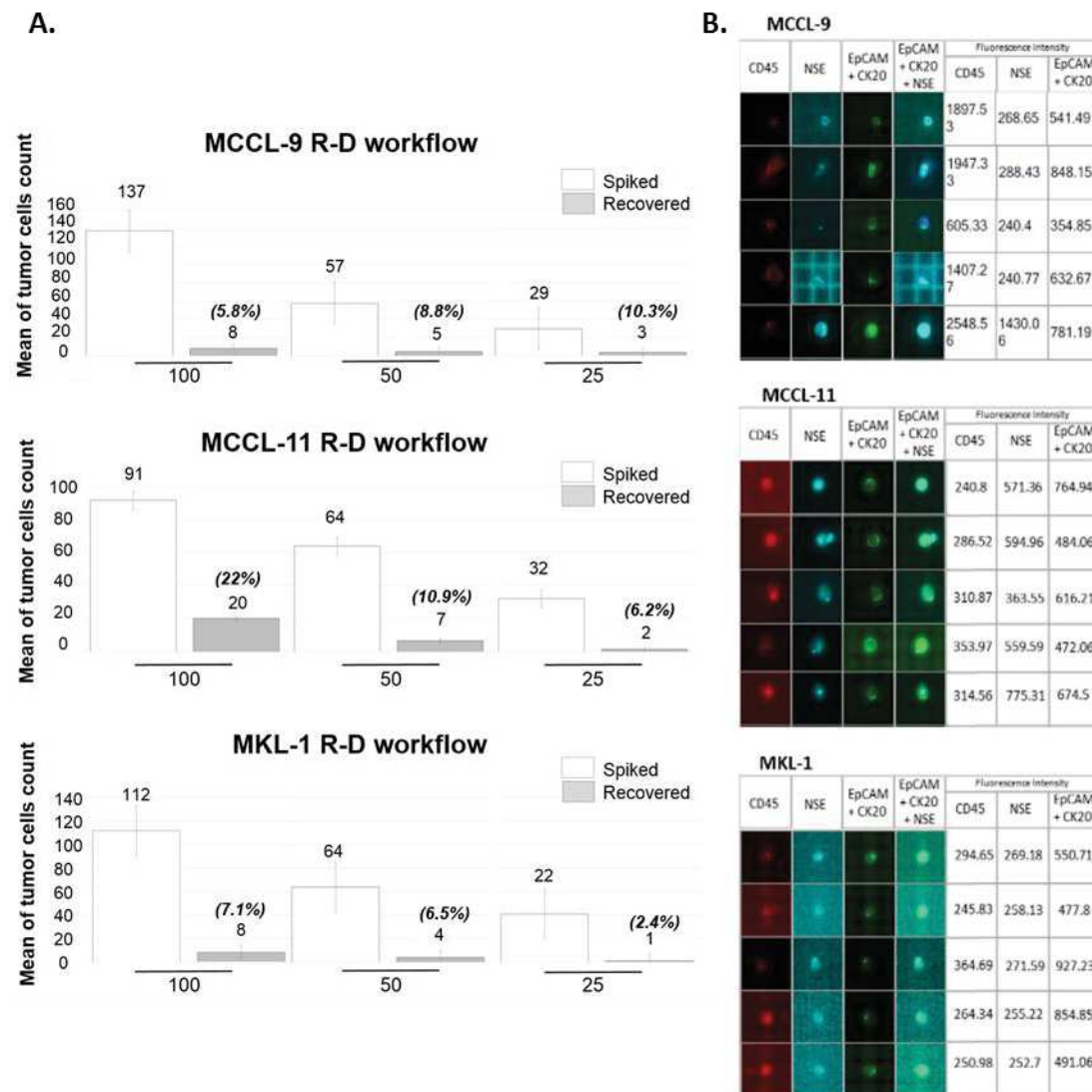


Figure 20: R-D workflow : taux de récupération et illustrations des cellules spikées.

A. Nombre et pourcentage de récupération des cellules (n=3), **B.** Illustrations des lignées au DEPArray après enrichissement depuis des échantillons sanguins de donneurs sains, après marquage avec les anticorps : anti-CD45 – PE, anti-NSE – APC, anti-EpCAM – FITC, anti-CK20 – FITC. Le DEPArray considère comme bruit de fond les intensités de fluorescence inférieures à 400.

En supplément des expériences de mime de sang de patient ayant des CTC avec les différentes dilutions, nous avons testé cette méthode sur différents échantillons sanguins de donneurs sains (n=3)

sans ajout de cellules de lignées cellulaires et aucune cellule n'a été retrouvée au DEPArray dans ces échantillons, validant ainsi la spécificité de notre méthode.

De plus, nous avons pu confirmer les phénotypes des lignées déterminés lors des analyses avec le cytomètre en flux grâce au DEPArray avec les images de microscopie (**Figure 20 B**). En effet, toutes les lignées sont négatives pour le CD45, positives pour EpCAM et/ou CK20 et seule la lignée MKL-1 est négative pour la NSE. De plus, la cytokératine des lignées CCM apparaît sous la forme d'un point, comme décrit dans la littérature pour les marquages des tumeurs CCM en ICC (Tanaka et al. 2004). La limite de détection du R-D workflow a été déterminée à 25 cellules par 10mL de sang car on ne détecte que de 1 à 3 cellules lorsque 25 cellules sont présentes dans l'échantillon sanguin.

En conclusion, nous pouvons dire que la méthode R-D est une méthode qui permet de détecter les cellules tumorales du CCM à partir d'échantillons sanguins.

4. Taux de récupération des cellules avec le CellSearch

Afin de pouvoir comparer la méthode R-D avec le système CellSearch, les tests de rendement ont été réalisés en parallèle avec le système CellSearch (**Figure 21**). Le CellSearch a déjà été utilisé pour détecter les CTC dans le CCM dans seulement deux études (Blom et al. 2014; Riethdorf et al. 2019) sans rechercher les rendements avec des lignées cellulaires cancéreuses. De la même façon qu'avec le R-D workflow, nous avons donc mélangé 100, 50 et 25 cellules dans des échantillons sanguins de donneurs sains. Le système CellSearch possède un quatrième canal libre pour ajouter un marqueur supplémentaire. Nous avons donc sélectionné un anticorps anti-PD-L1 (anti-B7H1) au vu de son implication dans la prise en charge des patients métastatiques CCM (Becker et al. 2017). L'expression de PD-L1 sur les CTC dans le quatrième canal du CellSearch avait déjà été optimisée au sein de notre laboratoire sur des CTC de cancer du sein métastatique (Mazel et al. 2015).

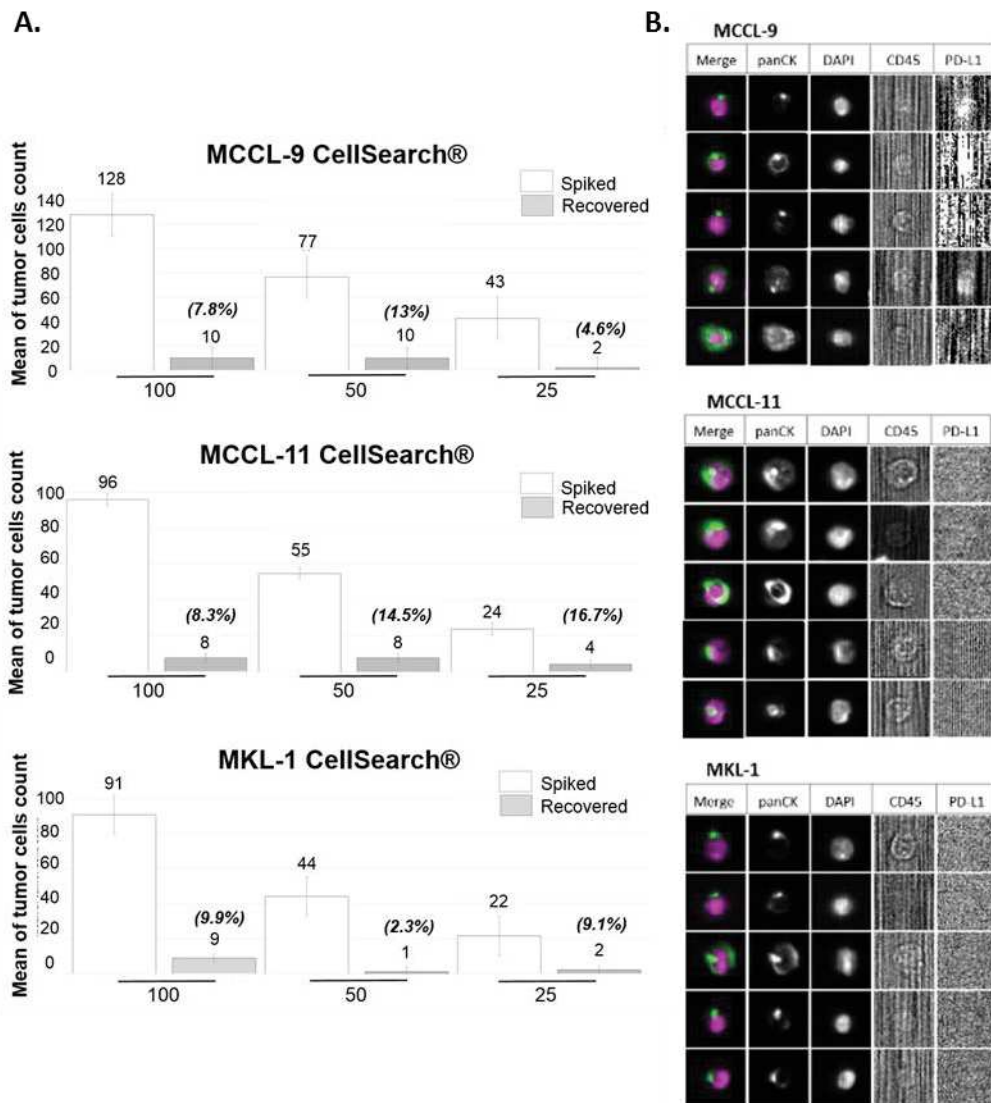


Figure 21: CellSearch : taux de récupération et illustrations des lignées cellulaires mélangées au sang de donneur sain.

A. Nombre et pourcentage de récupération des cellules ($n=3$), **B.** Illustrations des lignées au CellSearch depuis des échantillons sanguins de donneurs sains.

Globalement, on obtient 8,4% de récupération des cellules pour la lignée MCCL-9, 13,1% pour la lignée MCCL-11 et 7,1% pour la lignée MKL-1. Plus précisément, on récupère pour les MCCL-9 7,8%, 13% et 4,6%, pour les MCCL-11 8,3%, 14,5% et 16,7% et pour les MKL-1 9,9%, 2,3% et 9,1% pour 100, 50 et 25 cellules mélangées à du sang de donneur sain, respectivement (**Figure 21 A**). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec le workflow R-D, et le seuil de détection est ici aussi déterminé à 25

cellules car on retrouve pour ce nombre de cellules mélangées dans le sang de donneur sain, 2 à 4 cellules au CellSearch. On peut expliquer ces taux faibles par le fait que, selon les instructions du système CellSearch, une cellule ne peut être considérée comme CTC que si son réseau de cytokératine est plus large que le noyau de la cellule. Or, comme précédemment, on remarque que la cytokératine se présente comme un point, de façon para-nucléaire. Il est donc possible qu'une grande partie des cellules de lignées CCM soient manquées lors de l'analyse des résultats. Cela suggère donc une adaptation de la lecture des résultats du CellSearch pour le CCM afin de prendre en compte les cellules où la cytokératine est présente uniquement sous forme de point. Enfin, pour chacune des trois lignées cellulaires cancéreuses, aucune cellule ne présente de marquage PD-L1.

En conclusion, on peut dire que les deux méthodes testées nous permettent la détection de cellules tumorales du CCM à partir d'échantillons sanguins. Elles présentent des résultats similaires de sensibilité avec des seuils 'limites' de détection déterminés à 25 cellules. Cependant, le R-D permet de trier directement les cellules à la cellule unique dès leur détection pour l'analyse moléculaire, alors que le CellSearch nécessite une étape supplémentaire : la récupération des cellules une par une par micromanipulation ou par analyse de la cassette CellSearch au DEPArray.

En résumé, nous avons mis au point une nouvelle méthode, le R-D workflow, pour la détection des cellules tumorales dans le CCM, qui combine la méthode de RosetteSep, pour un enrichissement négatif, avec le DEPArray, pour une détection des cellules $\text{EpCAM}^+/\text{CK20}^+/\text{NSE}^{\pm}/\text{CD45}^-$. Cette méthode présente un rendement de recouvrement des lignées CCM identique à celui du système CellSearch, le Gold-Standard dans la détection des CTC dans les cancers solides. De plus, le R-D workflow permet de trier les cellules à un niveau de cellules uniques afin de réaliser des analyses moléculaires, notamment la détection du MCPyV, que nous développerons dans le chapitre III de ce manuscrit.

II. Pertinence Clinique de la détection des CTC dans le CCM

Après avoir validé la possibilité de détecter les cellules tumorales du CCM avec la méthode R-D, à partir d'échantillons sanguins, nous avons appliqué cette méthode à des patients atteints du CCM et suivis par le département de dermatologie du CHU de Montpellier. Dans une démarche d'optimisation des chances de détecter des CTC dans le sang, le premier patient inclus était atteint d'une tumeur avec métastases à distance. Nous avons ainsi pu retrouver une CTC sur le prélèvement sanguin de ce premier patient avec le R-D workflow (**Figure 22**).

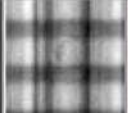

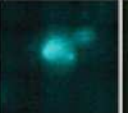

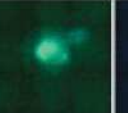

White Light	CD45 PE	NSE APC	EpCAM /CK20 FITC	EpCAM /CK20 + NSE	EpCAM /CK20 + DAPI	Fluorescence intensity		
						CD45 PE	NSE APC	EpCAM /CK20 FITC
						306.98	614.96	754.12

Figure 22: CTC du premier prélèvement chez un patient CCM

La cellule retrouvée était positive pour les marqueurs EpCAM et CK20 (avec une intensité de fluorescence supérieure à 400), tout comme pour la NSE, et négative pour le CD45. Ainsi, nous avons pu confirmer de la faisabilité de la méthode R-D à détecter des CTC dans des CCM en conditions réelles avec les marqueurs déterminés grâce aux lignées cellulaires CCM. Cependant, le marqueur NSE était également exprimé par les leucocytes (**Figure 23**).

White Light	CD45 PE	NSE APC	EpCAM /CK20 FITC	EpCAM /CK20 + NSE	EpCAM /CK20 + DAPI	Fluorescence intensity		
						CD45 PE	NSE APC	EpCAM /CK20 FITC
						445.21	1014.86	366.38
						877.63	1192.11	375.07
						663.12	1055.43	360.12

Figure 23: Illustrations de leucocytes au DEPArray

Cette positivité peut être liée à un manque de spécificité de l'anticorps ou à une superposition des fluorescences entre PE et APC. Ainsi, pour les prélèvements suivants, les réglages du DEPArray ont été affinés afin de limiter ce problème, car les tests en cytométrie nous ont bien montré que les leucocytes sont négatifs pour la NSE (Figure 17).

Tous les patients atteints de CCM suivis par le département de dermatologie du CHU de Montpellier entre octobre 2017 et septembre 2020 ont ensuite été inclus de façon prospective. Pour cette étude nous avons ainsi pu inclure 28 patients pour un total de 51 prélèvements analysés par la méthode R-D mise au point ainsi que par le système CellSearch (Figure 24).

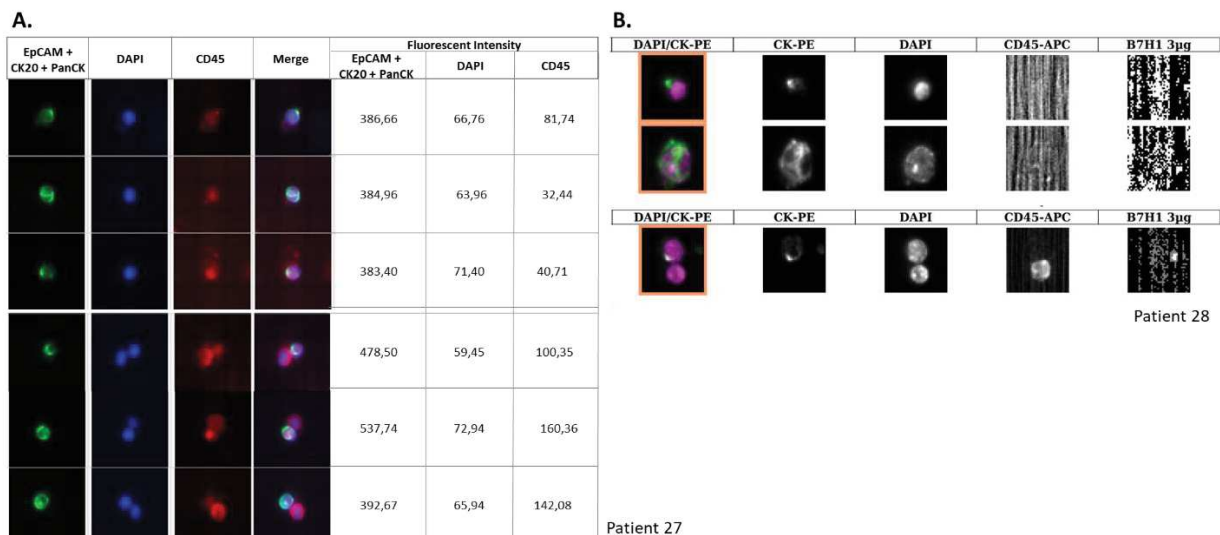


Figure 24: Illustrations de CTCs avec le DEPArray et le système CellSearch

A. Illustrations de CTC et leucocytes retrouvés avec le DEPArray NxT. Cette nouvelle version du DEPArray considère un évènement positif pour une fluorescence lorsque l'intensité de fluorescence est supérieure à 100. Dans la première partie du tableau, on voit des CTC seules, positives pour EpCAM, CK20 et PanCK, et négatives pour CD45. Dans la seconde partie du tableau, on voit des CTC accrochées à des leucocytes. Le marquage des cellules permet de bien différencier les cellules. B. Illustrations de CTC et leucocytes retrouvés avec le système CellSearch. Les CTC seules sont bien positives pour le panel de cytokératines (CK-PE) et négatives pour le CD45. Dans la seconde partie du tableau, on visualise une CTC accrochée à un leucocyte, ici encore le marquage permet de bien différencier cellule cancéreuse de cellule sanguine. Toutes les CTC détectées avec le système CellSearch sont négatives pour le marqueur B7-H1 (PD-L1).

Enfin, le caractère tumoral des cellules triées avec la méthode R-D a été vérifié. Pour cela, nous avons amplifié le génome global des cellules et recherché des aberrations chromosomiques, (CNA – *Copy number aberration*). En effet, une cellule saine est considérée comme tel lorsque son profil CNA est plat, c'est-à-dire lorsqu'il y a 2 copies de gènes par cellules (pour chacun des chromosomes). A l'inverse, une cellule cancéreuse va présenter des anomalies du nombre de copies, notamment des duplications ou des délétions de portions de chromosomes. 4 cellules triées avec le DEPArray ont ainsi été analysées (**Figure 25**).

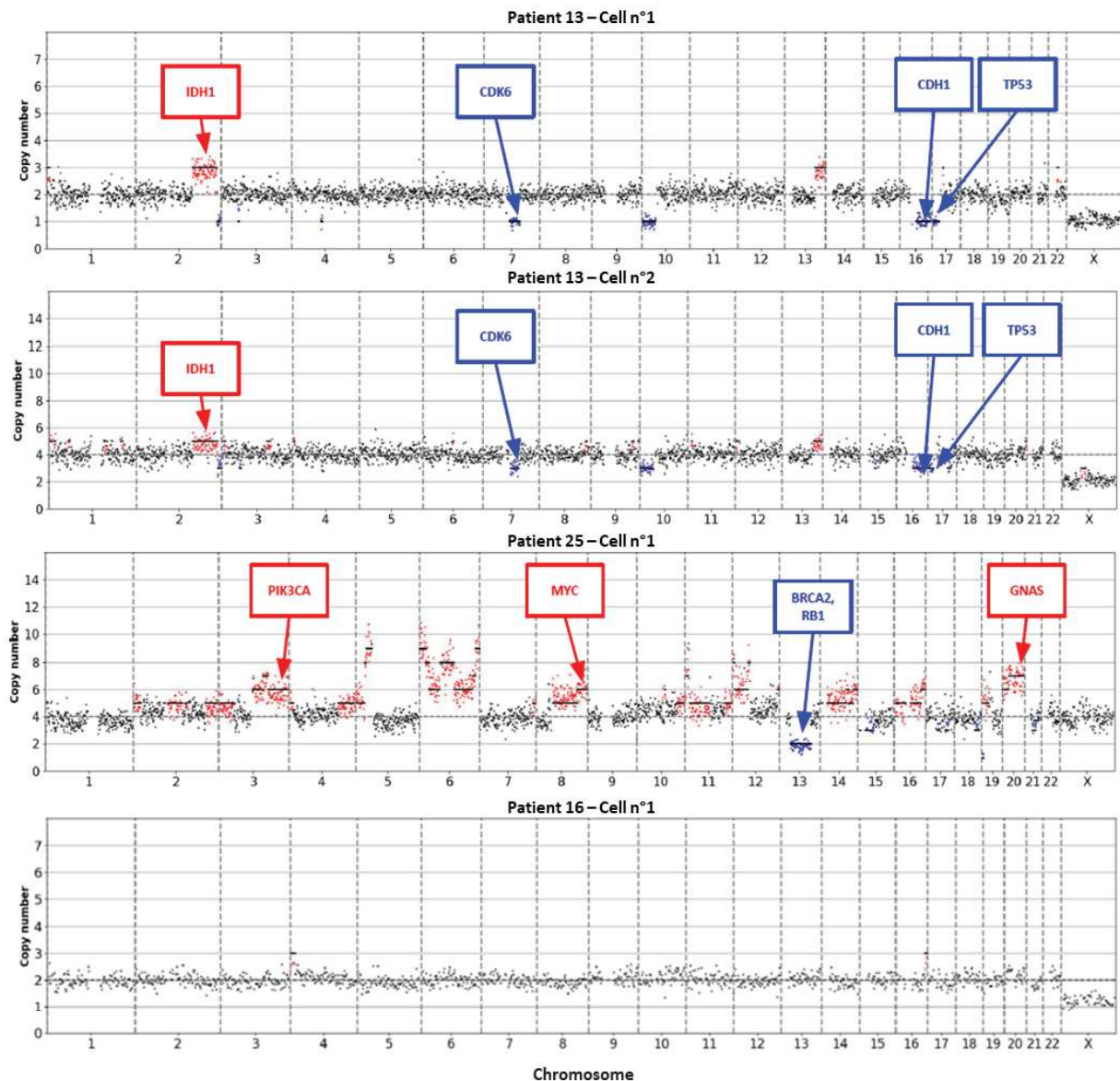


Figure 25: Aberrations chromosomique des CTC

Les études de CNA ont permis de confirmer le caractère tumoral des cellules triées avec la méthode R-D. En effet, les cellules des patients 13 et 25 présentent en effet des aberrations chromosomiques. Les deux cellules analysées du patient 13 présentent les mêmes variations de copies de gènes, à savoir une duplication d’une portion de chromosome dans la zone codante pour le gène IDH1, ou des délétions des zones codantes pour les gènes CDK6, CDH1 ou encore TP53. Le patient 25 lui présente d’autres variations, avec des duplications des zones codantes pour les gènes PIK3CA, MYC et GNAS, et une délétion pour la zone codante pour les gènes BRCA2 et RB1. On remarque que ce sont des régions qui

codent pour des gènes souvent impliqués dans la tumorigénèse, mais qu'il n'y a pas de zone modification chromosomique commune entre ces deux patients.

Pour le patient 16, on ne voit pas de modification du profil génétique de la cellule analysée. Après vérification dans le panel de DEPAArray, il apparaît que cette cellule était CD45+, donc une cellule sanguine qui a été triée et analysée par CNA. On peut donc noter que les cellules sanguines ont un profil plat dans les analyses CNA.

Cette analyse CNA nous a permis de confirmer la capacité de la méthode R-D à trier des cellules tumorales à partir d'échantillons sanguins grâce au DEPAArray. De même, l'ADN amplifié de ces cellules uniques pourrait être utilisé pour des analyses moléculaires telles que les aberrations chromosomiques ou la recherche de modifications géniques et/ou épigénétiques plus fines.

1. Caractéristiques de la cohorte de patients

Cette étude a été validée par le Comité de bioéthique du CHU de Montpellier (IRB) et répertoriée sous le numéro : 2018_IRB_MTP_12-07. Les patients ont été inclus après signature d'un consentement éclairé (Annexe). Les caractéristiques cliniques des 28 patients inclus dans cette étude et ayant bénéficié d'une détection des CTC avec le R-D workflow et le CellSearch sont présentées dans le Tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3: Caractéristiques de la cohorte des patients CCM

<i>Caractéristique des patients</i>	<i>Nombre (% des patients)</i>
Patients	28
Age (années)	
Moyenne	74,5
Intervalle	49-96
Genre	
Homme	17 (60,7)
Femme	11(39,3)

Stade	
I	3 (10,7)
II	8 (28,6)
III	9 (32,1)
IV	8 (28,6)
Localisation de la tumeur	
Tête	12 (42,9)
Membres Supérieurs	3 (10,7)
Tronc	1 (3,6)
Membres Inférieurs	9 (32,1)
Non connue	3 (10,7)
Antécédents de cancer	
Oui	7 (25)
Non	21 (75)
Organes avec des métastases	
<3	3 (37,5)
>3	5 (62,5)
Nombre d'échantillon / patients	1 - 6
Temps de suivi des patients (jours)	1 - 695

L'âge moyen des patients est de 74,5 ans, avec une prédominance d'hommes (60,7%), ce qui correspond à l'épidémiologie globale du CCM dans le monde. Nous avons inclus peu de patients en stade I (10,7%), et de façon homogène des patients en stades II, III et IV (28,6 à 32,1%). Douze des 28 patients (42,9%) présentaient une tumeur initiale localisée à l'extrémité céphalique, 3 patients (10,7%) sur les membres supérieurs, 1 (3,6%) sur le tronc, 9 (32,1%) sur les membres inférieurs, et 3 patients (10,7%) ne présentaient pas de tumeur primaire identifiable, comme cela est possible dans certains cas de CCM (Vandeven et al. 2018). La majorité des patients (75%) n'avaient pas d'autres antécédents néoplasiques. Parmi les patients en stade IV, plus de la moitié (62,5%) présentaient des métastases dans plus de trois organes, 5 étaient traités par immunothérapie (avelumab ou pembrolizumab) et 3 par chimiothérapie (Etoposide / carboplatine). Pour 20 patients, un seul prélèvement a été effectué, 3 patients ont été prélevés 2 fois, 2 patients ont eu 4 prélèvements, 1 patient 5 prélèvements, et enfin 2 patients ont eu 6 prélèvements. Le suivi du patient dans notre étude de détection des CTC dans le CCM a été d'un jour (pour les prélèvements uniques) à 695 jours (pour un patient en stade IV, avec 4 prélèvements), avec une moyenne de 87 jours de suivi.

Parallèlement à la détection des CTC, nous avons constitué une bio-banque de plasma à partir des échantillons de patients pour permettre des études rétrospectives sur d'autres biomarqueurs circulants (ctDNA, exosomes par exemple).

2. Détection des CTC dans le CCM avec CellSearch et R-D workflow

Nous avons donc recherché les CTC du CCM dans 51 prélèvements (Tableau 4), par les deux méthodes (R-D et le système CellSearch) en parallèle pour la plupart des échantillons. Pour 5 prélèvements, le CellSearch n'a pas pu être effectué, pour des raisons techniques (caillot dans le prélèvement sanguin, abandon d'échantillon par le système). Pour 6 des échantillons, nous n'avons pas recherché les CTC avec la méthode R-D pour privilégier la mise en culture des cellules, et pour 2 prélèvements nous n'avons effectué ni le CellSearch ni le R-D workflow car ils ont été réalisés au lendemain de prélèvements révélant de fortes concentrations de CTC (au-dessus de 300 CTC au CellSearch) et uniquement dans le but de mettre ces CTC en culture *in vitro* (Chapitre IV. Culture *in-vitro* des CTC). Dans ce tableau, le nombre de CTC retrouvée avec le système CellSearch a été normalisé par rapport au volume de sang analysé en raison d'un différentiel de volume initial de sang utilisé pour les deux méthodes (7,5 ml pour le CellSearch vs 20mL de pour le R-D workflow). La normalisation s'est donc faite sur le volume le plus grand et arrondie au nombre entier supérieur afin d'obtenir des nombres entiers et comparables de CTC.

Tableau 4: Résultats de la détection des CTC chez les patients CCM

Patients	Cancer stage	Blood collection	Date	Time interval	CellSearch®	R-D workflow
1	I	After diagnosis	8/06/18	D ₀	0	0
2	I	After diagnosis	12/11/18	D ₀	0	1
3	I	After diagnosis	18/09/18	D ₀	0	4
		After diagnosis	15/01/19	D ₁₂₀	0	0
		After diagnosis	4/4/19	D ₁₉₉	0	0
		After diagnosis	4/10/19	D ₃₈₂	0	4
		After diagnosis	22/07/20	D ₆₇₄	0	0
		After diagnosis				
4	II	After diagnosis	4/4/18	D ₀	0	0
5	II	After diagnosis	19/04/18	D ₀	0	0
6	II	After diagnosis	04/06/18	D ₀	0	0

7	II	After diagnosis	21/06/18	D ₀	0	0
8	II	After diagnosis	08/10/18	D ₀	0	0
9	II	After diagnosis	11/12/19	D ₀	0	0
10	II	After diagnosis	25/2/19	D ₀	0	1
11	II	After diagnosis	19/7/19	D ₀	0	4
12	III	After diagnosis	5/03/18	D ₀	3	0
13	III	After diagnosis	18/04/18	D ₀	NA	17
		Before chemotherapy	2/05/18	D ₁₄	11	23
		Under treatment	06/09/18	D ₁₄₁	0	0
		Under treatment	08/04/19	D ₃₅₅	45	2
14	III	After diagnosis	18/04/18	D ₀	0	0
		After diagnosis	18/10/18	D ₁₅₂	0	1
15	III	After diagnosis	10/7/18	D ₀	0	1
16	III	After diagnosis	6/08/18	D ₀	0	1
		Under treatment	19/07/19	D ₃₄₇	0	2
		Under treatment	4/06/20	D ₆₆₇	471	117
		Under treatment	2/07/20	D ₆₉₅	2574	NA
17	III	After diagnosis	30/08/18	D ₀	0	0
18	III	After diagnosis	9/01/19	D ₀	0	5
19	III	After diagnosis	4/4/19	D ₀	0	5
20	III	After diagnosis	4/4/19	D ₀	0	7
21	IV	Before chemotherapy	24/8/18	D ₀	0	0
22	IV	After treatment	8/9/20	D ₀	0	3
23	IV	Under treatment	2/08/19	D ₀	6	2
		Under treatment	4/12/19	D ₁₂₄	16	2
24	IV	Under treatment	5/06/18	D ₀	11	7
25	IV	Before chemotherapy	2/10/17	D ₀	NA	0
		Under treatment	19/12/17	D ₇₈	NA	1
		Under treatment	15/1/18	D ₁₀₅	NA	9
		Under treatment	21/02/18	D ₁₄₂	996	18
		Under treatment	26/02/18	D ₁₄₇	858	NA
		After treatment	4/4/18	D ₁₈₅	892	NA
26	IV	Under treatment	3/07/18	D ₀	32	6
27	IV	Under treatment	9/05/19	D ₀	1098	2
		Under treatment	16/5/19	D ₇	NA	NA
		Under treatment	19/7/19	D ₇₁	7813	8
		Under treatment	10/9/19	D ₁₂₄	11	NA
		Under treatment	18/12/19	D ₂₂₃	6500	>300
		Under treatment	19/12/19	D ₂₂₄	NA	NA
28	IV	Under treatment	4/9/20	D ₀	7384	146
		Under treatment	16/9/20	D ₁₂	15808	NA

La totalité des prélèvements chez les patients en stades I et II ont été réalisés après diagnostic et en l'absence de traitement médical ; de façon prévisible compte tenu du stade, très peu de CTC ont été

retrouvées. Pour les patients au stade avancé (III et IV), les prélèvements ont été réalisés après diagnostic, avant, pendant ou après le traitement médical (chimiothérapie ou de l'immunothérapie).

Des CTC ont été retrouvées avec les deux méthodes de détection ; cependant, les méthodes qui montraient des résultats similaires avec les lignées CCM ont cette fois détecté les CTC des patients CCM avec des résultats différents. En effet, on retrouve des CTC chez 18 patients (64%) avec le R-D workflow et seulement 9 patients (19%) avec le CellSearch, patients pour la plupart en stade IV. Plus précisément, chez certains patients, on retrouve des CTC uniquement avec le CellSearch (patient 12), inversement, chez certains patients les CTC ne sont détectées qu'avec le R-D workflow (patients 2, 3, 10, 11, 14, 15, 18, 19, 20, 22). Enfin, pour 8 patients (28%), on retrouve des CTC avec les deux méthodes mais dans des proportions différentes, allant jusqu'à 50 fois plus de CTC détectées avec le CellSearch (patient 28) par rapport à la méthode R-D.

On peut aussi noter que 87% (7) des patients en stade IV ont des CTC avec la méthode R-D vs 75% (6) avec le système CellSearch. Pour les patients en stade III, 77% (7) ont des CTC avec le R-D workflow vs 33% (3) avec le CellSearch. Enfin, pour les patients en stades I et II, aucun ne présente de CTC au CellSearch, alors qu'on en identifie chez 36% (4) avec la méthode R-D.

On peut donc conclure que la méthode R-D et le système CellSearch semblent détecter les CTC de manière complémentaire. Le R-D workflow semble être plus performant chez les patients en stade précoce, alors que le système CellSearch n'en détecte que chez des patients en stades avancés (III et IV). Il est d'ailleurs possible que les sous-populations de CTC détectées par chacune des deux méthodes soient différentes. Ceci peut s'expliquer notamment par la méthode d'enrichissement qui diffère entre les méthodes, avec un enrichissement et donc une détection des cellules EpCAM⁺ pour le CellSearch, et un enrichissement négatif pour le R-D qui peut détecter des CTC EpCAM⁻ ou EpCAM^{low}.

3. Détermination de la valeur seuil de détection des CTC

Un des intérêts cliniques de la détection des CTC chez les patients est de pouvoir détecter les patients à risque évolutif élevé (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Dans ce projet, nous avons donc cherché à établir un seuil de détection des CTC permettant de séparer les patients en stade IV des autres stades (I, II, III vs IV) et donc éventuellement d'identifier des stades IV méconnus. Ce seuil pourrait en effet indiquer aux cliniciens une probabilité de présence de métastases à distance qui n'ont pas encore

été détectées par les imageries habituelles, ce qui permettrait donc d'adapter la surveillance de ces patients. Nous avons pour cela construit une courbe ROC (*receiver operating characteristic*), qui indique la spécificité et la sensibilité d'un test, ici un test clinique (la détection de CTC avec le R-D workflow et/ou le système CellSearch vs présence de métastase à distance) pour chaque point, qui correspondent ici aux prélèvements. La courbe ROC obtenue permet ainsi de déterminer pour quel seuil la spécificité et la sensibilité de chacun des tests sont à leur optimum. Pour établir les courbes de ROC de chacune des deux méthodes, chaque prélèvement a été évalué comme un évènement indépendant, et ainsi les courbes ROC ont été construites avec 44 points pour la méthode R-D (**Figure 26 A**) et 45 points pour le CellSearch (**Figure 26 B**).

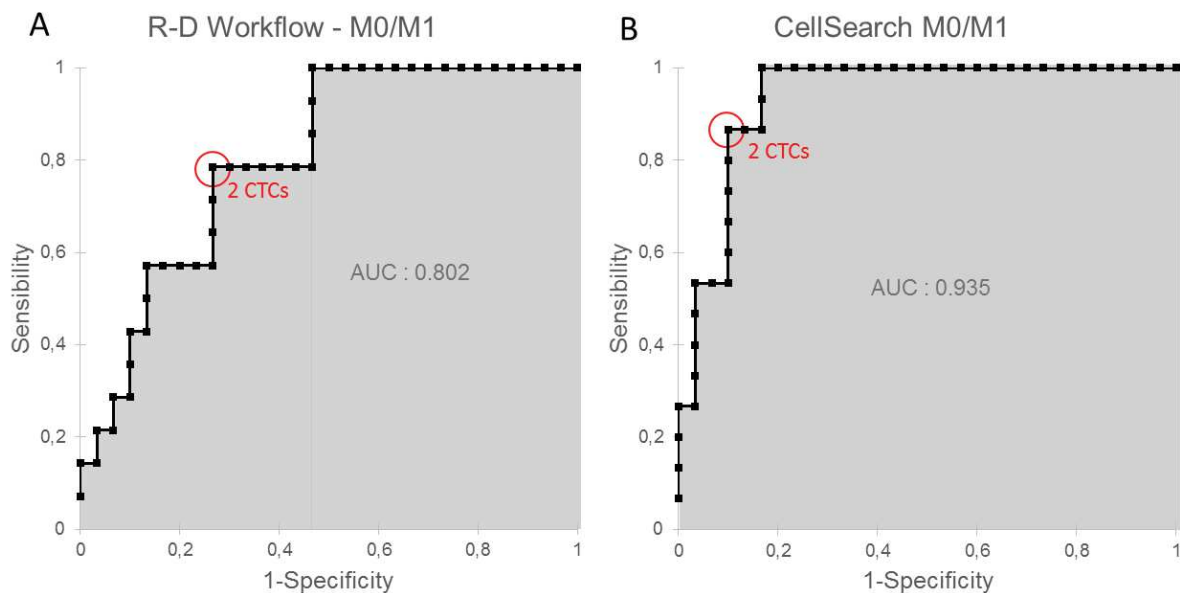


Figure 26: Courbe ROC du workflow R-D et du CellSearch

La courbe ROC pour le R-D workflow permet de déterminer le seuil est établi à 2 CTC pour 20mL de sang pour discriminer les patients non métastatiques (M_0) des patients métastatiques (M_1). En d'autres termes, les patients en dessous de ce seuil seront classés non stade IV (M_0), et ceux au-dessus de ce seuil sont certainement en stade IV (M_1), avec une sensibilité de 78% et une spécificité de 74%. Pour le CellSearch, le seuil de détection des CTC pour discriminer les patients M_0 des patients M_1 est lui aussi déterminé à 2 CTC pour 7,5mL de sang avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 90%.

Enfin, l'aire sous la courbe (AUC) des courbes ROC permet de déterminer la probabilité du test à classer correctement un évènement. Plus elle est proche de 1, plus la méthode va classer correctement les évènements. Pour la méthode R-D, l'AUC est de 0.802, une valeur assez élevée qui indique que les chances de se tromper dans la classification des patients sont relativement faibles ; pour le système CellSearch, l'AUC est de 0.935, ce qui indique qu'avec le CellSearch, la probabilité de classer correctement le stade clinique des patients est réellement forte.

Par ailleurs, lorsqu'on compare les deux méthodes (**Figure 27**), l'AUC du CellSearch est plus grande que celle du R-D workflow (0.935 vs 0.802), ce qui signifie que la classification M_0 vs M_1 avec le système CellSearch est plus fiable que la classification avec le R-D workflow.

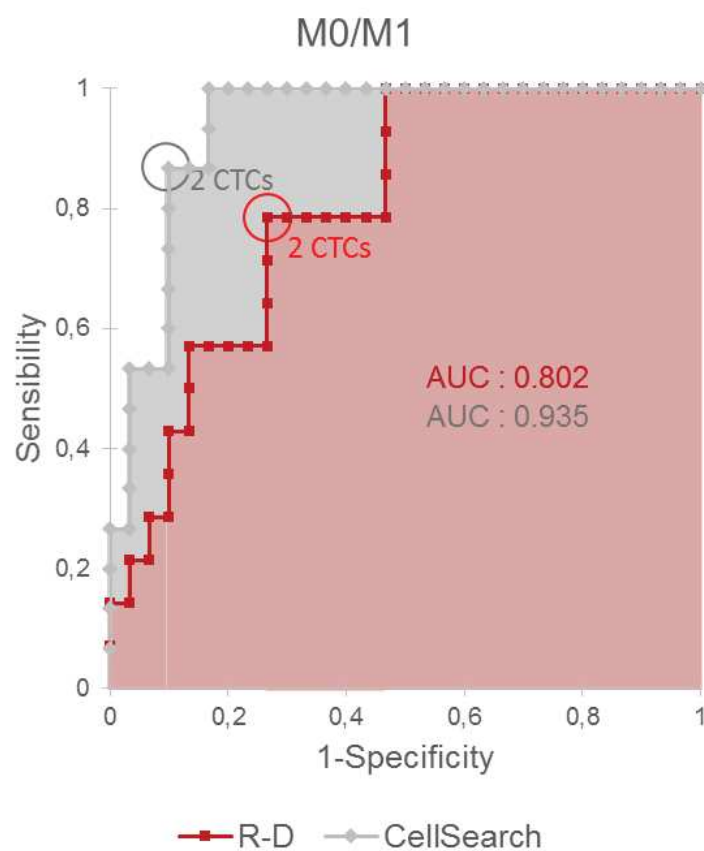


Figure 27: Comparaison des courbes ROC : R-D vs CellSearch

Ces courbes ROC permettent donc de déterminer un seuil de détection des CTC à prendre en compte par les cliniciens pour le suivi des patients. Ainsi, si un patient présente plus de 2 CTC, que ce soit avec

le CellSearch, ou le R-D workflow, on peut supposer qu'il a de fortes chances d'être en stade IV, ce qui peut conduire le clinicien à rechercher de façon plus précise et plus rapprochée la présence de métastases à distance qui ne sont pas encore connues (par exemple, anticiper une imagerie par rapport au planning prévu, notamment pour les stades III très à risque). La détection des CTC apparaît donc comme un outil d'affinement et d'adaptation du suivi des patients.

A terme, le but est de valider le lien entre ce seuil de détection de 2 CTC et l'évolution métastatique, afin d'en faire un authentique marqueur pronostique de l'évolution de la maladie et de suivi personnalisé.

4. Concordance de la détection de CTC et des paramètres cliniques chez les patients CCM
Enfin, la concordance de la détection des CTC avec les paramètres cliniques des patients a été analysée (Tableau 5). Nous avons ainsi déterminé la positivité d'un patient à la détection des CTC avec un seuil à 2 CTC et analysé. La concordance entre la détection de CTC ainsi définie et l'âge des patients, leur genre, le stade de leur cancer, l'état métastatique, le nombre d'organes avec plus de 3 métastases ou encore les antécédents de cancers de patients a été recherchée. La significativité de la concordance entre détection de CTC et paramètre clinique a été évaluée avec le Test de Fisher, et a été déterminée comme significative lorsque la *p* valeur était supérieure à 0,05.

Tableau 5: Caractéristiques cliniques des patients et détection des CTC

Clinicopathological parameter	Both methods combined				R-D Workflow				CellSearch® system				
	CTC positive ≥2		CTC negative		R-D - CTC positive ≥2		R-D - CTC negative		CS CTC positive ≥2		CS CTC negative		p value
Total patients	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
28	13	46,4	15	53,6	13	46,4	15	53,6	8	28,6	20	71,4	
Age, years	0,128				0,128				0,677				
≤75	9	32,1	5	17,9	9	32,1	5	17,9	5	17,9	9	32,1	
>75	4	14,3	10	35,7	4	14,3	10	35,7	3	10,7	11	39,3	
Sex	1				1				1				
Men	8	28,6	9	32,1	8	28,6	9	32,1	5	17,9	12	42,9	
Women	5	17,9	6	21,4	5	17,9	6	21,4	3	10,7	8	28,6	
AJCC stage	0,002				0,046				0,0006				
I/II	1	3,6	10	35,7	2	7,1	9	32,1	0	0,0	11	39,3	
III	5	17,9	4	14,3	5	17,9	4	14,3	2	7,1	7	25,0	
IV	7	25,0	1	3,6	6	21,4	2	7,1	6	21,4	2	7,1	
M0/M1	0,01				0,09				0,001				
M0	6	21,4	14	50,0	7	25,0	13	46,4	2	7,1	18	64,3	
M1	7	25,0	1	3,6	6	21,4	2	7,1	6	21,4	2	7,1	
Nbr organs with metastasis	0,375				1				1				
≤3	2	7,1	1	3,6	2	7,1	1	3,6	2	7,1	1	3,6	
>3	5	17,9	0	0,0	4	14,3	1	3,6	4	14,3	1	3,6	
Cancers antecedents	1				0,65				0,639				
Yes	3	10,7	4	14,3	3	10,7	4	14,3	1	3,6	5	17,9	
No	10	35,7	11	39,3	10	35,7	6	21,4	7	25,0	15	53,6	

Ainsi, 13 patients sur 28 (46,4%) sont positifs à la détection de CTC (CTC+) lorsqu'on utilise la méthode R-D, et 8 (28,6%) le sont avec le système CellSearch. Lorsqu'on additionne les deux méthodes, ce sont

là encore 13 patients qui sont CTC+. Pour le R-D workflow, on voit que 9 patients qui ont moins de 75 ans sont CTC+ et 5 ont 2 CTC ou moins (CTC-), 5 patients sont CTC+ pour le CellSearch et 9 CTC-. Parmi les patients de plus de 75 ans, pour le R-D workflow, 4 sont CTC+ et 10 sont CTC-, pour le CellSearch c'est 3 patients qui sont CTC+ et 11 CTC-. Pour les deux méthodes combinées, les résultats sont les mêmes que pour le R-D workflow. L'âge ne semble donc pas concorder avec la détection de CTC dans notre cohorte.

Concernant le genre, 8 patients CTC+ pour le R-D workflow sont des hommes, 5 sont des femmes ; 9 CTC- sont des hommes, et 6 femmes sont CTC-. Pour le CellSearch c'est 5 hommes et 3 femmes qui sont CTC+ et 12 hommes et 8 femmes qui sont CTC-. Ici encore, les résultats des deux méthodes combinées correspondent à ceux du R-D workflow. Le genre aussi ne semble pas corrélé avec la détection de CTC chez les patients de cette étude.

Concernant le stade des patients, on peut voir que pour le R-D workflow seuls 2 patients sont CTC+ en stades I/II, 5 en stade III et 6 en stade IV, tandis que 9 patients sont CTC- en stades I/II, 4 en stade III et seulement 2 en stade IV. Ici, la détection de CTC est donc significativement corrélée avec le stade des patients. Pour le CellSearch, aucun patient n'est CTC+ en stades I/II, 2 et 6 sont positifs en stade III et IV respectivement, alors que 11 sont CTC- en stades I/II, 7 en stade III et 2 seulement en stade IV. On remarque donc alors une association très significative entre le stade et le statut CTC avec cette technique ($p < 0,005$). Enfin, quand on combine les deux méthodes, c'est-à-dire lorsqu'un patient est positif avec l'une ou l'autre des méthodes, on note 1 seul patient CTC+ en stades I/II, 5 patients CTC+ en stade III, et 7 en stade IV, à l'inverse, 10 patients en stades I/II sont CTC-, 4 en stade III et 1 seul en stade IV. Globalement, une corrélation significative existe entre détection des CTC et stade de la maladie, que ce soit pour chaque méthode individuellement, ou en combinant les deux méthodes.

Nous avons ensuite voulu plus particulièrement évaluer le lien entre détection de CTC et statut métastatique à distance des patients. En effet, pour le R-D workflow, 7 patients CTC+ n'avaient pas de métastases à distance (M_0), tandis que 6 CTC+ avaient des métastases à distances (M_1) ; inversement 13 CTC- étaient en stade M_0 vs 2 CTC- M_1 . Cependant, le test de Fisher n'a pas permis d'établir une corrélation significative entre détection de CTC et état métastatique des patients. Pour le CellSearch, 2 patients M_0 sont CTC+ contre 6 patients M_1 , et parmi les CTC- 18 sont M_0 contre 2 sont M_1 . Ici, le même test montre que la détection de CTC avec le CellSearch semble corrélée avec le statut métastatique à distance des patients. Enfin, lorsqu'on combine les deux méthodes, 6 patients CTC+

sont M_0 et 7 patients CTC+ sont M_1 vs 14 CTC- M_0 et 1 CTC- M_1 . En combinant les deux méthodes, la détection des CTC reste corrélé avec le statut métastatique à distance. On peut donc dire que la détection des CTC avec les deux méthodes combinées, ainsi qu'avec le système CellSearch seul semble corrélée avec le statut métastatique à distance des patients de cette cohorte.

Puis, nous nous sommes intéressés au nombre d'organes sièges de métastases chez les patients M_1 , De manière homogène entre R-D workflow et CellSearch, 2 patients M_1 CTC+ ont moins de 3 organes touchés par des métastases, 4 patients CTC+ ont plus de 3 organes atteints vs 1 patient M_1 CTC- avec moins de 3 organes touchés et 1 patient M_1 CTC- avec plus de 3 organes atteints. En combinant les deux méthodes, 2 patients M_1 CTC+ ont moins de 3 organes atteints, 5 patients M_1 CTC+ avec plus de 3 organes atteints vs 1 patients M_1 CTC- avec moins de 3 organes touchés et aucun patient M_1 CTC- avec plus de trois organes sièges de métastases. De manière générale, aucun de ces résultats de détection de CTC ne semble donc être significativement corrélé au nombre d'organes sièges de métastases, mais le faible nombre de patients en stade métastatique inclus dans notre cohorte (8) ne permet probablement pas une robustesse statistique permettant de conclure.

Enfin, nous avons voulu voir si des antécédents d'autres cancers chez les patients pouvaient être liés à la détection de CTC. Pour le R-D workflow, 3 patients CTC+ avaient des antécédents de cancer, contre 10 qui n'en avaient pas, pour les patients CTC- 4 patients avaient des antécédents de cancer, contre 6 qui n'en avaient pas. Pour le système CellSearch, 1 patient CTC+ présentaient des antécédents de cancers, contre 7 CTC+ qui n'en avaient pas. Pour les patients CTC-, c'est 5 patients qui avaient eu des antécédents de cancers, contre 15 qui n'ont pas eu de cancers avant le CCM. Enfin, quand on combine les résultats du R-D workflow et du CellSearch, 3 patients avec des CTC ont eu d'autres cancers avant, 10 ont des CTC sans avoir eu d'autres cancers, 4 patients chez qui on ne détecte pas de CTC ont eu des cancers avant, et 11 n'ont pas de CTC et n'ont pas eu de cancers avant. De façon globale, on ne trouve pas de relation significative entre détection de CTC et antécédents d'autres cancers chez les patients de cette cohorte.

Enfin, nous avons voulu voir si des antécédents d'autres cancers chez les patients pouvaient être liés à la détection de CTC. Pour le R-D workflow, 3 patients CTC+ avaient des antécédents de cancer (carcinomes cutanés, myélome, mélanome, cancer du sein), contre 10 qui n'en avaient pas, pour les patients CTC- 4 patients avaient des antécédents de cancer (prostate, mélanome, glaucome), contre 6 qui n'en avaient pas. Pour le système CellSearch, 1 patient CTC+ présentaient des antécédents de

cancers, contre 7 CTC+ qui n'en avaient pas. Pour les patients CTC-, c'est 5 patients qui avaient eu des antécédents de cancers, contre 15 qui n'ont pas eu de cancers avant le CCM. Enfin, quand on combine les résultats du R-D workflow et du CellSearch, 3 patients avec des CTC ont des antécédents néoplasiques, 10 ont des CTC sans avoir eu d'autres cancers, 4 patients chez qui on ne détecte pas de CTC ont des antécédents néoplasiques d'autre nature, et 11 n'ont pas de CTC et n'ont pas eu de cancers avant. De façon globale, on ne trouve pas de relation significative entre détection de CTC et antécédents d'autres cancers chez les patients de cette cohorte.

En conclusion, l'âge, le genre des patients, le nombre d'organes atteints par les métastases à distance (plus de 3 vs pas plus de 3) ou encore les antécédents néoplasiques ne semblent pas corrélés avec la détection de CTC dans notre cohorte de patients. En revanche la détection de CTC est significativement corrélée aux stades de la maladie dans cette cohorte, que ce soit avec le R-D workflow, le système CellSearch ou en combinant les résultats des deux méthodes. De plus, la détection des CTC est aussi corrélée de manière significative avec le statut métastatique à distance lorsqu'on utilise le système CellSearch ou que l'on combine les deux méthodes.

Cette étude préliminaire en conditions réelles chez des patients atteints de CCM établit d'une part la faisabilité des deux méthodes de détection des CTC dans une petite cohorte de patients, et d'autre part de déterminer un seuil permettant de différencier les patients métastatiques vs non-métastatiques à distance. Nous avons ainsi pu corréliser la détection de CTC chez les patients avec le stade de la maladie, ce qui ouvre la voie à la mise en place d'une surveillance cliniquement pertinente par biopsie liquide à l'avenir. Toutefois, ces résultats doivent être confirmés sur des cohortes plus larges, descriptives et statiques dans un premier temps, puis prospectives et suivies afin de confirmer le caractère authentique de ce seuil. Par ailleurs des études à plus long terme permettront de corréliser détection de CTC et survie sans progression et globale des patients, notamment en stade III.

III. Détection du MCPyV dans les CTC et les cellules tumorales issues de la biopsie tissulaire

Dans un troisième temps, nous avons voulu rechercher la présence du MCPyV dans les CTC des patients CCM. Ce polyomavirus présent dans 80% des cas de CCM est lié à l'oncogenèse de ce cancer sans que l'on connaisse les mécanismes sous-jacents. Cependant, on suppose des mécanismes biologiques différents entre CCM MCPyV⁺ et MCPyV⁻, car les CCM MCPyV⁺ semblent plus faciles à traiter que les MCPyV⁻. En effet, le taux de mutations induites par les UV est nettement supérieur dans les MCC MCPyV⁻ (Goh et al. 2016) et ils semblent répondre moins bien aux immunothérapies. Nous savons que l'ADN de ce virus est intégré à l'ADN cellulaire lorsque les cellules sont cancéreuses. Ainsi, l'étude du statut viral des CTC pourrait nous permettre de mieux comprendre la cascade métastatique ou de le corrélérer avec une agressivité amoindrie du CCM.

a) Recherche du MCPyV dans les lignées cellulaires cancéreuses de Merkel

Afin de valider la faisabilité de la détection du MCPyV sur cellule unique, nous l'avons tout d'abord testée sur les cellules tumorales de lignées cellulaires cancéreuses détectées et triées avec la méthode R-D. Pour cela, nous avons amplifié le génome global de cellules uniques (n=20) grâce au kit *Ampli1* WGA (Menarini Silicon Biosystems - **Figure 28**: Procédure de kit WGA Ampli1) conçu pour l'amplification génomique après le tri au DEPArray pour permettre des analyses moléculaires de ces cellules.

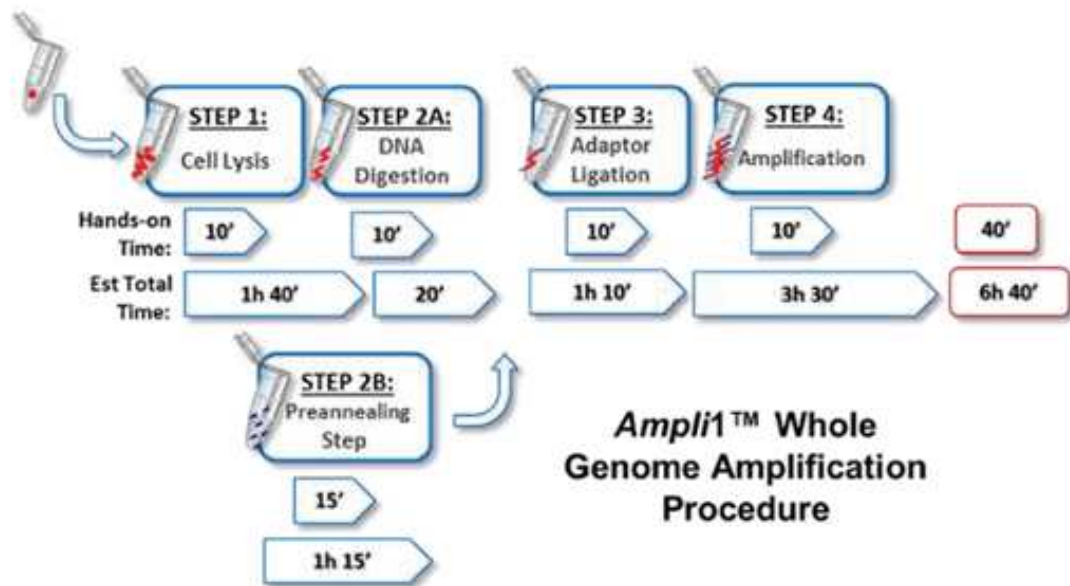


Figure 28: Procédure de kit WGA Ampli1

Ce protocole d'amplification génomique WGA *Ampli1*, permet d'obtenir une quantité suffisante d'ADN à partir d'une cellule unique pour des analyses moléculaires dont le type va dépendre de la qualité de l'ADN obtenu lors du contrôle qualité du WGA *Ampli1*. Ainsi, il est possible de faire de simples PCR, mais si la qualité de l'échantillon le permet, il est aussi possible de faire de l'hybridation génomique sur ces mêmes cellules uniques. Ce contrôle qualité est une PCR qui va cibler spécifiquement 4 séquences de l'ADN amplifié sur différents chromosomes. Ces produits de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 2% afin de séparer les différents fragments (Figure 29). Le nombre de fragments va indiquer la qualité de l'ADN.

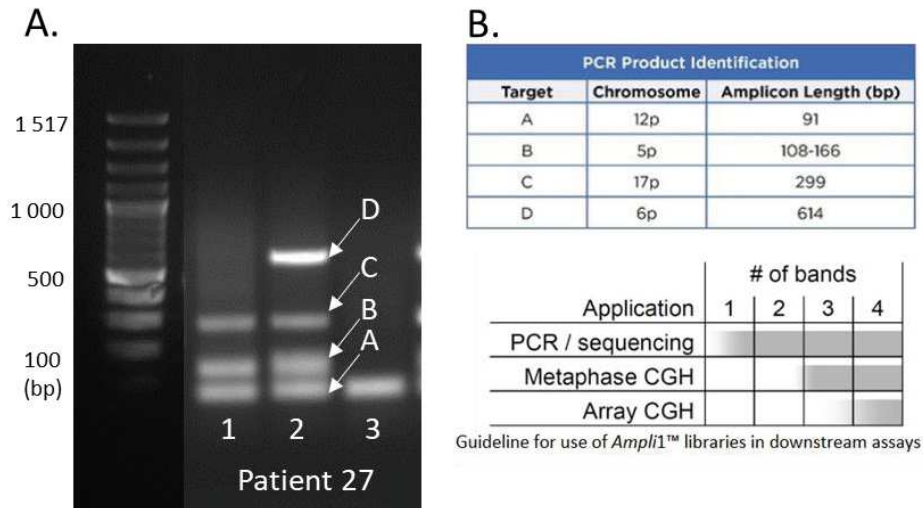


Figure 29: Contrôle qualité du WGA *Ampli1*

A. Illustration d'un gel d'agarose avec 3 cellules du patient 27 après WGA. La première cellule présente 3 fragments, la cellule n°2 4 fragments et enfin la cellule n°3 n'a qu'un fragment d'ADN. **B.** Tableaux du protocole du kit de contrôle qualité du WGA *Ampli1*. Le nombre de bande indique le type de d'analyses moléculaires possibles.

Ici on confirme qu'à partir de cellules uniques triées avec DEPAarray et dont l'ADN a été amplifié par le WGA *Ampli1*, il est possible d'obtenir une qualité d'ADN suffisante pour réaliser des PCR (cellule n°3) et l'hybridation génomique comparative (CGH, cellule n°2). Dans ce gel d'illustration, on voit bien les 4 bandes dans la cellule n°2 témoin d'une bonne qualité de l'ADN. La cellule n°1 possède 3 bandes, ce qui indique une qualité suffisante pour faire de la CGH métaphase, en revanche la cellule n°3 possède une seule bande, rendant uniquement possibles la PCR et le séquençage. Ces gels permettent aussi de savoir quels sont les échantillons vides, notamment il est possible qu'une cellule soit perdue lors de la réduction de volume après le tri au DEPAarray et avant la congélation, ou il est possible qu'on ait trié des débris qui fluoresçaient de même façon que des CTC. Notre but premier ici est de rechercher la présence du MCPyV par qPCR. Ainsi, il suffit d'une seule bande qui apparaît sur le gel d'agarose pour pouvoir rechercher le MCPyV dans l'ADN de l'échantillon.

La détection du MCPyV s'est d'abord faite en collaboration avec le Pr Vincent Foulongne, du laboratoire de virologie de l'hôpital Saint Eloi, où la qPCR s'est déroulée selon le protocole décrit par Bialasiewicz *et al.* (Bialasiewicz *et al.* 2009), sur LightCycler 480 en utilisant la Taq Polymérase pour l'amplification des cibles de PCR. Il a été possible de détecter le MCPyV sur l'ADN extrait à partir de

groupe de cellules ainsi que sur les cellules uniques de lignées. La technique a ensuite été transposée au sein de notre laboratoire, sur l'appareil PCR QuantStudio 3, en plaque 96 puits, en conservant les mêmes amorces ciblant l'ADN codant pour la partie VP2/3 de l'ADN du MCPyV. Cependant, la Taq polymérase a été modifiée, avec l'utilisation du mix FastStart PCR Master (Roche), sans que la détection du MCPyV soit modifiée.

Le MCPyV a ensuite été recherché dans deux lignées cellulaires CCM, la MKL-1, positive au MCPyV et la MCCL-9, négative au MCPyV, sur cellules uniques ainsi que sur de l'ADNg extrait de groupes cellulaires à une concentration de 10 ng/μL. La recherche du MCPyV s'est faite par qPCR ciblant différentes régions de l'ADN viral (Matériel et méthodes). Ainsi, nous avons recherché le MCPyV en ciblant la partie de l'ADN viral codant pour les protéines virales VP2/3, mais aussi en ciblant d'autres régions du génome viral du MCPyV (Feng et al. Science. 2008

Figure 2) : la partie c-terminale du gène codant pour le LT du MCPyV (Tableau 6), ainsi qu'une partie du gène codant pour le sT (Tableau 7).

Tableau 6: Détection du MCPyV - Comparaison des cibles VP2/3 et Lt dans les lignées MKL-1 et MCCL-9

Echantillon	Cible	Ct	Echantillon	Cible	Ct
MKL-1 1	VP2/3	22,45	MCCL-9 1	VP2/3	No Amp
MKL-1 2	VP2/3	22,78	MCCL-9 2	VP2/3	No Amp
MKL-1 3	VP2/3	24,49	MCCL-9 3	VP2/3	No Amp
ADN MKL-1	VP2/3	21,34	ADN MCCL-9	VP2/3	No Amp
MKL-1 1	LT	No Amp	MCCL-9 1	LT	No Amp
MKL-1 2	LT	No Amp	MCCL-9 2	LT	No Amp
MKL-1 3	LT	No Amp	MCCL-9 3	LT	No Amp
ADN MKL-1	LT	23,69	ADN MCCL-9	LT	No Amp

MKL-1/MCCL-9 x : cellule unique ; ADN MKL-1/MCCL-9 : ADN extrait d'un pool de cellules MKL-1 (10ng/μL) ; Ct : Cycle seuil de qPCR où l'ADN est détecté ; No Amp : pas d'amplification

Tableau 7: Détection du MCPyV - Comparaison des cibles VP2/3 et sT dans les lignées MKL-1 et MCCL-9

Echantillon	Cible	Ct	Echantillon	Cible	Ct
MKL-1 1	VP2/3	22,34	MCCL-9 1	VP2/3	No Amp

MKL-1 2	VP2/3	21,89	MCCL-9 2	VP2/3	No Amp
MKL-1 3	VP2/3	22,00	MCCL-9 3	VP2/3	No Amp
ADN MKL-1	VP2/3	23,22	ADN MCCL-9	VP2/3	No Amp
MKL-1 1	sT	24,65	MCCL-9 1	sT	25,11
MKL-1 2	sT	25,18	MCCL-9 2	sT	No Amp
MKL-1 3	sT	25,33	MCCL-9 3	sT	No Amp
ADN MKL-1	sT	28,70	ADN MCCL-9	sT	No Amp

MKL-1/MCCL-9 x : cellule unique ; ADN MKL-1/MCCL-9 : ADN extrait d'un pool de cellules MKL-1 (10ng/ μ L) ; Ct : Cycle seuil de qPCR où l'ADN est détecté ; No Amp : pas d'amplification

Dans la lignée MKL-1, la cible VP2/3 permet de détecter le MCPyV dans des cellules uniques ou dans l'ADNg d'extrait cellulaire à environs 22 Ct, c'est-à-dire que l'ADN viral est rapidement détecté dans les cycles de qPCR. Il n'y a pas de différence notable entre le seuil de détection du MCPyV sur cellule unique ou sur ADNg, indiquant que l'amplification génomique totale avec le WGA *Ampli1* suffit pour la détection du MCPyV. Sur la lignée MCCL-9, la cible VP2/3 ne détecte pas d'ADN viral, que ce soit sur cellule unique ou sur l'ADNg, ce qui correspond avec la description de la lignée comme étant MCPyV- (Fischer et al. 2010).

Concernant l'utilisation de la cible LT (Tableau 6), on remarque qu'il est possible de détecter le MCPyV dans l'ADNg à 10ng/ μ L des MKL-1 ; en revanche, on ne le détecte pas dans les cellules uniques. Cette cible n'est donc pas assez sensible pour notre étude qui porte sur l'étude moléculaire des cellules uniques. Ce manque de sensibilité peut s'expliquer par le faite que le MCPyV subit une perte de matériel génétique sur la partie codant pour le LT lors de son intégration dans le génome cellulaire, on peut donc suggérer que si cette perte est trop importante, elle peut induire un raccourcissement de la partie ciblée par ces amorces et donc on ne peut pas détecter le MCPyV à la cellule unique, alors que sur le groupe cellulaire, comme la perte n'est pas la même sur toutes les cellules, il est possible de détecter le MCPyV avec la globalité des cellules.

Enfin, la détection du MCPyV avec la cible sT détecte bien le virus dans les ADNg à 10ng/ μ L comme dans les cellules uniques dans la lignée MKL-1 (Tableau 7). Cependant, cette cible très courte (70pb) détecte le MCPyV dans près de 20% des cellules uniques de MCCL-9 qui ont été testées, mais pas dans les ADNg de la lignée. Ainsi, on ne sait pas si cette détection du MCPyV dans la lignée considérée

comme négative est dû à la présence d'une sous-population de MCCL-9 qui serait positive, ou s'il s'agit d'un problème de spécificité de la détection dû à la courte séquence ciblée par les amorces.

Ces résultats montrent qu'il est possible de détecter le MCPyV sur des cellules uniques et que la cible VP2/3 est celle qui permet de détecter au mieux le MCPyV dans les cellules uniques des lignées CCM. En effet, la cible LT manque de sensibilité dans la détection du MCPyV tandis que la cible sT semble manquer de spécificité. Ainsi, la cible MCPyV VP2/3 a été retenue comme étant la plus adaptée à la détection du MCPyV dans les cellules uniques.

b) Recherche du MCPyV dans les CTC de patients

Une fois la validité du test prouvée sur les cellules des lignées CCM, nous avons voulu rechercher le MCPyV dans les CTC des patients suivis dans notre étude. Lorsque des CTC ont été retrouvées à partir de prélèvements de patients, elles ont été triées à un niveau de cellule unique grâce au DEPArray puis conservées à -80°C jusqu'aux analyses moléculaires. Pour les cellules détectées avec le système CellSearch, la cassette a été analysée avec le DEPArray, induisant une perte des CTC détectées d'environ 2/3 du nombre initialement détecté avec le CellSearch mais permettant un tri automatisé. Une fois l'ADN amplifié par WGA *Ampli1*, le MCPyV a été recherché dans la quasi-totalité des CTC triées à partir des échantillons de patients grâce à une qPCR ciblant la zone VP2/3 du génome viral. En effet, pour chaque prélèvement, un maximum de cellules a été trié mais lorsque le nombre de CTC dans un échantillon était élevé, le MCPyV n'a été recherché que dans une vingtaine de cellules (1-20), afin de diminuer les coûts tout en conservant un nombre de CTC assez grand pour être représentatif de l'échantillon. Ainsi nous avons recherché le MCPyV dans les CTC de 15 patients (**Figure 30**).

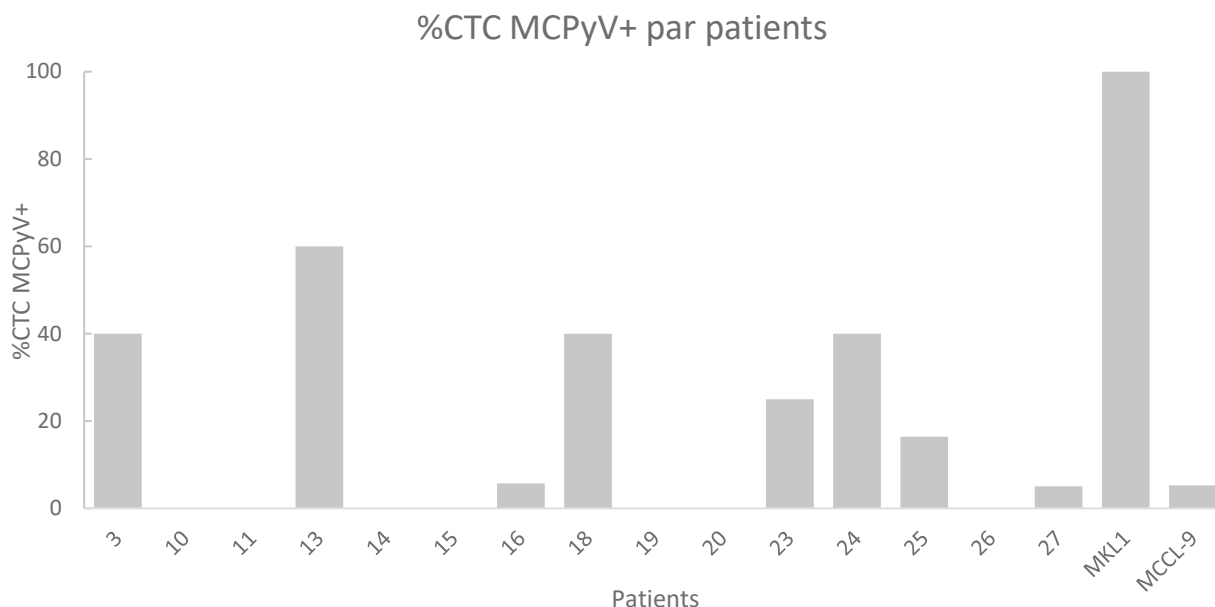


Figure 30: Détection du MCPyV dans les CTC de patients

Les cellules de 15 patients ont été analysées, sur 18 présentant des CTC dans leurs différents prélèvements. En effet, comme mentionné précédemment, sur certains échantillons les cellules ont pu être perdues lors des différentes étapes après le DEPArray ou l'ADN obtenu après amplification ne présentait pas une qualité suffisante pour l'analyse moléculaire, c'est le cas du patient 12 où seulement 3 cellules ont été retrouvées au CellSearch, une seule a été retrouvée au DEPArray à partir de la cassette de CellSearch, et aucun ADN n'a été détecté lors du contrôle qualité de WGA *Ampli1*. Pour les patients 22 et 28, les prélèvements ont été reçus très récemment et les analyses moléculaires n'ont pas pu être réalisées à temps et doivent se poursuivre.

Pour contrôler l'efficacité de notre méthode, nous avons choisi de rechercher la présence du MCPyV dans 20 cellules uniques isolées des lignées MKL-1 et MCCL-9. La totalité des cellules analysées de la lignée MKL-1 se sont révélées être positives pour le MCPyV (**Figure 30**), en revanche, environ 5% des cellules MCCL-9 ont été positives à la détection du MCPyV, suggérant un manque de spécificité de la méthode, ou soulevant la question d'une hétérogénéité au sein même de la lignée cellulaire, avec une sous-population minoritaire positive pour le MCPyV qui n'apparaît pas lorsqu'on étudie le statut viral global sur un groupe de cellules.

Dans les CTC de 8 patients, le MCPyV n'est pas retrouvé (patients 10, 11, 12, 14, 15, 19, 20 et 26). Pour les patients 16 et 27, 5% de leurs CTC sont positives au MCPyV, mais ce taux est similaire à celui retrouvé pour les MCCL-9 et remet donc en question la spécificité de ces résultats. Pour le patient 23 on retrouve 16% de CTC positives au MCPyV, et 25% pour le patient 25. Pour les patients 3, 18, 24, on retrouve 40% des CTC MCPyV⁺. Le patient 13, lui, a 60% de ses CTC qui sont MCPyV⁺.

La recherche du MCPyV dans l'ADN des CTC analysées de 15 patients CCM révèle donc une hétérogénéité du statut viral au sein des CTC d'un même patient. La question de l'origine de cette hétérogénéité se pose, représentative d'une hétérogénéité du statut viral au sein même de la tumeur d'origine, ou bien liée à une perte de l'ADN viral lorsque les cellules tumorales quittent la tumeur primaire.

c) Recherche du MCPyV dans les cellules tumorales de biopsies tissulaires

Pour répondre à cette question, le statut viral des cellules des tumeurs des patients suivis dans cette étude a été recherché. Pour chaque patient où des CTC ont été retrouvées avec l'une des deux méthodes de détection, les biopsies solides ont été collectées auprès des laboratoires d'anatomopathologie correspondants, sous la forme de copeaux des tumeurs fixées au formaldéhyde et incluses dans la paraffine (FFPE - *Formalin Fixed Paraffin Embedded*).

1. Statut viral global des tissus tumoraux

Dans un premier temps, des copeaux tumoraux fins (5µm d'épaisseur) des 8 premiers patients positifs pour la détection des CTC ont été utilisés. L'ADN global a été extrait grâce au kit QIAamp® DNA FFPE Tissue KIT (QIAGEN) sur lequel la présence du MCPyV a été recherchée avec la même méthode que pour les CTC (Tableau 8).

Tableau 8: Statut viral des tumeurs et métastases

<i>Patient - Tissu</i>	<i>Statut viral</i>
6 - Tumeur	-
12 - Tumeur	+
13 - Tumeur	+
15 - Tumeur	+
16 - Tumeur	+
24 - Ponction tissulaire	+
25 - Métastase 1	+
25 - Métastase 2	-
26 - Tumeur	+

Tumeur : tumeur primaire de CCM, Ponction tissulaire : ponction réalisée au site tumoral primaire

Parmi les 9 tissus analysés, 2 provenaient de sites métastatiques d'un même patient (patient 25). Sur ces 9 tissus, 7 se sont révélés positifs à la détection du MCPyV de manière homogène (cycles de qPCR de détection du signal similaires). Les deux tissus négatifs, la tumeur du patient 6 et une métastase du patient 25, avaient été décrits lors de la réception comme étant des échantillons de moindre qualité. Ces résultats négatifs sont donc peut-être dus à la qualité de l'échantillon et non à une absence du MCPyV dans ces échantillons.

Hormis deux échantillons dont le résultat négatif peut être discuté, tous les tissus se sont révélés positifs au MCPyV. Le statut viral global des tissus ne permet donc pas d'établir un lien avec le pourcentage de CTC positives au MCPyV.

2. Statut viral des cellules uniques tumorales issues de biopsies tissulaires

Pour déterminer l'origine de cette hétérogénéité du statut viral au sein des CTC d'un même patient, nous avons ensuite voulu analyser le statut viral de la tumeur à l'échelle de cellules individuelles afin de visualiser une potentielle corrélation entre leur statut viral et celui des CTC. Pour cela, des coupes des tissus FFPE des tumeurs des patients ayant des CTC ont de nouveau été réceptionnées sous la forme cette fois-ci de 5 copeaux de 30µm d'épaisseur. Ainsi, nous avons reçu les pièces opératoires de 10 patients (patients 3, 12, 13, 15, 16, 19, 24, 25, 26, 27). Puis les tumeurs ont pu être dissociées en

utilisant le kit FFPE SamplePrep (Menarini Silicon Biosystems), qui permet aussi de marquer les cellules avec des anticorps permettant de différencier les cellules tumorales des cellules stromales (**Figure 31**). Une fois les cellules marquées, elles ont été analysées avec le DEPArray Nxt et les cellules tumorales ont été triées sous la forme de cellules uniques.



- ① FFPE SamplePrep Kit - Disaggregation
- ② FFPE SamplePrep Kit - Staining
- ③ Chargement de 12 000 cellules tumorales dans la cassette DEPArray Nxt
- ④ Tri d'au moins 20 cellules tumorales à la cellules uniques + pools de cellules tumorales

Figure 31: Dissociation et tri des cellules de tumeur

1. La dissociation de la tumeur nécessite de déparaffiner le copeau tumoral, le réhydrater, puis dissocier le tissu par action enzymatique. On obtient ainsi une suspension cellulaire des cellules de la tumeur, à savoir un mélange entre cellules tumorales et cellules stromales. **2.** La seconde étape consiste à marquer les cellules en suspension, pour cela on utilise des anticorps primaires anti-cytokératine et anti-vimentine incubés 30min à 4°C, puis des anticorps secondaires et du DAPI 30min à 4°C à l'obscurité. Les cellules marquées sont ensuite comptées. **3.** Jusqu'à 12 000 cellules sont chargées dans la cassette du DEPArray Nxt. Ce nombre a été déterminé afin de ne pas surcharger la cassette et bloquer les cages, ce qui générerait l'établissement des chemins des cellules jusqu'au point de tri. **4.** Un minimum de 20 et un maximum de 40 cellules tumorales uniques sont ensuite triées, en plus d'une dizaine de groupes de cellules tumorales de 2 à 10 cellules par tube.

De la même façon que pour les CTC, un maximum de cellules tumorales ont été triées individuellement ou sous forme de groupe de cellules, puis conservées à -80°C jusqu'aux analyses moléculaires. Cependant, nous avons choisi de rechercher le MCPyV dans un maximum de 20 cellules uniques tumorales, afin d'être représentatif de la tumeur tout en limitant les coûts liés à cette analyse (WGA *Ampli1*, QC *Ampli1*, qPCR).

Ainsi, la présence du MCPyV dans 20 cellules provenant des tumeurs de 10 patients a été recherchée (**Figure 32**). Pour les patients 25 et 19, deux pièces opératoires ont pu être analysées, pour le patient 25 ce sont deux métastases, et pour le patient 19 la tumeur primaire ainsi qu'un ganglion métastatique. Le patient 25, dont une des deux pièces analysées avaient été décrite comme de mauvaise qualité, présentait des pourcentages différents de présence du MCPyV entre les deux pièces analysées, avec 28% des cellules tumorales positives dans la première pièce analysée, et seulement 5% des cellules tumorales MCPyV⁺ dans la pièce de qualité moindre. Compte tenu de la qualité du second tissu, il est impossible de conclure sur la différence du pourcentage de cellules possédant le MCPyV. En revanche, pour le patient 19, la tumeur primaire présentait 43% des cellules MCPyV⁺ contre seulement 21% MCPyV⁺ des cellules tumorales du ganglion proximal, suggérant une sélection des cellules tumorales MCPyV⁺ qui se détachent de la tumeur pour aller former les métastases, ou une perte du virus lors du processus métastatique.

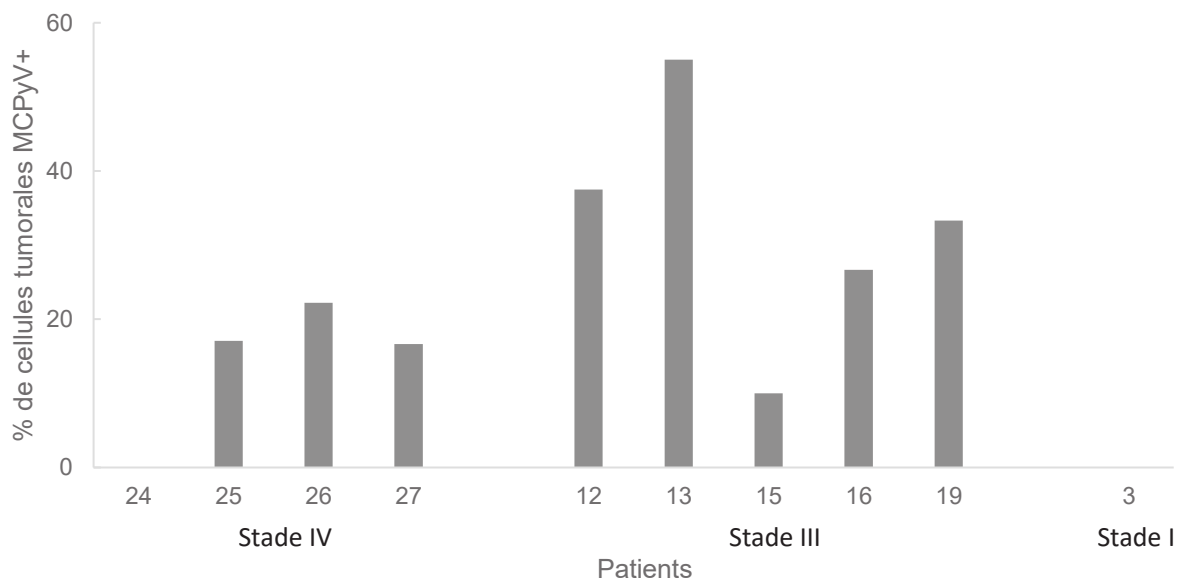


Figure 32: Pourcentage de cellules tumorales MCPyV⁺

Les pourcentages de cellules MCPyV⁺ ont été combinés ici pour les tissus des patients 25 et 19.

Les patients 24 et 3 ne semblent pas posséder de MCPyV dans leurs cellules de tumeur. Pour le patient 15, on retrouve 10% des cellules MCPyV⁺, environ 20% (17%, 22% et 16% respectivement) pour les patients 25, 26, 27, 26% pour le patient 16, 37% et 33% respectivement pour les patients 12 et 19, et près de 55% pour le patient 13. Globalement, seuls deux patients sur 10 n'ont pas de MCPyV et aucun

n'a 100% des cellules MCPyV⁺. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le pourcentage de cellules tumorales MCPyV⁺ et le stade de cancer. De même ni l'âge, ni le sexe ne semble être corrélé avec le statut viral des cellules tumorales.

Le pourcentage de cellules de tumeurs MCPyV⁺ a ensuite été comparé au pourcentage de CTC MCPyV⁺ (**Figure 33**).

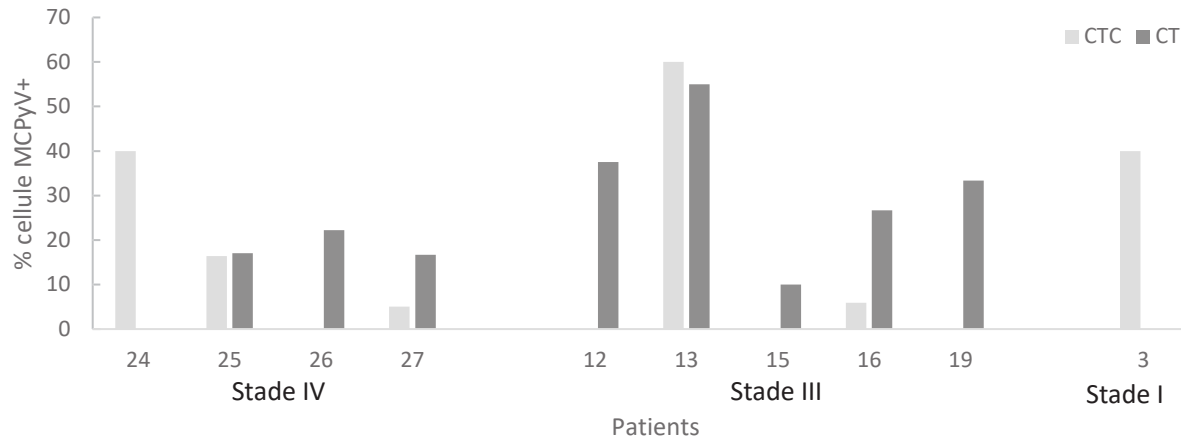


Figure 33: Comparaison des status viraux des CTC vs cellules tumorales

CTC : Cellules tumorales circulantes. CT : Cellule de tumeur.

Les patients 24 et 3 ont des CTC MCPyV⁺ mais ne présentent pas de virus dans les cellules de la tumeur. Pour les patients 26, 12, 15 et 19, à l'inverse, ce sont les cellules de la tumeur qui possèdent le MCPyV mais on n'en détecte pas dans les CTC, cependant il est important de noter que moins de 5 CTC ont été récupérées pour chacun de ces patients (4 CTC pour le patient 26, 1 CTC pour les patients 12 et 15 et 5 CTC pour le patient 19). Pour les patients 27 et 16, on détecte 4 à 5 fois plus de MCPyV dans les cellules de la tumeur que dans les CTC, respectivement. Enfin, pour les patients 25 et 13, on retrouve un pourcentage de cellules MCPyV⁺ similaire entre CTC et cellules tumorales.

Ces résultats semblent mettre en évidence une hétérogénéité du statut viral des cellules au sein de la tumeur. Pour la première fois, le statut viral des cellules de tumeur CCM a été recherché à la cellule unique. L'analyse d'échantillons FFPE grâce au nouveau DEPAarray Nxt n'en est qu'à ses débuts et on ne compte pour l'heure que 7 publications utilisant cette technologie (Micalizzi, Maheswaran, and Haber 2017), principalement pour du séquençage et la détection de mutations.

Le MCPyV, présent dans 80% des CCM, ne semble cependant pas être un virus qui infecte la globalité du tissu tumoral, mais il apparaît plutôt comme un polyomavirus présent de manière hétérogène dans les cellules de la tumeur. De la même manière, lorsqu'on recherche le MCPyV dans les CTC d'un même patient, à un niveau de cellule unique, il semble là aussi être présent de façon hétérogène, sans que l'on ait pu corréler le pourcentage de cellules MCPyV⁺ dans la tumeur avec celui des CTC. Ces résultats supposent donc que les cellules qui se détachent de la tumeur le font de manière sporadique, ainsi il n'existe pas de pression de sélection sur les cellules qui vont entrer dans la circulation sanguine et qui vont pouvoir aller former des métastases. En revanche, il serait intéressant de pouvoir élargir ses analyses à un nombre plus grand de patients où l'on pourrait récupérer les tumeurs primaires ainsi que les métastases et rechercher le MCPyV dans ces différents tissus à l'échelle de cellules uniques, tout en le comparant au statut des CTC. Ce travail permettrait de confirmer, ou d'infirmer les résultats observés chez le patient 19, à savoir, ce patient en stade III semble avoir une présence plus forte de cellules infectées par le MCPyV dans la tumeur primaire que dans le ganglion métastasé. Cette observation pourrait mettre en évidence une tendance à former des métastases avec une présence limitée du MCPyV dans le CCM, ou peut être suggérer une capacité plus forte des CTC MCPyV à former des métastases. Les analyses des statuts viraux des cellules tumorales du CCM peuvent donc nous apporter encore beaucoup d'informations sur le fonctionnement de ce cancer et l'implication du MCPyV.

IV. Culture *in-vitro* des CTC issues de patients CCM

Dans un dernier temps, nous avons tenté de mettre en culture *in-vitro* des CTC isolées à partir de sang de patients CCM. La culture de CTC et leur pérennisation permettent d'étendre les possibilités d'études, notamment fonctionnelles. En effet, l'établissement d'une lignée CTC fournit le matériel biologique nécessaire à l'étude du génome, de l'exome ou du protéome des cellules, mais aussi la réponse à des traitements et les mécanismes qui y sont impliqués. Les études fonctionnelles permettent notamment de comprendre la biologie des cellules initiatrices de tumeur, de détecter de nouveaux biomarqueurs et la compréhension des mécanismes de ces cellules pourrait apporter un grand intérêt dans ce cancer très agressif où le risque à former des métastases est très élevé.

L'établissement de lignées CTC *in-vitro* a déjà été réalisée au sein de notre laboratoire, à partir de CTC de patients atteints de cancer colorectal métastatique (Cayrefourcq et al. 2015). Les cellules ont été mises en culture à partir cellules enrichies avec la méthode des RosetteSep, puis cultivées dans du milieu μ Met complet (supplémenté en EGF et FGF) +2% de SVF, en plaque 24 puits non-adhérente. Cependant, cette étude qui a inclus 168 patients ayant un cancer du côlon métastatique a permis d'obtenir des lignées CTC immortalisées à partir des CTC d'un seul patient. Ce très faible taux de réussite révèle la difficulté à établir ces lignées à partir de CTC cultivée *in-vitro*. Le premier prélèvement à avoir permis d'établir une lignée présentait 516 CTC au CellSearch, et la lignée a été nommée CTC-MCC-41 (MCC : metastatic colon cancer).

Pour notre étude, nous avons tenté à plusieurs reprises la mise en culture *in-vitro* de CTC, pour les patients en stades métastatiques présentant, de la même façon que pour les patients atteints de cancer colorectal, plus de 300 CTC au CellSearch. Les prélèvements ont été réalisés lors du suivi clinique des patients, avant les nouvelles lignes de traitements. Ainsi, nous avons réalisé le premier essai avec un patient en stade métastatique présentant 330 CTC au CellSearch (patient 25). Cette mise en culture a été réalisée dans les mêmes conditions que lors de l'établissement de la lignée CTC-MCC-41 (**Figure 34**).

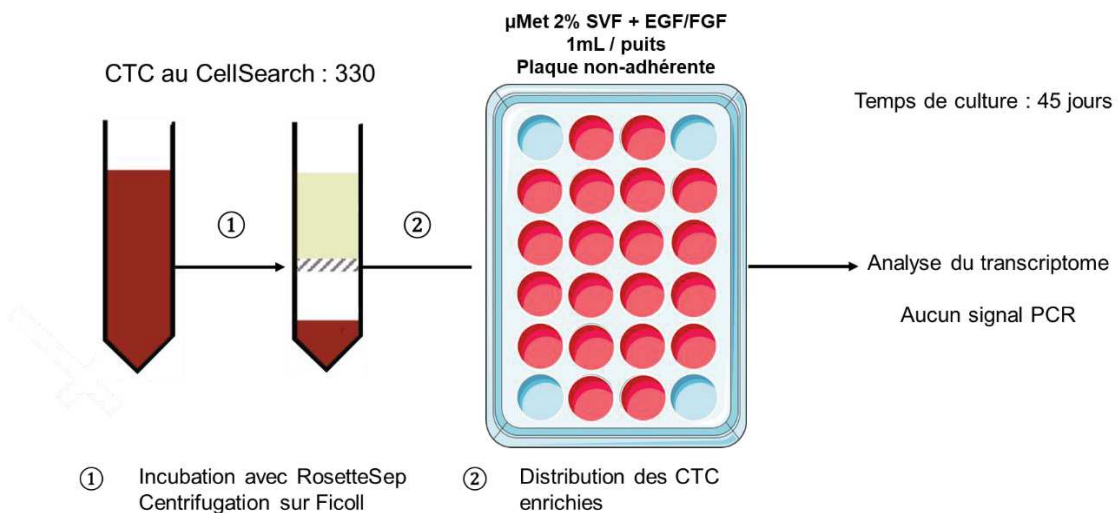


Figure 34: Mise en culture des CTC - Patient 25

Cette culture a été conservée durant 45 jours. L'état des cellules dans les puits se dégradant au fur et à mesure de la culture, nous avons décidé de les récupérer à un niveau de cellule unique, une à une à la main, puis nous avons amplifié leur transcriptome (WTA Ampli1), et recherché des marqueurs cancéreux et des gènes de ménages grâce à une RT-qPCR. Cependant, aucun signal PCR n'a pu être détecté depuis ces échantillons. Il est possible ce que nous ayons cru être des cellules soit des débris résiduels après RosetteSep, ou encore que les cellules étaient en trop mauvais état pour permettre des analyses moléculaires.

Pour le second essai de mise en culture de CTC du CCM, nous avons conservé les mêmes conditions (μ Met complet + 2% de SVF), cette fois avec un prélèvement du patient 27, présentant 422 CTC au CellSearch. Après 30 jours en culture, il ne semblait pas y avoir de cellule dans les puits de la plaque, et nous avons décidé de stopper cet essai.

Pour le troisième essai, toujours provenant de prélèvement du patient 27, mais qui présentait cette fois-ci 2500 cellules au CellSearch, nous avons voulu tester différentes conditions de mise en culture (Figure 35).

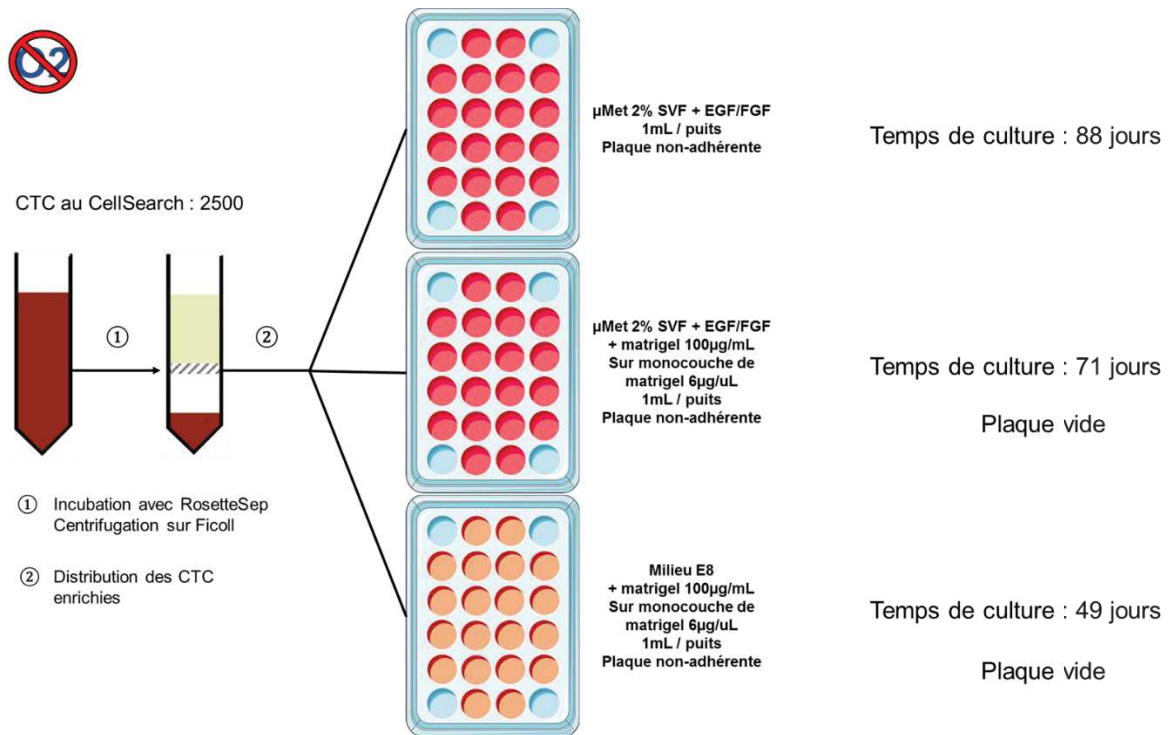


Figure 35: Culture in-vitro des CTC du patient 27

Etant donné le nombre élevé de cellules retrouvées au CellSearch, nous avons supposé qu'un grand nombre de CTC serait enrichi par les RosetteSep, et avons donc choisi de diviser cette fraction enrichie en différentes conditions de culture, afin de trouver celles qui permettraient l'établissement d'une lignée. Ces cultures ont été mises en conditions d'hypoxie (2% O₂, 5% CO₂, 5% N₂). La condition μMet complet +2% SVF a été conservée. Pour les autres conditions, nous avons pris en compte que deux des trois lignées cellulaires CCM présentes au laboratoire sont cultivées sur une monocouche de fibroblastes mitomycinés (vivants mais dont la multiplication a été inhibée, avec une durée de vie de 4 semaines), soulevant l'hypothèse de la nécessité pour les CTC d'avoir une matrice sur laquelle s'accrocher pour se multiplier. Ainsi, pour la seconde condition, une fine couche de matrigel (gel qui mime une matrice basale) a été coulée dans les fonds des puits de la plaque, et du matrigel a été dilué dans le milieu μMet complet afin de créer une accroche pour les CTC. Dans une troisième condition de culture, le même processus de tapissage de matrigel a été utilisé, mais cette fois dans du milieu E8, un milieu spécialement conçu pour la culture cellulaire de cellules souches, dans l'idée de stimuler la croissance des CTC par les facteurs de croissance des cellules souches.

Les plaques avec le matrigel (μ Met et E8) ne présentaient pas de cellules après 71 et 49 jours respectivement, nous avons donc stoppé la culture. Le matrigel devait donner une accroche aux cellules pour qu'elles puissent survivre et proliférer, tout en évitant les contaminations cellulaires que pourraient apporter une co-culture avec des fibroblastes. Malheureusement, il semble que le matrigel n'ait pas permis aux CTC du patient 27 de pousser, et ce quelque que soit le milieu de culture utilisé. En revanche, dans les conditions μ Met seul, des amas de cellules ont été observés après plusieurs semaines de culture en conditions d'hypoxie (**Figure 36**).

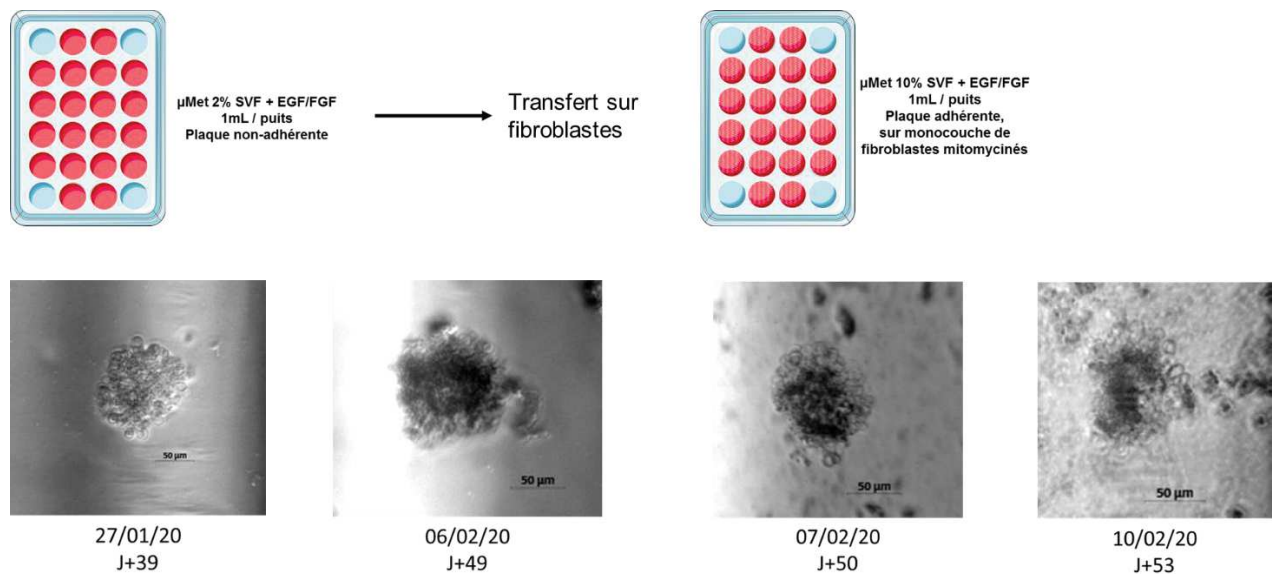


Figure 36: Illustrations de cellules en culture in-vitro du patient 27

Parmi les cellules observées dans cette plaque, cet amas a été repéré à J+39, mais à J+49 les cellules semblaient noircies, peut-être en voie de mort cellulaire. Cette plaque de culture a donc été transférée dans une plaque possédant une monocouche de fibroblastes mitomycinés (**Figure 36**, J+50), dans le but de fournir aux cellules les facteurs sécrétés par les fibroblastes dont elles pourraient avoir besoin pour proliférer. Bien que cet amas ait ensuite semblé se désagréger (**Figure 36**, J+53), une poursuite de la culture de la plaque a été tentée en transférant les cellules sur des nouveaux fibroblastes mitomycinés toutes les 4 semaines. Malheureusement, après 88 jours en culture, la plaque a été contaminée et donc perdue.

Pour le quatrième essai, les cellules provenant d'un prélèvement du patient 16, qui présentait 990 CTC au CellSearch, ont été mises en culture (**Figure 37**) toujours en condition d'hypoxie.

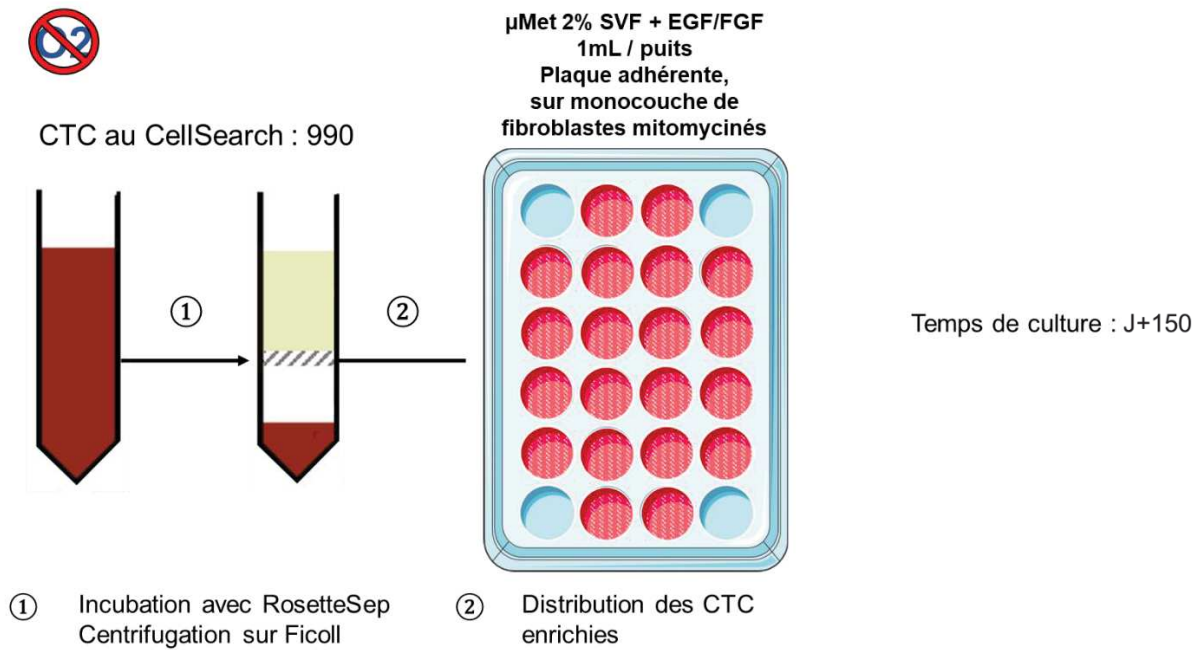


Figure 37: Culture in-vitro des CTC du patient 16

Cette fois-ci, les CTC ont été mises en culture directement sur une monocouche de fibroblastes mitomycinés, dans du milieu μ Met complet + 2% de SVF, et transférées sur de nouveaux fibroblastes toutes les trois semaines. La croissance de petites cellules circulaires dans différents puits de la plaque a ainsi pu être observée (**Figure 38**).

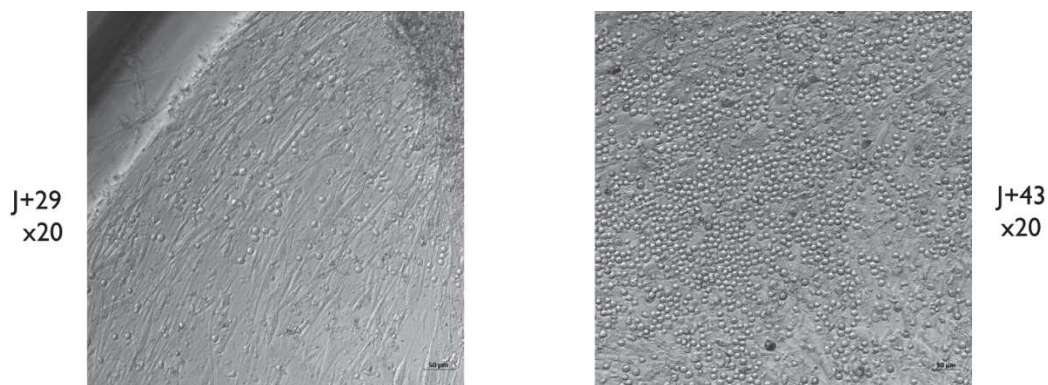


Figure 38: Illustrations de cellules en culture in-vitro du patient 16

Ces cellules, petites et rondes, se sont multipliées de façon intense durant environ 2 mois. La croissance s'est ensuite ralentie. Le transfert régulier des cellules sur de nouveaux fibroblastes a probablement dilué le nombre de cellules à chaque transfert. En effet, il est difficile de récupérer la totalité des cellules en culture sans transférer les fibroblastes mitomycinés de la plaque précédente.

Nous avons donc essayé de transférer le maximum de cellules sans perturber la monocouche de fibroblastes mais cette perte de cellules à chaque transfert a probablement entraîné le ralentissement de la croissance cellulaire.

Afin de connaître la nature de ces cellules, les cellules d'un puits de la plaque ont ensuite été récupérées et marquées avec différents anticorps dirigés des marqueurs de CTC (EpCAM), de fibroblastes (Vimentine), ou de cellules sanguines (CD45) ainsi que le marqueur nucléaire DAPI (**Figure 39**).

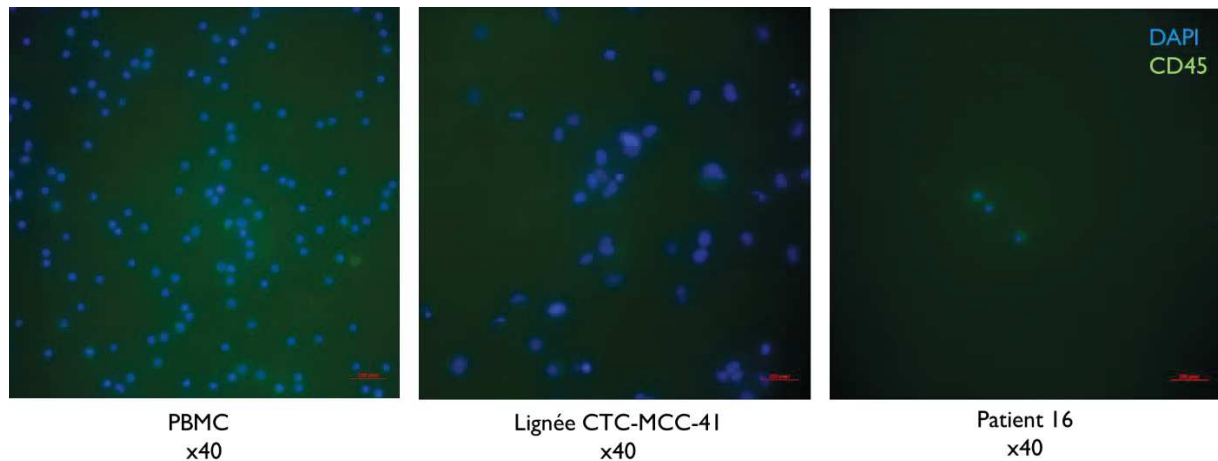


Figure 39: Marquage immunologique de PBMC, lignée CTC-MCC-41 et patient 16

Marquage avec les réactifs Beckman & Coulter, DAPI, CD56-APC, Vimentine-PE, CD45-FITC.

Les PBMC, ainsi que des cellules issues de la lignée CTC-MCC-41, établie à partir de CTC de côlon, ont été utilisées comme témoins. Les cellules provenant d'un prélèvement du patient 16 se sont avérées négatives pour le marqueur épithélial (EpCAM), en revanche, elles semblaient être positives pour le marqueur de cellules sanguines (CD45). L'hypothèse de l'état des cellules a alors été soulevée. En effet, comme ces cellules étaient en culture depuis longtemps au moment de marquage (J+68), et qu'elles n'étaient plus en phase de croissance, elles pouvaient avoir subi des modifications impliquant une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux. La culture de ces cellules a été poursuivie, tandis que certaines cellules ont été récupérées manuellement à la cellule unique dans le but de faire des analyses moléculaires plus précises notamment pour connaître marqueurs exprimés ou encore leur profil d'aberrations chromosomiques.

Enfin, un cinquième prélèvement a été mis en culture *in-vitro* pour la croissance de CTC, depuis un nouveau patient (28), qui présentait 6080 CTC au CellSearch (**Figure 40**).

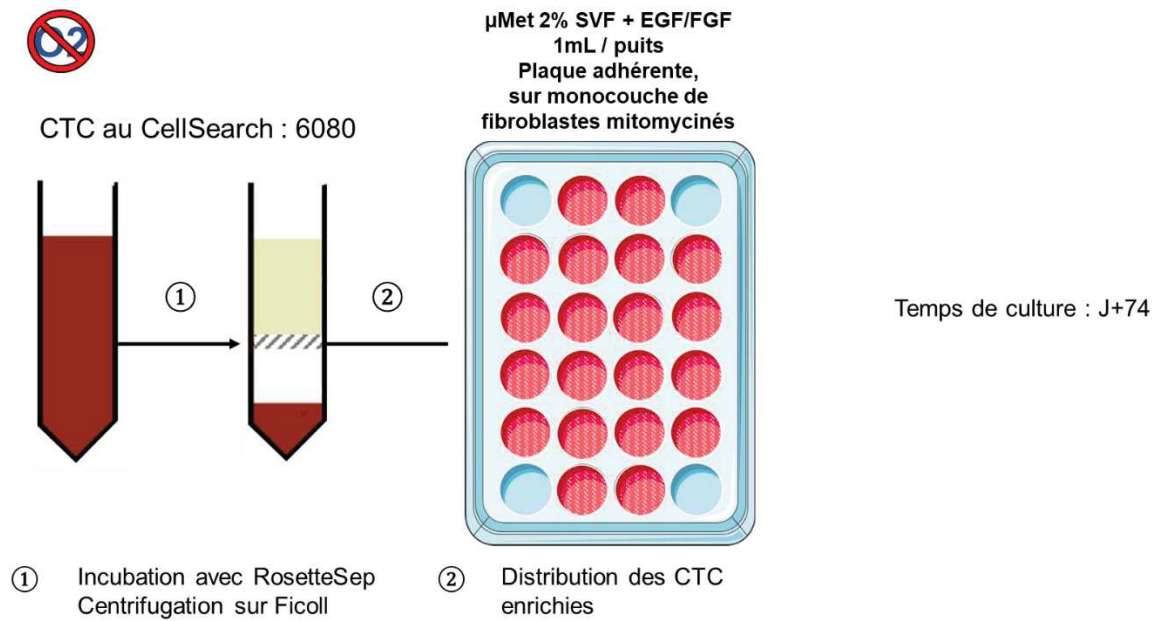


Figure 40: Culture *in-vitro* des CTC du patient 28

Ces cellules ont été mises en culture dans les mêmes conditions que celles du prélèvement précédant, c'est-à-dire sur monocouche de fibroblastes mitomycinés, dans du milieu μ Met complet + 2% de SVF, en conditions d'hypoxie. De la même façon, des petites cellules circulaires se sont multipliées dans les puits de culture dès les premiers jours (**Figure 41**).

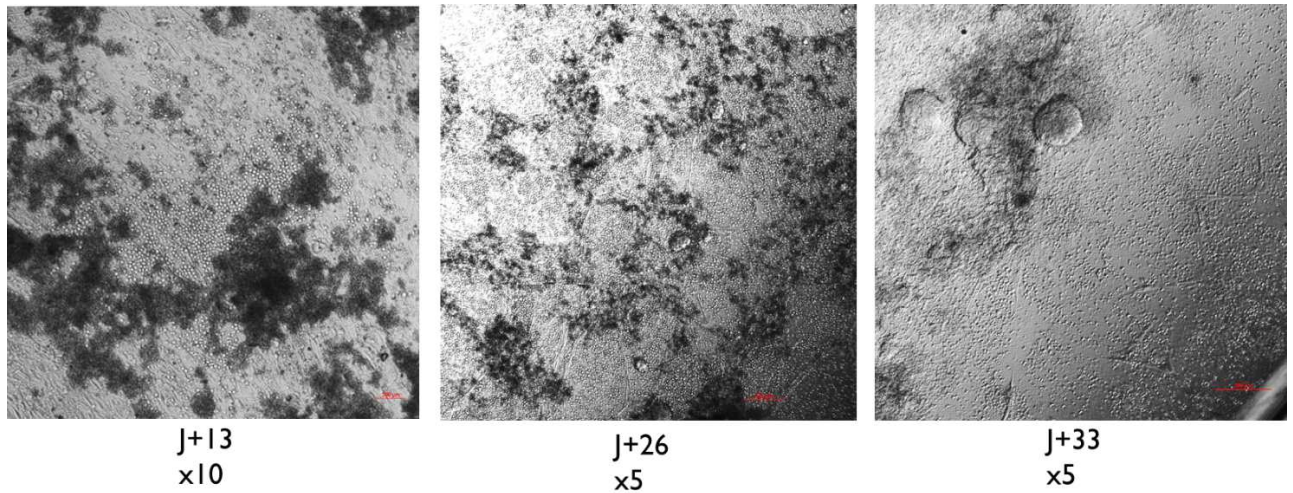


Figure 41: Illustrations de cellules en culture in-vitro du patient 28

Les cellules observées ont commencé à se multiplier rapidement, avant même que les globules rouges soient morts (**Figure 41**, J+13). Les cellules de ce prélèvement présentaient un phénotype fortement similaire à celui observé pour les cellules du le prélèvement du patient 16, suggérant une même nature. Ces cellules, plus nombreuses, et en culture depuis moins de temps, ont été marquées avec des anticorps dirigés contre EpCAM, CD45 et du DAPI (**Figure 42**).

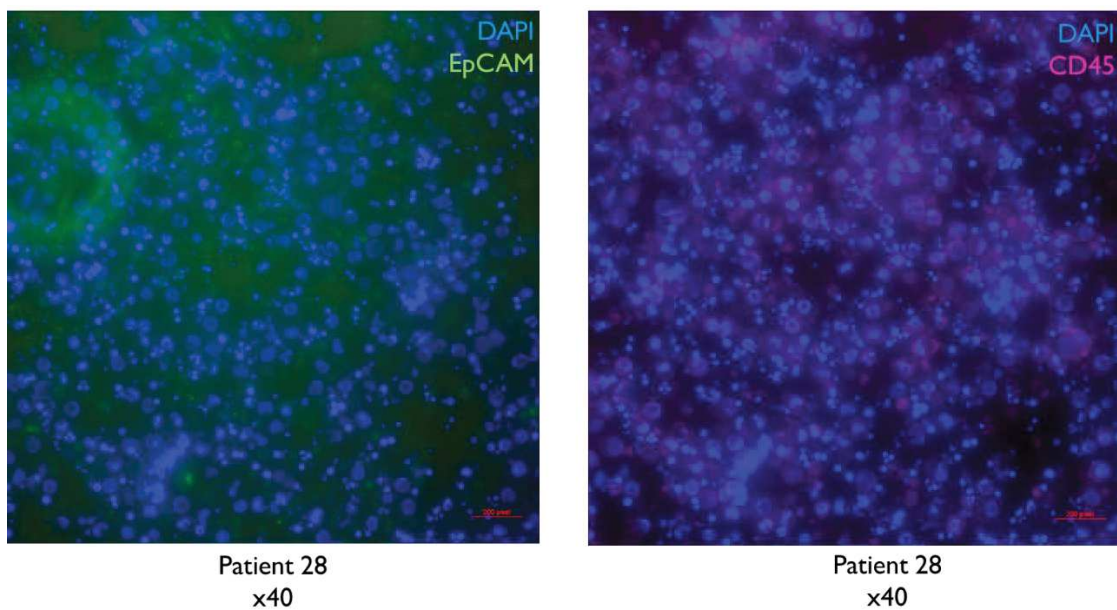


Figure 42: Marquage immunologique des cellules du patient 28

Marquage avec les réactifs et les anticorps CellSearch : DAPI, CD45 - APC. Et anticorps EpCAM – FITC (Milteniy)

Cette fois encore, les cellules en culture n'expriment pas de marqueurs épithéiaux, et l'expression de CD45 est clairement visible.

Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle les cellules en culture provenant des prélèvements de patients CCM sont des cellules sanguines, des prélèvements de patients sains ont été analysés de la même manière que pour les prélèvements de patients CCM, avec l'enrichissement avec les RosetteSep et la mise en culture sur une monocouche de fibroblastes mitomycinés. Après 15 jours en culture, des cellules semblables à celles observées dans les prélèvements de patients CCM ont été photographiées dans les puits depuis les prélèvements de donneurs sains (**Figure 43**).

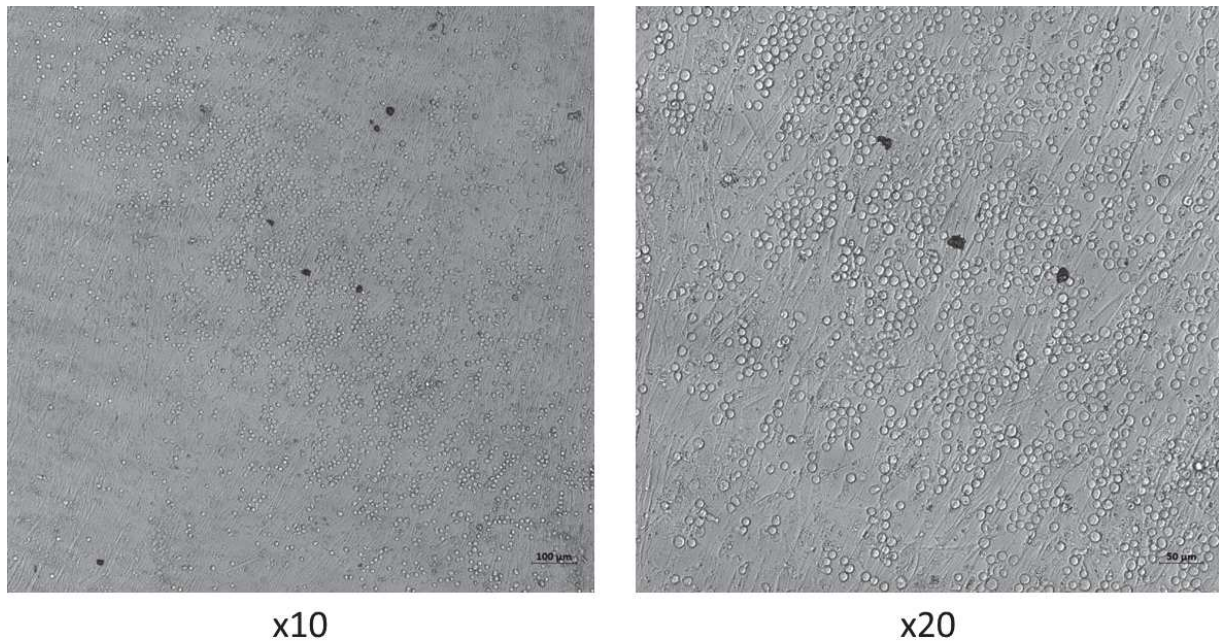
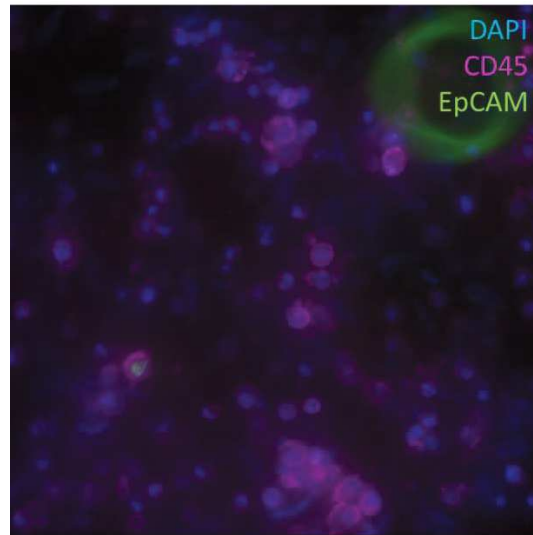


Figure 43: Illustrations de cellules en culture in-vitro de sang de donneur sain

Ces cellules ont ensuite été marquées de la même façon que les cellules obtenues depuis les prélèvements de patients CCM avec des anticorps dirigés contre des marqueurs épithéiaux (EpCAM), de cellule sanguine (CD45) et marqueur nucléaire (DAPI) (**Figure 44**).



x40

Figure 44: Marquage immunologique des cellules de patient sain

Marquage avec les réactifs et les anticorps CellSearch : DAPI, CD45 - APC. Et anticorps EpCAM – FITC (Milteniy)

Les cellules sont négatives pour le marqueur EpCAM, mais clairement positives pour le CD45. Le marquage de ces cellules issues d'un prélèvement de patient sain révèle le même marquage que les cellules issues des derniers prélèvements de patients CCM, à savoir la présence d'antigènes de cellules sanguines et l'absence d'antigènes de cellules épithéliales.

Nous avons donc conclu que les cellules en culture étaient certainement des cellules sanguines dont la croissance avait été stimulée par une concentration trop forte en facteurs de croissance : les facteurs sécrétés par les fibroblastes en plus des facteurs ajoutés dans le milieu de culture (EGF et FGF). L'expansion de ces cellules sanguines a pu être délétère pour les CTC qui ont fini par mourir.

Malgré différents essais de mise en culture des CTC provenant de patients CCM soldés par des échecs, ces résultats orientent vers de nouveaux tests de culture. On peut notamment suggérer de tenter la culture des CTC sans ajouter les facteurs EGF et FGF dans le milieu μ Met, ainsi, seuls les facteurs sécrétés par les fibroblastes seraient disponibles. La diminution de la concentration de facteurs de croissance pourrait être délétère pour les cellules sanguines, ne laissant que les cellules tumorales en culture. Une autre hypothèse d'amélioration de ces cultures est de se questionner sur la nécessité de changer de plaque de culture pour avoir de nouveaux fibroblastes tous les mois. En effet, les CTC ont besoin notamment de facteurs de croissance sécrétés par les fibroblastes pour se multiplier, on peut

alors imaginer les mettre en culture avec le surnageant de culture des fibroblastes, ainsi les facteurs de croissance seraient disponibles pour la croissance des CTC sans les fibroblastes, ce qui éviterait aussi les contaminations cellulaires lors des analyses immunologiques ou moléculaires des CTC. De plus, lors de l'établissement des lignées côlon, les fibroblastes n'ont pas été nécessaires à la croissance des CTC. Ce travail préliminaire, bien qu'il n'ait pas permis d'établir des lignées CTC CCM, aura permis de tester différentes conditions de culture, notamment les conditions en hypoxie qui semblent plus propices au développement cellulaire qu'en normoxie. De nouveaux tests pourront être faits en s'appuyant sur les résultats obtenus lors de ces essais.

Discussion et Conclusion

Ce travail, portant sur l'identification et l'analyse des CTC dans le CCM, nous aura permis de développer une nouvelle méthode de détection des CTC dans cette tumeur primitivement cutanée rare mais agressive. Cette méthode, la R-D, s'est révélée complémentaire du CellSearch, le Gold-Standard en matière de détection des CTC dans plusieurs tumeurs malignes solides. Nous avons ainsi pu rechercher les CTC dans les prélèvements sanguins de 28 patients atteints de CCM et suivis au CHU de Montpellier. Cette étude nous a permis de corréler le nombre de CTC avec le stade tumoral clinique des patients. De plus, il a été possible de trier ces CTC sous forme de cellules uniques. Ainsi, le MCPyV, un virus présent dans 80% des cas de CCM, a pu être recherché dans les CTC ainsi que dans un certain nombre de cellules tumorales uniques isolées de tumeurs primaires ou secondaires. Ces analyses ont révélé une hétérogénéité du statut viral au sein d'un même patient, dans les cellules de la tumeur comme dans les CTC. Enfin, un dernier objectif de cette thèse a été de tester la mise en culture de CTC du CCM, sans que l'on ait pu identifier pour l'instant les conditions adéquates pour l'établissement d'une lignée depuis les CTC enrichies à partir d'un prélèvement sanguin.

La biologie des CTC du CCM est pour l'heure très peu étudiée avec seulement 2 études publiées avant le début de ce projet (Blom et al. 2014) (Gaiser et al. 2015), se basant respectivement sur la détection des CTC avec le système CellSearch (qui enrichie les cellules EpCAM⁺) et le système Maintrac, et une étude publiée en 2019 (Riethdorf et al. 2019), qui se base elle aussi sur la détection des CTC avec le système CellSearch. Ces études ont corrélé la détection des CTC avec la survie et la prédiction de la réponse aux traitements, l'évolution de la maladie ou encore l'agressivité du CCM, respectivement (Boyer, Cayrefourcq, Dereure, et al. 2020). Pour avancer dans la connaissance des caractéristiques des CTC dans le CCM, nous avons pu développer une méthode se basant sur un enrichissement négatif et une détection immunologique afin de limiter au maximum la perte cellulaire lors de l'étape d'enrichissement. Pour cela, nous avons déterminé le phénotype des CTC du CCM grâce à différentes lignées cellulaires CCM, en combinant des marqueurs fréquemment utilisés pour la détection de CTC (EpCAM, PanCK) ainsi que des marqueurs spécifiques du CCM (CK20, NSE). L'enrichissement négatif a été effectué grâce à la méthode des RosetteSep combiné à l'utilisation d'un appareil de pointe tel que le DEPArray pour la détection. Le DEPArray aura aussi permis de trier les CTC de façon individuelle, afin de pouvoir rechercher la présence du MCPyV dans chaque CTC isolée. Cette méthode développée par nos soins (méthode R-D) a été comparée avec le système CellSearch concernant l'efficacité de détection des CTC du CCM, le système CellSearch étant actuellement le seul

système approuvé par la FDA pour la recherche de CTC dans trois tumeurs solides métastatiques (sein, colon et prostate). Pour la première fois, les rendements de détection pour chacune de ces deux méthodes ont pu être mesurés et comparés, révélant des taux similaires de récupération sur des lignées cellulaires de CCM.

Nous avons ensuite inclus des patients atteints de CCM, d'abord en stade métastatique puis de tout stade (28 patients en tout), pour recherche de CTC en conditions réelles sur des prélèvements sanguins ponctuels ou successifs, en utilisant en parallèle la méthode R-D et le système CellSearch. Sur les trois ans de ce projet, un total de 51 échantillons ont été analysés. Ces analyses ont révélé une complémentarité entre les méthodes de détection, contrairement aux résultats des lignées cellulaires de CCM. En effet, les CTC ne sont pas détectées de façon similaire ou cohérente par ces deux méthodes avec parfois détection de CTC par la seule la méthode R-D ou un ratio élevé entre quantités détectées. De manière globale, la méthode R-D semble détecter les CTC chez des patients en stades précoces, tandis que le système CellSearch détecterait plutôt les CTC chez des patients en stades avancés. Ces différences peuvent s'expliquer notamment par la méthode d'enrichissement des CTC, avec un enrichissement positif pour le CellSearch et négatif pour la méthode R-D. Il est donc possible que ces deux méthodes détectent des sous-populations différentes de CTC, et leur complémentarité permet d'augmenter les capacités de détection des CTC en les couplant.

De même, nous avons voulu corrélérer la détection de CTC chez les patients avec leurs caractéristiques cliniques. Dans un premier article sur les 19 premiers patients inclus dans cette étude(Boyer, Cayrefourcq, Garima, et al. 2020), la détection des CTC a été corrélée avec les stades localisés (M_0) et métastatique à distance (M_1), ainsi qu'avec le nombre d'organes atteints par des métastases, cette dernière corrélation non confirmée sur un plus grand nombre de patients. En revanche, une corrélation entre présence de CTC avec les 2 méthodes de détection (indépendamment ou combinées) et le stade métastatique à distance a été identifiée ainsi qu'un lien entre leur détection par CellSearch ou par les deux méthodes et le stade des patients. L'âge, le genre, le nombre d'organes siège de métastases ainsi que les antécédents d'autres néoplasies ne sont pas corrélés avec la détection de CTC.

Enfin, la construction de courbes ROC a permis de tester la sensibilité et la spécificité de chacun de ces tests vis à vis de la présence de métastases à distance et de déterminer des seuils de détection pour différencier les patients M_0 des patients M_1 . Ainsi, un seuil de 2 CTC a été déterminé pour chacune des méthodes, avec une spécificité de 74% et une sensibilité de 78% pour la méthode R-D, et une spécificité

de 90% et une sensibilité de 86% pour le système CellSearch. Ces résultats indiquent que la classification des patients en M_0/M_1 avec un seuil à 2 CTC est robuste. Ces seuils pourront être ensuite testés dans des cohortes multicentriques plus larges et pour des patients dont le stade clinique de cancer n'est pas connu à l'avance pour valider leur pertinence clinique. Si ces seuils sont confirmés, ils pourraient être utilisés pour le suivi des patients afin de moduler la fréquence et les modalités de ce suivi. La détection des CTC pourrait également, à terme, être utilisée comme un biomarqueur pronostique intervenant dans une décision de traitement adjuvant par exemple par immunothérapie. Ce travail sur la détection des CTC dans ce cancer apporte donc des bases pour réaliser les toutes premières études portant sur l'intérêt de la biopsie liquide dans le CCM.

En parallèle, nous avons voulu déterminer le statut viral des CTC de nos patients afin d'identifier une possible corrélation entre la présence du MCPyV dans les CTC et l'agressivité de la tumeur et entre les statuts viraux tissulaires et des CTC. Pour cela, nous avons optimisé la détection du MCPyV sur cellule unique après amplification du génome total cellulaire grâce aux lignées cellulaires. Nous avons ensuite recherché le MCPyV dans les CTC après tri des cellules grâce au DEPArray, directement avec la méthode R-D ou en analysant la cassette CellSearch. Nous avons ainsi pu constater que le virus n'était pas présent de manière homogène dans les CTC. En effet, la présence du MCPyV était identifiée dans 0 à 60% des CTC d'un même patient, sans corrélation avec le stade tumoral. Ces résultats sont actuellement en cours de rédaction sous forme d'un article scientifique.

Afin de connaître l'origine de cette curieuse hétérogénéité du statut viral, les biopsies tissulaires des mêmes patients ont été analysées à l'échelle de la cellule unique vis à vis de la présence du MCPyV, sous la forme d'un travail pionnier. Là encore, nous avons pu constater que le virus était présent de façon hétérogène, donnée non connue à ce jour. Le stade tumoral, l'âge ou le genre des patients ne semblaient pas être corrélés avec le pourcentage de cellules MCPyV⁺. Par ailleurs, il n'y avait pas de corrélation évidente entre les pourcentages de cellules MCPyV⁺ présentes dans la tumeur et de CTC MCPyV⁺ chez un même patient. Ces résultats suggèrent que le virus infecte les cellules de la tumeur de façon hétérogène et qu'il n'existe pas de pression de sélection sur les cellules sources des métastases à distance. Chez un patient il semble exister un pourcentage plus faible de cellules MCPyV⁺ au sein d'une métastase comparée à la tumeur primaire ce qui pourrait laisser supposer que les cellules sources de métastases sont majoritairement MCPyV⁻, et que ces cellules auraient une agressivité plus forte. Cependant, ces conclusions sont préliminaires et restent à confirmer. A terme, ces résultats

pourraient apporter des importantes informations sur le potentiel initiateur de métastases des cellules MCPyV.

Enfin, un dernier axe de ce projet de recherche a été d'identifier les conditions idéales de la mise en culture *in vitro* des CTC dans le CCM. En effet, la compréhension des mécanismes de la dissémination métastatique serait particulièrement intéressante dans cette tumeur où le risque métastatique est très élevé. Pour cela, obtenir des lignées de CTC serait un atout essentiel car il fournirait le matériel nécessaire pour la compréhension des mécanismes notamment fonctionnels des CTC. En effet, la présence de CTC est un évènement particulièrement rare dans le sang, et leur étude est donc limitée. Malgré différentes conditions testées au laboratoire, les conditions idéales pour la croissance des CTC n'ont pas encore été identifiées. Cependant, de nombreuses possibilités restent à tester, notamment mise en culture en présence de facteurs de croissance synthétisés par des fibroblastes, dans des conditions similaires à celles des lignées CCM.

Ce travail de thèse nous aura donc permis de développer et confirmer la validité de la méthode R-D. De plus, les rendements du CellSearch dans le CCM ont pour la première fois été testés et comparés à ceux de notre méthode. Cette étude aura également permis de corrélérer la présence de CTC avec le stade tumoral des patients CCM. De plus vastes études cliniques permettant la constitution de cohortes plus grandes pourront s'appuyer sur nos résultats afin notamment d'utiliser les CTC comme marqueur pronostique dans cette tumeur où une prise en charge précoce est essentielle. La compréhension des mécanismes de dissémination métastatique du CCM reste pour l'heure toujours un défi, mais ce travail aura apporté des éléments intéressants notamment la mise en évidence de l'hétérogénéité virale tumorale comme à l'échelle des CTC, ce qui pourrait apporter des informations sur un éventuel profil métastatique particulier des cellules non infectées. Ce travail aura donc permis d'ouvrir de nouvelles perspectives pour comprendre et prendre en charge le Carcinome à cellules de Merkel.

Matériels et Méthodes

Inclusion des patients

Les patients inclus dans cette étude sont tous suivis au département de dermatologie du CHU de Montpellier. Après lecture et signature du consentement éclairé (cf. Annexe), les échantillons de sang sont collectés. Toutes les expériences sont faites en accord avec les règles et instructions approuvées par le Comité de Bioéthique « IRB » du CHU de Montpellier (N° 2018_IRB_MTP_12-07). Les échantillons de 28 patients suivis au CHU de Montpellier ont été collectés entre Octobre 2017 et Août 2020. Les échantillons sont collectés dans des tubes Cell-Free DNA BCT (Streck) et les tubes CellSave® (Menarini Silicon Biosystems) et traités dans les 24 heures après le prélèvement sanguin, pour les méthodes R-D et CellSearch®. Au total, 51 échantillons ont été analysés.

Les échantillons sanguins utilisés pour les tests, la mise au point des méthodes ainsi que les échantillons ayant servi comme contrôle de donneurs sains ont été fournis par l'Établissement Français du Sang.

Cultures cellulaires

La lignée cellulaire MKL-1 (09111801, Public Health England), est dérivée de site métastatique (ganglion) d'un patient atteint du Carcinome à Cellule de Merkel (CCM). Cette lignée est cultivée en conditions non-adhérentes, en suspension dans du milieu RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine à 5mM et 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Elle est caractérisée comme étant positive à la présence du polyomavirus de Merkel. Les MKL-1 se multiplient en formant des amas, semblables à des lambeaux de peau. La dissociation des MKL-1 nécessite un traitement enzymatique avec de l'Accumax (Réf 00-4666-56, eBioscience) incubé 5 minutes à 37°C.

Les lignées MCCL-9 et MCCL-11 sont dérivées de métastases de patients atteints du CCM (Fischer et al. 2010), elles se cultivent sur une monocouche de cellules nourricières : les fibroblastes F255, dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 5mM de L-Glutamine, 5mM de Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) et 10% de SVF. Ces lignées nous ont été gracieusement données par le Prof. Brandner (University Medical Center, Hamburg, Allemagne). La lignée MCCL-9 est caractérisée comme étant négative pour le MCPyV, la lignée MCCL-11 est, elle, caractérisée comme étant positive pour le MCPyV.

La lignée F255 est une lignée primaire de fibroblastes humains. La culture de ces cellules ne dépasse pas le 12^{ème} passage pour conserver le caractère primaire de la lignée. Cette lignée est cultivée en conditions adhérentes, dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 5mM de L-glutamine et 10% de SVF. Une fois à 80% de confluence dans la flasque de culture, les fibroblastes sont traités avec 8ug/mL de Mytomycin C (M4287-5X2MG, Sigma), pendant 4 à 5 heures pour stopper la prolifération cellulaire. Une fois traités les F255 peuvent être utilisés comme couche nourricières pour les lignées MCCL-9 et MCCL-11.

Les 4 lignées cellulaires citées ci-dessus sont cultivées dans des incubateurs en normoxie (~20% O₂), à 37°C, 5% CO₂.

Les tests de mise en culture des CTC ont été réalisés dans du milieu µMet, ainsi que dans du milieu E8 (ref A1517001, Gibco), spécifique pour la croissance cellulaire des cellules souches pluripotentes. Dans certaines conditions de culture nous avons utilisé du matrigel (ref 354234, Corning), qui mime la matrice extracellulaire nécessaire à la croissance des cellules.

Marquage des cellules par anticorps immuno-fluorescents

Les premiers tests sur les lignées cellulaires sont réalisés sur des suspensions de 200uL pour environ 100 000 cellules. Chaque anticorps a d'abord été testé individuellement sur chacune des lignées. Pour les marqueurs de surface, l'anticorps est incubé directement dans la suspension cellulaire pendant 30 minutes, à température ambiante, à l'obscurité. Pour les anticorps intracellulaires, les cellules sont fixées et perméabilisées en même temps que l'incubation de l'anticorps avec les réactifs du kit CellSearch[®] (réf: 7900001 – Menarini Silicon Biosystems) : 50uL de réactif de fixation et 50uL de réactif de perméabilisation, pendant 30 minutes, à l'obscurité, à température ambiante. Une fois les anticorps testés individuellement et sélectionnés, le cocktail d'anticorps choisis a été testé sur 200uL de suspension cellulaire, sur chacune des lignées, comme précédemment, afin de valider les marquages et de s'assurer qu'il n'y a pas de problèmes de gêne stérique entre les différents anticorps choisis.

La liste des anticorps testés, leur référence et leur concentration se trouvent dans le tableau suivant :

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Références</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Dilutions</i>
<i>Chromogranin A</i>	FITC	FCMAB329F	Millipore	1/20
<i>CD24</i>	PE	130-095-953	Miltenyi	1/50
<i>CD44</i>	FITC	J.173	Bekman Coulter	1/20
<i>CD45</i>	PE	130-113-118	Miltenyi	1/14
<i>CD56</i>	APC	130-113-867	Miltenyi	1/20
<i>CK19</i>	FITC	61029	Progen	1/50
<i>CK20</i>	FITC	ab189087	Abcam	1/14
<i>PanCK (8, 18, 19)</i>	FITC	130-080-101	Miltenyi	1/20
<i>EpCAM</i>	FITC	130-080-301	Miltenyi	1/33
<i>Neuro-Specific Enolase (NSE)</i>	Alexa 647	ab199829	Abcam	1/14
<i>Synaptophysin</i>	Alexa 647	bs-0121R-AF647	Bioss	1/100
<i>Vimentin</i>	PE	562337	BD Bioscience	1/50

Pour les CTC isolées de patients, le nombre de cellules varie en fonction du prélèvement, dans une suspension cellulaire ~200uL. Les cellules sont marquées de la même manière que pour les lignées cellulaires, avec le cocktail d'anticorps choisis après les tests sur les lignées. La fixation et perméabilisation s'est faite avec les réactifs du kit CellSearch® (réf: 7900001 – Menarini Silicon Biosystems), 50uL de réactif de fixation et 50uL de réactif de perméabilisation. Les anticorps sont incubés en même temps que les réactifs de fixation et perméabilisation, pendant 30 minutes, à l'obscurité, à température ambiante.

Cytométrie en flux

L'analyse au cytomètre en flux a permis de déterminer chaque anticorps individuellement, sur chacune des lignées du carcinome de Merkel testées (MCCL-9, MCCL-11 et MKL-1), ainsi que le cocktail d'anticorps. Après avoir marqués les échantillons comme décrit précédemment (cf. Marquage des cellules par anticorps immuno-fluorescents), ils ont été traités avec le CyAn™ ADP Analyzer (Beckman Coulter) et les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Chacune des lignées est testée de manière individuelle, avec un échantillon non-marqué servant de contrôle négatif pour chaque marqueur fluorescent testé.

Immunocytochimie

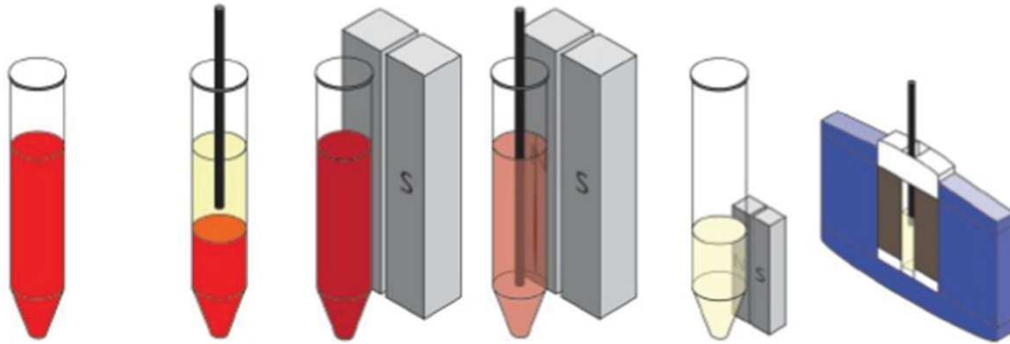
Les échantillons analysés en cytométrie en flux ont ensuite été montés sur lame de verre. Pour cela, 200µL de chaque échantillon a été déposé dans les portoirs de lames du cytospin : les cytofunnels (ThermoScientific, A78710003), et les lames ont été centrifugées 10 min à 450 G au Cytospin 4 Centrifugeuse (ThermoFisher). Après centrifugation, du « Prolong Gold anti-fade with Dapi » (Invitrogen, Réf : P36962) a été ajouté avant de positionner la lamelle. Ces lames ont été analysées au microscope inversé Axio Observer 7 (Zeiss).

Détection des CTC par le système CellSearch®

Le CellSearch® est une méthode de détection des cellules tumorales circulantes approuvée par la Food-Drug Administration (FDA) aux États-Unis, pour les cancers métastatiques du sein, du colon et de la prostate. Cette technologie est basée sur un enrichissement des cellules EpCAM-positives par immuno-magnétisme. Concrètement, 7.5mL de sang total + 6.5mL de tampon CellSearch® sont chargés dans le CellTack Autoprep CellSearch® System. Dans cette étude, le kit IVD CTC a été utilisé (7900001 – Menarini Silicon Biosystems), des anticorps anti-EpCAM couplés à des billes magnétiques sont ajoutés au sang total, puis par un système d'aimant, les anticorps sont récupérés. Cette fraction enrichie de cellules EpCAM+ est ensuite marquée avec un cocktail d'anticorps anti-CK19 (couplé PE), anti-CD45 (couplé APC) et DAPI, et l'échantillon est injecté dans la cassette CellSearch® dans un MagNest (Adapté de Van Dalum *et al.* EJIFCC. 2012

Figure 45).

Sample Plasma aspiration EpCAM enrichment Staining Sample presentation

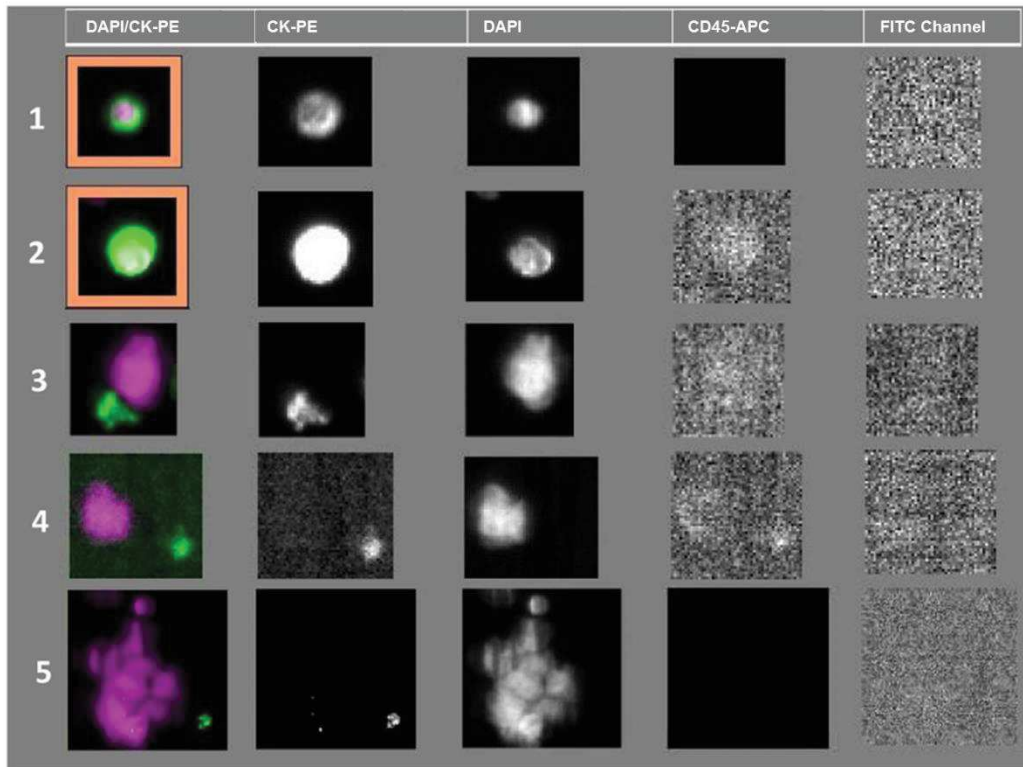


Adapté de Van Dalum *et al.* EJIFCC. 2012

Figure 45: Enrichissement et marquage des CTC avec le système CellSearch

Dans cette étude, on a choisi d'ajouter dans le quatrième canal de fluorescence (FITC), un anticorps B7H1/PD-L1 (Cat N°FAB1561P, R&D system) pour caractériser l'expression de PD-L1 par les CTC. La cassette est scannée dans le CellTracks® Analyseur II pour chacune des fluorescences. Le logiciel sélectionne ensuite les événements CK19+ et CD45-, puis une relecture doit être faite de manière manuelle pour valider les événements qui sont des CTC (Adapté de Marchetti *et al.* PLoS ONE. 2014

Figure 46).



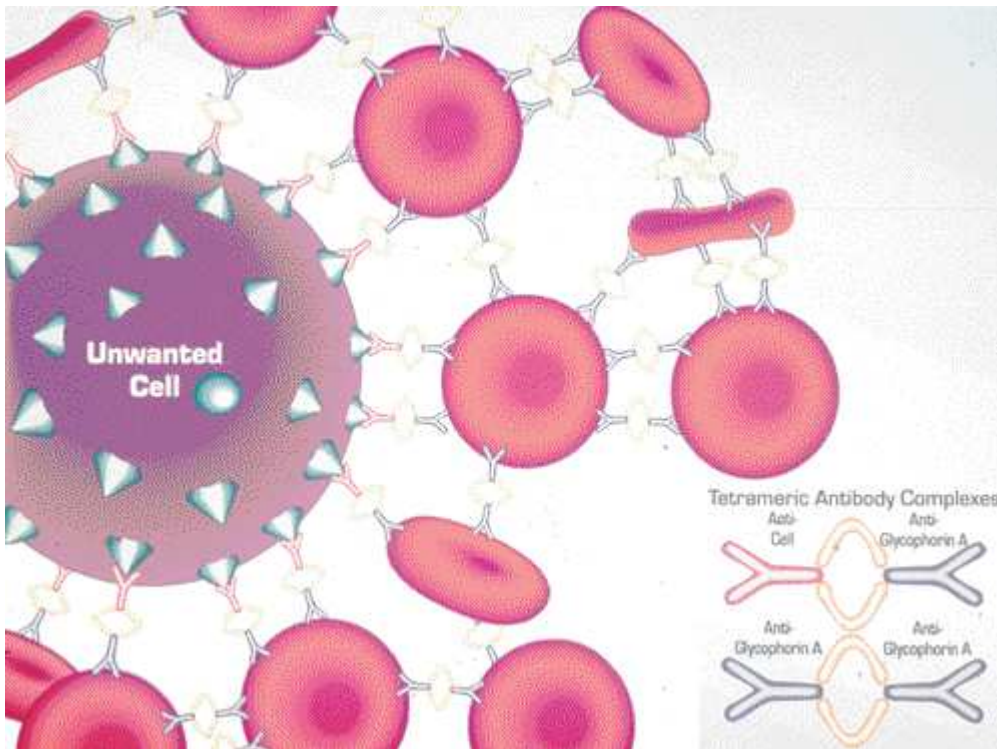
Adapté de Marchetti *et al.* PLoS ONE. 2014

Figure 46: Illustration de l'affichage du CellTrack Analyseur II

Enrichissement des CTC par la méthode RosetteSep™

La technique RosetteSep™ (Stemcell Technologies) est une méthode d'enrichissement négatif des CTC. Cette technologie consiste à former un réseau de cellules sanguines grâce à un cocktail d'anticorps dirigé contre les marqueurs sanguins : CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, Cd66b et glycophorine A (<https://odont.info/facultad-de-ciencias-veterinarias-y-ambientales.html?page=3>

Figure 47).

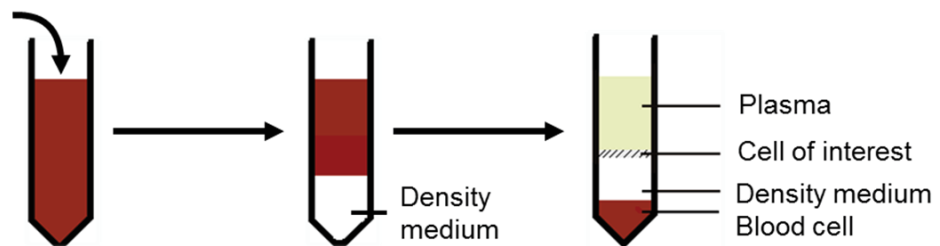


<https://odont.info/facultad-de-ciencias-veterinarias-y-ambientales.html?page=3>

Figure 47: RosetteSep

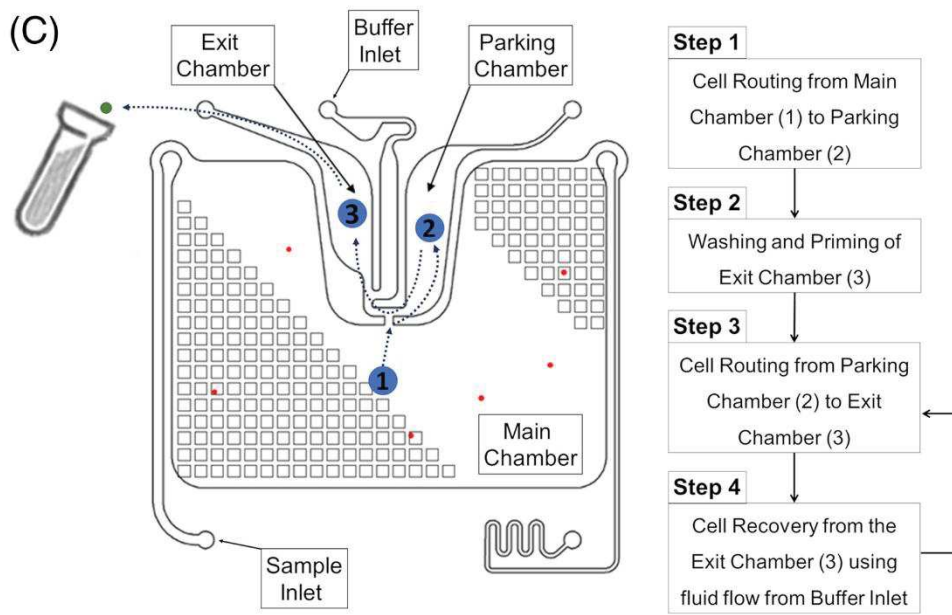
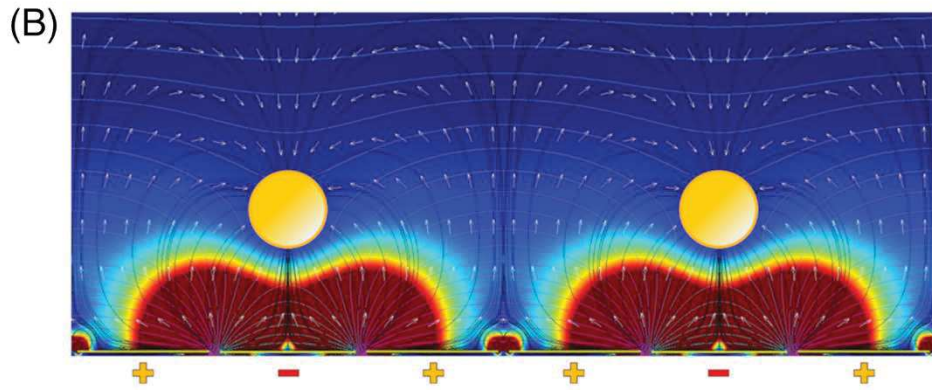
Ce cocktail d'anticorps est incubé directement dans le sang total frais, avec 50uL de RosetteSep™/mL de sang, pendant minimum 20 minutes. Après incubation, le sang et les Rosette formées sont déposés sur un milieu de densité (Ficoll, Eurobio, CMSMSL01-01) puis centrifuger 20 minutes à 1 200g, sans accélération ni frein. On obtient donc plusieurs couches : le réseau de cellules sanguines qui a sédimenté dans le fond du tube, et les cellules d'intérêt ainsi que le plasma à la surface du milieu de densité. On peut donc récupérer facilement les cellules d'intérêt enrichies.

RosetteSep™



Le système de tri à la cellule unique DEPArray™

Le DEPArray est un système innovant qui permet de trier les cellules avec un fort niveau de pureté, puisqu'on peut trier à la cellule unique. Ce système combine la micro-fluidique et la diélectrophorèse dans une cassette constituée de 30 000 cages dans lequel l'échantillon est chargé (Figure 48). Ces cages diélectrophorétiques (DEP) capturent les cellules par affinité de charge, elles sont donc immobiles. Un microscope fluorescent scanne ensuite la totalité de la cassette avec 4 canaux de fluorescence (DAPI, FITC, APC, PE) et en lumière blanche. Le logiciel du DEPArray constitue alors des panels avec tous les évènements qu'il a détectés. L'utilisateur choisi, basé sur leur phénotype (fluorescence, forme, taille, etc.) les évènements qu'il considère comme étant des cellules d'intérêt. Ces cellules sont ensuite déplacées dans une zone de parking. Le mouvement des cellules s'effectue par inversion des charges dans les cages DEP, ainsi les cellules suivent les charges négatives et se déplacent donc de cage en cage jusqu'au parking. Une fois rangée, on peut choisir comment trier les cellules : de manière pure à la cellule unique, ou en groupe, ainsi que le support dans lequel on veut les récupérer : tube, plaque, etc. On sait ainsi quelle cellule est dans quel tube avec son identifiant et l'image correspondante. Le DEPArray permet de travailler avec des cellules vivantes ou fixées, depuis une fraction enrichie de cellules, ou même depuis des cellules de coupes FFPE après dissociation. Les cellules vivantes restent viables pour des analyses biologiques après tri, tout comme les cellules fixées peuvent être analysées pour des analyses moléculaires par exemple.



<http://www.siliconbiosystems.com/>

Figure 48: DEPArray

Amplification du génome total des cellules uniques

L'amplification du génome total des cellules uniques, provenant des lignées cellulaires après micromanipulation ou isolation au DEPArray™, ou des CTC après DEPArray™, a été réalisée à l'aide du kit *Ampli1*™ WGA kit (Menarini Silicon Biosystem). Ce kit a été spécialement conçu par Menarini Silicon Biosystem pour amplifier l'ADN d'une cellule unique après le tri au DEPArray™. Il est fait de quatre étapes principales : la lyse de la cellule, la fragmentation de l'ADN (digestion par enzyme de restriction), la ligation d'amorce à chaque extrémité des fragments d'ADN, et enfin l'amplification des fragments par PCR (**Figure 49**).



<http://www.siliconbiosystems.com/>

Figure 49: Amplification du génome total (WGA)

Cette procédure est un protocole sur un jour. Une fois l'ADN total de la cellule amplifié, il a été stocké à -20°C avant de procéder au contrôle qualité du WGA.

Le contrôle qualité du WGA consiste en une PCR qui amplifie 4 fragments spécifiques de l'ADN total de la cellule. Les produits PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose. Après optimisation du protocole, les gels ont été faits à 2% d'agarose. Les produits PCR (10uL) ont été mixés avec 3uL d'EZ-Vision One Dye (VWR), et 7.6uL DNA-ladder 1000pb (New England BioLabs) mixé avec 3uL d'EZ-Vision One Dye. La migration s'est faite à 135 Volts pendant environ 25 minutes. Une fois les échantillons migrés, le gel a été photographié avec l'imageur Universal Hood II (BioRad), grâce au logiciel ChemiDoc XRS.

Le kit *Ampli1* existe aussi pour l'amplification transcriptomique totale (WTA *Ampli1*, réf: WT001, Menarini Silicon Biosystem), qui permet d'analyser les ARN à partir d'une cellule unique viable. Ce kit a lui aussi été développé spécialement pour les cellules triées avec le DEPArray™.

Détection du virus MCPyV dans les cellules tumorales

Le MCPyV a été recherché dans les lignées cellulaires, sur ADN extrait de pool cellulaire, mais aussi sur des cellules uniques, tout comme dans les CTC isolés de patients, les ADN extrait des tumeurs, et les cellules tumorales isolées depuis les coupes FFPE des tumeurs de patients. La détection du MCPyV s'est faite par qPCR, utilisant la Taq Polymérase (Ref : 4710452001, Roche/SigmaAldrich). La qPCR a été réalisée sur l'appareil Quant Studio™ 3 (Thermo Fisher). Les programmes ont été déterminés et les résultats analysés avec le logiciel Quant Studio™ Design & Analysis Software v.1.4.2.

Le programme de qPCR est :

- 50°C – 2 min
- 95°C – 10 min
- 95°C – 15 sec
- 60°C – 10 sec

} x40

Un échantillon est considéré comme étant positif au MCPyV lorsqu'un signal sort avant le 40^{ème} cycle.

Les plusieurs cibles du MCPyV qui ont été testées sont listées dans le tableau ci-après :

Tableau 9: Cibles du MCPyV

Zone cible du MCPyV	Amorce Sens	Amorce anti-sens	Sonde	Réf
VP2/3	5'-GGCAGCATCCCGGCTTA-3'	5'-CCAAAAAGAAAAGCATCATCCA-3'	5'-FAM-ATACATTGCCTTTTGGGTGT TTT-BHQ1-3'	(Bialasiewicz et al. 2009)

LT C-ter	5'-AGATGGTGCTGTAGCTG- 3'	5'- AGGGAATCTCTTAGATTTGC C-3'	5'-6-FAM- TTTCCTCCTGTATTGTTACT GCTAATGATTATTT-BBQ-3'	(Schmitt et al. 2012)
sT	CCCTTTGGAGCAAATTCCA	CTGACCTCATCAAACATAGA GAA	CAAATATCCACAAGCTCA GAAGTGA	(Arvia et al. 2017)

50L d'échantillon ont été utilisés pour la détection du MCPyV. Pour les contrôles positifs sur ADN extrait de cellules, ainsi que sur les ADN de tumeurs, la concentration en ADN était de l'ordre de 40µg/mL. Pour la détection sur les CTC après amplification de l'ADN total, la concentration n'est pas connue.

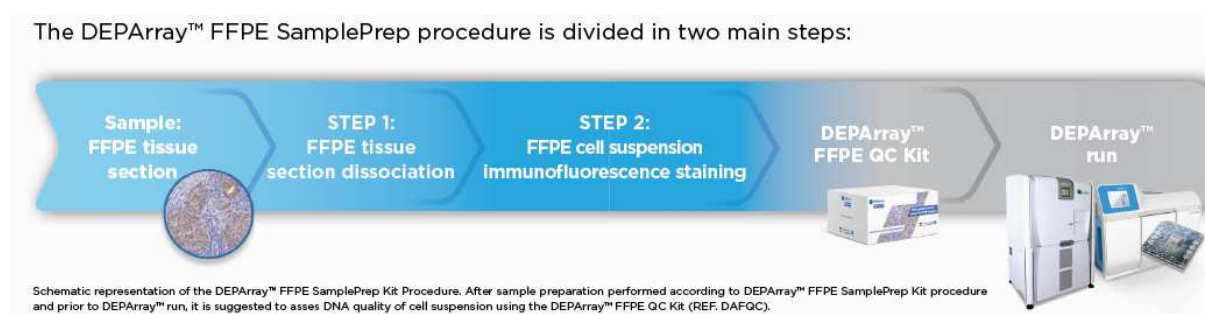
Détection des aberrations génomiques

Les aberrations chromosomiques de certaines CTC après le R-D workflow ont été analysées pour confirmer le caractère cancéreux des cellules triées avec cette méthode. Pour cela, les cellules ont été envoyées à Menarini Silicon Biosystems où ils ont utilisé le kit *Ampli1* LowPass kit for Illumina platforms (Menarini Silicon Biosystems). Ce kit est utilisé sur des cellules uniques dont l'ADN a été amplifié par WGA *Ampli1* pour préparer des bibliothèques pour le séquençage du génome total. Les fichiers FASTQ obtenus sont alignés sur la séquence humaine de référence hg19 en utilisant l'aligneur Burrows-Wheeler, version 0.7.12 (BWA)(Li and Durbin 2009). Les aberrations de copies sont identifiées en utilisant le logiciel Control-FREEC (Version 11.0)(Boeva et al. 2012). Les niveaux de ploïdies ont été directement identifiés par Menarini Silicon Biosystems pour chaque bibliothèque, basée sur la meilleure correspondance des profils de nombre de copies des échantillons par rapport au nombre de base de copies.

Dissociation de coupes fixées au formol et inclus dans la paraffine (FFPE)

Les coupes FFPE ont été récupérées auprès des différents laboratoires conservant les tumeurs et métastases des patients inclus dans ce projet. Deux types des coupes ont été récupérées : des copeaux de 5µm d'épaisseur pour l'extraction d'ADN et des copeaux de 40µm d'épaisseur pour la dissociation des coupes et le tri des cellules tumorales au DEPAarray™. Pour chacune des épaisseurs il a fallu réhydrater les tissus, suivant des protocoles différents.

Sur les copeaux de 5µm d'épaisseur, le kit QIAamp® DNA FFPE Tissue KIT (56404 – Qiagen) est utilisé en suivant le protocole (**Figure 50**). En résumé, la paraffine est dissociée par des bains de xylène, puis les coupes sont réhydratées par des bains d'éthanol puis d'eau. Une fois les coupes réhydratées, les cellules sont lysées et l'ADN peut être extrait. A la fin de l'extraction, l'ADN est quantifié grâce au NanoDrop One (ThermoFisher).



<http://www.siliconbiosystems.com/>

Figure 50: Protocole de DEPAarray pour analyse d'échantillons FFPE

Pour les copeaux de 40µm d'épaisseur, la dissociation de la paraffine et la réhydratation des tissus est faite en suivant le protocole DEPAarray™ FFPE SamplePrep Kit (K10021 – Menarini Silicon Biosystems), qui consiste lui aussi en des bains successifs de xylène et d'éthanol. Une fois les coupes réhydratées, la tumeur est dissociée, puis les cellules sont marquées avec les anticorps suivant :

Tableau 10: Marquage pour le protocole DEPAarray FFPE

Anticorps primaires	Incubation
Anti-Cytokeratin A	30min, 4°C

Anti-Cytokeratin B

Anti-Vimentin

Anticorps secondaires	Incubation
Secondary Ab-Alexa Fluor 488	
Secondary Ab-Alexa Fluor 647	30min, 4°C, obscurité
DAPI nuclear stain	

Après avoir été marquées, les cellules sont marquées dans la cassette de DEPArray pour être sélectionnée en fonction de leur statut stromal ou cancéreux.

Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est faite sur des pools de 100 000 cellules grâce au kit QIAamp DNA micro kit (56304 - Qiagen). Brièvement, les cellules sont lysées puis l'ADN est enrichi par différentes phases d'élution. Une fois l'ADN extrait, il est dosé avec le NanoDrop One (ThermoFisher) avant d'être stocké à -20°C.

Analyses statistiques

1. Courbe ROC

La détermination des seuils de détection pour chacune des deux méthodes a été faite grâce à l'élaboration de courbes ROC (*receiver operating characteristic*, **Figure 51**). La courbe ROC permet d'évaluer les performances diagnostiques d'un test. Sous forme de graphique, elle représente la relation entre spécificité et sensibilité, et permet de déterminer un seuil pour lequel elles sont à leur maximum (Delacour et al. 2005). Ces courbes ont été construites avec les résultats de détection des CTC dans la cohorte des patients, en prenant chaque échantillon en compte individuellement, chaque point correspond à un échantillon, avec une relation spécificité/sensibilité pour chaque point.

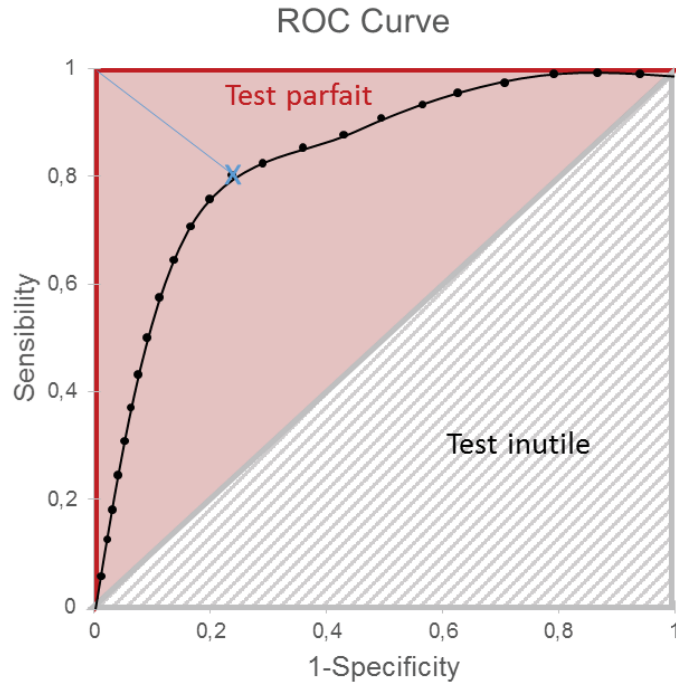


Figure 51: Courbe ROC

Chaque point du test est représenté par un cercle noir. La courbe de ROC relie tous les points obtenus avec le test. Le seuil optimum du test, à savoir le point où spécificité et sensibilité sont égales à 1, est le point se rapprochant le plus du coin supérieur gauche.

L'aire sous la courbe (AUC) reflète les performances diagnostiques du test. Elle permet de déterminer la probabilité du test à classer correctement un évènement. Plus elle est proche de 1, plus la méthode va classer correctement les évènements. Un test est inutile si la courbe formée par ses différents points suit la diagonale grise, et si l'AUC (zone rayée blanc et gris) est égale à 0.5. Un test est parfait si la courbe formée par les différents points suit la courbe rouge et si son AUC (zone rouge + zone rayée blanc et gris) est égale à 1.

2. Test de Fisher

La corrélation entre la détection des CTC et les caractéristiques physiopathologiques des patients est faite grâce au test statistique de Fisher. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque la p valeur est inférieure ou égale à 0.05 ($p \leq 0.05$). L'âge, le sexe, le stade tumoral du cancer, la

présence/absence de métastases à distance, le nombre d'organes avec des métastases ainsi que les antécédents d'autres cancers sont comparés avec détection des CTC par l'une ou l'autre des méthodes de manière individuelle, ou par combinaison des résultats des deux méthodes.

ANNEXES

OPEN

Circulating Tumor Cell Detection and Polyomavirus Status in Merkel Cell Carcinoma

Magali Boyer¹, Laure Cayrefourcq¹, Françoise Garima¹, Vincent Foulongne², Olivier Dereure³ & Catherine Alix-Panabières^{1*}

The incidence of Merkel cell carcinoma (MCC), a rare and highly metastatic skin malignancy, has sharply increased in the last decade. Clinical biomarkers are urgently needed for MCC prognosis, treatment response monitoring, and early diagnosis of relapse. The clinical interest of circulating tumors cells (CTCs) has been validated in many solid cancers. The aim of this study was to compare CTC detection and characterization in blood samples of patients with MCC using the CellSearch System and the RosetteSep-DEPArray workflow, an innovative procedure to enrich, detect and isolate single CTCs. In preliminary experiments (using spiked MCC cell lines) both methods allowed detecting very few MCC cells. In blood samples from 19 patients with MCC at different stages, CellSearch detected MCC CTCs in 26% of patients, and the R-D workflow in 42% of patients. The detection of CTC-positive patients increased to 52% by the cumulative positivity rate of both methodologies. Moreover, Merkel cell polyomavirus DNA, involved in MCC oncogenesis, was detected in tumor biopsies, but not in all single CTCs from the same patient, reflecting the tumor heterogeneity. Our data demonstrate the possibility to detect, isolate and characterize CTCs in patients with MCC using two complementary approaches.

Merkel Cell Carcinoma (MCC) is a rare and aggressive neuroendocrine skin cancer, the incidence of which has been steadily increasing over the last decades^{1,2}. It is one of the most lethal skin malignancies after melanoma³, and more frequently affects fair-skinned men with a median age of 70 years at diagnosis⁴. MCC usually appears as a rapidly growing red or purple nodule mostly located on UV-exposed areas (head, neck or upper limbs). Several risk factors have been identified, such as UV exposure, disease- or treatment-related immunosuppression, notably transplanted and HIV-infected patients⁵. A new virus belonging to the *Polyomaviridae* family and named Merkel cell polyomavirus (MCPyV) has been identified in some MCC tissue specimens⁶. The clonal integration of the viral DNA in the genome of MCC cells⁷ suggests that this phenomenon is an early event occurring before malignant transformation⁸. This virus is present in most MCC (about 80% of patients) and seems to play a direct role in malignant transformation, most notably through the intervention of oncogenic proteins⁶. Indeed, MCPyV expresses the large T antigen and the small T antigen that display a strong oncogenic activity^{9,10}. These oncogenic viral proteins are both expressed in MCPyV⁺ MCC and seem to be necessary for the maintenance of MCPyV⁺ MCC cell lines¹¹. Conversely, MCPyV⁻ MCC are characterized by higher number of mutations in key genes, a UV-mutational signature, and more chromosomal aberrations compared with MCPyV⁺ tumors^{8,12}, suggesting two distinct oncogenic pathways.

Circulating tumor cells (CTCs) are considered as the real-time *liquid biopsy* for patients with cancer, described for the first time in 2010^{13,14}. The stem-cell properties and sometimes the clustering capacities of the most aggressive CTCs are related to metastasis progression^{15,16}. CTC detection and characterization may provide information on the cancer progression, prognosis, and therapy response. Indeed, numerous clinical studies and meta-analyses, including in large cohorts of patients, have shown that CTC number is an important indicator of the risk of progression or death in patients with metastatic solid cancer (e.g., breast, prostate, colon cancer)^{17–19}. Other studies demonstrated that CTC number decreases in patients who respond to cancer therapy^{20–22}, whereas it increases in poor responders. In MCC, liquid biopsy and CTCs could be used to obtain information about the oncogenic

¹Laboratory of Rare Human Circulating Cells, University Medical Centre of Montpellier, 34093, Montpellier, France.

²Pathogenesis and Control of Chronic Infections, University of Montpellier, INSERM, EFS, University Medical Centre, 34090, Montpellier, France. ³Department of Dermatology, University Medical Centre of Montpellier and INSERM 1058 Pathogenesis and Control of Chronic Infections University of Montpellier, 34090, Montpellier, France. *email: c-panabieres@chu-montpellier.fr

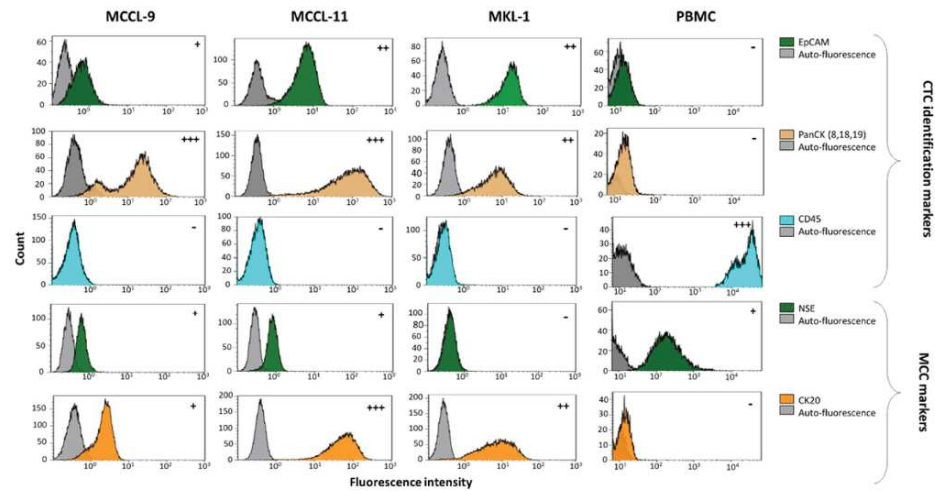


Figure 1. Phenotypic characterization of MCC cell lines. Specific CTC, leukocyte and MCC markers were used to characterize the MCCL-9, MCCL-11 and MKL-1 Merkel cancer cell lines and PBMCs as controls. The markers presented in this Fig. are those that have been selected to detect CTCs in MCC. (+) represents a positive marker, and the number of (+) indicates the signal intensity. (–) represents a negative marker. Grey represent the auto-fluorescence of the MCC cell lines (negative control). All these markers were also tested on PBMCs to determine which markers can be used to discriminate CTCs from normal blood cells. **Abbreviations:** EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule, CK: Cytokeratin. Pan: panel. NSE: Neuron-Specific Enolase, CD: Cluster Differentiation.

pathway in this poorly understood malignancy. For example, we can follow the viral status, and the evolution of mutational burden in serial liquid biopsies compared to the initial tissue biopsy. Up to now, few studies have investigated the clinical relevance of biomarkers in MCC. One study correlated the presence of miR-375 in serum of patients with MCC²³, some others determined T antigen antibodies as a prognostic marker in MCC^{24,25} and only three studies have investigated CTC detection in MCC: two based on EpCAM-positive selection of CTCs using the CellSearch system and one using the Maintrac system^{26–28}. These three studies found that CTC detection in MCC is feasible, and one also reported that the presence of CTCs is a prognostic factor of worse clinical outcome²⁸. As the biology of MCC CTCs is not yet fully understood, we decided to detect CTCs without any bias of selection for the enrichment step.

Thus, we describe in this study a new workflow based on negative enrichment of MCC CTCs using the RosetteSep technology combined with CTC detection and sorting with the DEPArray technology. We subsequently tested blood samples from 19 patients with MCC using this new workflow and the CellSearch system, and correlated the CTC detection with biological, pathological and clinical data. In addition, we investigated the MCPyV status in single CTCs, and compared the results with the viral status of the corresponding primary or metastatic tumor biopsies. We describe in this study two technologies for CTC detection in MCC and MCPyV detection at single cell level in order to develop tools to better understand the biology of this cancer.

Results

Phenotypic characterization of Merkel cell carcinoma (MCC) cell lines. To select markers that could be used to identify circulating MCC cells in blood samples, first we determined the phenotype of three MCC cell lines (MCCL-9, MCCL-11 and MKL-1) using markers that are commonly employed for the histopathological diagnosis of this cancer (Neuron-Specific Enolase (NSE); Synaptophysin, Chromogranin A; Cytokeratin 20 (CK20); and CD56) and markers usually used for CTCs detection (Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM); PanCK (8, 18, 19); Vimentin; CD24, CD44, CD45) (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1). All markers were first tested independently.

Concerning the MCC-specific markers, all three cell lines expressed CD56, chromogranin A and CK20, but not synaptophysin. The MCCL-9 (MCPyV[–] cell line) and MCCL-11 (MCPyV⁺) expressed NSE. However, the antibodies against chromogranin A and CD56 labeled also blood cells (Supplementary Fig. S1), precluding their use to detect circulating MCC cells in blood samples. The three MCC cell lines also expressed some of the markers used for CTC detection, particularly the cytokeratin panel (8, 18, 19) and the Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM), that is not expressed by the PBMCs (Supplementary Fig. S2). As expected, the three MCC cell lines did not express the hematopoietic marker CD45 and vimentin, a marker commonly used for mesenchymal CTC

detection but also expressed in all leukocytes. Concerning CD24 and CD44, used to identify the cancer stem cells^{29,30}, MCCL-9 and MCCL-11 cells were CD24⁻/CD44⁺, whereas the MKL-1 cell line displayed a CD24⁺/CD44⁻ profile.

On the basis of these results, we selected EpCAM, CK20 and NSE to differentiate circulating MCC cells from normal blood cells, and CD45 as exclusion marker. We tested all the antibodies against the selected markers together to ensure that binding/detection was not hampered by any steric obstruction (Supplementary Fig. S3).

Detection of MCC cells in spiking experiments. To test whether these markers could identify MCC cells in blood, we spiked a known number of MCCL-9, MCCL-11, or of MKL-1 cells into blood of different healthy donors to mimic blood samples from patients with MCC. We detected MCC cells in these blood samples using the CellSearch system (an EpCAM-positive enrichment method based on magnetic beads selection combined with an immunocytochemical staining to identify CTCs), and the new workflow that combines RosetteSep for negative enrichment, by forming a network of unwanted blood cells discarded after blood centrifugation on a density medium, combine with the DEPArray, a dielectrophoresis technology allowing visual selection and single cell sorting, for cell identification. At least three experiments were done for each cell lines with each detection methods.

MCC CTC detection using the CellSearch system. We determined the CellSearch system recovery rate by spiking 100, 50 and 25 MCCL-9, MCCL-11 or MKL-1 cells in 7.5 mL of blood (Fig. 2A–C). Although, 50 to 70% of spiked cells were selected as potential events to review by the CellSearch software, we could identify as tumor cells only 8.5% of MCCL-9, 13.1% of MCCL-11 and 8.8% of MKL-1 cells by strictly following the CellSearch instructions according to which a CTC is a cell with cytokeratin staining larger than the nucleus (DAPI) (Fig. 3A). Specifically, we detected 7.8%, 13% and 4.6% of MCCL-9 cells (n = 3), 7.7%, 13.7% and 18% of MCCL-11 cells (n = 3) and 10.3%, 4.5% and 11.5% of MKL-1 cells (n = 3) in the blood samples when 100, 50 or 25 MCC cells were spiked in, respectively. Indeed, as already described in the literature, the cytokeratin network in MCC cells can be observed as a dot²⁷. When following carefully the CellSearch' instructions, these events cannot be identified and validated as CTCs, which could explain the few numbers of CTCs detected in spiking experiments. An adaptation of CellSearch cassette reading should be necessary to obtained better recovery rates. Moreover, as anti-PD-L1 immunotherapy is the newly FDA-approved treatment for metastatic MCC³¹, we defined the status for PD-L1 expression of the three MCC cell lines based on our optimized protocol already described in Mazel *et al. Mol Oncol* 2015³². The addition of an anti-PD-L1 antibody in the 4th channel of the CellSearch system indicated that the three MCC cell lines did not express PD-L1.

CTC detection using the RosetteSep–DEPArray (R-D) workflow. For the R-D workflow, we added the same numbers of MCCL-9, MCCL-11 and MKL-1 cell lines to 10 mL healthy donor blood samples. As this procedure has not been validated yet (differently from the CellSearch system), we evaluated each step of the workflow. (Fig. 4) First, we determined the enrichment yield as the number of calcein-labeled cells (63% for MCCL-9, 74% for the MCCL-11- and 53% for the MKL-1-spiked samples; n = 3). Then, we incubated the enriched cells with the antibody cocktail described in Material and Methods to determine the labeling yield (43.6% for MCCL-9, 58% for MCCL-11 and 60% for MKL-1 cells).

After the RosetteSep enrichment step, we loaded labeled cells in DEPArray cartridge. The three MCC cell lines were detected by DEPArray (Fig. 2D–F). Cells identified as tumor cells were EpCAM and/or CK20 (+) (FITC) (fluorescence intensity > 400), NSE (+/–) (APC), DAPI (+) and CD45 (–) (PE). The three cell lines were positive for CK20/EpCAM and negative for CD45 (exclusion marker, specific of leukocytes) and only MCCL-9 and MCCL-11 were positive for NSE. As observed with CellSearch, CK staining was displayed as a dot in MCC cell lines. With the R-D workflow, we recovered 8.3% of MCCL-9, 13.3% of MCCL-11 and 5.3% of MKL-1 cells (Fig. 3B). Specifically, we detected 5.8%, 8.8%, 10.3% of MCCL-9 (n = 3), 22%, 10.9% and 6.2% of MCCL-11 cells (n = 3), and 7.1%, 6.5% and 2.4% of MKL-1 cells (n = 3) in the samples with 100, 50 and 25 MCC cells, respectively. The estimated detection threshold of the R-D workflow was about 25 cells per 10 mL of blood (Fig. 3B). Moreover, blood samples from healthy donors (n = 3) were tested with this new workflow and no CTCs were detected.

In conclusion, both methods (CellSearch and R-D workflow) showed comparable recovery rates for tumor cell detection. However, only the R-D workflow allowed the direct cell sorting after the detection step.

MCPyV status of single tumor cells – Proof of concept using MCC cell lines. After the CellSearch analysis or the negative enrichment with RosetteSep, MCC cells were sorted with the DEPArray as single cells or as a pool. Then, we determined the presence of MCPyV DNA using genomic DNA obtained by Whole Genome Amplification (WGA) of single MCC cells with the *Ampli1* WGA kit (MENARINI SILICON BIOSYSTEMS). Quantitative PCR (qPCR) analysis with primers that target the VP2/3 region of MCPyV confirmed that MCPyV DNA was present in MKL-1 and MCCL-11 but not in the MCCL-9 cells. The qPCR targeting VP2/3 of MCPyV was compared with a qPCR targeting the C-terminal part of the large T antigen of MCPyV. We could observe that both methods detect MCPyV in DNA of MCCL-11 and MKL-1 cell line from DNA extraction, and not in MCCL-9 cell line. However, the MCPyV was detected in DNA of single cell of MCCL-11 and MKL-1 only with the qPCR targeting the VP2/3 region of MCPyV. This data demonstrates that single MCC cells can be used to assess the MCPyV status with the qPCR targeting VP2/3.

Patients' characteristics. To test whether these two methods could detect MCC CTCs, we used 28 blood samples from 19 patients with stage I/II (n = 8; 42%), stage III (n = 7; 37%), and stage IV MCC (n = 4; 21%). The primary tumor site was on head and neck (n = 7), inferior limb (n = 5), upper limb (n = 2) and trunk (n = 2), and

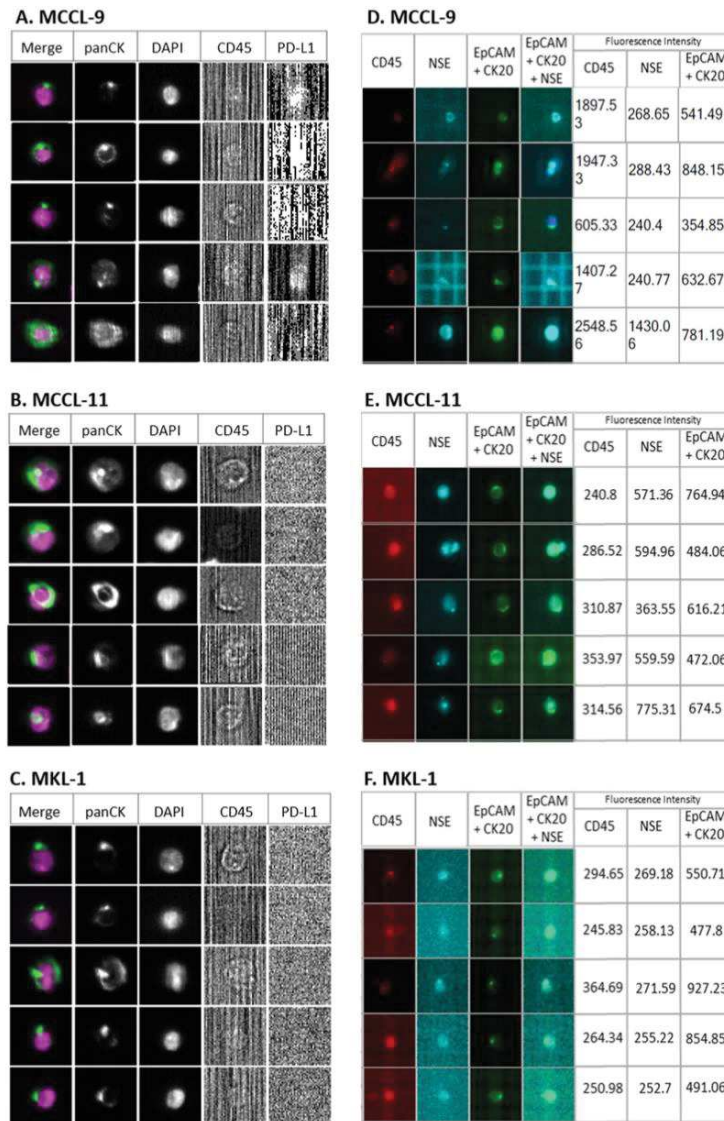


Figure 2. Representative photos of MCC cells detected in spiking experiments. Detection of (A) MCCL-9, (B) MCCL-11 and (C) MKL-1 cells added to blood from healthy donor using the CellSearch system; an anti-PD-L1 antibody was added in the fourth channel for CTC characterization in the CellSearch system. Detection of (D) MCCL-9, (E) MCCL-11 and (F) MKL-1 cells added to blood sample from healthy donors using the “RosetteSep–DEPArray” workflow; anti-CD45 conjugated to PE, anti-NSE conjugated to APC, anti-EpCAM conjugated to FITC and anti-CK20 conjugated to FITC antibodies were used for CTC detection. In DEPArray, fluorescence intensities below 400 were considered negative, according to manufacturer’s instructions. *Abbreviations:* EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule, CK: Cytokeratin. Pan: panel. NSE: Neuron-Specific Enolase.

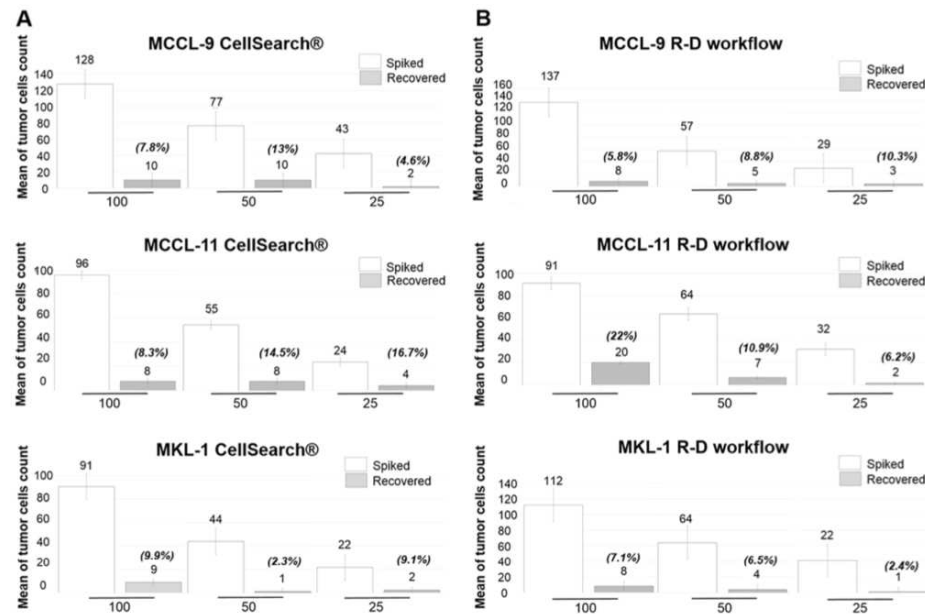


Figure 3. Number and percentages of tumor cells recovered using the CellSearch system (A) and the 'RosetteSep-DEPArray' workflow (B). Different numbers of MCCL-9, MCCL-11 and MKL-1 cells (100, 50 and 25) were spiked in blood of healthy donors (mean of 3 different experiments). The exact number of spiked tumor cells has been verified and used for the calculation of the recovery rate.

was unknown in 2 patients. All patients underwent wide surgical excision of the primary tumors followed by radiotherapy. Five patients (26%) had a history of other diseases (basal-cell carcinoma, papillary thyroid carcinoma, breast carcinoma, glaucoma, adenoma). Three of the four patients with stage IV MCC were treated with systemic chemotherapy and one with immunotherapy against PD-1 at the time of blood collection. One patient with stage I MCC was on long-term immunosuppressive treatment after kidney transplant (patient 2). Sequential blood samples were available for four patients ($n = 2$ to 6 blood samples at different times).

CTC detection in blood samples from patients with MCC. We could detect CTCs in blood samples from five patients with MCC (26% of 19) using the CellSearch system and from eight patients (42% of 19) with the R-D workflow (Table 1) and (Fig. 5). Only three patients (16%) were positive with both methods. Analysis of the correlation between clinical data and CTC presence (Table 1) showed that CTC detection with the CellSearch system correlated significantly ($p < 0.05$) with MCC stage (M_0 vs M_1). CTC detection with both methods (CellSearch and R-D workflow) was significantly associated with the number of metastases (≤ 3 vs > 3) in patients with stage IV MCC, indeed CTCs were detected in 75% of stage IV MCC patients. Comparison of the individual results suggested that the two detection methods identified different CTC sub-populations. For example, in the six blood samples of patient 17 (during chemotherapy), the CellSearch system identified more than 1000 CTCs, while the R-D workflow detected at most 18 CTCs (Table 2). Moreover, the number of CTCs detected in the subsequent samples increased with the R-D workflow (from 1 to 18), but not with the CellSearch system. For patient 10, three blood samples were collected at different time points (two before chemotherapy initiation, and one after treatment and before primary tumor surgery). The R-D workflow detected CTCs only in the first two samples (17 and 23 CTCs per blood sample), but not in the third sample after treatment. Moreover, in five patients (Patients 2, 3, 10, 12 and 13), the R-D workflow could detect up to 23 cells, whereas the CellSearch system did not detect any (Table 2). By cumulating the positivity rate of both technologies, CTC detection rate increased to 52% (10/19). Finally, all CTCs detected with the CellSearch system were PD-L1 negative.

Single CTC sequencing. After the CellSearch and RosetteSep enrichment step, we analyzed cells with DEPArray for single cell sorting; however, around 75% of the CTCs cells identified with the CellSearch system were lost in this process. We then investigated copy number variations in five single CTCs sorted with the R-D workflow to confirm their tumor origin (Fig. 6). As in one case DNA quality after WGA was too low to allow proper analysis, we could test only four single CTCs from three different patients with MCC. The two single CTCs from patient 10 displayed the same mutation profile with *TP53*, *CDH1* and *CDK6* deletions and *IDH1* gain. Two

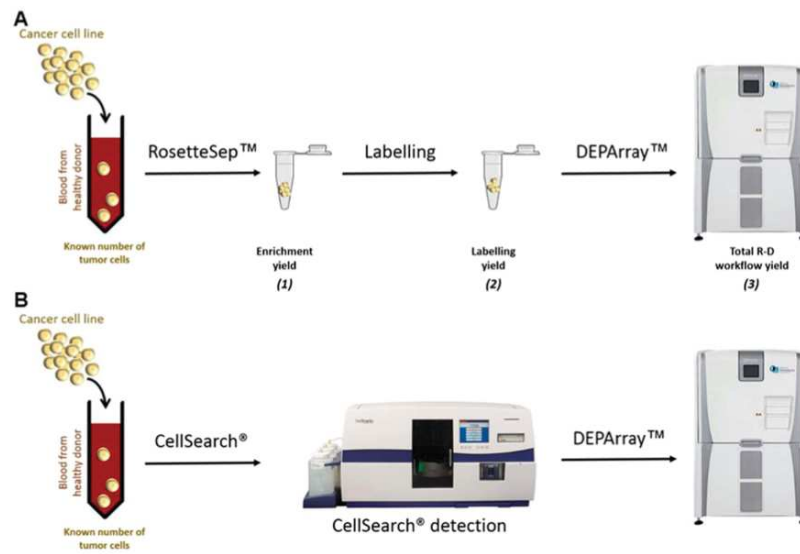


Figure 4. Illustration of RosetteSep-DEPArray workflow steps and CellSearch-DEPArray combination. (A) R-D workflow. A known number of tumor cells (Merkel cancer cell line) have been spiked in the blood of healthy donors. The recovery rate of tumor cells (yield) were calculated at each step of this R-D workflow: we counted the remaining tumor cells in the sample (1) after the enrichment step (RosetteSep), (2) after the labelling step and (3) after the detection step (DEPArray) and compared this counting with the initial number of spiked tumor cells. (B) CellSearch-DEPArray. CTCs are detected using the CellSearch system and the sample is taken from the cassette of the CellSearch to subsequently sort single CTCs with the DEPArray.

of the four samples have a ploidy of 4 (Cell n°2 from patient 10, and Cell n°1 from patient 17) may be explained by a profile identical to that at ploidy 2 recovered along with a normal diploid cell. The single cell from patient 13 had a flat profile with no significant chromosomal aberration, this sorted cell may be a leukocyte. Cell from patient 17 showed clear aberrations, involving several chromosomal regions that encompass cancer-related genes, such as *BRCA2* (deletion) and *PI3KCA* (amplification). These results confirmed the R-D workflow feasibility for detecting and sorting MCC CTCs from blood samples and the possibility of downstream single-cell genomic analyses after genomic DNA amplification.

Comparison of the MCPyV status in tissue and liquid biopsies. To compare MCPyV status in tumor tissue biopsies from patients positive for CTCs, we collected nine tumor biopsies from eight patients (two tissue biopsies were available for patient 17 of two different metastases). We could detect MCPyV only in seven tumor biopsies because of the poor genomic DNA quality of two virus-negative biopsies. In parallel, we investigated the viral status of single CTCs (Table 3). MCPyV status seems to be heterogeneous in CTCs from the same patient (intra-tumor heterogeneity). For example, in patient 17, among the 52 single CTCs we tested, only 5 (10%) were MCPyV⁺; in patient 18, only one CTC (25%) was MCPyV⁺; and in patient 10, among the 24 tested CTCs, 75% were MCPyV⁺. Overall, up to 75% of the tested CTCs appear as MCPyV⁺. These data suggest that despite the positivity of the tumor tissue biopsies, some single CTCs from the same patient can be MCPyV⁻, highlighting a possible tumor cell heterogeneity (Table 3).

Discussion

Liquid biopsy is a potential tool to closely monitor MCC, to identify patients at high risk of recurrence, to detect early clues of relapse, and to predict treatment efficacy. A few studies have addressed this issue in MCC with the quantification of (i) antibodies against large T antigen, and (ii) miR-365 in the serum. In addition, CTCs have been included as prognostic markers in MCC. Three recent studies addressed CTC detection in MCC^{26–28}, two using positive selection strategy for CTC enrichment before their detection and one using erythrocytes lysis. Conversely, our study compared two different complementary methods for CTC detection in MCC: (i) the CellSearch system, the only FDA-cleared technology for metastatic breast, prostate and colon cancer^{17–19}, and (ii) the RosetteSep and DEPArray (R-D) workflow, where CTC detection is based on negative enrichment (leukocyte depletion) followed by CTC detection by DEPArray that also allows the direct sorting of single CTCs. Our preliminary experiments performed with MCC lines indicate that both methods display similar performances. We have clearly shown that tumor cells in MCC do not express the Cytokeratin (CK) like in other cancer types. Indeed,

Clinicopathological parameter	Combined				R-D Workflow				CellSearch system						
	CTC positive ≥ 1		CTC negative		p value	R-D-CTC positive ≥ 1		R-D-CTC negative		p value	CS CTC positive ≥ 1		CS CTC negative		p value
Total patients	n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%	
19	10	53	9	47		8	42	11	58		5	26	14	74	
Age, years					1					0.369					1
≤75	5	26	4	21		5	26	4	21		2	10	7	37	
>75	5	26	5	26		3	16	7	37		3	16	7	37	
Mean	75.1														
Median	76														
Sex					0.369					0.352					0.602
Men	7	37	4	21		6	32	5	26		2	10	9	47	
Women	3	16	5	26		2	10	6	32		3	16	5	26	
AJCC stage					0.607					0.292					0.07
I/II	3	16	5	26		2	10	6	32		1	5	7	37	
III	4	21	3	16		3	16	4	21		1	5	6	32	
IV	3	16	1	5		3	16	1	5		3	16	1	5	
M0/M1					0.582					0.262					0.03
M0	7	37	8	42		5	26	10	53		2	10	13	68	
M1	3	16	1	5		3	16	1	5		3	16	1	5	
Nbr organs with metastasis					0.210					0.05					0.01
≤3	7	37	9	47		5	26	11	58		2	10	14	74	
>3	3	16	0	0		3	16	0	0		3	16	0	0	
Cancers antecedents					1					0.894					1
Yes	4	21	1	5		2	10	3	16		1	5	4	21	
No	7	37	7	37		6	32	8	42		4	21	10	53	

Table 1. Clinico-pathological characteristics and CTC detection in patients with MCC. n: number of patients; %: percentage of patients; p values calculated with the Fisher test. R-D: RosetteSep – DEPArray workflow; CS: CellSearch; p ≤ 0.05.

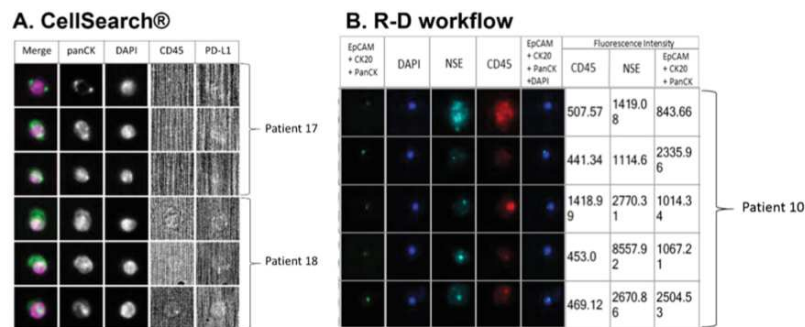


Figure 5. Representative images of CTCs from three patients with MCC. CTCs were detected using (A) the CellSearch system in blood samples of patients 17 and 18; CTCs are clearly PD-L1 negative (B7H1 antibody; 3 μg); (B) Analysis of a blood sample from patient 10 with the ‘RosetteSep-DEPArray’ workflow using the anti-CD45 conjugated to PE, anti-NSE conjugated to APC, anti-EpCAM conjugated to FITC, anti-Pan CK conjugated to FITC, and anti-CK20 conjugated to FITC antibodies. Fluorescence intensities below 400 were considered negative, according to the manufacturer’s instructions. Cytokeratin expression is detected as a dot in CTCs of patients with MCC, as described by Blom *et al.*²⁷. Abbreviations: EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule, CK: Cytokeratin. Pan: panel. NSE: Neuron-Specific Enolase.

as shown in our study, CK is frequently detected as a dot and not as a diffuse staining in the whole cytoplasm. We identified and counted CTCs only based on the strict criteria defined by the manufacturer and have missed, in a stochastic way, many of the spiked tumor cells. In our study, we included patients with an advanced disease (locally advanced, stage III, and metastatic, stage IV) as well as local cancer patients (I, II). As this cancer type is rare, the aim was to include first metastatic patients to increase the chance to detect CTCs but also localized cancer patients to assess the performance of our new technology where the cancer should be less disseminated.

Patients	Cancer stage	Blood collection	Time interval	CellSearch	R-D workflow
1	I	After diagnosis	D ₀	0	0
2	I	After diagnosis	D ₀	0	4
		After diagnosis	D ₁₂₀	0	0
3	I	After diagnosis	D ₀	0	1
4	II	After diagnosis	D ₀	0	0
5	II	After diagnosis	D ₀	0	0
6	II	After diagnosis	D ₀	2	0
7	II	After diagnosis	D ₀	0	0
8	II	After diagnosis	D ₀	0	0
9	III	After diagnosis	D ₀	2	0
10	III	After diagnosis	D ₀	NA	17
		Before chemotherapy	D ₁₄	0	23
		Under treatment	D ₁₄₁	0	0
11	III	After diagnosis	D ₀	0	0
		After diagnosis	D ₁₅₂	0	0
12	III	After diagnosis	D ₀	0	1
13	III	After diagnosis	D ₀	0	1
14	III	After diagnosis	D ₀	0	0
15	III	After diagnosis	D ₀	0	0
16	IV	Before chemotherapy	D ₀	0	0
17	IV	Before chemotherapy	D ₀	NA	0
		Under treatment	D ₇₈	NA	1
		Under treatment	D ₁₀₅	NA	9
		Under treatment	D ₁₄₂	1022	18
		Under treatment	D ₁₄₇	881	NA
		After treatment	D ₁₈₅	915	NA
18	IV	Under treatment	D ₀	10	6
19	IV	Under treatment	D ₀	32	6

Table 2. CTC detection in patients with MCC. CTC detection was performed using the CellSearch system and the RosetteSep-DEPArray (R-D) workflow in 19 patients. We could get a follow-up for four patients; 28 blood samples in total. D₀: blood sample at Day 0. The number of CTCs was normalized between the two detection methods.

In experiments performed using blood samples from patients with MCC, the CellSearch system detected CTCs in 26% of patients, and the R-D workflow in 42% of patients. The detection of CTC-positive patients increased to 52% by cumulating the positivity rate of both methodologies. We detected CTCs mostly in patients with stage III/IV MCC, but also in some patients with early-stage MCC (patient 6 with the CellSearch system, and patients 2 and 3 with the R-D workflow). CTC detection was correlated with tumor stage, presence of metastases, and number of organs with metastases.

CTC analysis at different times in four patients suggests that CTC dynamics could be correlated with the clinical outcome. Indeed, in patient 17 (non-responding stage IV MCC), CTC number (R-D workflow) slightly increased over time. In patient 10 (stage III MCC), CTC disappeared after surgery and chemotherapy that led to a reduction of lymph node metastases. However, the very short follow-up (mean: 6 months) did not allow establishing any correlation between CTC detection and clinical outcome (overall survival and progression-free survival).

Moreover, CTC evaluation by the two different methods used in this study provides complementary information. For instance, for patient 17 (stage IV MCC), the CTC yield was much higher with the CellSearch system compared with the R-D workflow. However, overall, the R-D workflow detected CTCs in more samples, probably because it identifies EpCAM⁻ CTCs, a profile that may be overlooked by the CellSearch system. Moreover, sequencing of individually sorted CTCs after the R-D workflow allowed showing specific gene gains and losses that are usually associated with malignancies, thus confirming the malignant nature of circulating cells. Therefore, the two methods are complementary and the use of both technologies in parallel may increase CTC detection rate in patients with MCC. Of note, all CTCs detected with the CellSearch system were PD-L1 negative, although metastatic MCC can be efficiently treated with PD-L1-based immunotherapy. These data suggest a heterogeneity in the primary tumor, metastases and CTCs, as previously described for other solid tumors^{33,34}.

Two previous studies on CTC detection in MCC with the CellSearch system identified CTCs in 41% of the tested patients^{27,28}. On the other hand, the Maintrac technology, based on the EpCAM/CD56 or CK20 markers for CTC detection, identified CTCs in up to 90% of patients. This very high detection rate was obtained at the cost of specificity because 30% of healthy patients also were considered as CTC-positive with the EpCAM/CK20 co-labelling²⁶.

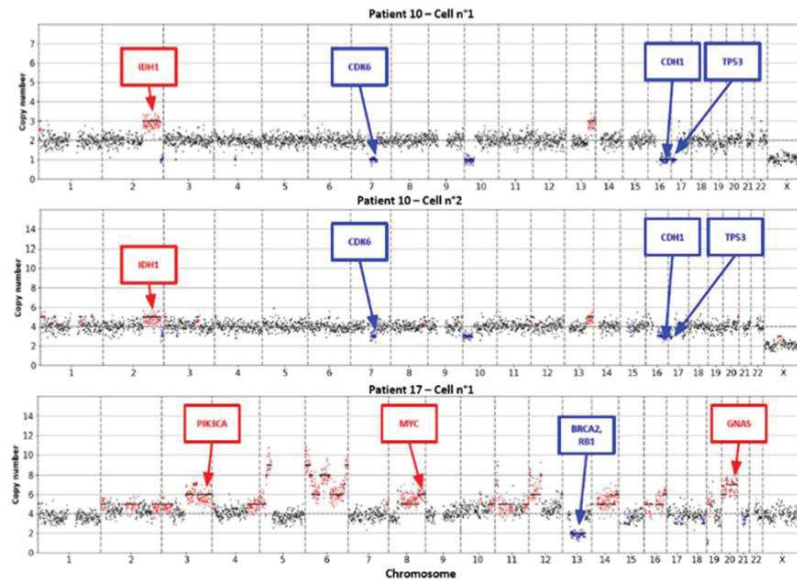


Figure 6. Copy number Aberration (CNA) in four single CTCs. The CNA profile was investigated in four single CTCs (sorted with DEPAarray) from three different patients. Three of the four single cells show aberrant chromosome profiles and can be considered as CTCs.

Patients	Tumor Status	Number of CTCs analyzed for the MCPyV status	Number of MCPyV ⁺ CTCs	Percentage of MCPyV ⁺ CTCs
6	–	0		
9	+	1	0	0%
10	+	24	18	75%
12	+	1	0	0%
13	+	2	0	0%
17 Metastasis 1	+	52	5	10%
17 Metastasis 2	–			
18	+	4	1	25%
19	+	4	1	25%

Table 3. MCPyV status of single CTCs and the corresponding tissue biopsy (primary tumor or metastases) in eight patients with MCC.

Concerning CTC molecular characterization, DEPAarray allowed the isolation of single cells after the RosetteSep- or CellSearch-based enrichment, but with considerable loss of CTCs. After WGA of single CTCs, analysis of copy number aberrations and MCPyV status in such cells showed that tumor tissue biopsies were mainly MCPyV⁺, whereas single CTCs from the same patient showed a more heterogeneous profile for detection of the polyomavirus. Heterogeneity of MCPyV status was already described, notably between primary and metastatic tumors³⁵. These discrepancies might be explained by (i) a bias of amplification of the CTC genome, (ii) a loss of viral DNA upon cancer cell detachment and dissemination, or (iii) the presence of MCPyV[–] clones in metastases, suggested by the hit-and-run theory, as discussed previously³⁶. A better understanding of the metastatic cascade biology in MCC is crucial and further insights may be more easily obtained by CTC analysis.

In conclusion, this study confirms the feasibility of CTC-based liquid biopsy in MCC and emphasizes the interest of using two different complementary approaches that may identify different CTC subsets. Although follow-up evaluations are now required to assess the clinical outcome (Progression-Free Survival and Overall

Survival), the present study allows investigations on minimal residual disease in MCC patients due to the sufficient capturing of CTCs for enumeration and subsequent characterization. Indeed, gene alterations and MCPyV status can be analyzed in single CTCs, opening new avenues for the molecular characterization of CTCs, of oncogenic events according to the tumor stage, and of tumor heterogeneity as well as for personalized patient monitoring. However, these data must be validated in larger cohorts of patients with MCC, and efforts should focus on developing a reliable, standardized and robust method to detect and enumerate CTCs in MCC. To meet this challenge, a European consortium involving scientists, dermatologists and virologists will help to achieve this goal (e.g., European Liquid Biopsy Society – ELBS).

Material and Methods

Cancer cell lines. The MCCL-9 (MCPyV-), and MCCL-11 cell lines (MCPyV+), were derived from metastatic sites³⁷ and kindly provided by Prof. Brandner (University Medical Center, Hamburg, Germany). These cancer cell lines grow on a layer of inactive F255 fibroblasts, in RPMI 1640 medium, supplied with 5 mM L-glutamine, 5 mM insulin-transferrin-selenium and 10% fetal calf serum (FCS). The MKL-1 cell line (09111801, Public Health England), derived from a lymph node MCC metastasis, is MCPyV+ and was cultured in non-adherent conditions in RPMI 1640 medium, supplemented with 5 mM L-glutamine and 10% FCS.

Flow cytometry and immunofluorescence experiment. To specifically identify circulating MCC cells, their phenotype was defined by independently testing a large panel of antibodies (Supplementary Table S1) in the three MCC cell lines. Antibodies against surface membrane markers (EpCAM, synaptophysin, CD24, CD44, CD56 and CD45) were directly added to cell samples at room temperature in the dark for 30 minutes. To evaluate the expression of different intracellular biomarkers, cells were fixed and permeabilized with CellSearch kit reagents (ref. 7900001 – MENARINI SILICON BIOSYSTEMS) at the same time of antibodies incubation (NSE, vimentin, chromogranin-A, PanCK (8, 18, 19) and CK20), for 30 minutes at room temperature, in the dark. Peripheral blood mononuclear cells were used as negative control. Cell markers were detected with a CyAn ADP Analyzer (BECKMAN COULTER) and data were analyzed with the Kaluza software (BECKMAN COULTER).

The CellSearch system is the only FDA-cleared system for CTC detection in metastatic breast, colon and prostate cancer.

CTC detection using the CellSearch system. The CellSearch system is the only FDA-cleared system for CTC detection in metastatic breast, colon and prostate cancer^{38–40}. This technology is based on the selection and detection of epithelial cells from blood samples by immunomagnetic enrichment and immunofluorescence detection. For this study, the IVD CTC kit (7900001 – MENARINI SILICON BIOSYSTEMS) was used. Briefly, blood samples collected in special CellSave tubes (MENARINI SILICON BIOSYSTEMS) were diluted and centrifuged to be loaded in the CellSearch Autoprep system. This automate performs a magnetic enrichment with an anti-EpCAM antibody coated with magnetic beads and labels the enriched cells with a cocktail of antibodies (anti-Pan CK conjugated to PE, -CD45 conjugated to APC, and DAPI dye) for immunofluorescence detection. Even CTCs with a low expression of EpCAM can be isolated using the CellSearch system⁴¹. In this study, an anti-human B7H1/PD-L1 monoclonal antibody (Cat N° FAB1561P, R&D SYSTEM) was added to the CellSearch kit to characterize PD-L1 expression in CTCs. The CellSearch cassettes positive for CTC detection were selected and cells were subsequently sorted one by one using the DEPArray System (MENARINI SILICON BIOSYSTEMS).

RosetteSep-DEPArray workflow for CTC detection. In this study, the RosetteSep-DEPArray workflow, an alternative way to enrich, detect and sort MCC CTCs, was improved. First, a negative selection with the RosetteSep technology (STEMCELL TECHNOLOGIES) was used to enrich CTCs, according to the manufacturer's instructions. Briefly, RosetteSep networks of unwanted blood cells were first formed using a cocktail of tetrameric complexes of antibodies against several blood cell markers (CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66b and glycophorin A). After rosette formation, blood samples were layered on a density gradient medium and centrifuged to separate the sample in different phases: plasma, cells of interest, and rosettes of unwanted blood cells. The cells of interest were enriched and collected on the upper layer of the density gradient medium for analysis; unwanted cells were discarded. Then, CTCs were detected using the DEPArray after labeling the enriched cells with a cocktail of antibodies against markers selected by the characterization of MCC cell lines: EpCAM, CK20, Pan CK, NSE, and CD45 (exclusion marker specific of leukocytes).

The DEPArray is a single-cell sorting technology system that uses cartridges with microfluidic chambers and dielectrophoresis cages to capture cells by charge affinity. According to the manufacturer's instructions, cells were loaded in the micro-chamber of the cartridge that is then scanned automatically using up to six fluorescent channels. In this study, FITC was used to detect epithelial markers (EpCAM, CK20 and Pan CK), APC for NSE, and PE for CD45. Cells were then selected according to their phenotype and staining pattern as either single cells or as small pools of cells with the same phenotype. With this high-tech system, rare CTCs can be used for further experiments, such as MCPyV DNA detection in single CTCs (this study).

Spiking experiments: dilution of cancer cell lines in blood from healthy donors. These experiments allowed mimicking blood samples of patients with MCC by spiking known and controlled numbers of MCC cells in blood samples of healthy donors obtained at the Établissement Français du Sang. Specifically, 100, 50, and 25 cells (MCCL-11 or MKL-1 cells) were added to 7.5 mL (CellSearch system) and 10 mL (RosetteSep-DEPArray workflow) of blood to evaluate the recovery rate and detection threshold of the two methods. MCCL-11 and MCCL-9 were suspended by pipetting, MKL-1 were dissociated using the Accumax solution (eBioscience, ref. 00–4666–56). The real number of tumor cells added to each blood sample was confirmed by counting an aliquot of diluted cells under a microscope, and the recovery rate was corrected if required. The

evaluation of the enrichment yield was determined by addition of calcein, a cell-permeant dye that labels viable cells and that allowed following the tumor cell number through all successive steps of the RosetteSep-DEPArray workflow.

DNA preparation from single/pools of CTCs and from tumor biopsies. The genome of single CTCs sorted with the DEPArray was amplified with the Ampli1 WGA kit (MENARINI SILICON BIOSYSTEMS) following the manufacturer's instructions. After genome amplification, the Ampli1 WGA Quality Control kit was used, as recommended by the supplier, to determine the DNA quality before further analyses.

MCC tissue biopsies of eight patients positive for CTCs were collected from different pathology laboratories (University Medical Centers of Montpellier and Nîmes; Hospitals of Alès, Avignon, Béziers and Perpignan; Inopath LaboSud, Inovie Group). Genomic DNA was extracted from these formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples with the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions, and was stored at -20°C until use.

Single CTC sequencing. The Ampli1 LowPass Kit for Illumina platforms (MENARINI SILICON BIOSYSTEMS) was used for preparing low-pass whole genome sequencing libraries from five single CTC cells. Libraries concentrations were then normalized and sequenced with the MiSeq System (150 SR run mode). The obtained FASTQ files were aligned to the hg19 human reference sequence using Burrows-Wheeler Aligner, version 0.7.12 (BWA)⁴². Copy-number aberrations were identified using the Control-FREEC⁴³ software (version 11.0). Ploidy level was automatically estimated by the MENARINI SILICON BIOSYSTEMS pipeline for each library, based on best fitting of the copy number profiles of the samples to the underlying copy number levels.

MCPyV DNA detection. MCPyV DNA was detected by a real-time PCR assay using primers that target the VP2/3 region [MCPyV-2.0-4367 F (5'-GGCAGCATCCCGGCTTA-3') and MCPyV-2.0-4399 R (5'-CCAAAAAGAAAAGCATCATCCA-3')], and the dual-labeled probe MCPyV-2.0-4371-Prb (5'-FAM-ATACATTGCCTTTTGGGTGTTT-BHQ1-3'), as already described by Bialasiewicz *et al.*⁴⁴.

A qPCR targeting the C-term part of the large T antigen of MCPyV was investigated using [MCV_TAG_C_fw1 (5'-AGATGGTGCTGTAGCTG-3') and MCV_TAG_C_bw1 (5'-AGGGAATCTCTTAGATTGCC-3') and the dual-labeled probe MCV_TAG_C_p1 (5'-6-FAM-TTCTCCTTGATTGTTACTGCTAATGATTATTT-BBQ-3')], as described by Schmitt *et al.*⁴⁵

Investigation of MCPyV detection in FFPE DNA was done on normalized concentration at 40 ng/ μL . For amplified DNA from single cells, the amount was not known, thus 5 μL of WGA product was used for the MCPyV detection. Positive samples were samples where the MCPyV signal was observed before the 40th cycle of the qPCR.

Blood collection from healthy donors and MCC patients. After signature of the informed consent by all participants in this study, peripheral blood samples were collected. All the experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and were approved by the Bioethical Committee of the University Medical Center of Montpellier 'IRB' (No 2018_IRB_MTP_12-07). Blood samples from 19 patients with MCC followed at the Department of Dermatology (University Medical Center of Montpellier) between October 2017 and January 2019 were collected in Cell-Free DNA BCT tubes (STRECK) and CellSave tubes (MENARINI SILICON BIOSYSTEMS), then processed within 24 hours after blood collection using the RosetteSep-DEPArray workflow and the CellSearch system. In total, 28 blood samples were analyzed. Blood samples from three healthy donors have been provided by the Établissement Français du Sang.

Statistical analysis. The correlation between clinico-pathological characteristics and CTC detection was analyzed using the Fisher's exact test. Results were considered significant when $p \leq 0.05$. Age, sex, American Joint Committee on Cancer (AJCC) tumor stage, absence/presence of distant metastases (M_0/M_1), number of organs with metastases and cancer antecedents were compared in patients with CTC detected by combining both complementary technologies and by using each method separately.

Received: 26 August 2019; Accepted: 29 December 2019;

Published online: 31 January 2020

References

- Hodgson, N. C. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J. Surg. Oncol.* **89**, 1–4, <https://doi.org/10.1002/jso.20167> (2005).
- Reichgelt, B. A. & Visser, O. Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993-2007. *Eur. J. Cancer* **47**, 579–585, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.11.002> (2011).
- Kouzmina, M., Koljonen, V., Leikola, J., Bohling, T. & Lantto, E. Frequency and locations of systemic metastases in Merkel cell carcinoma by imaging. *Acta Radiol Open* **6**, 2058460117700449, <https://doi.org/10.1177/2058460117700449> (2017).
- Kukko, H. *et al.* Merkel cell carcinoma - a population-based epidemiological study in Finland with a clinical series of 181 cases. *Eur. J. Cancer* **48**, 737–742, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.06.001> (2012).
- Llombart, B., Requena, C. & Cruz, J. Update on Merkel Cell Carcinoma: Epidemiology, Etiopathogenesis, Clinical Features, Diagnosis, and Staging. *Actas Dermosifiliogr.* **108**, 108–119, <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.07.022> (2017).
- Chang, Y. & Moore, P. S. Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **7**, 123–144, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130227> (2012).
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Sci.* **319**, 1096–1100, <https://doi.org/10.1126/science.1152586> (2008).
- Becker, J. C. *et al.* Merkel cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17077, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.77> (2017).
- Cheng, J. *et al.* Merkel cell polyomavirus recruits MYCL to the EP400 complex to promote oncogenesis. *PLoS Pathog.* **13**, e1006668, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006668> (2017).
- Verhaegen, M. E. *et al.* Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Initiates Merkel Cell Carcinoma-like Tumor Development in Mice. *Cancer Res.* **77**, 3151–3157, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0035> (2017).

11. Houben, R. *et al.* Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J. Virol.* **84**, 7064–7072, <https://doi.org/10.1128/JVI.02400-09> (2010).
12. Carter, M. D. *et al.* Genetic profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma show links between combined and pure MCPyV-negative tumors. *Hum. Pathol.* **71**, 117–125, <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.10.014> (2018).
13. Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. reviews. Cancer* **14**, 623–631, <https://doi.org/10.1038/nrc3820> (2014).
14. Pantel, K. & Alix-Panabieres, C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* **16**, 398–406, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.001> (2010).
15. Hong, Y., Fang, F. & Zhang, Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int. J. Oncol.* **49**, 2206–2216, <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3747> (2016).
16. Pantel, K. & Alix-Panabieres, C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3> (2019).
17. Cristofanilli, M. *et al.* The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **134**, 39–45, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.12.004> (2019).
18. Huang, X. *et al.* Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC Cancer* **15**, 202, <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1218-9> (2015).
19. Scher, H. I. *et al.* Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1348–1355, <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.3487> (2015).
20. Lianidou, E. S., Strati, A. & Markou, A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **51**, 160–171, <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.896316> (2014).
21. Mateo, J., Gerlinger, M., Rodrigues, D. N. & de Bono, J. S. The promise of circulating tumor cell analysis in cancer management. *Genome Biol.* **15**, 448, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0448-5> (2014).
22. Yu, M. *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Sci.* **339**, 580–584, <https://doi.org/10.1126/science.1228522> (2013).
23. Fan, K. *et al.* Circulating Cell-Free miR-375 as Surrogate Marker of Tumor Burden in Merkel Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **24**, 5873–5882, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1184> (2018).
24. Samimi, M. *et al.* Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **174**, 813–822, <https://doi.org/10.1111/bjd.14313> (2016).
25. Paulson, K. G. *et al.* Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of Merkel cell carcinoma: A prospective validation study. *Cancer* **123**, 1464–1474, <https://doi.org/10.1002/cncr.30475> (2017).
26. Gaiser, M. R. *et al.* Evaluating blood levels of neuron specific enolase, chromogranin A, and circulating tumor cells as Merkel cell carcinoma biomarkers. *Oncotarget* **6**, 26472–26482, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4500> (2015).
27. Blom, A. *et al.* Clinical utility of a circulating tumor cell assay in Merkel cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 449–455, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.10.051> (2014).
28. Riethdorf, S. *et al.* Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells in Patients with Merkel Cell Carcinoma. *Clin. Chem.* <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.297028> (2019).
29. Li, W. *et al.* Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci. Rep.* **7**, 13856, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2> (2017).
30. Horimoto, Y. *et al.* Combination of Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24 Is Superior to ALDH1 as a Prognostic Indicator in Breast Cancer Patients with Distant Metastases. *PLoS One* **11**, e0165253, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165253> (2016).
31. Samimi, M. Immune Checkpoint Inhibitors and Beyond: An Overview of Immune-Based Therapies in Merkel Cell Carcinoma. *Am J Clin Dermatol.* <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00427-9> (2019).
32. Mazel, M. *et al.* Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol. Oncol.* **9**, 1773–1782, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.05.009> (2015).
33. Zhang, X. *et al.* Differential expressions of PD-1, PD-L1 and PD-L2 between primary and metastatic sites in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* **19**, 360, <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5578-4> (2019).
34. von Hardenberg, J. *et al.* Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Status and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Hot Spots of Primary and Liver Metastases in Prostate Cancer With Neuroendocrine Differentiation. *Clin. Genitourin. Cancer* **17**, 145–153 e145, <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.12.007> (2019).
35. Haymerle, G. *et al.* Expression of Merkelcell polyomavirus (MCPyV) large T-antigen in Merkel cell carcinoma lymph node metastases predicts poor outcome. *PLoS One* **12**, e0180426, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180426> (2017).
36. Houben, R. *et al.* Merkel cell carcinoma and Merkel cell polyomavirus: evidence for hit-and-run oncogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 254–256, <https://doi.org/10.1038/jid.2011.260> (2012).
37. Fischer, N., Brandner, J., Fuchs, F., Moll, I. & Grundhoff, A. Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. *Int. J. Cancer* **126**, 2133–2142, <https://doi.org/10.1002/ijc.24877> (2010).
38. Cristofanilli, M. *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 781–791, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040766> (2004).
39. Cohen, S. J. *et al.* Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3213–3221, <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.8923> (2008).
40. de Bono, J. S. *et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6302–6309, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0872> (2008).
41. de Wit, S. *et al.* EpCAM(high) and EpCAM(low) circulating tumor cells in metastatic prostate and breast cancer patients. *Oncotarget* **9**, 35705–35716, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26298> (2018).
42. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma.* **25**, 1754–1760, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324> (2009).
43. Boeva, V. *et al.* Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data. *Bioinforma.* **28**, 423–425, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr670> (2012).
44. Bialasiewicz, S., Lambert, S. B., Whiley, D. M., Nissen, M. D. & Sloots, T. P. Merkel cell polyomavirus DNA in respiratory specimens from children and adults. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 492–494, <https://doi.org/10.3201/eid1503.081067> (2009).
45. Schmitt, M., Wieland, U., Kreuter, A. & Pawlita, M. C-terminal deletions of Merkel cell polyomavirus large T-antigen, a highly specific surrogate marker for virally induced malignancy. *Int. J. Cancer* **131**, 2863–2868, <https://doi.org/10.1002/ijc.27607> (2012).

Acknowledgements

Buson Genny, Marianna Garonzi for the help in generating libraries and analyzing the Ampli1 LowPass data, and Prof. Brandner (University Medical Center, Hamburg, Germany) for giving us the MCCL-9 and MCCL-11 cell lines. The solid MCC biopsies were collected from the Pathology laboratories of two University Medical Centers (CHU of Montpellier and Nîmes, France), of different hospitals (Hospitals of Alès, Avignon, Béziers and Perpignan, France) and from Inopath LaboSud – Inovie Group, Montpellier, France. We thank Dr. Elisabetta

Andermarcher for assistance with her comments and proof-reading that greatly improved the manuscript. The authors received support from 'La Ligue Contre le Cancer' in the form of a PhD studentship (Magali Boyer).

Author contributions

C.A.-P. and L.C. conceived the concepts of the research. O.D. included the MCC patients. M.B., L.C., F.G. and V.F. performed the experiments including cell lines characterization, blood samples analysis and molecular characterization. M.B. analyzed the data. M.B. wrote and all the authors revised the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58572-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.A.-P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



Review

Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma

Magali Boyer ^{1,†}, Laure Cayrefourcq ^{1,†}, Olivier Dereure ², Laurent Meunier ³, Ondine Becquart ³ and Catherine Alix-Panabières ^{1,*}

¹ Laboratory of Rare Human Circulating Cells, University Medical Centre of Montpellier, 34093 Montpellier, France; m-boyer@chu-montpellier.fr (M.B.); l-cayrefourcq@chu-montpellier.fr (L.C.)

² Department of Dermatology and INSERM 1058 Pathogenesis and Control of Chronic Infections, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France; o-dereure@chu-montpellier.fr

³ Department of Dermatology, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France; l-meunier@chu-montpellier.fr (L.M.); o-becquart@chu-montpellier.fr (O.B.)

* Correspondence: c-panabieres@chu-montpellier.fr; Tel.: +33-4-1175-99-31; Fax: +33-4-1175-99-33

† These authors contributed equally to this work.

Received: 4 March 2020; Accepted: 10 April 2020; Published: 13 April 2020



Abstract: Melanoma and Merkel cell carcinoma are two aggressive skin malignancies with high disease-related mortality and increasing incidence rates. Currently, invasive tumor tissue biopsy is the gold standard for their diagnosis, and no reliable easily accessible biomarker is available to monitor patients with melanoma or Merkel cell carcinoma during the disease course. In these last years, liquid biopsy has emerged as a candidate approach to overcome this limit and to identify biomarkers for early cancer diagnosis, prognosis, therapeutic response prediction, and patient follow-up. Liquid biopsy is a blood-based non-invasive procedure that allows the sequential analysis of circulating tumor cells, circulating cell-free and tumor DNA, and extracellular vesicles. These innovative biosources show similar features as the primary tumor from where they originated and represent an alternative to invasive solid tumor biopsy. In this review, the biology and technical challenges linked to the detection and analysis of the different circulating candidate biomarkers for melanoma and Merkel cell carcinoma are discussed as well as their clinical relevance.

Keywords: cancer; skin cancers; liquid biopsy; biomarkers; melanoma; merkel cell carcinoma

1. Introduction

This review discusses the most recent data on liquid biopsy in patients with melanoma, the most common skin cancer with high prevalence in US and European populations [1], or Merkel Cell Carcinoma (MCC), a skin tumor with a disease-associated mortality rate even higher than that of melanoma [2]. Due to their high mortality rate, new technologies are needed to improve the patient outcome. Particularly, specific biomarkers are required to facilitate their diagnosis and management. For a long time, cancer study was based on the analysis of specimens from the primary tumor or its metastases and on imaging data. The current limitations of tumor tissue biopsies and clinical imaging for cancer diagnosis and molecular profiling have led to the development of liquid biopsy. Indeed, tumor biopsy is an invasive procedure, and tumor tissue (especially in patients with cutaneous melanoma) is not always available. Therefore, liquid biopsy, a blood-based analysis of tumor-specific biomarkers, has been introduced as a new diagnostic approach that relies on circulating tumor cells (CTCs) and on circulating tumor-derived factors, such as cell-free tumor DNA (ctDNA), microRNAs (miRNA) and exosomes. The ultimate goal of liquid biopsy is to use the information gathered from such cells and factors to predict early cancer progression and to longitudinally monitor the treatment

response, for a personalized medicine of patients with cancer. In melanoma, liquid biopsy has been already used to study many biomarkers (e.g., CTCs, ctDNA and exosomes), and its clinical pertinence is currently investigated in various clinical trials. For MCC, studies are in the early days and very few articles have been published. Moreover, no clinical trial is assessing liquid biopsy in MCC. In this review, we describe the circulating biomarkers and discuss the technical challenges and the clinical relevance of liquid biopsy for these two skin malignancies.

2. Melanoma

Melanoma represents only 10% of all skin malignancies, but is one of the most aggressive cancers, responsible for approximately 80% of all skin cancer-related deaths [3]. Risk factors are well known and include acute sun exposure during childhood, teenage and early adulthood, genetic background, skin pigmentation features and number of naevi [4]. Its incidence is steadily increasing in most western countries. Melanoma can be surgically cured if detected at early stages, but survival rates are drastically reduced when discovered at advanced stages. The main issue for melanoma management is the huge heterogeneity of molecular changes that can occur during the disease course. Liquid biopsy might represent a valuable tool especially in high-risk patients with advanced stage melanoma (IIc, III and IV) because currently, no melanoma-specific blood-based biomarker test is available. Biomarkers could be used to provide “real-time” snapshots of the cancer before, during and after specific treatments. Different groups have been working on strategies to monitor melanoma course and therapy responses by measuring circulating markers, such as CTCs, ctDNA and miRNA [5]. Here, we will review the most recent advances.

2.1. Circulating Tumor Cells

Originally, liquid biopsy was developed to study CTCs [6]. CTCs are cancer cells that are released by the primary tumor and/or metastases in the circulation. Due to cancer cell short half-life, CTC detection, count and characterization offer real-time data on the cancer status. Moreover, they can bring insights into the heterogeneity of the melanoma cell population. The detection of Circulating Melanoma Cells (CMCs) was described for the first time in 1991. Since then, the many studies on CMCs from patients with melanoma at different stages and using different detection approaches have given conflicting results [7].

2.1.1. Biology

Melanoma cells do not express epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), the classical epithelial cell surface marker that is at the basis of most CTC isolation strategies [8]. Therefore, alternative approaches based on the large size of primary melanoma cells have been developed to isolate CMCs by filtration, and several melanoma-specific cell surface epitopes have been tested for CTC enrichment [9]. Indeed, as metastatic melanoma is a highly heterogeneous tumor, CMCs may display different phenotypes and functional states. For example, nestin, CD133 [10], receptor activator of NF- κ B (RANK) [11], ABCB5 [12], CD20 [13] and CD271 [14] have been proposed as potential candidates for the identification of melanoma-initiating cells. However, the diversity of markers limits the possibility to compare studies and reduces the significance of the obtained results.

Melanoma is one of the malignancies which present the highest mutation landscape, mainly caused by carcinogenic ultraviolet (UV) light exposure and other mutational process. The most common genomic alterations studied in melanoma are BRAF, NRAS, TP53, CDKN2A, PTEN, NF1, KIT, RAC1 and TERT [15,16]. Despite the lack of clear clinical relevance of most mutations, some exceptions exist, for example, BRAF V600 mutations clearly predict sensitivity to inhibitors of BRAF and MEK [15]. Interestingly, recent studies suggest that the mutational heterogeneity of melanoma cells might influence their volume and the expression of surface markers. For example, activation of the RAS/RAF pathway drives the expression of HMW-MAA, commonly used as a surface marker for CMC enrichment [17,18]. Georges et al. also reported that the RAS/RAF-mutated cohort present a

larger proportion of surface marker-positive cells (e.g., CSPG4/MCAM) compared to the non-RAF/RAS mutated cohort and concluded that the positive enrichment method based on surface markers could be biased by the mutational status of the cells which lead to the loss of subsets of CTCs [19]. On the other hand, treatment with BRAF inhibitors decreases the volume of enlarged BRAF-mutated melanoma cells in a glucose-dependent manner [20].

CTC analysis showed not only their genomic heterogeneity and phenotypic diversity, but also their ability to form clusters and to escape the immune system [21]. Indeed, CMCs can be detected as circulating clusters [22]. Studies in other cancer types demonstrated that in clusters, CTCs display a higher metastatic potential with longer survival and reduced apoptosis following dissemination despite a faster clearance [23,24]. Concerning the immune system escape, it is well known that programmed death-ligand 1 (PD-L1)-positive cancer cells are not detected and destroyed by immune cells because its expression hinders their recognition as tumor cells [25]. This observation led to the development of immune checkpoint inhibitors, antibodies against PD-L1 and its receptor PD-1, with a remarkable clinical response in different malignancies, particularly in melanoma.

2.1.2. Technological Challenges

In the first studies on CMCs, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were used to amplify different melanoma-specific transcripts. Several studies have showed that CTC detection is associated with disease progression in patients with advanced melanoma [26–31]. However, the use of CTC data for the management of patients with melanoma has not been incorporated in the clinical practice, probably because different, non-standardized methodologies were used.

During the last decade, the CellSearch[®] system (Menarini Silicon Biosystems Inc), a standardized, US Food Drug Administration (FDA)-cleared methodology for CTC detection (for metastatic breast, colon and prostate cancer) has been intensively evaluated as a prognostic tool in patients with different metastatic solid tumors. A CellSearch[®] Circulating Melanoma Cell Kit is also available. Despite the limited number of studies on this kit, they all reported similar results: detection of two or more CMCs in approximately 25% of patients with metastatic melanoma, and significant association of CMC detection with overall survival (OS) [9,32,33].

In parallel, many other new technologies have been developed to overcome the challenge of CMC detection. Different microfluidic chips and biosensors have been tested in patients with melanoma [34–40]; however, the multiplicity of procedures reduces their potential clinical utility, like previously observed for RT-PCR-based methods.

Another very new and interesting technology might overcome the low sensitivity of the available CTC assays by analyzing larger blood volumes. For instance, the *in vivo* photoacoustic flow cytometry platform uses a high pulse rate laser and focused ultrasound transducers for transcutaneous label-free detection of CMCs. This method is called “Cytophone platform”, and detected individual CMCs, clots and CMC-clot emboli in 27 of the 28 patients with melanoma under study [22].

2.1.3. Clinical Relevance

CMCs as liquid biopsy are not routinely used in clinical practice because of the lack of robust and consistent results. As discussed before, the variety of technologies diminish the statistical power of the collected data. Furthermore, reproducible results, like those obtained with the CellSearch[®] CMC kit, are not yet of clinical interest because they evaluated the association between CMCs and OS only in patients with advanced disease and short survival probability and should be expanded to patients with non-metastatic melanoma.

Most of the previously described technologies have been tested in patient cohorts enrolled in clinical trials to validate their potential clinical application. Among the eleven studies currently registered in the *ClinicalTrials.gov* database (Table 1), five are devoted to the technological validation and OS evaluation in patients with metastatic melanoma. This specific population is often preferred for the validation of new technologies because it is more likely to find high CMC numbers in patients

with metastatic melanoma. The other six studies listed in the *ClinicalTrials.gov* database are assessing CTCs as biomarkers for monitoring the therapy response. The goal is to identify a biomarker that can predict therapy failure before clinical relapse. For instance, changes in the number of CTCs might reflect the treatment efficacy.

Indeed, in these last years, several innovative systemic therapies for the treatment of metastatic melanoma have emerged and novel first-line therapies have replaced conventional treatments. The FDA has approved several inhibitors that target the proto-oncogene serine/threonine-protein kinase BRAF mutated at V600E (BRAFFV600E) and mitogen-activated protein kinase (MEK), as well as immune checkpoint inhibitors against cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) and PD-1 for the management of patients with advanced-stage melanoma [41]. These therapies have greatly improved the OS of patients with advanced disease; however, some patients will not benefit from these treatments, and many will become resistant [42]. For example, although most patients responded well in the beginning of treatment to BRAF inhibitors, a rapid development of drug resistance has been observed while anti-CTLA4 or anti-PD1 treatment demonstrated a durable response but only in a small fraction of patients (20–30% in monotherapy). With the widening of the indications for these therapies, clinicians are often faced with decisions concerning the clinical benefits relative to the risk of adverse events and the costs of these treatments.

Interestingly, a new study evaluated whether PD-L1 expression on CTCs can serve as a predictive biomarker of clinical benefit and response to the anti-PD-1 treatment pembrolizumab on melanoma patients [43]. Their results showed better response rates in patients with PD-L1⁺ CTCs at baseline and an enhanced progression-free survival (PFS) at 12 months for PD-L1⁺ CTC patients compared with PD-L1⁻ CTC patients. These data suggest that PD-L1 expression on CTC may predict response to pembrolizumab in advanced melanoma patients. Even if these results need further validation in a larger cohort of patients, they indicate that liquid biopsy might be a useful tool to stratify patients more likely to respond to immunotherapy.

Table 1. Circulating Tumor Cells (CTCs) in melanoma: clinical studies listed in the *ClinicalTrials.gov* database.

N°	Status	Study Title	Cancer	Location	Outcomes	Measurements
1	Completed	Culture and Characterization of Circulating Tumor Cells (CTC) in Melanoma and Other Cancers	Melanoma and other cancers	Comprehensive Cancer Centers of Nevada, Las Vegas, Nevada, United States	Technological validation Survival evaluation	CTC culture and analysis
2	Completed	Study of Circulating Tumor Cells Before and After Treatment in Patients with Metastatic Melanoma	Metastatic Melanoma	CHU of Nice, Nice, France	CTC evaluation from pre- to post-treatment Survival evaluation	CTC analysis Treatment follow-up
3	Recruiting	Biomarker Analysis Using Circulating Tumor Cells in Patients with Melanoma	Melanoma Stage I-IV	Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania Philadelphia, Pennsylvania, United States	CTC evaluation during treatment	CTC analysis Treatment follow-up
4	Completed	Circulating Tumor Cells and Melanoma: Comparing the EPISPOT and CellSearch Techniques	Metastatic Melanoma	CHU of Montpellier, Montpellier, France	Technological validation	CTC analysis
5	Recruiting	In Vivo Real-time Detection of Circulating Melanoma Cells	Melanoma Stage I-IV	CHU of Nîmes, Nîmes, France University of Arkansas for Medical Sciences Little Rock, Arkansas, United States	Survival evaluation Technological validation	CTC analysis
6	Recruiting	Ex Vivo Expansion of Circulating Tumor Cells as a Model for Cancer Predictive Pharmacology	Melanoma Stage III-IV	Saint-Louis Hospital Paris, France	Therapeutic response Survival evaluation	CTC culture and analysis
7	Unknown †	Concurrent Ipilimumab and Stereotactic Ablative Radiation Therapy (SART) for Oligometastatic But Unresectable Melanoma	Melanoma Stage III-IV	Comprehensive Cancer Centers of Nevada Las Vegas, Nevada, United States	Therapy and Survival evaluation Safety and Tolerability evaluation	Gene mutations, serum markers and CTC analysis Treatment follow-up
8	Active, not recruiting	Molecular Characterization of Advanced Stage Melanoma by Blood Sampling	Metastatic Melanoma	CHU of Reims Reims, France	Technological validation Survival evaluation	ctDNA and CTC analysis
9	Recruiting	Lymphodepletion Plus Adoptive Cell Transfer with or Without Dendritic Cell Immunization in Patients With Metastatic Melanoma	Metastatic Melanoma	University of Texas MD Anderson Cancer Center Houston, Texas, United States	Therapy and Survival evaluation	T cells and CTC analysis Treatment follow-up
10	Completed	High-activity Natural Killer Immunotherapy for Small Metastases of Melanoma	Metastatic Melanoma	Fuda Cancer Institute of Fuda Cancer Hospital Guangzhou, Guangdong, China	Therapy and Survival evaluation	Serum markers, lymphocytes and CTC analysis Treatment follow-up
11	Unknown †	Circulating Melanoma Cells in Metastatic Patients Treated with Selective BRAF Inhibitors	Metastatic Melanoma	Istituto Oncologico Veneto IRCCS Padova, Italy	CTC evaluation during treatment Survival evaluation	CTC Analysis Treatment follow-up

CHU: University hospital center, CTC: circulating tumor cell, ctDNA: circulating tumor DNA.

2.2. Circulating Tumor DNA

Among the many biomarkers used in melanoma, ctDNA is already considered a valuable tool for monitoring the therapy response [44–46]. For instance, it has been shown that the increase of ctDNA level in the plasma of patients with BRAF-mutated melanoma treated with targeted therapies precedes the detection of relapses by imaging and by clinical evaluation [47]. Moreover, the main explanation for targeted therapy failure is the emergence of new mutations in cancer cells that can bypass the initial molecular targets. Therefore, ctDNA might help to determine the new mutation landscape and to define new personalized therapeutic orientations. Finally, ctDNA can also be a source of genetic material for additional molecular investigations [3], including the longitudinal follow-up of the epigenetic profile during the disease course.

2.2.1. Biology

The term ctDNA defines short DNA fragments (<166 pb) that are released from cancer cells in the circulation. They are a part of the cell-free DNA (cfDNA) present in plasma, usually released from cells in a state of apoptosis or necrosis. In cancer, the cell turn-over increases and leads to higher cfDNA amounts in plasma [48]. Several studies showed that ctDNA is a good biomarker for the follow-up of patients with metastatic cancer [49–52]. Indeed, due to its short half-life (about 2 h), it is representative of the real-time molecular changes in the tumor [53] and might alert about the emergence of new mutations. ctDNA has been used as a biomarker in patients with breast [54,55], colon [56] and lung [57,58] cancer, and its presence has been linked to the diagnosis [59,60], prognosis [61–63] and also follow-up of the disease [50,64–68]. ctDNA level has been associated with the overall response rate and also with PFS [47,69]. It also reflects the tumor mutational burden [70]. Therefore, ctDNA has a clinical value for cancer surveillance [47,71].

2.2.2. Technological Challenges

As plasma contains a huge amount of biological material (e.g., cfDNA from healthy cells, exosomes), technologies must be very sensitive to detect the low concentration of ctDNA relative to all the circulating DNA released from non-tumor cells. Technologies must also be sensitive enough to detect single-nucleotide mutations present at low frequency in ctDNA. In their review, Diefenbach et al. [72] listed the methods used to detect ctDNA in patients with melanoma and classified them in two main groups: PCR-based and sequencing-based methods. In the first group, droplet digital PCR [73,74] is sensitive, but needs the previous knowledge of the genetic rearrangements [75], like allele-specific PCR and the Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics (BEAMing) digital PCR methods [76]. To try to improve detection of ctDNA mutation, such as BRAF or KRAS, some methods were developed, such as the Allele-Specific Locked Nucleic Acid Quantitative PCR (ASLNAqPCR) [77]. This method will block the amplification of wild-type sequences and the mutated sequences will then be increased and detection will be easier. Next-generation sequencing (NGS)-based approaches have the same limitations of PCR-based methods concerning the low abundance of ctDNA compared with standard sequencing samples. Among these methodologies, the Illumina, ThermoFisher Ion Torrent and Roche sequencing platforms have already been used for ctDNA analysis in patients with melanoma. The cost of whole-genome and whole-exome sequencing is also a limitation and more targeted sequencing approaches could be envisaged [72]. In addition, as the typical NGS panels target common somatic driver mutations of cancer, some mutations linked to possible further resistance to treatment could also be included, such as those found in the *BRAF* and *NRAS* genes. Their detection could help to adapt the treatment for personalized medicine. To deal with the low abundance of ctDNA in the whole plasma, many rounds of PCR are needed to analyze ctDNA and differentiate it from other DNA sources. However, many PCR cycles could induce amplification mistakes. Some bioinformatic tools were developed to allow to distinguish ctDNA original mutations from PCR mistakes. For example, Duplex Sequencing (DS) based on barcode, integrated digital error suppression (iDES) which combine

DS and a second background polishing, based on a healthy donor background model, or also PCR Error Correction (PEC), who discard redundancies on reads after alignment and allow to detect original reads [78]. All these computational tools will help to deal with the technological challenges of low-abundance ctDNA and permit to detect single nucleotide mutations to better adapt medicine for each patient.

2.2.3. Clinical Relevance

CtDNA can help to determine the tumor genetic heterogeneity and can be used as a biomarker for patient follow-up and the early detection of relapse. As ctDNA comes directly from the tumor and can reflect the mutational burden, it could specifically identify therapeutic targets, particularly when the solid tumor is not accessible. Relapse in patients with advanced melanoma (IIc, III and IV) could be monitored by following the ctDNA level. For example, an initial low level of ctDNA harboring the BRAF^{V600E} mutation has been linked to better OS in patients with melanoma, while high level at diagnosis has been associated with shorter PFS and OS. Likewise, low ctDNA level at diagnosis is a good predictor of the response to immunotherapy in patients with advanced disease [76]. Conversely, ctDNA increase during treatment might reflect primary or secondary resistance to that targeted therapy. Moreover, clinical response of metastatic patients treated with PD-1 inhibitors can be monitored by levels of ctDNA, as the level of ctDNA at the initiation can be predictive of treatment response. It has been demonstrated that undetectable ctDNA level at baseline, as well as a decrease > 50% 3 weeks after treatment initiation are associated with better OS and PFS [79,80]. Concerning ctDNA molecular features, mutations in the *BRAF*, *NRAS*, *KIT* and *TERT* genes are considered melanoma-driving mutations and their detection could help to adapt the strategy for patient monitoring. Indeed, tumor progression mostly correlates with an increase of ctDNA with the same mutation, usually BRAF^{V600E} [3].

Currently, 16 clinical trials can be retrieved from the *ClinicalTrials.gov* database using the key words “melanoma” and “circulating DNA”, of which 11 are still open. Among these ongoing studies, six are assessing ctDNA prognostic value (for example, *BRAF*- or *NRAF*-mutated ctDNA), three are evaluating methods for ctDNA quantification and mutation detection and two are monitoring ctDNA level changes over time and their relationship with treatments (Table 2).

In conclusion, ctDNA is a potential biomarker for the management and follow-up of patients with melanoma, although the optimization and standardization of the detection and analysis methods must be refined to obtain clinically significant results. Indeed, the many different approaches to detect ctDNA introduce experimental bias that prevents obtaining meaningful and robust data on ctDNA clinical relevance. Therefore, the standardization of the methods to detect ctDNA in patients with melanoma is mandatory before its implementation for the routine follow-up of patients as part of personalized medicine.

Table 2. ctDNA in melanoma: clinical studies listed in the *ClinicalTrials.gov* database.

N°	Status	Study Title	Cancer	Location	Outcomes	Measurements
1	Completed	Circulating Cell-free DNA in Metastatic Melanoma Patient: Mutational Analyses in Consecutive Measurement Before and After Chemotherapy	Metastatic melanoma	CHU of Nice Nice, France	Therapeutic response	ctDNA mutational burden analysis
2	Completed	A Study to Detect V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 (BRAF) V600 Mutation on Cell-Free Deoxyribonucleic Acid (cfDNA) from Plasma in Participants with Advanced Melanoma	Metastatic melanoma	UZ Brussel, Brussel, Belgium Institute Jules Bordet, Brussel, Belgium CHIREC Edith Cavell, Brussel, Belgium (and 11 more...)	Therapy response duration Survival evaluation	BRAF mutation measurement
3	Active, not recruiting	Detection of Plasma Cell-free BRAF and NRAS Mutations: a New Tool for Monitoring Patients with Metastatic Malignant Melanoma Treated with Targeted Therapies or Immunotherapy (MALT)	Melanoma stage III–IV	CHU of Nice Nice, France	Technological validation ctDNA evaluation during treatment	BRAF and NRAF mutation measurement Measure follow-up
4	Completed	Use of Exome Sequence Analysis and Circulating Tumor In: Assessing Tumor Heterogeneity in BRAF Mutant Melanoma	BRAF-mutated Melanoma	Princess Margaret Cancer Centre Toronto, Ontario, Canada	ctDNA evaluation	ctDNA pre- and post-mortem and metastases analysis
5	Recruiting	Biomarkers for the Activity of Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients with Advanced Melanoma	Metastatic melanoma	UZ Brussel Jette, Brabant, Belgium	Treatment follow-up	Treatment follow-up
6	Active, not recruiting	Vemurafenib and Cobimetinib Combination in BRAF Mutated Melanoma with Brain Metastasis	Metastatic melanoma	CHU of Bordeaux, Bordeaux, France CHU Ambroise Paré, Boulogne, France CHU Brest Hôpital Morvan, Brest, France (and 14 more...)	Therapy and Survival evaluation	Treatment follow-up ctDNA mutation rate
7	Recruiting	CActUS—Circulating Tumor DNA Guided Switch	Metastatic melanoma	The Christie NHS Foundation Trust Manchester, United Kingdom	Therapeutic response	ctDNA level measurement Treatment follow-up
8	Active, not recruiting	Low-Dose Ipilimumab With Pembrolizumab in Treating Patients with Melanoma that has Spread to the Brain	Metastatic melanoma and other cancers	MD Anderson Cancer Center Houston, Texas, United States	Therapy and Survival evaluation	ctDNA level measurement
9	Recruiting	Therapeutic Drug Monitoring of BRAF-Mutated Advanced Melanoma	Metastatic melanoma	Hôpital de Mercy, Ars-Laquerex, Fr CHRU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, Fr Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL), Vandœuvre-lès-Nancy, Fr	Therapy and ctDNA evaluation	ctDNA level measurement Treatment follow-up
10	Recruiting	Bevacizumab and Atezolizumab with or without Cobimetinib in Treating Patients with Untreated Melanoma Brain Metastases	Metastatic melanoma	MD Anderson Cancer Center Houston, Texas, United States	Therapy evaluation	ctDNA level measurement

Table 2. Cont.

N°	Status	Study Title	Cancer	Location	Outcomes	Measurements
11	Active, not recruiting	Molecular Characterization of Advanced Stage Melanoma by Blood Sampling	Metastatic melanoma	Chu of Reims Reims, France	Biomarkers significance	ctDNA analysis
12	Recruiting	Liquid Biopsy Evaluation and Repository Development at Princess Margaret	Cancer or high risk of cancer	Princess Margaret Cancer Centre Toronto, Ontario, Canada	Protocol development	ctDNA analysis
13	Active, not recruiting	Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of Vemurafinib in Combination with Cobimetinib (Continuous and Intermittent) in BRAFV600-Mutation-Positive Patients With Unresectable Locally Advanced or Metastatic Melanoma	Melanoma stage III-IV	Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Guipuzcoa, Spain Hospital General Universitario Santa Lucía, Cartagena, Murcia, Spain Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain (and 15 more...)	Therapy and Survival evaluation	ctDNA analysis
14	Active, not recruiting	Selection Pressure and Evolution Induced by Immune Checkpoint Inhibitors and Other Immunologic Therapies	Neuroendocrine metastatic tumors	Princess Margaret Cancer Centre Toronto, Ontario, Canada	Therapy and ctDNA evaluation	ctDNA analysis
15	Recruiting	Circulating Tumor DNA Exposure in Peripheral Blood	Cancer stage 0-IV	University of Arizona Cancer Center, Tucson, Arizona, US Florida Hospital Celebration Health, Celebration, Florida, US Orlando Health UF Health Cancer Center, Orlando, Florida, US (and 3 more...)	Protocol development	ctDNA level measurement and analysis

CHU: University hospital center, UZ: Universitair Ziekenhuis, NHS: National Health Service, CTC: circulating tumor cell, ctDNA: circulating tumor DNA, Fr: France, US: United-States, UF: University of Florida.

2.3. Other Circulating Biomarkers

2.3.1. Proteins

Several serum proteins might have diagnostic and prognostic value for melanoma, including lactate dehydrogenase (LDH), S100B and melanoma-inhibiting activity (MIA). However, according to the staging system by the American Joint Committee on Cancer, LDH is the only circulating protein with significant prognostic value in melanoma [81]. Specifically, elevated LDH concentration in patients with stage IV melanoma correlates with poor survival [82], and is a clinically significant factor associated with response, PFS and OS in patients treated with targeted [83] and immune therapies [84,85]. However, it is of clinical interest only for patients with metastatic melanoma.

Among the proteins expressed and released by melanoma cells, the S100 family is the most studied [86,87]. S100B expression is increased in melanoma cells compared with melanocytes [82], and can be used for the staging of metastatic malignant melanoma by immunohistochemistry [88]. Moreover, serum S100B level is increased in patients with melanoma, independent of the cancer stage [89,90]. Its expression is clearly correlated with the presence of metastases, tumor burden, prognosis and survival [91,92]. S100B could also serve as a strong baseline marker of OS in patients with melanoma receiving anti-CTLA4 and/or anti-PD-1 antibodies [93,94].

MIA is a soluble protein expressed by malignant melanoma cells [95]. This protein was proposed as a diagnostic serum marker of melanoma progression because the MIA ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) could correctly classify 100% of the investigated serum samples of patients with stage III and stage IV melanoma [96]. However, in a study that compared different serum proteins in 373 patients with melanoma, serum S100B showed the highest sensitivity for newly diagnosed metastases (0.86), followed by MIA (0.80), LDH (0.48) and albumin (0.15). Conversely, MIA displayed the lowest specificity (0.62) compared with albumin (0.99), LDH (0.98) and S100B (0.91) [97]. Similar results were reported by a more recent study in patients with stage II melanoma [98]. Therefore, MIA does not offer more advantages compared with S100B and LDH.

2.3.2. Circulating MicroRNAs

Circulating miRNAs are emerging as potential non-invasive biomarkers for melanoma. miRNAs are directly released in the blood circulation during tumor cell apoptosis or necrosis, but also by cells via extracellular vesicles including exosomes, micro-vesicles and apoptotic bodies, which prevent their degradation by serum and plasma RNases [99]. In the blood, circulating miRNAs are associated with lipid particles, and/or are bound by protective proteins, such as argonaute-2 (AGO2) and nucleophosmin. Therefore, circulating miRNAs are very stable. Although miRNAs are present at extremely low concentrations in the circulation, they can be detected by standard techniques, including real-time quantitative RT-PCR.

During the last decade, it has become increasingly clear that miRNA expression dysregulation in human malignancies directly contributes to the acquisition of cancer hallmarks [100]. Indeed, miRNAs play a critical role in the regulation of many cancer-relevant processes, such as cell proliferation, migration and apoptosis, by regulating the expression of oncogenes (tumor-suppressor miRNAs) and tumor-suppressor genes (oncogenic miRNAs).

Several reviews have highlighted the role of miRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers and as key molecular regulators in melanoma development [101–103]. For example, miR-137 is a well-established tumor suppressor miRNA often downregulated in melanoma and in many other cancer types. Its downregulation has been associated with poor prognosis in patients with melanoma [104]. This is not surprising because miR-137 inhibits invasion and migration of melanoma cell lines by directly targeting oncogenes, including the transcription factors TBX3, EZH2, c-MET and Y box-binding protein 1 (YB1) [105,106].

Several efforts have been made to identify circulating miRNAs that may be used as diagnostic and prognostic biomarkers for melanoma; however, due to the variety of profiling platforms and

inputs, and the different techniques for serum and plasma preparation, RNA extraction, quality control, normalization and statistical evaluation, the results of the different studies show limited consistency.

2.3.3. Exosomes

Melanoma cells produce various types of extracellular vesicles (EV), including micro-vesicles, apoptotic bodies and exosomes. The specific EV content and role in recipient cells depend on their molecular composition that is determined by their cell of origin. Cell type-specific proteins, lipids and nucleic acids can be detected in the respective EV populations, and this explains their prognostic and diagnostic value in specific conditions, including different cancer types [107]. Currently, few markers (i.e., TSG101, syntenin and the simultaneous expression of three tetraspanins (CD9, CD63 and CD81)) allows for distinguishing exosomes from other EVs, such as micro-vesicles and apoptotic bodies [108]. It is thought that exosomes secreted by cancer cells have critical roles in several tumor-related biological processes by promoting (1) survival and growth of the primary tumor through cell–cell communications between tumor and non-tumor cells, (2) tumor invasion through extracellular matrix remodeling and (3) angiogenesis [109]. Tumor-derived exosomes may also modulate the immune cell behavior, by dampening the anti-tumor immune response and promoting melanoma progression [109]. Conversely, exosomes secreted by immune cells may modulate melanoma cell behavior and exert therapeutic effects [103,110].

Melanoma-derived and other EVs are generally isolated using established differential ultracentrifugation methods. This enables the separation of different EV types based on their sedimentation rate [111,112]. Other techniques, such as density gradient, precipitation, filtration, size-exclusion chromatography and immunological separation, have been employed with relative success in terms of EV recovery and specificity [113]. Then, electron microscopy, ELISA, flow cytometry and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) approaches are the most commonly used methods for the detection and quantification of exosomes [114,115]. Moreover, microfluidic chips also have the potential to be an emerging tool for exosome separation as well as detection applications with the improvement of using only a single chip for both steps [116]. However, at this stage, there is no recommended isolation/detection protocols and more comparative studies are needed.

Clinically, EVs might become biomarkers of cancer progression, particularly for predicting and, hopefully, preventing future metastasis development, and also therapeutic targets. Hoshino et al. showed that the integrin expression profile of circulating plasma exosomes isolated from patients with cancer directs their tissue- and organ-specific colonization for metastasis [117]. Thus, it will be of interest to target the integrins expressed by these exosomes to prevent metastasis formation. Exosomes could also be used to develop new drug delivery strategies. Indeed, due to their ability to reach a specific tissue, exosomes are promising nano-vehicles for the bio-delivery of therapeutic RNAs, proteins and other agents [109]. Moreover, some recent studies have evaluated the role of exosomal PD-L1 expression in melanoma patients treated with immunotherapy [118,119] and provided a rationale for the application of exosomal PD-L1 as a biomarker to predict therapy response and clinical outcome.

2.4. Conclusion

Liquid biopsy in melanoma has already showed its clinical relevance for the early diagnosis, prognosis and follow-up of the disease. However, method standardization needs to be optimized to increase the clinical use and the clinical benefits of the biomarkers assessed by liquid biopsy. Finally, to reduce the costs linked to tumor surveillance and monitoring, data obtained by liquid biopsy might be used in the future to detect relapse before positron-emission tomography/computed tomography (PET/CT) imaging (the current detection approach in patients with advanced melanoma).

3. Merkel Cell Carcinoma

MCC is a rare skin cancer that usually appears as a pink/red, rapidly growing skin nodule on UV-exposed areas, such as head, neck and upper limbs. Usually, it is characterized by aggressive behavior and high metastasis rate without specific location [120]. Despite the currently low (but rapidly increasing) incidence (0.7 per 100,000) [121–123], MCC is associated with shorter disease-free and OS and higher cancer-related death rates than melanoma. To date, two main different oncogenic pathways have been identified [124,125]. The first is related to UV exposure with high tumor mutational burden, while the second one is related to a ubiquitous DNA virus, Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV). Although the involvement of this virus in MCC development has been clearly established, the underlying molecular mechanisms have not been fully characterized. MCPyV was first described in 2008 by Feng et al. [126], and is the first human polyomavirus clearly linked to a human cancer [127]. Moreover, its epidemiological link with immunosuppressive conditions, including chronic lymphocytic leukemia and solid organ transplantation, is well established [128,129].

The hypothesis that MCC originates from epidermal Merkel cells [130] is supported by some common features between Merkel and MCC cells, such as the presence of a cytokeratin network as a dot, and the expression of cytokeratin-20 and neuron-specific enolase [131,132]. However, alternative theories have been proposed, involving, for example, a common cell ancestor with B lymphocytes [133].

Besides these debates on MCC cellular origin [131,134], recent studies tried to better understand the mechanisms underlying this malignancy, notably the involvement of the MCPyV virus that is detected in 80% of cases [124,127,135–137]. Currently, it is known that MCPyV is first present in cells in an episomal conformation [138] and is subsequently integrated in the cell DNA.

As this tumor remains poorly understood, liquid biopsy might help to decipher its nature, the underlying mechanisms and might ensure a real-time follow-up of the disease and of its response to different treatments. Research on this topic is in its early days, but some studies have already investigated different circulating biomarkers in MCC (Table 3).

Table 3. Studies on liquid biopsy in Merkel cell carcinoma.

Study	Title	Bio-Marker	Inclusion Criteria	n	Detection Method	Prognosis Relevance	Ref
Blom et al. (2014)	Clinical utility of a circulating tumor cell assay in Merkel cell carcinoma	CTCs	Stage I–IV	34	CellSearch—Epithelial kit	CTCs associated with survival, prediction of treatment response, shorter OS and reflect disease burden.	[139]
Gaiser et al. (2015)	Evaluating blood levels of neuron specific enolase, chromogranin A, and circulating tumor cells as Merkel cell carcinoma biomarkers	CTCs	Stage I–IV	30	Maintrac	Correlation between CTC detection and disease outcomes.	[140]
Samimi et al. (2016)	Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma	Anti-MCPyV-antibody	Stage I–IV	143	ELISA	Basal level of anti-VP1 antibodies used as prognostic marker. Anti-T-antigen antibodies are marker of disease recurrence or progression if detected >12 months after diagnosis	[141]
Fan et al. (2018)	Circulating cell-free miR-375 as surrogate marker of tumor burden in Merkel cell carcinoma	miRNA	Stage I–IV	102	RT-qPCR	Circulating miR-375 is a useful biomarker for tumor burden, therapy monitoring and follow-up of patients with MCC.	[142]
Riethdorf et al. (2019)	Detection and characterization of circulating tumor cells in patients with Merkel cell carcinoma	CTCs	Stage I–IV	51	CellSearch—CXC kit	Correlations between CTC counts and MCC aggressiveness.	[143]
Boyer et al. (2020)	Circulating tumor cell detection and polyomavirus status in Merkel cell carcinoma	CTCs	Stage I–IV	19	<ul style="list-style-type: none"> •CellSearch—CTC kit •RosetteSep/DEPArray 	CTC presence associated with tumor stage and number of organs with metastases.	[144]

CTC: circulating tumor cell, OS: Overall Survival, MCPyV: Merkel Cell Polyomavirus, ctDNA: circulating tumor DNA, miRNA: microRNA, ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, RT-qPCR: Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction.

3.1. CTCs and Circulating miRNAs

The few studies on this topic show how little is known about MCC. Moreover, the existing data concern small patient cohorts, due to MCC rarity. Nevertheless, some circulating biomarkers might help to better understand MCC. CTCs have been associated with patient survival and MCC aggressiveness [139,140,143,145], and high miRNA-375 concentration in plasma with tumor burden [142,146]. Therefore, they are candidate biomarkers for MCC follow-up. In patients with MCC, CTCs are usually detected using the CellSearch[®] system [147–149], based on the positive enrichment of EpCAM-expressing cells. A new CTC detection method based on negative enrichment was investigated by Boyer et al. [144]. They evaluated CTC number to follow the disease course, and also characterized MCC CTCs (e.g., PD-L1 status). They found that CTC detection was associated with the cancer stage. The few studies on circulating miRNA in MCC used RT-qPCR as detection technology [142,150], like for other cancers [151,152]. The MCC miRNome has been investigated mostly in formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples [153,154], and the miRNAs identified as MCC-specific could now be evaluated in liquid biopsies.

3.2. Exosomes

Exosomes are small vesicles secreted by different types of cells under the influence of cellular conditions and environment [155]. They might be used as an MCC biomarker. However, they have been investigated only in MCC cell lines and more data are needed. These preliminary studies suggest that exosomes might be a good candidate biomarker. Indeed, they showed that MCC-derived exosomes transport proteins linked to cancer, such as LDH and factors implicated in the p38 MAPK and Wnt signaling pathways. Importantly, these proteins were detected independently of the cell line MCPyV status [155], thus they could be used to monitor all patients with MCC.

3.3. Anti-MCPyV Antibodies

The presence of MCPyV in most MCC specimens and the higher incidence in immune-deficient patients indicate the implication of the immune system in MCC [123,124]. The large T (LT) and small T (sT) antigens of MCPyV are involved in oncogenesis, for example their presence has been linked to cell cycle disturbance or viral replication. Moreover, LT is required for the survival of cancer cell lines [156]. Titration of the VP1 capsid protein of MCPyV has been used as a circulating biomarker of the viral load in patients. In these studies, high levels of anti-VP1 and anti-sT antibodies in blood was correlated with better outcome [157], and anti-LT antibodies are a prognostic factor of recurrence if they are detected more than one year after diagnosis [141].

3.4. Immunotherapy

An immunohistochemical analysis of MCC specimens found that many cancer cells express PD-L1, particularly when they are in close proximity to infiltrating immune cells [158]. This mechanism is used by MCC cells to escape immunity. Specifically, cancer cells express PD-L1 at their surface, and its interaction with PD-1 at the surface of immune cells will block their identification as cancer cells. This phenomenon has been highlighted in many different cancers and is one of the immune checkpoints targeted by immunotherapy. Recently, immunotherapy based on PD-1/PD-L1 inhibition [159–161] has been approved by the US FDA for patients with metastatic MCC. This therapy has already been used in other cancers for some years [162] and is also efficient in patients with metastatic MCC, although the response rate remains unsatisfactory [159,163]. Detection of PD-L1 at the surface of CTCs could help for MCC patient management. This emphasizes the need of better understanding this disease to develop more appropriate treatments.

A query of the *ClinicalTrials.gov* database with the keyword “Merkel cell carcinoma” in November 2019 did not retrieve any ongoing study on circulating biomarkers in MCC. Most of the listed studies were testing new treatments.

3.5. Conclusion

Liquid biopsy in MCC could be of clinical interest for patient management, as suggested by the correlation of CTCs and circulating miRNAs with disease outcomes and tumor burden. However, more research must be done in larger cohorts and on different potential candidate biomarkers.

4. Discussion

The potential use of liquid biopsy in melanoma has already been extensively studied and some circulating biomarkers are clinically relevant (Figure 1). Conversely, few but encouraging data are available in the context of MCC, due to its rarity. The detection of circulating biomarkers in blood is challenging, but technological advances help to deal with their scarcity in liquid biopsies (Figure 2). Circulating biomarkers help to assess the tumor heterogeneity in real-time, unlike conventional biopsy that is representative only of the sampling site. Therefore, liquid biopsy could be clinically relevant in these two skin cancers, for prognosis and staging, and also for the follow-up of patients (Figure 1). In the future, information gained from liquid biopsies might be used to indicate when restaging is needed, or when surveillance is sufficient for patients without evidence of micro-metastatic tumor burden in the blood. Recent studies have shown that the micro-metastatic tumor burden is often increased before the clinical evidence of metastasis by imaging. In the future, both therapy and imaging decision-making might be guided by the data obtained by liquid biopsy. Liquid biopsy could become a really useful tool for the personalized management of patients with melanoma, among whom relapse and resistance to immunotherapy are common, or with MCC, where the risk of aggressive disease is very high. Many studies have proven the value of liquid biopsy in melanoma. On the other hand, clinical studies must be performed in patients with MCC to confirm the relevance of the circulating biomarkers tested in small patient cohorts. Some multi-national projects have been established, such as the European Liquid Biopsy Society (ELBS) or the International Society of Liquid Biopsy (ISLB), to expand the use of circulating biomarkers.

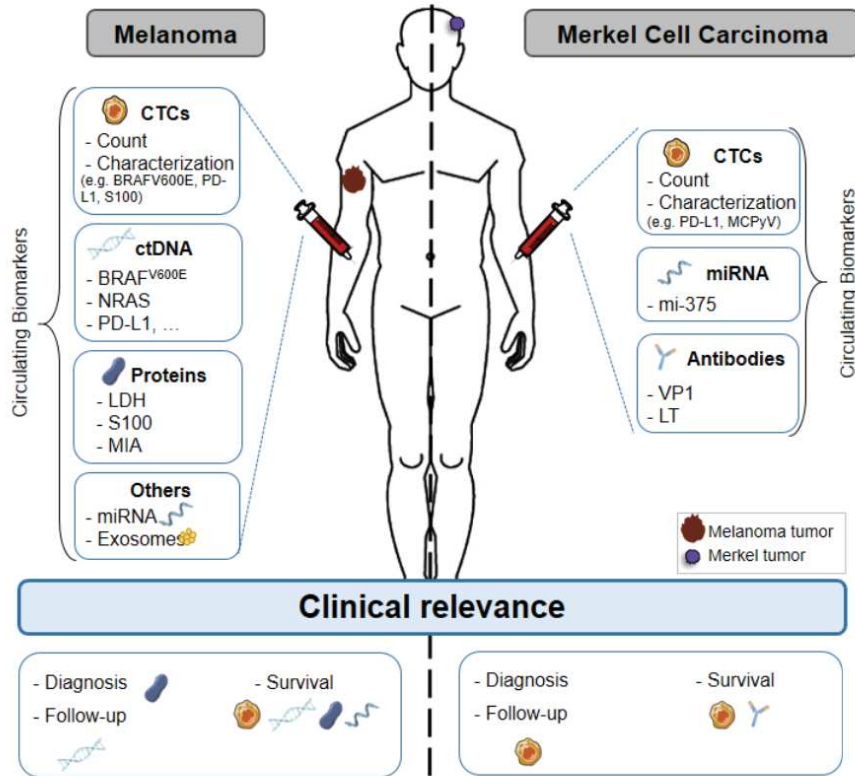


Figure 1. Liquid biopsy of circulating biomarkers in melanoma and Merkel cell carcinoma. Circulating biomarkers used in melanoma and Merkel cell carcinoma: use, characterization and clinical relevance. Abbreviations: CTC: Circulating Tumor Cell, ctDNA: Circulating tumor DNA, miRNA: microRNA, MAPK: Mitogen-activated protein kinases, TERT: telomerase reverse transcriptase, LDH: Lactate dehydrogenase, MIA: Melanoma Inhibitory Activity, VP1: Capsid Protein, LT: Large T antigen, PD-L1: Programmed death-ligand.

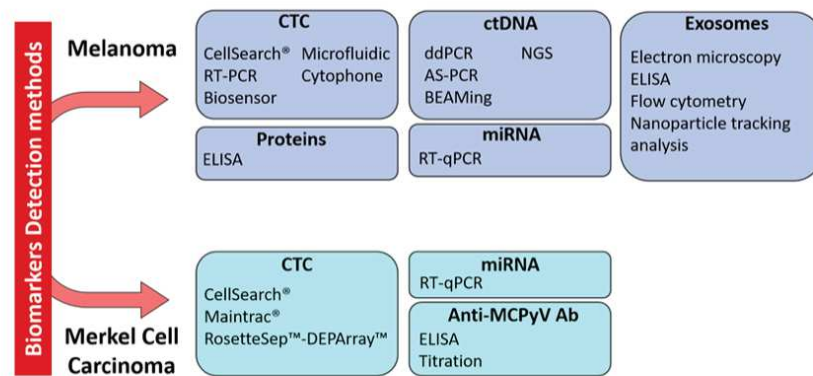


Figure 2. Technologies for the detection of circulating biomarkers currently used in melanoma and Merkel cell carcinoma. Abbreviations: CTC: Circulating Tumor Cell, ctDNA: Circulating tumor DNA, miRNA: microRNA, RT-PCR: reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-qPCR: reverse-transcriptase quantitative PCR, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, ddPCR: droplet digital PCR, AS-PCR: Allele Specific PCR, BEAMing: Bead Emulsion Amplification Magnetic, NGS: Next-Generation Sequencing.

Author Contributions: Conceptualization, C.A.-P.; Investigation, M.B. and L.C.; Writing—Original Draft Preparation, M.B. and L.C.; Writing—Review and Editing, M.B., L.C., O.D., L.M., O.B. and C.A.-P.; Visualization, M.B., L.C. and C.A.-P.; Supervision, O.D. and C.A.-P.; Project Administration, C.A.-P.; Funding Acquisition, M.B., L.C. and C.A.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ‘La Ligue Contre le Cancer’ in the form of a PhD studentship (Magali Boyer), and by the SIRIC Montpellier Cancer Grant, grant number INCa_Inserm_DGOS_12553.

Acknowledgments: We thank Elisabetta Andermarcher for assistance with her comments and proof-reading that greatly improved the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Leiter, U.; Eigentler, T.; Garbe, C. Epidemiology of skin cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *810*, 120–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Houben, R.; Schrama, D.; Becker, J.C. Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma. *Exp. Dermatol.* **2009**, *18*, 193–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Calapre, L.; Warburton, L.; Millward, M.; Ziman, M.; Gray, E.S. Circulating tumour DNA (ctDNA) as a liquid biopsy for melanoma. *Cancer Lett.* **2017**, *404*, 62–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rastrelli, M.; Tropea, S.; Rossi, C.R.; Alaibac, M. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* **2014**, *28*, 1005–1011. [[PubMed](#)]
5. Huang, S.K.; Hoon, D.S.B. Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients. *Mol. Oncol.* **2016**, *10*, 450–463. [[CrossRef](#)]
6. Pantel, K.; Alix-Panabieres, C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 398–406. [[CrossRef](#)]
7. Khoja, L.; Lorigan, P.; Dive, C.; Keilholz, U.; Fusi, A. Circulating tumour cells as tumour biomarkers in melanoma: Detection methods and clinical relevance. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med Oncol. ESMO* **2015**, *26*, 33–39. [[CrossRef](#)]
8. Yu, M.; Stott, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D.A. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 373–382. [[CrossRef](#)]

9. Khoja, L.; Lorigan, P.; Zhou, C.; Lancashire, M.; Booth, J.; Cummings, J.; Califano, R.; Clack, G.; Hughes, A.; Dive, C. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 1582–1590. [[CrossRef](#)]
10. Fusi, A.; Reichelt, U.; Busse, A.; Ochsenreither, S.; Rietz, A.; Maisel, M.; Keilholz, U. Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. *J. Investig. Dermatol.* **2011**, *131*, 487–494. [[CrossRef](#)]
11. Kupas, V.; Weishaupt, C.; Siepmann, D.; Kaserer, M.L.; Eickelmann, M.; Metzke, D.; Luger, T.A.; Beissert, S.; Loser, K. RANK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated on melanoma-initiating cells. *J. Investig. Dermatol.* **2011**, *131*, 944–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Schatton, T.; Murphy, G.F.; Frank, N.Y.; Yamaura, K.; Waaga-Gasser, A.M.; Gasser, M.; Zhan, Q.; Jordan, S.; Duncan, L.M.; Weishaupt, C.; et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **2008**, *451*, 345–349. [[CrossRef](#)]
13. Fang, D.; Nguyen, T.K.; Leishear, K.; Finko, R.; Kulp, A.N.; Hotz, S.; Van Belle, P.A.; Xu, X.; Elder, D.E.; Herlyn, M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9328–9337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Boiko, A.D.; Razorenova, O.V.; van de Rijn, M.; Swetter, S.M.; Johnson, D.L.; Ly, D.P.; Butler, P.D.; Yang, G.P.; Joshua, B.; Kaplan, M.J.; et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* **2010**, *466*, 133–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Davis, E.J.; Johnson, D.B.; Sosman, J.A.; Chandra, S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer* **2018**, *124*, 3490–3499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hayward, N.K.; Wilmott, J.S.; Waddell, N.; Johansson, P.A.; Field, M.A.; Nones, K.; Patch, A.M.; Kakavand, H.; Alexandrov, L.B.; Burke, H.; et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* **2017**, *545*, 175–180. [[CrossRef](#)]
17. Ampofo, E.; Schmitt, B.M.; Menger, M.D.; Laschke, M.W. The regulatory mechanisms of NG2/CSPG4 expression. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2017**, *22*, 4. [[CrossRef](#)]
18. Kennedy, R.A.; Kemp, T.J.; Sugden, P.H.; Clerk, A. Using U0126 to dissect the role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) cascade in the regulation of gene expression by endothelin-1 in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2006**, *41*, 236–247. [[CrossRef](#)]
19. Gorges, K.; Wiltfang, L.; Gorges, T.M.; Sartori, A.; Hildebrandt, L.; Keller, L.; Volkmer, B.; Peine, S.; Babayan, A.; Moll, I.; et al. Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. *Cancers* **2019**, *11*, 1685. [[CrossRef](#)]
20. Theodosakis, N.; Held, M.A.; Marzuka-Alcala, A.; Meeth, K.M.; Micevic, G.; Long, G.V.; Scolyer, R.A.; Stern, D.F.; Bosenberg, M.W. BRAF Inhibition Decreases Cellular Glucose Uptake in Melanoma in Association with Reduction in Cell Volume. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1680–1692. [[CrossRef](#)]
21. Alix-Panabieres, C.; Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 623–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Galanzha, E.I.; Menyayev, Y.A.; Yadem, A.C.; Sarimollaoglu, M.; Juratli, M.A.; Nedosekin, D.A.; Foster, S.R.; Jamshidi-Parsian, A.; Siegel, E.R.; Makhoul, I.; et al. In vivo liquid biopsy using Cytophone platform for photoacoustic detection of circulating tumor cells in patients with melanoma. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaat5857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.T.; Donaldson, M.C.; Wittner, B.S.; Spencer, J.A.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hou, J.M.; Krebs, M.; Ward, T.; Sloane, R.; Priest, L.; Hughes, A.; Clack, G.; Ranson, M.; Blackhall, F.; Dive, C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 989–996. [[CrossRef](#)]
25. Tsai, K.K.; Zarzoso, I.; Daud, A.I. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum. Vaccines Immunother.* **2014**, *10*, 3111–3116. [[CrossRef](#)]
26. Curry, B.J.; Myers, K.; Hersey, P. MART-1 Is Expressed Less Frequently on Circulating Melanoma Cells in Patients Who Develop Distant Compared With Locoregional Metastases. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2562. [[CrossRef](#)]
27. Fusi, A.; Collette, S.; Busse, A.; Suci, S.; Rietz, A.; Santinami, M.; Kruit, W.H.J.; Testori, A.; Punt, C.J.A.; Dalglish, A.G.; et al. Circulating melanoma cells and distant metastasis-free survival in stage III melanoma patients with or without adjuvant interferon treatment (EORTC 18991 side study). *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 3189–3197. [[CrossRef](#)]

9. Khoja, L.; Lorigan, P.; Zhou, C.; Lancashire, M.; Booth, J.; Cummings, J.; Califano, R.; Clack, G.; Hughes, A.; Dive, C. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 1582–1590. [[CrossRef](#)]
10. Fusi, A.; Reichelt, U.; Busse, A.; Ochsenreither, S.; Rietz, A.; Maisel, M.; Keilholz, U. Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. *J. Investig. Dermatol.* **2011**, *131*, 487–494. [[CrossRef](#)]
11. Kupas, V.; Weishaupt, C.; Siepmann, D.; Kaserer, M.L.; Eickelmann, M.; Metzke, D.; Luger, T.A.; Beissert, S.; Loser, K. RANK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated on melanoma-initiating cells. *J. Investig. Dermatol.* **2011**, *131*, 944–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Schatton, T.; Murphy, G.F.; Frank, N.Y.; Yamaura, K.; Waaga-Gasser, A.M.; Gasser, M.; Zhan, Q.; Jordan, S.; Duncan, L.M.; Weishaupt, C.; et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **2008**, *451*, 345–349. [[CrossRef](#)]
13. Fang, D.; Nguyen, T.K.; Leishear, K.; Finko, R.; Kulp, A.N.; Hotz, S.; Van Belle, P.A.; Xu, X.; Elder, D.E.; Herlyn, M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9328–9337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Boiko, A.D.; Razorenova, O.V.; van de Rijn, M.; Swetter, S.M.; Johnson, D.L.; Ly, D.P.; Butler, P.D.; Yang, G.P.; Joshua, B.; Kaplan, M.J.; et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* **2010**, *466*, 133–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Davis, E.J.; Johnson, D.B.; Sosman, J.A.; Chandra, S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer* **2018**, *124*, 3490–3499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hayward, N.K.; Wilmott, J.S.; Waddell, N.; Johansson, P.A.; Field, M.A.; Nones, K.; Patch, A.M.; Kakavand, H.; Alexandrov, L.B.; Burke, H.; et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* **2017**, *545*, 175–180. [[CrossRef](#)]
17. Ampofo, E.; Schmitt, B.M.; Menger, M.D.; Laschke, M.W. The regulatory mechanisms of NG2/CSPG4 expression. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2017**, *22*, 4. [[CrossRef](#)]
18. Kennedy, R.A.; Kemp, T.J.; Sugden, P.H.; Clerk, A. Using U0126 to dissect the role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) cascade in the regulation of gene expression by endothelin-1 in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2006**, *41*, 236–247. [[CrossRef](#)]
19. Gorges, K.; Wiltfang, L.; Gorges, T.M.; Sartori, A.; Hildebrandt, L.; Keller, L.; Volkmer, B.; Peine, S.; Babayan, A.; Moll, I.; et al. Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. *Cancers* **2019**, *11*, 1685. [[CrossRef](#)]
20. Theodosakis, N.; Held, M.A.; Marzuka-Alcala, A.; Meeth, K.M.; Micevic, G.; Long, G.V.; Scolyer, R.A.; Stern, D.F.; Bosenberg, M.W. BRAF Inhibition Decreases Cellular Glucose Uptake in Melanoma in Association with Reduction in Cell Volume. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1680–1692. [[CrossRef](#)]
21. Alix-Panabieres, C.; Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 623–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Galanzha, E.I.; Menyayev, Y.A.; Yadem, A.C.; Sarimollaoglu, M.; Juratli, M.A.; Nedosekin, D.A.; Foster, S.R.; Jamshidi-Parsian, A.; Siegel, E.R.; Makhoul, I.; et al. In vivo liquid biopsy using Cytophone platform for photoacoustic detection of circulating tumor cells in patients with melanoma. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaat5857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.T.; Donaldson, M.C.; Wittner, B.S.; Spencer, J.A.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hou, J.M.; Krebs, M.; Ward, T.; Sloane, R.; Priest, L.; Hughes, A.; Clack, G.; Ranson, M.; Blackhall, F.; Dive, C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 989–996. [[CrossRef](#)]
25. Tsai, K.K.; Zarzoso, I.; Daud, A.I. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum. Vaccines Immunother.* **2014**, *10*, 3111–3116. [[CrossRef](#)]
26. Curry, B.J.; Myers, K.; Hersey, P. MART-1 Is Expressed Less Frequently on Circulating Melanoma Cells in Patients Who Develop Distant Compared With Locoregional Metastases. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2562. [[CrossRef](#)]
27. Fusi, A.; Collette, S.; Busse, A.; Suci, S.; Rietz, A.; Santinami, M.; Kruit, W.H.J.; Testori, A.; Punt, C.J.A.; Dalglish, A.G.; et al. Circulating melanoma cells and distant metastasis-free survival in stage III melanoma patients with or without adjuvant interferon treatment (EORTC 18991 side study). *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 3189–3197. [[CrossRef](#)]

28. Koyanagi, K.; O'Day, S.J.; Boasberg, P.; Atkins, M.B.; Wang, H.-J.; Gonzalez, R.; Lewis, K.; Thompson, J.A.; Anderson, C.M.; Lutzky, J.; et al. Serial Monitoring of Circulating Tumor Cells Predicts Outcome of Induction Biochemotherapy plus Maintenance Biotherapy for Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2402–2408. [[CrossRef](#)]
29. Palmieri, G.; Satriano, S.M.R.; Budroni, M.; Cossu, A.; Tanda, F.; Canzanella, S.; Caracò, C.; Simeone, E.; Daponte, A.; Mozzillo, N.; et al. Serial detection of circulating tumour cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays is a marker for poor outcome in patients with malignant melanoma. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 266. [[CrossRef](#)]
30. Šamija, I.; Lukac, J.; Maric-Brozic, J.; Buljan, M.; Alajbeg, I.; Kovacevic, D.; Šitum, M.; Kusic, Z. Prognostic value of microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase as markers for circulating tumor cells detection in patients with melanoma. *Melanoma Res.* **2010**, *20*, 293–302. [[CrossRef](#)]
31. Salvianti, F.; Costanza, F.; Sonnati, G.; Pinzani, P. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells by Quantitative Real-Time PCR. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2065*, 139–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rao, C.; Bui, T.; Connelly, M.; Doyle, G.; Karydis, I.; Middleton, M.R.; Clack, G.; Malone, M.; Coumans, F.A.; Terstappen, L.W. Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 755–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cayrefourcq, L.; De Roeck, A.; Garcia, C.; Stoebner, P.E.; Fichel, F.; Garima, F.; Perriard, F.; Daures, J.P.; Meunier, L.; Alix-Panabieres, C. S100-EPISPOT: A New Tool to Detect Viable Circulating Melanoma Cells. *Cells* **2019**, *8*, 755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Anu Prathap, M.U.; Castro-Perez, E.; Jimenez-Torres, J.A.; Setaluri, V.; Gunasekaran, S. A flow-through microfluidic system for the detection of circulating melanoma cells. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *142*, 111522. [[CrossRef](#)]
35. Seenivasan, R.; Warrick, J.W.; Rodriguez, C.I.; Mattison, W.; Beebe, D.J.; Setaluri, V.; Gunasekaran, S. Integrating Electrochemical Immunosensing and Cell Adhesion Technologies for Cancer Cell Detection and Enumeration. *Electrochim. Acta* **2018**, *286*, 205–211. [[CrossRef](#)]
36. Kiriwa, Y.; Nakamura, K.; Mikoshiba, A.; Akiyama, Y.; Morimoto, A.; Okuyama, R. Diversity of circulating tumor cells in peripheral blood: Detection of heterogeneous BRAF mutations in a patient with advanced melanoma by single-cell analysis. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *90*, 211–213. [[CrossRef](#)]
37. Li, J.; Wang, J.; Wang, Y.; Trau, M. Simple and rapid colorimetric detection of melanoma circulating tumor cells using bifunctional magnetic nanoparticles. *Analyst* **2017**, *142*, 4788–4793. [[CrossRef](#)]
38. Aya-Bonilla, C.A.; Marsavela, G.; Freeman, J.B.; Lomma, C.; Frank, M.H.; Khattak, M.A.; Meniawy, T.M.; Millward, M.; Warkiani, M.E.; Gray, E.S.; et al. Isolation and detection of circulating tumour cells from metastatic melanoma patients using a slanted spiral microfluidic device. *Oncotarget* **2017**, *8*, 67355–67368. [[CrossRef](#)]
39. Ozkumur, E.; Shah, A.M.; Ciciliano, J.C.; Emmink, B.L.; Miyamoto, D.T.; Brachtel, E.; Yu, M.; Chen, P.I.; Morgan, B.; Trautwein, J.; et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 179ra147. [[CrossRef](#)]
40. Hong, X.; Sullivan, R.J.; Kalinich, M.; Kwan, T.T.; Giobbie-Hurder, A.; Pan, S.; LiCausi, J.A.; Milner, J.D.; Nieman, L.T.; Wittner, B.S.; et al. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 2467–2472. [[CrossRef](#)]
41. Christiansen, S.A.; Khan, S.; Gibney, G.T. Targeted Therapies in Combination With Immune Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Cancer J.* **2017**, *23*, 59–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Korn, E.L.; Liu, P.Y.; Lee, S.J.; Chapman, J.A.; Niedzwiecki, D.; Suman, V.J.; Moon, J.; Sondak, V.K.; Atkins, M.B.; Eisenhauer, E.A.; et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 527–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Khattak, M.A.; Reid, A.; Freeman, J.; Pereira, M.; McEvoy, A.; Lo, J.; Frank, M.H.; Meniawy, T.; Didan, A.; Spencer, I.; et al. PD-L1 Expression on Circulating Tumor Cells May Be Predictive of Response to Pembrolizumab in Advanced Melanoma: Results from a Pilot Study. *Oncologist* **2020**, *25*, e520–e527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lim, S.Y.; Lee, J.H.; Diefenbach, R.J.; Kefford, R.F.; Rizos, H. Liquid biomarkers in melanoma: Detection and discovery. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 8. [[CrossRef](#)]

45. Gaiser, M.R.; von Bubnoff, N.; Gebhardt, C.; Utikal, J.S. Liquid biopsy to monitor melanoma patients. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2018**, *16*, 405–414. [[CrossRef](#)]
46. Buder-Bakhaya, K.; Machiraju, D.; Hassel, J.C. Liquid Biopsy: Value for Melanoma Therapy. *Oncol Res. Treat.* **2017**, *40*, 430–434. [[CrossRef](#)]
47. Gray, E.S.; Rizos, H.; Reid, A.L.; Boyd, S.C.; Pereira, M.R.; Lo, J.; Tembe, V.; Freeman, J.; Lee, J.H.; Scolyer, R.A.; et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 42008–42018. [[CrossRef](#)]
48. Soda, N.; Rehm, B.H.A.; Sonar, P.; Nguyen, N.T.; Shiddiky, M.J.A. Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 6670–6704. [[CrossRef](#)]
49. Alix-Panabieres, C.; Schwarzenbach, H.; Pantel, K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 199–215. [[CrossRef](#)]
50. Cheng, F.; Su, L.; Qian, C. Circulating tumor DNA: A promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 48832–48841. [[CrossRef](#)]
51. Cree, I.A.; Uttley, L.; Buckley Woods, H.; Kikuchi, H.; Reiman, A.; Harman, S.; Whiteman, B.L.; Philips, S.T.; Messenger, M.; Cox, A.; et al. The evidence base for circulating tumour DNA blood-based biomarkers for the early detection of cancer: A systematic mapping review. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nalejska, E.; Maczynska, E.; Lewandowska, M.A. Prognostic and predictive biomarkers: Tools in personalized oncology. *Mol. Diagn. Ther.* **2014**, *18*, 273–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lo, Y.M.; Zhang, J.; Leung, T.N.; Lau, T.K.; Chang, A.M.; Hjelm, N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* **1999**, *64*, 218–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. De Mattos-Arruda, L.; Caldas, C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol. Oncol.* **2016**, *10*, 464–474. [[CrossRef](#)]
55. Clatot, F. Review ctDNA and Breast Cancer. *Recent Results Cancer Res.* **2020**, *215*, 231–252. [[CrossRef](#)]
56. Vietsch, E.E.; Graham, G.T.; McCutcheon, J.N.; Javaid, A.; Giaccone, G.; Marshall, J.L.; Wellstein, A. Circulating cell-free DNA mutation patterns in early and late stage colon and pancreatic cancer. *Cancer Genet.* **2017**, *218–219*, 39–50. [[CrossRef](#)]
57. Lim, M.; Kim, C.J.; Sunkara, V.; Kim, M.H.; Cho, Y.K. Liquid Biopsy in Lung Cancer: Clinical Applications of Circulating Biomarkers (CTCs and ctDNA). *Micromachines* **2018**, *9*, 100. [[CrossRef](#)]
58. Mamdani, H.; Ahmed, S.; Armstrong, S.; Mok, T.; Jalal, S.I. Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment. *Transl. Lung Cancer Res.* **2017**, *6*, 648–660. [[CrossRef](#)]
59. Pasha, H.A.; Rezk, N.A.; Riad, M.A. Circulating Cell Free Nuclear DNA, Mitochondrial DNA and Global DNA Methylation: Potential Noninvasive Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis. *Cancer Investig.* **2019**, *37*, 432–439. [[CrossRef](#)]
60. Hofman, P. Liquid biopsy for early detection of lung cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2017**, *29*, 73–78. [[CrossRef](#)]
61. Nicolini, A.; Ferrari, P.; Duffy, M.J. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *52*, 56–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Rohanizadegan, M. Analysis of circulating tumor DNA in breast cancer as a diagnostic and prognostic biomarker. *Cancer Genet.* **2018**, *228–229*, 159–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Fan, G.; Zhang, K.; Yang, X.; Ding, J.; Wang, Z.; Li, J. Prognostic value of circulating tumor DNA in patients with colon cancer: Systematic review. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Vymetalkova, V.; Cervena, K.; Bartu, L.; Vodicka, P. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Reinert, T.; Scholer, L.V.; Thomsen, R.; Tobiasen, H.; Vang, S.; Nordentoft, I.; Lamy, P.; Kannerup, A.S.; Mortensen, F.V.; Stribolt, K.; et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* **2016**, *65*, 625–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Siravegna, G.; Bardelli, A. Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients. *Mol. Oncol.* **2016**, *10*, 475–480. [[CrossRef](#)]
67. Chaudhuri, A.A.; Chabon, J.J.; Lovejoy, A.F.; Newman, A.M.; Stehr, H.; Azad, T.D.; Khodadoust, M.S.; Esfahani, M.S.; Liu, C.L.; Zhou, L.; et al. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 1394–1403. [[CrossRef](#)]
68. Russo, A.; De Miguel Perez, D.; Gunasekaran, M.; Scilla, K.; Lapidus, R.; Cooper, B.; Mehra, R.; Adamo, V.; Malapelle, U.; Rolfo, C. Liquid biopsy tracking of lung tumor evolutions over time. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2019**, *19*, 1099–1108. [[CrossRef](#)]

69. Hrebien, S.; Citi, V.; Garcia-Murillas, I.; Cutts, R.; Fenwick, K.; Kozarewa, I.; McEwen, R.; Ratnayake, J.; Maudsley, R.; Carr, T.H.; et al. Early ctDNA dynamics as a surrogate for progression free survival in advanced breast cancer in the BEECH trial. *Ann. Oncol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
70. Bettegowda, C.; Sausen, M.; Leary, R.J.; Kinde, I.; Wang, Y.; Agrawal, N.; Bartlett, B.R.; Wang, H.; Luber, B.; Alani, R.M.; et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 224ra224. [[CrossRef](#)]
71. Kurtz, D.M.; Scherer, F.; Jin, M.C.; Soo, J.; Craig, A.F.M.; Esfahani, M.S.; Chabon, J.J.; Stehr, H.; Liu, C.L.; Tibshirani, R.; et al. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 2845–2853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Diefenbach, R.J.; Lee, J.H.; Rizos, H. Monitoring Melanoma Using Circulating Free DNA. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2019**, *20*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Valpione, S.; Campana, L. Detection of circulating tumor DNA (ctDNA) by digital droplet polymerase chain reaction (dd-PCR) in liquid biopsies. *Methods Enzymol.* **2019**, *629*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Van Ginkel, J.H.; Huibers, M.M.H.; van Es, R.J.J.; de Bree, R.; Willems, S.M. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Yi, X.; Ma, J.; Guan, Y.; Chen, R.; Yang, L.; Xia, X. The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 2642–2647. [[CrossRef](#)]
76. Busser, B.; Lupo, J.; Sancey, L.; Mouret, S.; Faure, P.; Plumas, J.; Chaperot, L.; Leccia, M.T.; Coll, J.L.; Hurbin, A.; et al. Plasma Circulating Tumor DNA Levels for the Monitoring of Melanoma Patients: Landscape of Available Technologies and Clinical Applications. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 5986129. [[CrossRef](#)]
77. Morandi, L.; de Biase, D.; Visani, M.; Cesari, V.; De Maglio, G.; Pizzolitto, S.; Pession, A.; Tallini, G. Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): An accurate and cost-effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36084. [[CrossRef](#)]
78. Kim, C.S.; Mohan, S.; Ayub, M.; Rothwell, D.G.; Dive, C.; Brady, G.; Miller, C. In silico error correction improves cfDNA mutation calling. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 2380–2385. [[CrossRef](#)]
79. Forschner, A.; Battke, F.; Hadaschik, D.; Schulze, M.; Weissgraeber, S.; Han, C.T.; Kopp, M.; Frick, M.; Klumpp, B.; Tietze, N.; et al. Tumor mutation burden and circulating tumor DNA in combined CTLA-4 and PD-1 antibody therapy in metastatic melanoma—Results of a prospective biomarker study. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 180. [[CrossRef](#)]
80. Lipson, E.J.; Velculescu, V.E.; Pritchard, T.S.; Sausen, M.; Pardoll, D.M.; Topalian, S.L.; Diaz, L.A., Jr. Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J. Immunother. Cancer* **2014**, *2*, 42. [[CrossRef](#)]
81. Gershenwald, J.E.; Scolyer, R.A.; Hess, K.R.; Sondak, V.K.; Long, G.V.; Ross, M.I.; Lazar, A.J.; Faries, M.B.; Kirkwood, J.M.; McArthur, G.A.; et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 472–492. [[CrossRef](#)]
82. Agarwala, S.S.; Keilholz, U.; Gilles, E.; Bedikian, A.Y.; Wu, J.; Kay, R.; Stein, C.A.; Itri, L.M.; Suci, S.; Eggermont, A.M. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 1807–1814. [[CrossRef](#)]
83. Long, G.V.; Grob, J.J.; Nathan, P.; Ribas, A.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Lane, S.R.; Mak, C.; Legenne, P.; Flaherty, K.T.; et al. Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: A pooled analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1743–1754. [[CrossRef](#)]
84. Diem, S.; Kasenda, B.; Martin-Liberal, J.; Lee, A.; Chauhan, D.; Gore, M.; Larkin, J. Prognostic score for patients with advanced melanoma treated with ipilimumab. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 2785–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Nosrati, A.; Tsai, K.K.; Goldinger, S.M.; Tume, P.; Grimes, B.; Loo, K.; Algazi, A.P.; Nguyen-Kim, T.D.L.; Levesque, M.; Dummer, R.; et al. Evaluation of clinicopathological factors in PD-1 response: Derivation and validation of a prediction scale for response to PD-1 monotherapy. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 1141–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Palmer, S.R.; Erickson, L.A.; Ichetovkin, I.; Knauer, D.J.; Markovic, S.N. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. *Mayo Clinic Proc.* **2011**, *86*, 981–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Alegre, E.; Sammamed, M.; Fernández-Landázuri, S.; Zubiri, L.; González, Á. Chapter Two—Circulating Biomarkers in Malignant Melanoma. In *Advances in Clinical Chemistry*; Makowski, G.S., Ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 2015; Volume 69, pp. 47–89.
88. Blessing, K.; Sanders, D.S.; Grant, J.J. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology* **1998**, *32*, 139–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. von Schoultz, E.; Hansson, L.O.; Djureen, E.; Hansson, J.; Karnell, R.; Nilsson, B.; Stigbrand, T.; Ringborg, U. Prognostic value of serum analyses of S-100 beta protein in malignant melanoma. *Melanoma Res.* **1996**, *6*, 133–137. [[CrossRef](#)]
90. Mocellin, S.; Zavagno, G.; Nitti, D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: A meta-analysis. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 2370–2376. [[CrossRef](#)]
91. Zargoulidis, P.; Tsakiridis, K.; Karapantou, C.; Lampaki, S.; Kioumis, I.; Pitsiou, G.; Papaiwannou, A.; Hohenforst-Schmidt, W.; Huang, H.; Kesisis, G.; et al. Use of proteins as biomarkers and their role in carcinogenesis. *J. Cancer* **2015**, *6*, 9–18. [[CrossRef](#)]
92. Kruijff, S.; Hoekstra, H.J. The current status of S-100B as a biomarker in melanoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2012**, *38*, 281–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Felix, J.; Cassinat, B.; Porcher, R.; Schlageter, M.H.; Maubec, E.; Pages, C.; Baroudjian, B.; Homyrda, L.; Boukouaci, W.; Tamouza, R.; et al. Relevance of serum biomarkers associated with melanoma during follow-up of anti-CTLA-4 immunotherapy. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *40*, 466–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wagner, N.B.; Forschner, A.; Leiter, U.; Garbe, C.; Eigentler, T.K. S100B and LDH as early prognostic markers for response and overall survival in melanoma patients treated with anti-PD-1 or combined anti-PD-1 plus anti-CTLA-4 antibodies. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 339–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Blesch, A.; Bosserhoff, A.K.; Apfel, R.; Behl, C.; Hessdoerfer, B.; Schmitt, A.; Jachimczak, P.; Lottspeich, F.; Buettner, R.; Bogdahn, U. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5695–5701.
96. Bosserhoff, A.K.; Kaufmann, M.; Kaluza, B.; Bartke, I.; Zirngibl, H.; Hein, R.; Stolz, W.; Buettner, R. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3149–3153.
97. Krahn, G.; Kaskel, P.; Sander, S.; Waizenhofer, P.J.; Wortmann, S.; Leiter, U.; Peter, R.U. S100 beta is a more reliable tumor marker in peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, albumin and lactate-dehydrogenase. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 1311–1316.
98. Nikolin, B.; Djan, I.; Trifunovic, J.; Dugandzija, T.; Novkovic, D.; Djan, V.; Vucinic, N. MIA, S100 and LDH as important predictors of overall survival of patients with stage IIb and IIc melanoma. *J. BUON* **2016**, *21*, 691–697.
99. Lunavat, T.R.; Cheng, L.; Kim, D.K.; Bhadury, J.; Jang, S.C.; Lasser, C.; Sharples, R.A.; Lopez, M.D.; Nilsson, J.; Gho, Y.S.; et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells—Evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 810–823. [[CrossRef](#)]
100. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
101. Varamo, C.; Occelli, M.; Vivenza, D.; Merlano, M.; Lo Nigro, C. MicroRNAs role as potential biomarkers and key regulators in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **2017**, *56*, 3–10. [[CrossRef](#)]
102. Ross, C.L.; Kaushik, S.; Valdes-Rodriguez, R.; Anvekar, R. MicroRNAs in cutaneous melanoma: Role as diagnostic and prognostic biomarkers. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 5133–5141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Mumford, S.L.; Towler, B.P.; Pashler, A.L.; Gilleard, O.; Martin, Y.; Newbury, S.F. Circulating MicroRNA Biomarkers in Melanoma: Tools and Challenges in Personalised Medicine. *Biomolecules* **2018**, *8*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Li, N. Low Expression of Mir-137 Predicts Poor Prognosis in Cutaneous Melanoma Patients. *Med. Sci. Monit.* **2016**, *22*, 140–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Luo, C.; Tetteh, P.W.; Merz, P.R.; Dickes, E.; Abukiwan, A.; Hotz-Wagenblatt, A.; Holland-Cunz, S.; Sinnberg, T.; Schitteck, B.; Schadendorf, D.; et al. miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 768–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Peres, J.; Kwesi-Maliepaard, E.M.; Rambow, F.; Larue, L.; Prince, S. The tumour suppressor, miR-137, inhibits malignant melanoma migration by targeting the TBX3 transcription factor. *Cancer Lett.* **2017**, *405*, 111–119. [[CrossRef](#)]

107. Surman, M.; Stepien, E.; Przybylo, M. Melanoma-Derived Extracellular Vesicles: Focus on Their Proteome. *Proteomes* **2019**, *7*, 21. [[CrossRef](#)]
108. Kowal, J.; Arras, G.; Colombo, M.; Jouve, M.; Morath, J.P.; Primdal-Bengtson, B.; Dingli, F.; Loew, D.; Tkach, M.; Thery, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E968–E977. [[CrossRef](#)]
109. Becker, A.; Thakur, B.K.; Weiss, J.M.; Kim, H.S.; Peinado, H.; Lyden, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 836–848. [[CrossRef](#)]
110. Zhu, L.; Kalimuthu, S.; Gangadaran, P.; Oh, J.M.; Lee, H.W.; Baek, S.H.; Jeong, S.Y.; Lee, S.W.; Lee, J.; Ahn, B.C. Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics* **2017**, *7*, 2732–2745. [[CrossRef](#)]
111. Hood, J.L. Natural melanoma-derived extracellular vesicles. *Semin. Cancer Biol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
112. Théry, C.; Witwer, K.W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M.J.; Anderson, J.D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G.K.; et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7*, 1535750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Mateescu, B.; Kowal, E.J.K.; van Balkom, B.W.M.; Bartel, S.; Bhattacharyya, S.N.; Buzás, E.I.; Buck, A.H.; de Candia, P.; Chow, F.W.N.; Das, S.; et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA—An ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* **2017**, *6*, 1286095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Coumans, F.A.W.; Brisson, A.R.; Buzas, E.I.; Dignat-George, F.; Drees, E.E.E.; El-Andaloussi, S.; Emanuelli, C.; Gasecka, A.; Hendrix, A.; Hill, A.F.; et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1632–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Boriachek, K.; Islam, M.N.; Moller, A.; Salomon, C.; Nguyen, N.T.; Hossain, M.S.A.; Yamauchi, Y.; Shiddiky, M.J.A. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small* **2018**, *14*. [[CrossRef](#)]
116. Lin, S.; Yu, Z.; Chen, D.; Wang, Z.; Miao, J.; Li, Q.; Zhang, D.; Song, J.; Cui, D. Progress in Microfluidics-Based Exosome Separation and Detection Technologies for Diagnostic Applications. *Small* **2020**, *16*, e1903916. [[CrossRef](#)]
117. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T.L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **2015**, *527*, 329–335. [[CrossRef](#)]
118. Chen, G.; Huang, A.C.; Zhang, W.; Zhang, G.; Wu, M.; Xu, W.; Yu, Z.; Yang, J.; Wang, B.; Sun, H.; et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* **2018**, *560*, 382–386. [[CrossRef](#)]
119. Cordonnier, M.; Nardin, C.; Chanteloup, G.; Derangere, V.; Algros, M.P.; Arnould, L.; Garrido, C.; Aubin, F.; Gobbo, J. Tracking the evolution of circulating exosomal-PD-L1 to monitor melanoma patients. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1710899. [[CrossRef](#)]
120. Kouzmina, M.; Koljonen, V.; Leikola, J.; Bohling, T.; Lantto, E. Frequency and locations of systemic metastases in Merkel cell carcinoma by imaging. *Acta Radiol. Open* **2017**, *6*, 2058460117700449. [[CrossRef](#)]
121. Paulson, K.G.; Park, S.Y.; Vandeven, N.A.; Lachance, K.; Thomas, H.; Chapuis, A.G.; Harms, K.L.; Thompson, J.A.; Bhatia, S.; Stang, A.; et al. Merkel cell carcinoma: Current US incidence and projected increases based on changing demographics. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2018**, *78*, 457–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Hodgson, N.C. Merkel cell carcinoma: Changing incidence trends. *J. Surg. Oncol.* **2005**, *89*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Reichgelt, B.A.; Visser, O. Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993–2007. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 579–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Becker, J.C.; Stang, A.; DeCaprio, J.A.; Cerroni, L.; Lebbe, C.; Veness, M.; Nghiem, P. Merkel cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Carter, M.D.; Gaston, D.; Huang, W.Y.; Greer, W.L.; Pasternak, S.; Ly, T.Y.; Walsh, N.M. Genetic profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma show links between combined and pure MCPyV-negative tumors. *Hum. Pathol.* **2018**, *71*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Feng, H.; Shuda, M.; Chang, Y.; Moore, P.S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **2008**, *319*, 1096–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

127. Chang, Y.; Moore, P.S. Merkel cell carcinoma: A virus-induced human cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **2012**, *7*, 123–144. [\[CrossRef\]](#)
128. Ritter, C.; Fan, K.; Paschen, A.; Reker Hardrup, S.; Ferrone, S.; Nghiem, P.; Ugurel, S.; Schrama, D.; Becker, J.C. Epigenetic priming restores the HLA class-I antigen processing machinery expression in Merkel cell carcinoma. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2290. [\[CrossRef\]](#)
129. Popovic, L.; Jovanovic, D.; Petrovic, D.; Nikin, Z.; Matovina-Brko, G.; Trifunovic, J.; Kolarov-Bjelobrk, I. Concurrent chronic lymphocytic leukemia and merkel cell carcinoma in primary skin tumor and metastatic lymph node. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **2014**, *30*, 422–424. [\[CrossRef\]](#)
130. Maricich, S.M.; Wellnitz, S.A.; Nelson, A.M.; Lesniak, D.R.; Gerling, G.J.; Lumpkin, E.A.; Zoghbi, H.Y. Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science* **2009**, *324*, 1580–1582. [\[CrossRef\]](#)
131. Kervarec, T.; Samimi, M.; Guyetant, S.; Sarma, B.; Cheret, J.; Blanchard, E.; Berthon, P.; Schrama, D.; Houben, R.; Touze, A. Histogenesis of Merkel Cell Carcinoma: A Comprehensive Review. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 451. [\[CrossRef\]](#)
132. Yang, A.; Cordoba, C.; Cheung, K.; Konya, J. Merkel cell carcinoma in situ: New insights into the cells of origin. *Australas J. Dermatol.* **2019**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Sauer, C.M.; Haugg, A.M.; Chteinberg, E.; Rennspiess, D.; Winnepeninckx, V.; Speel, E.J.; Becker, J.C.; Kurz, A.K.; Zur Hausen, A. Reviewing the current evidence supporting early B-cells as the cellular origin of Merkel cell carcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2017**, *116*, 99–105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Sunshine, J.C.; Jahchan, N.S.; Sage, J.; Choi, J. Are there multiple cells of origin of Merkel cell carcinoma? *Oncogene* **2018**, *37*, 1409–1416. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Cheng, J.; Park, D.E.; Berrios, C.; White, E.A.; Arora, R.; Yoon, R.; Branigan, T.; Xiao, T.; Westerling, T.; Federation, A.; et al. Merkel cell polyomavirus recruits MYCL to the EP400 complex to promote oncogenesis. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006668. [\[CrossRef\]](#)
136. Verhaegen, M.E.; Mangelberger, D.; Harms, P.W.; Eberl, M.; Wilbert, D.M.; Meireles, J.; Bichakjian, C.K.; Saunders, T.L.; Wong, S.Y.; Dlugosz, A.A. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Initiates Merkel Cell Carcinoma-like Tumor Development in Mice. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 3151–3157. [\[CrossRef\]](#)
137. Sastre-Garau, X.; Peter, M.; Avril, M.F.; Laude, H.; Couturier, J.; Rozenberg, F.; Almeida, A.; Boitier, F.; Carlotti, A.; Couturaud, B.; et al. Merkel cell carcinoma of the skin: Pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J. Pathol.* **2009**, *218*, 48–56. [\[CrossRef\]](#)
138. Laude, H.C.; Jonchere, B.; Maubec, E.; Carlotti, A.; Marinho, E.; Couturaud, B.; Peter, M.; Sastre-Garau, X.; Avril, M.F.; Dupin, N.; et al. Distinct merkel cell polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001076. [\[CrossRef\]](#)
139. Blom, A.; Bhatia, S.; Pietromonaco, S.; Koehler, K.; Iyer, J.G.; Nagase, K.; Paulson, K.; Sabath, D.E.; Nghiem, P. Clinical utility of a circulating tumor cell assay in Merkel cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2014**, *70*, 449–455. [\[CrossRef\]](#)
140. Gaiser, M.R.; Daily, K.; Hoffmann, J.; Brune, M.; Enk, A.; Brownell, I. Evaluating blood levels of neuron specific enolase, chromogranin A, and circulating tumor cells as Merkel cell carcinoma biomarkers. *Oncotarget* **2015**, *6*, 26472–26482. [\[CrossRef\]](#)
141. Samimi, M.; Molet, L.; Fleury, M.; Laude, H.; Carlotti, A.; Gardair, C.; Baudin, M.; Gouguet, L.; Maubec, E.; Avenel-Audran, M.; et al. Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **2016**, *174*, 813–822. [\[CrossRef\]](#)
142. Fan, K.; Ritter, C.; Nghiem, P.; Blom, A.; Verhaegen, M.E.; Dlugosz, A.; Odum, N.; Woetmann, A.; Tothill, R.W.; Hicks, R.J.; et al. Circulating Cell-Free miR-375 as Surrogate Marker of Tumor Burden in Merkel Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 5873–5882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
143. Riethdorf, S.; Hildebrandt, L.; Heinzerling, L.; Heitzer, E.; Fischer, N.; Bergmann, S.; Mauermann, O.; Waldspuhl-Geigl, J.; Coith, C.; Schon, G.; et al. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells in Patients with Merkel Cell Carcinoma. *Clin. Chem.* **2019**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
144. Boyer, M.; Cayrefourcq, L.; Garima, F.; Foulongne, V.; Dereure, O.; Alix-Panabieres, C. Circulating Tumor Cell Detection and Polyomavirus Status in Merkel Cell Carcinoma. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1612. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
145. Greenberg, E.S.; Chong, K.K.; Huynh, K.T.; Tanaka, R.; Hoon, D.S. Epigenetic biomarkers in skin cancer. *Cancer Lett.* **2014**, *342*, 170–177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
146. Konstatinell, A.; Coucheron, D.H.; Sveinbjornsson, B.; Moens, U. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Merkel Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1873. [\[CrossRef\]](#)

147. Cristofanilli, M.; Budd, G.T.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Matera, J.; Miller, M.C.; Reuben, J.M.; Doyle, G.V.; Allard, W.J.; Terstappen, L.W.; et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 781–791. [[CrossRef](#)]
148. Cohen, S.J.; Punt, C.J.; Iannotti, N.; Saidman, B.H.; Sabbath, K.D.; Gabrail, N.Y.; Picus, J.; Morse, M.; Mitchell, E.; Miller, M.C.; 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. [[CrossRef](#)]
149. de Bono, J.S.; Scher, H.I.; Montgomery, R.B.; Parker, C.; Miller, M.C.; Tissing, H.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W.; Pienta, K.J.; Raghavan, D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6302–6309. [[CrossRef](#)]
150. Abraham, K.J.; Zhang, X.; Vidal, R.; Pare, G.C.; Feilotter, H.E.; Tron, V.A. Roles for miR-375 in Neuroendocrine Differentiation and Tumor Suppression via Notch Pathway Suppression in Merkel Cell Carcinoma. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 1025–1035. [[CrossRef](#)]
151. Uso, M.; Jantus-Lewintre, E.; Sirera, R.; Bremnes, R.M.; Camps, C. miRNA detection methods and clinical implications in lung cancer. *Future Oncol.* **2014**, *10*, 2279–2292. [[CrossRef](#)]
152. Kappel, A.; Keller, A. miRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2017**, *55*, 636–647. [[CrossRef](#)]
153. Kumar, S.; Xie, H.; Shi, H.; Gao, J.; Juhlin, C.C.; Bjornhagen, V.; Hoog, A.; Lee, L.; Larsson, C.; Lui, W.O. Merkel cell polyomavirus oncoproteins induce microRNAs that suppress multiple autophagy genes. *Int. J. Cancer* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Ning, M.S.; Kim, A.S.; Prasad, N.; Levy, S.E.; Zhang, H.; Andl, T. Characterization of the Merkel Cell Carcinoma miRNome. *J. Skin Cancer* **2014**, *2014*, 289548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Konstantinell, A.; Bruun, J.A.; Olsen, R.; Aspar, A.; Skalko-Basnet, N.; Sveinbjornsson, B.; Moens, U. Secretomic analysis of extracellular vesicles originating from polyomavirus-negative and polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell lines. *Proteomics* **2016**, *16*, 2587–2591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Samimi, M. Immune Checkpoint Inhibitors and Beyond: An Overview of Immune-Based Therapies in Merkel Cell Carcinoma. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
157. Paulson, K.G.; Lewis, C.W.; Redman, M.W.; Simonson, W.T.; Lisberg, A.; Ritter, D.; Morishima, C.; Hutchinson, K.; Mudgistratova, L.; Blom, A.; et al. Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of Merkel cell carcinoma: A prospective validation study. *Cancer* **2017**, *123*, 1464–1474. [[CrossRef](#)]
158. Mitteldorf, C.; Berisha, A.; Tronnier, M.; Pfaltz, M.C.; Kempf, W. PD-1 and PD-L1 in neoplastic cells and the tumor microenvironment of Merkel cell carcinoma. *J. Cutan. Pathol.* **2017**, *44*, 740–746. [[CrossRef](#)]
159. Giraldo, N.A.; Nguyen, P.; Engle, E.L.; Kaunitz, G.J.; Cottrell, T.R.; Berry, S.; Green, B.; Soni, A.; Cuda, J.D.; Stein, J.E.; et al. Multidimensional, quantitative assessment of PD-1/PD-L1 expression in patients with Merkel cell carcinoma and association with response to pembrolizumab. *J. Immunother Cancer* **2018**, *6*, 99. [[CrossRef](#)]
160. Barkdull, S.; Brownell, I. PD-L1 blockade with avelumab: A new paradigm for treating Merkel cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **2017**, *18*, 937–939. [[CrossRef](#)]
161. Gaiser, M.R.; Bongiorno, M.; Brownell, I. PD-L1 inhibition with avelumab for metastatic Merkel cell carcinoma. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 345–359. [[CrossRef](#)]
162. Hamanishi, J.; Mandai, M.; Matsumura, N.; Abiko, K.; Baba, T.; Konishi, I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: Perspectives and issues. *Int. J. Clin. Oncol.* **2016**, *21*, 462–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Shirley, M. Avelumab: A Review in Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *Target. Oncol.* **2018**, *13*, 409–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Consentement éclairé :



Consentement éclairé pour l'utilisation à des fins de recherche scientifique d'un prélèvement biologique effectué au cours d'un soin

Je soussigné(e) ai pris connaissance du document m'informant de la constitution d'une collection biologique à partir de la fraction non utilisée des prélèvements biologiques effectués au cours de mon hospitalisation, et de leur utilisation pour des recherches scientifiques sous la responsabilité du Dr.....

Je sais qu'ils pourront être utilisés par des chercheurs travaillant au Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, des chercheurs travaillant en dehors du CHU pour des travaux de recherche entrepris dans le cadre de programmes évalués par le Conseil Scientifique du CHU.

Considérant disposer des informations qui me permettent de prendre ma décision,

- Je donne mon accord pour que la partie non utilisée des prélèvements biologiques soit utilisée à des fins de recherches scientifiques
- Je m'oppose à ce que la partie non utilisée des prélèvements biologiques soit utilisée à des fins de recherches scientifiques

Je sais que ma décision n'est pas irrévocable et que je peux donc revenir dessus à tout moment, sans avoir à la justifier et sans que cela porte préjudice aux soins qui me sont prodigués.

J'ai également été informé(e) du fait que les données médicales à caractère personnel me concernant seront transmises aux personnes collaborant à ces recherches scientifiques. Je serai personnellement averti(e) par le Centre Hospitalier de Montpellier chaque fois qu'elles seront nécessaires à la réalisation d'une recherche en particulier. Ces données à caractère personnel resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par les personnes qui collaborent à la recherche. En application de la loi « Informatique et Liberté » du 6 Janvier 1978, modifiée par les lois n° 94-548 du 1^{er} Juillet 1994, n° 2002-303 du 4 Mars 2002, et 2004-801 du 6 Août 2004, j'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette étude, y compris mon origine ethnique, puissent faire l'objet d'un traitement. J'ai bien noté que les droits d'accès (article 39) et de rectification (article 40), que m'ouvrent les textes susvisés, pourront s'exercer à tout moment auprès du Dr.....

Si je le souhaite, les données me concernant pourront m'être communiquées directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix.

Si je le souhaite, j'ai le droit d'être informé(e) des résultats globaux de cette recherche selon les modalités qui m'ont été précisées dans la note d'information.

Fait à Montpellier, le

Signature du patient

BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi, A. N., S. M. Ahmed, and B. M. Qureshi. 2019. 'Recent updates in the management of Merkel Cell Carcinoma', *J Pak Med Assoc*, 69: 1693-99.
- Abbosh, C., N. J. Birkbak, and C. Swanton. 2018. 'Early stage NSCLC - challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection', *Nat Rev Clin Oncol*, 15: 577-86.
- Aceto, N. 2020. 'Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis', *Biomed J*, 43: 18-23.
- Aceto, N., A. Bardia, D. T. Miyamoto, M. C. Donaldson, B. S. Wittner, J. A. Spencer, M. Yu, A. Pely, A. Engstrom, H. Zhu, B. W. Brannigan, R. Kapur, S. L. Stott, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, C. P. Lin, M. Toner, D. A. Haber, and S. Maheswaran. 2014. 'Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis', *Cell*, 158: 1110-22.
- Adams, D. L., S. Stefansson, C. Haudenschild, S. S. Martin, M. Charpentier, S. Chumsri, M. Cristofanilli, C. M. Tang, and R. K. Alpaugh. 2015. 'Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch((R)) CTC test', *Cytometry A*, 87: 137-44.
- Agarwal, A., M. Balic, D. El-Ashry, and R. J. Cote. 2018. 'Circulating Tumor Cells: Strategies for Capture, Analyses, and Propagation', *Cancer J*, 24: 70-77.
- Agashe, R., and R. Kurzrock. 2020. 'Circulating Tumor Cells: From the Laboratory to the Cancer Clinic', *Cancers (Basel)*, 12.
- Alix-Panabieres, C., K. Bartkowiak, and K. Pantel. 2016. 'Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients', *Mol Oncol*, 10: 443-9.
- Alix-Panabieres, C., and K. Pantel. 2014. 'Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision', *Lab Chip*, 14: 57-62.
- . 2016. 'Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy', *Cancer Discov*, 6: 479-91.
- . 2021a. 'Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application', *Cancer Discov*, 11: 858-73.
- . 2021b. 'Liquid biopsy: from discovery to clinical implementation', *Mol Oncol*, 15: 1617-21.
- Antfolk, M., C. Antfolk, H. Lilja, T. Laurell, and P. Augustsson. 2015. 'A single inlet two-stage acoustophoresis chip enabling tumor cell enrichment from white blood cells', *Lab Chip*, 15: 2102-9.
- Arora, R., J. E. Choi, P. W. Harms, and P. Chandrani. 2020. 'Merkel Cell Polyomavirus in Merkel Cell Carcinoma: Integration Sites and Involvement of the KMT2D Tumor Suppressor Gene', *Viruses*, 12.
- Arvia, R., M. Sollai, F. Pierucci, C. Urso, D. Massi, and K. Zakrzewska. 2017. 'Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies', *J Virol Methods*, 246: 15-20.
- Asaga, S., C. Kuo, T. Nguyen, M. Terpenning, A. E. Giuliano, and D. S. Hoon. 2011. 'Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer', *Clin Chem*, 57: 84-91.
- Ayaz, L., A. Gorur, H. Y. Yaroglu, C. Ozcan, and L. Tamer. 2013. 'Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma', *J Cancer Res Clin Oncol*, 139: 1499-506.
- Baccelli, I., A. Schneeweiss, S. Riethdorf, A. Stenzinger, A. Schillert, V. Vogel, C. Klein, M. Saini, T. Bauerle, M. Wallwiener, T. Holland-Letz, T. Hofner, M. Sprick, M. Scharpff, F. Marme, H. P. Sinn, K. Pantel, W. Weichert, and A. Trumpp. 2013. 'Identification of a population of blood

- circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay', *Nat Biotechnol*, 31: 539-44.
- Banko, P., S. Y. Lee, V. Nagygyorgy, M. Zrinyi, C. H. Chae, D. H. Cho, and A. Telekes. 2019. 'Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood', *J Hematol Oncol*, 12: 48.
- Bastos, D. A., and E. S. Antonarakis. 2018. 'CTC-derived AR-V7 detection as a prognostic and predictive biomarker in advanced prostate cancer', *Expert Rev Mol Diagn*, 18: 155-63.
- Becker, J. C., A. Stang, J. A. DeCaprio, L. Cerroni, C. Lebbe, M. Veness, and P. Nghiem. 2017. 'Merkel cell carcinoma', *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17077.
- Benezeder, T., V. Tiran, A. A. N. Treitler, C. Suppan, C. Rossmann, H. Stoeger, R. J. Cote, R. H. Datar, M. Balic, and N. Dandachi. 2017. 'Multigene methylation analysis of enriched circulating tumor cells associates with poor progression-free survival in metastatic breast cancer patients', *Oncotarget*, 8: 92483-96.
- Benoy, I. H., H. Elst, P. Van Dam, S. Scharpe, E. Van Marck, P. B. Vermeulen, and L. Y. Dirix. 2006. 'Detection of circulating tumour cells in blood by quantitative real-time RT-PCR: effect of pre-analytical time', *Clin Chem Lab Med*, 44: 1082-7.
- Best, M. G., P. Wesseling, and T. Wurdinger. 2018. 'Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring', *Cancer Res*, 78: 3407-12.
- Bialasiewicz, S., S. B. Lambert, D. M. Whiley, M. D. Nissen, and T. P. Sloots. 2009. 'Merkel cell polyomavirus DNA in respiratory specimens from children and adults', *Emerg Infect Dis*, 15: 492-4.
- Bidard, F. C., T. Fehm, M. Ignatiadis, J. B. Smerage, C. Alix-Panabieres, W. Janni, C. Messina, C. Paoletti, V. Muller, D. F. Hayes, M. Piccart, and J. Y. Pierga. 2013. 'Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials', *Cancer Metastasis Rev*, 32: 179-88.
- Bidard, F. C., W. Jacot, N. Kiavue, S. Dureau, A. Kadi, E. Brain, T. Bachelot, H. Bourgeois, A. Goncalves, S. Ladoire, H. Naman, F. Dalenc, J. Gligorov, M. Espie, G. Emile, J. M. Ferrero, D. Loirat, S. Frank, L. Cabel, V. Dieras, L. Cayrefourcq, C. Simondi, F. Berger, C. Alix-Panabieres, and J. Y. Pierga. 2020. 'Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial', *JAMA Oncol*.
- Bidard, F. C., D. J. Peeters, T. Fehm, F. Nole, R. Gisbert-Criado, D. Mavroudis, S. Grisanti, D. Generali, J. A. Garcia-Saenz, J. Stebbing, C. Caldas, P. Gazzaniga, L. Manso, R. Zamarchi, A. F. de Lascoiti, L. De Mattos-Arruda, M. Ignatiadis, R. Lebofsky, S. J. van Laere, F. Meier-Stiegen, M. T. Sandri, J. Vidal-Martinez, E. Politaki, F. Consoli, A. Bottini, E. Diaz-Rubio, J. Krell, S. J. Dawson, C. Raimondi, A. Rutten, W. Janni, E. Munzone, V. Caranana, S. Agelaki, C. Almici, L. Dirix, E. F. Solomayer, L. Zorzino, H. Johannes, J. S. Reis-Filho, K. Pantel, J. Y. Pierga, and S. Michiels. 2014. 'Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data', *Lancet Oncol*, 15: 406-14.
- Blom, A., S. Bhatia, S. Pietromonaco, K. Koehler, J. G. Iyer, K. Nagase, K. Paulson, D. E. Sabath, and P. Nghiem. 2014. 'Clinical utility of a circulating tumor cell assay in Merkel cell carcinoma', *J Am Acad Dermatol*, 70: 449-55.
- Boeva, V., T. Popova, K. Bleakley, P. Chiche, J. Cappel, G. Schleiermacher, I. Janoueix-Lerosey, O. Delattre, and E. Barillot. 2012. 'Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data', *Bioinformatics*, 28: 423-5.

- Borriello, L., G. S. Karagiannis, C. L. Duran, A. Coste, M. H. Oktay, D. Entenberg, and J. S. Condeelis. 2020. 'The role of the tumor microenvironment in tumor cell intravasation and dissemination', *Eur J Cell Biol*, 99: 151098.
- Bottani, M., G. Banfi, and G. Lombardi. 2019. 'Circulating miRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Common Solid Tumors: Focus on Lung, Breast, Prostate Cancers, and Osteosarcoma', *J Clin Med*, 8.
- Boya, M., C. H. Chu, R. Liu, T. Ozkaya-Ahmadov, and A. F. Sarioglu. 2020. 'Circulating Tumor Cell Enrichment Technologies', *Recent Results Cancer Res*, 215: 25-55.
- Boyer, M., L. Cayrefourcq, O. Dereure, L. Meunier, O. Becquart, and C. Alix-Panabieres. 2020. 'Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma', *Cancers (Basel)*, 12.
- Boyer, M., L. Cayrefourcq, F. Garima, V. Foulongne, O. Dereure, and C. Alix-Panabieres. 2020. 'Circulating Tumor Cell Detection and Polyomavirus Status in Merkel Cell Carcinoma', *Sci Rep*, 10: 1612.
- Bragado, P., Y. Estrada, F. Parikh, S. Krause, C. Capobianco, H. G. Farina, D. M. Schewe, and J. A. Aguirre-Ghiso. 2013. 'TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38alpha/beta signalling', *Nat Cell Biol*, 15: 1351-61.
- Bulfoni, M., L. Gerratana, F. Del Ben, S. Marzinotto, M. Sorrentino, M. Turetta, G. Scoles, B. Toffoletto, M. Isola, C. A. Beltrami, C. Di Loreto, A. P. Beltrami, F. Puglisi, and D. Cesselli. 2016. 'In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis', *Breast Cancer Res*, 18: 30.
- Caldwell, C., Jr., C. E. Johnson, V. N. Balaji, G. A. Balaji, R. D. Hammer, and R. Kannan. 2017. 'Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for Determination of PDL1 Expression in Tumors', *Sci Rep*, 7: 13682.
- Cann, G. M., Z. G. Gulzar, S. Cooper, R. Li, S. Luo, M. Tat, S. Stuart, G. Schroth, S. Srinivas, M. Ronaghi, J. D. Brooks, and A. H. Talasz. 2012. 'mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer', *PLoS One*, 7: e49144.
- Carmeliet, P., and R. K. Jain. 2000. 'Angiogenesis in cancer and other diseases', *Nature*, 407: 249-57.
- Carneiro, B. A., S. Pamarthy, A. N. Shah, V. Sagar, K. Unno, H. Han, X. J. Yang, R. B. Costa, R. J. Nagy, R. B. Lanman, T. M. Kuzel, J. S. Ross, L. Gay, J. A. Elvin, S. M. Ali, M. Cristofanilli, Y. K. Chae, F. J. Giles, and S. A. Abdulkadir. 2018. 'Anaplastic Lymphoma Kinase Mutation (ALK F1174C) in Small Cell Carcinoma of the Prostate and Molecular Response to Alectinib', *Clin Cancer Res*, 24: 2732-39.
- Cayrefourcq, L., T. Mazard, S. Joosse, J. Solassol, J. Ramos, E. Assenat, U. Schumacher, V. Costes, T. Maudelonde, K. Pantel, and C. Alix-Panabieres. 2015. 'Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells', *Cancer Res*, 75: 892-901.
- Cayrefourcq, L., F. Thomas, T. Mazard, E. Assenat, S. Assou, and C. Alix-Panabieres. 2021. 'Selective treatment pressure in colon cancer drives the molecular profile of resistant circulating tumor cell clones', *Mol Cancer*, 20: 30.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, and I. C. MacDonald. 2002. 'Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites', *Nat Rev Cancer*, 2: 563-72.
- Chen, B. T., R. D. Loberg, C. K. Neeley, S. M. O'Hara, S. Gross, G. Doyle, R. L. Dunn, L. M. Kalikin, and K. J. Pienta. 2005. 'Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease', *Urology*, 65: 616-21.

- Cheng, I. F., H. C. Chang, D. Hou, and H. C. Chang. 2007. 'An integrated dielectrophoretic chip for continuous bioparticle filtering, focusing, sorting, trapping, and detecting', *Biomicrofluidics*, 1: 21503.
- Cheng, I. F., W. L. Huang, T. Y. Chen, C. W. Liu, Y. D. Lin, and W. C. Su. 2015. 'Antibody-free isolation of rare cancer cells from blood based on 3D lateral dielectrophoresis', *Lab Chip*, 15: 2950-9.
- Cheng, S. B., M. Xie, J. Q. Xu, J. Wang, S. W. Lv, S. Guo, Y. Shu, M. Wang, W. G. Dong, and W. H. Huang. 2016. 'High-Efficiency Capture of Individual and Cluster of Circulating Tumor Cells by a Microchip Embedded with Three-Dimensional Poly(dimethylsiloxane) Scaffold', *Anal Chem*, 88: 6773-80.
- Cheng, Y. H., Y. C. Chen, E. Lin, R. Brien, S. Jung, Y. T. Chen, W. Lee, Z. Hao, S. Sahoo, H. Min Kang, J. Cong, M. Burness, S. Nagrath, S. Wicha M, and E. Yoon. 2019. 'Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA-sequencing for circulating tumor cells', *Nat Commun*, 10: 2163.
- Chikaishi, Y., K. Yoneda, T. Ohnaga, and F. Tanaka. 2017. 'EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip'', *Oncol Rep*, 37: 77-82.
- Chu, C. H., R. Liu, T. Ozkaya-Ahmadov, M. Boya, B. E. Swain, J. M. Owens, E. Burentugs, M. A. Bilen, J. F. McDonald, and A. F. Sarioglu. 2019. 'Hybrid negative enrichment of circulating tumor cells from whole blood in a 3D-printed monolithic device', *Lab Chip*, 19: 3427-37.
- Cieslikowski, W. A., J. Budna-Tukan, M. Swierczewska, A. Ida, M. Hrab, A. Jankowiak, M. Mazel, M. Nowicki, P. Milecki, K. Pantel, C. Alix-Panabieres, M. Zabel, and A. Antczak. 2020. 'Circulating Tumor Cells as a Marker of Disseminated Disease in Patients with Newly Diagnosed High-Risk Prostate Cancer', *Cancers (Basel)*, 12.
- Claesson-Welsh, L., and M. Welsh. 2013. 'VEGFA and tumour angiogenesis', *J Intern Med*, 273: 114-27.
- Coggshall, K., T. L. Tello, J. P. North, and S. S. Yu. 2018. 'Merkel cell carcinoma: An update and review: Pathogenesis, diagnosis, and staging', *J Am Acad Dermatol*, 78: 433-42.
- Cortes-Hernandez, L. E., S. Z. Eslami, and C. Alix-Panabieres. 2020. 'Circulating tumor cell as the functional aspect of liquid biopsy to understand the metastatic cascade in solid cancer', *Mol Aspects Med*, 72: 100816.
- Cortes-Hernandez, L. E., S. Z. Eslami, K. Pantel, and C. Alix-Panabieres. 2020. 'Molecular and Functional Characterization of Circulating Tumor Cells: From Discovery to Clinical Application', *Clin Chem*, 66: 97-104.
- Cristofanilli, M., G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M. C. Miller, J. M. Reuben, G. V. Doyle, W. J. Allard, L. W. Terstappen, and D. F. Hayes. 2004. 'Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer', *N Engl J Med*, 351: 781-91.
- Cristofanilli, M., D. F. Hayes, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. M. Reuben, G. V. Doyle, J. Matera, W. J. Allard, M. C. Miller, H. A. Fritsche, G. N. Hortobagyi, and L. W. Terstappen. 2005. 'Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer', *J Clin Oncol*, 23: 1420-30.
- Croce, C. M. 2009. 'Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer', *Nat Rev Genet*, 10: 704-14.
- Danila, D. C., G. Heller, G. A. Gignac, R. Gonzalez-Espinoza, A. Anand, E. Tanaka, H. Lilja, L. Schwartz, S. Larson, M. Fleisher, and H. I. Scher. 2007. 'Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 13: 7053-8.
- Davis, J. E., Jr., J. Kirk, Y. Ji, and D. G. Tang. 2019. 'Tumor Dormancy and Slow-Cycling Cancer Cells', *Adv Exp Med Biol*, 1164: 199-206.

- de Bono, J. S., H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, H. Tissing, G. V. Doyle, L. W. Terstappen, K. J. Pienta, and D. Raghavan. 2008. 'Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 14: 6302-9.
- de Wit, S., G. van Dalum, A. T. Lenferink, A. G. Tibbe, T. J. Hiltermann, H. J. Groen, C. J. van Rijn, and L. W. Terstappen. 2015. 'The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells', *Sci Rep*, 5: 12270.
- Del Marmol, V., and C. Lebbe. 2019. 'New perspectives in Merkel cell carcinoma', *Curr Opin Oncol*, 31: 72-83.
- Delacour, H., A. Servonnet, A. Perrot, J. F. Vigezzi, and J. M. Ramirez. 2005. '[ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology]', *Ann Biol Clin (Paris)*, 63: 145-54.
- Demicheli, R., M. W. Retsky, W. J. Hrushesky, M. Baum, and I. D. Gukas. 2008. 'The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations', *Ann Oncol*, 19: 1821-8.
- Desitter, I., B. S. Guerrouahen, N. Benali-Furet, J. Wechsler, P. A. Janne, Y. Kuang, M. Yanagita, L. Wang, J. A. Berkowitz, R. J. Distel, and Y. E. Cayre. 2011. 'A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells', *Anticancer Res*, 31: 427-41.
- Di Trapani, M., N. Manaresi, and G. Medoro. 2018. 'DEPArray system: An automatic image-based sorter for isolation of pure circulating tumor cells', *Cytometry A*, 93: 1260-66.
- Di Vizio, D., M. Morello, A. C. Dudley, P. W. Schow, R. M. Adam, S. Morley, D. Mulholland, M. Rotinen, M. H. Hager, L. Insabato, M. A. Moses, F. Demichelis, M. P. Lisanti, H. Wu, M. Klagsbrun, N. A. Bhowmick, M. A. Rubin, C. D'Souza-Schorey, and M. R. Freeman. 2012. 'Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease', *Am J Pathol*, 181: 1573-84.
- Dianat-Moghadam, H., M. Azizi, S. Z. Eslami, L. E. Cortes-Hernandez, M. Heidarifard, M. Nouri, and C. Alix-Panabieres. 2020. 'The Role of Circulating Tumor Cells in the Metastatic Cascade: Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance', *Cancers (Basel)*, 12.
- Dongre, A., and R. A. Weinberg. 2019. 'New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 69-84.
- Drapkin, B. J., J. George, C. L. Christensen, M. Mino-Kenudson, R. Dries, T. Sundaresan, S. Phat, D. T. Myers, J. Zhong, P. Igo, M. H. Hazar-Rethinam, J. A. Licausi, M. Gomez-Caraballo, M. Kem, K. N. Jani, R. Azimi, N. Abedpour, R. Menon, S. Lakis, R. S. Heist, R. Buttner, S. Haas, L. V. Sequist, A. T. Shaw, K. K. Wong, A. N. Hata, M. Toner, S. Maheswaran, D. A. Haber, M. Peifer, N. Dyson, R. K. Thomas, and A. F. Farago. 2018. 'Genomic and Functional Fidelity of Small Cell Lung Cancer Patient-Derived Xenografts', *Cancer Discov*, 8: 600-15.
- Duan, G. C., X. P. Zhang, H. E. Wang, Z. K. Wang, H. Zhang, L. Yu, W. F. Xue, Z. F. Xin, Z. H. Hu, and Q. T. Zhao. 2020. 'Circulating Tumor Cells as a Screening and Diagnostic Marker for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer', *Onco Targets Ther*, 13: 1931-39.
- Duda, D. G., A. M. Duyverman, M. Kohno, M. Snuderl, E. J. Steller, D. Fukumura, and R. K. Jain. 2010. 'Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 21677-82.
- Dudjak, L. A. 1992. 'Cancer metastasis', *Semin Oncol Nurs*, 8: 40-50.
- Erpenbeck, L., and M. P. Schon. 2010. 'Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells', *Blood*, 115: 3427-36.
- Escribano, J., M. B. Chen, E. Moeendarbary, X. Cao, V. Shenoy, J. M. Garcia-Aznar, R. D. Kamm, and F. Spill. 2019. 'Balance of mechanical forces drives endothelial gap formation and may facilitate cancer and immune-cell extravasation', *PLoS Comput Biol*, 15: e1006395.

- Eslami, S. Z., L. E. Cortes-Hernandez, and C. Alix-Panabieres. 2020. 'Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells', *Cells*, 9.
- Eslami, S. Z., L. E. Cortes-Hernandez, L. Cayrefourcq, and C. Alix-Panabieres. 2020. 'The Different Facets of Liquid Biopsy: A Kaleidoscopic View', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 10.
- Fabbri, F., S. Carloni, W. Zoli, P. Ulivi, G. Gallerani, P. Fici, E. Chiadini, A. Passardi, G. L. Frassinetti, A. Ragazzini, and D. Amadori. 2013. 'Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs', *Cancer Lett*, 335: 225-31.
- Fan, K., C. Ritter, P. Nghiem, A. Blom, M. E. Verhaegen, A. Dlugosz, N. Odum, A. Woetmann, R. W. Tothill, R. J. Hicks, M. Sand, D. Schrama, D. Schadendorf, S. Ugurel, and J. C. Becker. 2018. 'Circulating Cell-Free miR-375 as Surrogate Marker of Tumor Burden in Merkel Cell Carcinoma', *Clin Cancer Res*, 24: 5873-82.
- Farace, F., C. Massard, N. Vimond, F. Drusch, N. Jacques, F. Billiot, A. Laplanche, A. Chauchereau, L. Lacroix, D. Planchard, S. Le Moulec, F. Andre, K. Fizazi, J. C. Soria, and P. Vielh. 2011. 'A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas', *Br J Cancer*, 105: 847-53.
- Faugeroux, V., C. Lefebvre, E. Pailler, V. Pierron, C. Marcaillou, S. Tourlet, F. Billiot, S. Dogan, M. Oulhen, P. Vielh, P. Rameau, M. NgoCamus, C. Massard, C. Laplace-Builhe, A. Tibbe, M. Taylor, J. C. Soria, K. Fizazi, Y. Loriot, S. Julien, and F. Farace. 2020. 'An Accessible and Unique Insight into Metastasis Mutational Content Through Whole-exome Sequencing of Circulating Tumor Cells in Metastatic Prostate Cancer', *Eur Urol Oncol*, 3: 498-508.
- Faugeroux, V., E. Pailler, M. Oulhen, O. Deas, L. Brulle-Soumare, C. Hervieu, V. Marty, K. Alexandrova, K. C. Andree, N. H. Stoecklein, D. Tramalloni, S. Cairo, M. NgoCamus, C. Nicotra, Lwmm Terstappen, N. Manaresi, V. Lapierre, K. Fizazi, J. Y. Scoazec, Y. Loriot, J. G. Judde, and F. Farace. 2020. 'Genetic characterization of a unique neuroendocrine transdifferentiation prostate circulating tumor cell-derived eXplant model', *Nat Commun*, 11: 1884.
- Feng, H., M. Shuda, Y. Chang, and P. S. Moore. 2008. 'Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma', *Science*, 319: 1096-100.
- Fernandez-Lazaro, D., J. L. G. Hernandez, A. C. Garcia, A. C. D. Castillo, M. V. Hueso, and J. J. Cruz-Hernandez. 2020. 'Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy', *Diagnostics (Basel)*, 10.
- Fidler, I. J. 1970. 'Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine', *J Natl Cancer Inst*, 45: 773-82.
- Fidler, I. J., and C. M. Balch. 1987. 'The biology of cancer metastasis and implications for therapy', *Curr Probl Surg*, 24: 129-209.
- Fischer, N., J. Brandner, F. Fuchs, I. Moll, and A. Grundhoff. 2010. 'Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus', *Int J Cancer*, 126: 2133-42.
- Freitas, C., C. Sousa, F. Machado, M. Serino, V. Santos, N. Cruz-Martins, A. Teixeira, A. Cunha, T. Pereira, H. P. Oliveira, J. L. Costa, and V. Hespagnol. 2021. 'The Role of Liquid Biopsy in Early Diagnosis of Lung Cancer', *Front Oncol*, 11: 634316.
- Friedl, P., and S. Alexander. 2011. 'Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity', *Cell*, 147: 992-1009.
- Frithiof, H., K. Aaltonen, and L. Ryden. 2016. 'A FISH-based method for assessment of HER-2 amplification status in breast cancer circulating tumor cells following CellSearch isolation', *Onco Targets Ther*, 9: 7095-103.

- Gaiser, M. R., K. Daily, J. Hoffmann, M. Brune, A. Enk, and I. Brownell. 2015. 'Evaluating blood levels of neuron specific enolase, chromogranin A, and circulating tumor cells as Merkel cell carcinoma biomarkers', *Oncotarget*, 6: 26472-82.
- Gao, D., I. Vela, A. Sboner, P. J. Iaquina, W. R. Karthaus, A. Gopalan, C. Dowling, J. N. Wanjala, E. A. Undvall, V. K. Arora, J. Wongvipat, M. Kossai, S. Ramazanoglu, L. P. Barboza, W. Di, Z. Cao, Q. F. Zhang, I. Sirota, L. Ran, T. Y. MacDonald, H. Beltran, J. M. Mosquera, K. A. Touijer, P. T. Scardino, V. P. Laudone, K. R. Curtis, D. E. Rathkopf, M. J. Morris, D. C. Danila, S. F. Slovin, S. B. Solomon, J. A. Eastham, P. Chi, B. Carver, M. A. Rubin, H. I. Scher, H. Clevers, C. L. Sawyers, and Y. Chen. 2014. 'Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer', *Cell*, 159: 176-87.
- Gao, Y., K. Killian, H. Zhang, K. Yu, Q. Z. Li, S. Weinstein, J. Virtamo, M. Tucker, P. Taylor, D. Albanes, P. Meltzer, and N. Caporaso. 2012. 'Leukocyte DNA methylation and colorectal cancer among male smokers', *World J Gastrointest Oncol*, 4: 193-201.
- Garcia-Murillas, I., G. Schiavon, B. Weigelt, C. Ng, S. Hrebien, R. J. Cutts, M. Cheang, P. Osin, A. Nerurkar, I. Kozarewa, J. A. Garrido, M. Dowsett, J. S. Reis-Filho, I. E. Smith, and N. C. Turner. 2015. 'Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer', *Sci Transl Med*, 7: 302ra133.
- Garneski, K. M., A. H. Warcola, Q. Feng, N. B. Kiviat, J. H. Leonard, and P. Nghiem. 2009. 'Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors', *J Invest Dermatol*, 129: 246-8.
- Gasch, C., T. Bauernhofer, M. Pichler, S. Langer-Freitag, M. Reeh, A. M. Seifert, O. Mauermann, J. R. Izbicki, K. Pantel, and S. Riethdorf. 2013. 'Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer', *Clin Chem*, 59: 252-60.
- Gkolfinou, S., R. L. Jones, and A. Constantinidou. 2020. 'The Emerging Role of Platelets in the Formation of the Micrometastatic Niche: Current Evidence and Future Perspectives', *Front Oncol*, 10: 374.
- Gkoutela, S., F. Castro-Giner, B. M. Szczerba, M. Vetter, J. Landin, R. Scherrer, I. Krol, M. C. Scheidmann, C. Beisel, C. U. Stirnimann, C. Kurzeder, V. Heinzelmann-Schwarz, C. Rochlitz, W. P. Weber, and N. Aceto. 2019. 'Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding', *Cell*, 176: 98-112 e14.
- Gocheva, V., H. W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman, and J. A. Joyce. 2010. 'IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion', *Genes Dev*, 24: 241-55.
- Goddard, E. T., I. Bozic, S. R. Riddell, and C. M. Ghajar. 2018. 'Dormant tumour cells, their niches and the influence of immunity', *Nat Cell Biol*, 20: 1240-49.
- Goh, G., T. Walradt, V. Markarov, A. Blom, N. Riaz, R. Doumani, K. Stafstrom, A. Moshiri, L. Yelistratova, J. Levinsohn, T. A. Chan, P. Nghiem, R. P. Lifton, and J. Choi. 2016. 'Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy', *Oncotarget*, 7: 3403-15.
- Gong, J., A. Chehrazi-Raffle, S. Reddi, and R. Salgia. 2018. 'Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations', *J Immunother Cancer*, 6: 8.
- Goodman, O. B., Jr., L. M. Fink, J. T. Symanowski, B. Wong, B. Grobaski, D. Pomerantz, Y. Ma, D. C. Ward, and N. J. Vogelzang. 2009. 'Circulating tumor cells in patients with castration-resistant

- prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18: 1904-13.
- Gregory, A. C., E. Williamson, and G. Feder. 2017. 'The Impact on Informal Supporters of Domestic Violence Survivors: A Systematic Literature Review', *Trauma Violence Abuse*, 18: 562-80.
- Guedes, J. G., I. Veiga, P. Rocha, P. Pinto, C. Pinto, M. Pinheiro, A. Peixoto, M. Fragoso, A. Raimundo, P. Ferreira, M. Machado, N. Sousa, P. Lopes, A. Araujo, J. Macedo, F. Alves, C. Coutinho, R. Henrique, L. L. Santos, and M. R. Teixeira. 2013. 'High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer', *BMC Cancer*, 13: 169.
- Gundem, G., P. Van Loo, B. Kremeyer, L. B. Alexandrov, J. M. C. Tubio, E. Papaemmanuil, D. S. Brewer, H. M. L. Kallio, G. Hognas, M. Annala, K. Kivinummi, V. Goody, C. Latimer, S. O'Meara, K. J. Dawson, W. Isaacs, M. R. Emmert-Buck, M. Nykter, C. Foster, Z. Kote-Jarai, D. Easton, H. C. Whitaker, ICGC Prostate Group, D. E. Neal, C. S. Cooper, R. A. Eeles, T. Visakorpi, P. J. Campbell, U. McDermott, D. C. Wedge, and G. S. Bova. 2015. 'The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer', *Nature*, 520: 353-57.
- Guo, M., X. Li, S. Zhang, H. Song, W. Zhang, X. Shang, Y. Zheng, H. Jiang, Q. Lv, Y. Jiang, and H. Hao. 2015. 'Real-time quantitative RT-PCR detection of circulating tumor cells from breast cancer patients', *Int J Oncol*, 46: 281-9.
- Hayes, D. F., M. Cristofanilli, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, M. C. Miller, J. Matera, W. J. Allard, G. V. Doyle, and L. W. Terstappen. 2006. '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*, 12: 4218-24.
- Heidrich, I., L. Ackar, P. Mossahebi Mohammadi, and K. Pantel. 2020. 'Liquid biopsies: Potential and challenges', *Int J Cancer*.
- Heitzer, E., M. Auer, C. Gasch, M. Pichler, P. Ulz, E. M. Hoffmann, S. Lax, J. Waldispuehl-Geigl, O. Mauermann, C. Lackner, G. Hofler, F. Eisner, H. Sill, H. Samonigg, K. Pantel, S. Riethdorf, T. Bauernhofer, J. B. Geigl, and M. R. Speicher. 2013. 'Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing', *Cancer Res*, 73: 2965-75.
- Hen, O., and D. Barkan. 2020. 'Dormant disseminated tumor cells and cancer stem/progenitor-like cells: Similarities and opportunities', *Semin Cancer Biol*, 60: 157-65.
- Heymann, D., and M. Tellez-Gabriel. 2018. 'Circulating Tumor Cells: The Importance of Single Cell Analysis', *Adv Exp Med Biol*, 1068: 45-58.
- Hodgkinson, C. L., C. J. Morrow, Y. Li, R. L. Metcalf, D. G. Rothwell, F. Trapani, R. Polanski, D. J. Burt, K. L. Simpson, K. Morris, S. D. Pepper, D. Nonaka, A. Greystoke, P. Kelly, B. Bola, M. G. Krebs, J. Antonello, M. Ayub, S. Faulkner, L. Priest, L. Carter, C. Tate, C. J. Miller, F. Blackhall, G. Brady, and C. Dive. 2014. 'Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer', *Nat Med*, 20: 897-903.
- Hodgson, N. C. 2005. 'Merkel cell carcinoma: changing incidence trends', *J Surg Oncol*, 89: 1-4.
- Hofman, V., C. Bonnetaud, M. I. Ilie, P. Vielh, J. M. Vignaud, J. F. Flejou, S. Lantuejoul, E. Piaton, N. Mourad, C. Butori, E. Selva, M. Poudenx, S. Sibon, S. Kelhef, N. Venissac, J. P. Jais, J. Mouroux, T. J. Molina, and P. Hofman. 2011. 'Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker', *Clin Cancer Res*, 17: 827-35.
- Hong, M. K., G. Macintyre, D. C. Wedge, P. Van Loo, K. Patel, S. Lunke, L. B. Alexandrov, C. Sloggett, M. Cmero, F. Marass, D. Tsui, S. Mangiola, A. Lonie, H. Naeem, N. Sapre, P. M. Phal, N. Kurganovs, X. Chin, M. Kerger, A. Y. Warren, D. Neal, V. Gnanapragasam, N. Rosenfeld, J. S. Pedersen, A.

- Ryan, I. Haviv, A. J. Costello, N. M. Corcoran, and C. M. Hovens. 2015. 'Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer', *Nat Commun*, 6: 6605.
- Hoshino, A., B. Costa-Silva, T. L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M. Tesic Mark, H. Molina, S. Kohsaka, A. Di Giannatale, S. Ceder, S. Singh, C. Williams, N. Soplop, K. Uryu, L. Pharmed, T. King, L. Bojmar, A. E. Davies, Y. Ararso, T. Zhang, H. Zhang, J. Hernandez, J. M. Weiss, V. D. Dumont-Cole, K. Kramer, L. H. Wexler, A. Narendran, G. K. Schwartz, J. H. Healey, P. Sandstrom, K. J. Labori, E. H. Kure, P. M. Grandgenett, M. A. Hollingsworth, M. de Sousa, S. Kaur, M. Jain, K. Mallya, S. K. Batra, W. R. Jarnagin, M. S. Brady, O. Fodstad, V. Muller, K. Pantel, A. J. Minn, M. J. Bissell, B. A. Garcia, Y. Kang, V. K. Rajasekhar, C. M. Ghajar, I. Matei, H. Peinado, J. Bromberg, and D. Lyden. 2015. 'Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis', *Nature*, 527: 329-35.
- Hou, J. M., A. Greystoke, L. Lancashire, J. Cummings, T. Ward, R. Board, E. Amir, S. Hughes, M. Krebs, A. Hughes, M. Ranson, P. Lorigan, C. Dive, and F. H. Blackhall. 2009. 'Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy', *Am J Pathol*, 175: 808-16.
- Hou, J. M., M. G. Krebs, L. Lancashire, R. Sloane, A. Backen, R. K. Swain, L. J. Priest, A. Greystoke, C. Zhou, K. Morris, T. Ward, F. H. Blackhall, and C. Dive. 2012. 'Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer', *J Clin Oncol*, 30: 525-32.
- Hsieh, H. B., D. Marrinucci, K. Bethel, D. N. Curry, M. Humphrey, R. T. Krivacic, J. Kroener, L. Kroener, A. Ladanyi, N. Lazarus, P. Kuhn, R. H. Bruce, and J. Nieva. 2006. 'High speed detection of circulating tumor cells', *Biosens Bioelectron*, 21: 1893-9.
- Hu, Z., X. Chen, Y. Zhao, T. Tian, G. Jin, Y. Shu, Y. Chen, L. Xu, K. Zen, C. Zhang, and H. Shen. 2010. 'Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer', *J Clin Oncol*, 28: 1721-6.
- Huang, L. R., E. C. Cox, R. H. Austin, and J. C. Sturm. 2004. 'Continuous particle separation through deterministic lateral displacement', *Science*, 304: 987-90.
- Hvichia, G. E., Z. Parveen, C. Wagner, M. Janning, J. Quidde, A. Stein, V. Muller, S. Loges, R. P. Neves, N. H. Stoecklein, H. Wikman, S. Riethdorf, K. Pantel, and T. M. Gorges. 2016. 'A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells', *Int J Cancer*, 138: 2894-904.
- Iinuma, H., T. Watanabe, K. Mimori, M. Adachi, N. Hayashi, J. Tamura, K. Matsuda, R. Fukushima, K. Okinaga, M. Sasako, and M. Mori. 2011. '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*, 29: 1547-55.
- In 't Veld, Sgjj, and T. Wurdinger. 2019. 'Tumor-educated platelets', *Blood*, 133: 2359-64.
- Janni, W. J., B. Rack, L. W. Terstappen, J. Y. Pierga, F. A. Taran, T. Fehm, C. Hall, M. R. de Groot, F. C. Bidard, T. W. Friedl, P. A. Fasching, S. Y. Brucker, K. Pantel, and A. Lucci. 2016. 'Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer', *Clin Cancer Res*, 22: 2583-93.
- Junqueira-Neto, S., I. A. Batista, J. L. Costa, and S. A. Melo. 2019. 'Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA', *Acta Cytol*, 63: 479-88.
- Kallergi, G., H. Markomanolaki, V. Giannoukaraki, M. A. Papadaki, A. Strati, E. S. Lianidou, V. Georgoulas, D. Mavroudis, and S. Agelaki. 2009. 'Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients', *Breast Cancer Res*, 11: R84.

- Kallergi, G., M. A. Papadaki, E. Politaki, D. Mavroudis, V. Georgoulas, and S. Agelaki. 2011. 'Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients', *Breast Cancer Res*, 13: R59.
- Kapelleris, J., A. Kulasinghe, M. E. Warkiani, C. O'Leary, I. Vela, P. Leo, P. Sternes, K. O'Byrne, and C. Punyadeera. 2020. 'Ex vivo culture of circulating tumour cells derived from non-small cell lung cancer', *Transl Lung Cancer Res*, 9: 1795-809.
- Karabacak, N. M., P. S. Spuhler, F. Fachin, E. J. Lim, V. Pai, E. Ozkumur, J. M. Martel, N. Kojic, K. Smith, P. I. Chen, J. Yang, H. Hwang, B. Morgan, J. Trautwein, T. A. Barber, S. L. Stott, S. Maheswaran, R. Kapur, D. A. Haber, and M. Toner. 2014. 'Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples', *Nat Protoc*, 9: 694-710.
- Kerbel, R. S. 2008. 'Tumor angiogenesis', *N Engl J Med*, 358: 2039-49.
- Kervarrec, T., M. Samimi, S. Guyetant, B. Sarma, J. Cheret, E. Blanchard, P. Berthon, D. Schrama, R. Houben, and A. Touze. 2019. 'Histogenesis of Merkel Cell Carcinoma: A Comprehensive Review', *Front Oncol*, 9: 451.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. 'Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment', *Cell*, 141: 52-67.
- Kim, Y. N., K. H. Koo, J. Y. Sung, U. J. Yun, and H. Kim. 2012. 'Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis', *Int J Cell Biol*, 2012: 306879.
- Kitz, J., D. Goodale, C. Postenka, L. E. Lowes, and A. L. Allan. 2021. 'EMT-independent detection of circulating tumor cells in human blood samples and pre-clinical mouse models of metastasis', *Clin Exp Metastasis*, 38: 97-108.
- Koch, C., A. Kuske, S. A. Joosse, G. Yigit, G. Sflomos, S. Thaler, D. J. Smit, S. Werner, K. Borgmann, S. Gartner, P. Mossahebi Mohammadi, L. Battista, L. Cayrefourcq, J. Altmuller, G. Salinas-Riester, K. Raithatha, A. Zibat, Y. Goy, L. Ott, K. Bartkowiak, T. Z. Tan, Q. Zhou, M. R. Speicher, V. Muller, T. M. Gorges, M. Jucker, J. P. Thiery, C. Brisken, S. Riethdorf, C. Alix-Panabieres, and K. Pantel. 2020. 'Characterization of circulating breast cancer cells with tumorigenic and metastatic capacity', *EMBO Mol Med*, 12: e11908.
- Kolostova, K., M. Broul, J. Schraml, M. Cegan, R. Matkowski, M. Fiutowski, and V. Bobek. 2014. 'Circulating tumor cells in localized prostate cancer: isolation, cultivation in vitro and relationship to T-stage and Gleason score', *Anticancer Res*, 34: 3641-6.
- Kolostova, K., J. Spicka, R. Matkowski, and V. Bobek. 2015. 'Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers', *Am J Transl Res*, 7: 1203-13.
- Kolostova, K., Y. Zhang, R. M. Hoffman, and V. Bobek. 2014. 'In vitro culture and characterization of human lung cancer circulating tumor cells isolated by size exclusion from an orthotopic nude-mouse model expressing fluorescent protein', *J Fluoresc*, 24: 1531-6.
- Konstantinell, A., J. A. Bruun, R. Olsen, A. Aspar, N. Skalko-Basnet, B. Sveinbjornsson, and U. Moens. 2016. 'Secretomic analysis of extracellular vesicles originating from polyomavirus-negative and polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell lines', *Proteomics*, 16: 2587-91.
- Kosaka, N., H. Iguchi, and T. Ochiya. 2010. 'Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis', *Cancer Sci*, 101: 2087-92.
- Krebs, M. G., R. L. Metcalf, L. Carter, G. Brady, F. H. Blackhall, and C. Dive. 2014. 'Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers', *Nat Rev Clin Oncol*, 11: 129-44.
- Krebs, M. G., R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, J. M. Hou, A. Greystoke, T. H. Ward, R. Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive, and F. H. Blackhall. 2011. 'Evaluation and prognostic

- significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer', *J Clin Oncol*, 29: 1556-63.
- Krivacic, R. T., A. Ladanyi, D. N. Curry, H. B. Hsieh, P. Kuhn, D. E. Bergsrud, J. F. Kepros, T. Barbera, M. Y. Ho, L. B. Chen, R. A. Lerner, and R. H. Bruce. 2004. 'A rare-cell detector for cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 10501-4.
- Lallo, A., M. W. Schenk, K. K. Frese, F. Blackhall, and C. Dive. 2017. 'Circulating tumor cells and CDX models as a tool for preclinical drug development', *Transl Lung Cancer Res*, 6: 397-408.
- Lambert, A. W., D. R. Pattabiraman, and R. A. Weinberg. 2017. 'Emerging Biological Principles of Metastasis', *Cell*, 168: 670-91.
- Lang, J. E., A. Ring, T. Porras, P. Kaur, V. A. Forte, N. Mineyev, D. Tripathy, M. F. Press, and D. Campo. 2018. 'RNA-Seq of Circulating Tumor Cells in Stage II-III Breast Cancer', *Ann Surg Oncol*, 25: 2261-70.
- Lara, O., X. Tong, M. Zborowski, and J. J. Chalmers. 2004. 'Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation', *Exp Hematol*, 32: 891-904.
- Lecharpentier, A., P. Vielh, P. Perez-Moreno, D. Planchard, J. C. Soria, and F. Farace. 2011. 'Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer', *Br J Cancer*, 105: 1338-41.
- Lee, Y., G. Guan, and A. A. Bhagat. 2018. 'ClearCell(R) FX, a label-free microfluidics technology for enrichment of viable circulating tumor cells', *Cytometry A*, 93: 1251-54.
- Li, H., and R. Durbin. 2009. 'Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform', *Bioinformatics*, 25: 1754-60.
- Li, W., and Y. Kang. 2016. 'Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis', *Trends Cancer*, 2: 65-67.
- Li, Y., X. Zhang, S. Ge, J. Gao, J. Gong, M. Lu, Q. Zhang, Y. Cao, D. D. Wang, P. P. Lin, and L. Shen. 2014. 'Clinical significance of phenotyping and karyotyping of circulating tumor cells in patients with advanced gastric cancer', *Oncotarget*, 5: 6594-602.
- Liang, D. H., C. Hall, and A. Lucci. 2020. 'Circulating Tumor Cells in Breast Cancer', *Recent Results Cancer Res*, 215: 127-45.
- Lim, James, Charles J. Ryan, Bruce Adams, Jeff Hough, and Tianna Chow. 2016. 'Ex vivo propagation and characterization of circulating tumor cell clusters from late stage prostate cancer patients', *Journal of Clinical Oncology*, 34: 314-14.
- Lindsay, C. R., S. Le Moulec, F. Billiot, Y. Lorient, M. Ngo-Camus, P. Vielh, K. Fizazi, C. Massard, and F. Farace. 2016. 'Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer', *BMC Cancer*, 16: 168.
- Liotta, L. A., J. Kleinerman, and G. M. Sidel. 1974. 'Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation', *Cancer Res*, 34: 997-1004.
- Liotta, L. A., G. M. Sidel, and J. Kleinerman. 1976. 'Stochastic model of metastases formation', *Biometrics*, 32: 535-50.
- Liu, M. C., P. G. Shields, R. D. Warren, P. Cohen, M. Wilkinson, Y. L. Ottaviano, S. B. Rao, J. Eng-Wong, F. Seillier-Moiseiwitsch, A. M. Noone, and C. Isaacs. 2009. 'Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer', *J Clin Oncol*, 27: 5153-9.
- Liu, Q., H. Zhang, X. Jiang, C. Qian, Z. Liu, and D. Luo. 2017. 'Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to "seed and soil" hypothesis', *Mol Cancer*, 16: 176.

- Loizzi, V., V. Del Vecchio, G. Gargano, M. De Liso, A. Kardashi, E. Naglieri, L. Resta, E. Cicinelli, and G. Cormio. 2017. 'Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer', *Int J Mol Sci*, 18.
- Lu, Y. T., L. Zhao, Q. Shen, M. A. Garcia, D. Wu, S. Hou, M. Song, X. Xu, W. H. Ouyang, W. W. Ouyang, J. Lichterman, Z. Luo, X. Xuan, J. Huang, L. W. Chung, M. Rettig, H. R. Tseng, C. Shao, and E. M. Posadas. 2013. 'NanoVelcro Chip for CTC enumeration in prostate cancer patients', *Methods*, 64: 144-52.
- Luo, H., Q. Zhao, W. Wei, L. Zheng, S. Yi, G. Li, W. Wang, H. Sheng, H. Pu, H. Mo, Z. Zuo, Z. Liu, C. Li, C. Xie, Z. Zeng, W. Li, X. Hao, Y. Liu, S. Cao, W. Liu, S. Gibson, K. Zhang, G. Xu, and R. H. Xu. 2020. 'Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer', *Sci Transl Med*, 12.
- Lustberg, M., K. R. Jatana, M. Zborowski, and J. J. Chalmers. 2012. 'Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells', *Recent Results Cancer Res*, 195: 97-110.
- Macias, M., E. Alegre, A. Diaz-Lagares, A. Patino, J. L. Perez-Gracia, M. Sanmamed, R. Lopez-Lopez, N. Varo, and A. Gonzalez. 2018. 'Liquid Biopsy: From Basic Research to Clinical Practice', *Adv Clin Chem*, 83: 73-119.
- Maheswaran, S., L. V. Sequist, S. Nagrath, L. Ulkus, B. Brannigan, C. V. Collura, E. Inserra, S. Diederichs, A. J. Iafrate, D. W. Bell, S. Digumarthy, A. Muzikansky, D. Irimia, J. Settleman, R. G. Tompkins, T. J. Lynch, M. Toner, and D. A. Haber. 2008. 'Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells', *N Engl J Med*, 359: 366-77.
- Malanchi, I., A. Santamaria-Martinez, E. Susanto, H. Peng, H. A. Lehr, J. F. Delaloye, and J. Huelsken. 2011. 'Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization', *Nature*, 481: 85-9.
- Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. A. Weinberg. 2008. 'The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells', *Cell*, 133: 704-15.
- Margaret Hun, Dorian McIlroy. 2013. 'VIROLOGIE - CHAPITRE TROIS : STRATÉGIES DE RÉPLICATION DES VIRUS À ADN'. <http://microbiologybook.org/French-virology/virol-french3.htm>.
- Maricich, S. M., S. A. Wellnitz, A. M. Nelson, D. R. Lesniak, G. J. Gerling, E. A. Lumpkin, and H. Y. Zoghbi. 2009. 'Merkel cells are essential for light-touch responses', *Science*, 324: 1580-2.
- Massague, J., and A. C. Obenauf. 2016. 'Metastatic colonization by circulating tumour cells', *Nature*, 529: 298-306.
- Mazel, M., W. Jacot, K. Pantel, K. Bartkowiak, D. Topart, L. Cayrefourcq, D. Rossille, T. Maudelonde, T. Fest, and C. Alix-Panabieres. 2015. 'Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells', *Mol Oncol*, 9: 1773-82.
- Mazumder, S., S. Datta, J. G. Ray, K. Chaudhuri, and R. Chatterjee. 2019. 'Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer', *Cancer Epidemiol*, 58: 137-45.
- Melnikova, V. O., K. Balasubramanian, G. J. Villares, A. S. Dobroff, M. Zigler, H. Wang, F. Petersson, J. E. Price, A. Schroit, V. G. Prieto, M. C. Hung, and M. Bar-Eli. 2009. 'Crosstalk between protease-activated receptor 1 and platelet-activating factor receptor regulates melanoma cell adhesion molecule (MCAM/MUC18) expression and melanoma metastasis', *J Biol Chem*, 284: 28845-55.
- Micalizzi, D. S., S. Maheswaran, and D. A. Haber. 2017. 'A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology', *Genes Dev*, 31: 1827-40.

- Miller, M. C., G. V. Doyle, and L. W. Terstappen. 2010. 'Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer', *J Oncol*, 2010: 617421.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. 'High gradient magnetic cell separation with MACS', *Cytometry*, 11: 231-8.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogossova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, and M. Tewari. 2008. 'Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10513-8.
- Miyamoto, D. T., Y. Zheng, B. S. Wittner, R. J. Lee, H. Zhu, K. T. Broderick, R. Desai, D. B. Fox, B. W. Brannigan, J. Trautwein, K. S. Arora, N. Desai, D. M. Dahl, L. V. Sequist, M. R. Smith, R. Kapur, C. L. Wu, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, M. Toner, S. Maheswaran, and D. A. Haber. 2015. 'RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance', *Science*, 349: 1351-6.
- Moreno, J. G., M. C. Miller, S. Gross, W. J. Allard, L. G. Gomella, and L. W. Terstappen. 2005. 'Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer', *Urology*, 65: 713-8.
- Morrow, C. J., F. Trapani, R. L. Metcalf, G. Bertolini, C. L. Hodgkinson, G. Khandelwal, P. Kelly, M. Galvin, L. Carter, K. L. Simpson, S. Williamson, C. Wirth, N. Simms, L. Frankliln, K. K. Frese, D. G. Rothwell, D. Nonaka, C. J. Miller, G. Brady, F. H. Blackhall, and C. Dive. 2016. 'Tumourigenic non-small-cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: a clinical case study', *Ann Oncol*, 27: 1155-60.
- Morvan, M. G., and L. L. Lanier. 2016. 'NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks', *Nat Rev Cancer*, 16: 7-19.
- Moyret-Lalle, C., R. Pommier, C. Bouard, E. Nouri, G. Richard, and A. Puisieux. 2016. '[Cancer cell plasticity and metastatic dissemination]', *Med Sci (Paris)*, 32: 725-31.
- Nagrath, S., L. V. Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M. R. Smith, E. L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U. J. Balis, R. G. Tompkins, D. A. Haber, and M. Toner. 2007. 'Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology', *Nature*, 450: 1235-9.
- Nghiem, P., S. Bhatia, E. J. Lipson, W. H. Sharfman, R. R. Kudchadkar, A. S. Brohl, P. A. Friedlander, A. Daud, H. M. Kluger, S. A. Reddy, B. C. Boulmay, A. I. Riker, M. A. Burgess, B. A. Hanks, T. Olencki, K. Margolin, L. M. Lundgren, A. Soni, N. Ramchurren, C. Church, S. Y. Park, M. M. Shinohara, B. Salim, J. M. Taube, S. R. Bird, N. Ibrahim, S. P. Fling, B. Homet Moreno, E. Sharon, M. A. Cheever, and S. L. Topalian. 2019. 'Durable Tumor Regression and Overall Survival in Patients With Advanced Merkel Cell Carcinoma Receiving Pembrolizumab as First-Line Therapy', *J Clin Oncol*, 37: 693-702.
- Nicolson, G. L. 1976. 'Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy', *Biochim Biophys Acta*, 458: 1-72.
- Nieto, M. A., R. Y. Huang, R. A. Jackson, and J. P. Thiery. 2016. 'Emt: 2016', *Cell*, 166: 21-45.
- Ning, M. S., A. S. Kim, N. Prasad, S. E. Levy, H. Zhang, and T. Andl. 2014. 'Characterization of the Merkel Cell Carcinoma miRNome', *J Skin Cancer*, 2014: 289548.
- Norton, L., and J. Massague. 2006. 'Is cancer a disease of self-seeding?', *Nat Med*, 12: 875-8.
- Oskarsson, T., S. Acharyya, X. H. Zhang, S. Vanharanta, S. F. Tavazoie, P. G. Morris, R. J. Downey, K. Manova-Todorova, E. Brogi, and J. Massague. 2011. 'Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs', *Nat Med*, 17: 867-74.

- Otsuji, K., T. Sasaki, A. Tanaka, A. Kunita, M. Ikemura, K. Matsusaka, K. Tada, M. Fukayama, and Y. Seto. 2017. 'Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients', *Breast Cancer Res Treat*, 162: 11-18.
- Ozkumur, E., A. M. Shah, J. C. Ciciliano, B. L. Emmink, D. T. Miyamoto, E. Brachtel, M. Yu, P. I. Chen, B. Morgan, J. Trautwein, A. Kimura, S. Sengupta, S. L. Stott, N. M. Karabacak, T. A. Barber, J. R. Walsh, K. Smith, P. S. Spuhler, J. P. Sullivan, R. J. Lee, D. T. Ting, X. Luo, A. T. Shaw, A. Bardia, L. V. Sequist, D. N. Louis, S. Maheswaran, R. Kapur, D. A. Haber, and M. Toner. 2013. 'Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells', *Sci Transl Med*, 5: 179ra47.
- Pailler, E., J. Adam, A. Barthelemy, M. Oulhen, N. Auger, A. Valent, I. Borget, D. Planchard, M. Taylor, F. Andre, J. C. Soria, P. Vielh, B. Besse, and F. Farace. 2013. 'Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer', *J Clin Oncol*, 31: 2273-81.
- Palumbo, J. S., K. A. Barney, E. A. Blevins, M. A. Shaw, A. Mishra, M. J. Flick, K. W. Kombrinck, K. E. Talmage, M. Souri, A. Ichinose, and J. L. Degen. 2008. 'Factor XIII transglutaminase supports hematogenous tumor cell metastasis through a mechanism dependent on natural killer cell function', *J Thromb Haemost*, 6: 812-9.
- Palumbo, J. S., K. E. Talmage, J. V. Massari, C. M. La Jeunesse, M. J. Flick, K. W. Kombrinck, M. Jirouskova, and J. L. Degen. 2005. 'Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells', *Blood*, 105: 178-85.
- Pantel, K., and C. Alix-Panabieres. 2010. 'Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives', *Trends Mol Med*, 16: 398-406.
- . 2016. 'Liquid biopsy: Potential and challenges', *Mol Oncol*, 10: 371-3.
- . 2019. 'Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure', *Nat Rev Clin Oncol*.
- Papadimitrakopoulou, V. A., T. S. Mok, J. Y. Han, M. J. Ahn, A. Delmonte, S. S. Ramalingam, S. W. Kim, F. A. Shepherd, J. Laskin, Y. He, H. Akamatsu, W. C. Su, T. John, M. Sebastian, H. Mann, M. Miranda, G. Laus, Y. Rukazenzov, and Y. L. Wu. 2020. 'Osimertinib versus platinum-pemetrexed for patients with EGFR T790M advanced NSCLC and progression on a prior EGFR-tyrosine kinase inhibitor: AURA3 overall survival analysis', *Ann Oncol*.
- Park, J., D. M. Euhus, and P. E. Scherer. 2011. 'Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression', *Endocr Rev*, 32: 550-70.
- Paulson, K. G., C. W. Lewis, M. W. Redman, W. T. Simonson, A. Lisberg, D. Ritter, C. Morishima, K. Hutchinson, L. Mudgistratova, A. Blom, J. Iyer, A. S. Moshiri, E. S. Tarabdkar, J. J. Carter, S. Bhatia, M. Kawasumi, D. A. Galloway, M. H. Wener, and P. Nghiem. 2017. 'Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of Merkel cell carcinoma: A prospective validation study', *Cancer*, 123: 1464-74.
- Paulson, K. G., S. Y. Park, N. A. Vandeven, K. Lachance, H. Thomas, A. G. Chapuis, K. L. Harms, J. A. Thompson, S. Bhatia, A. Stang, and P. Nghiem. 2018. 'Merkel cell carcinoma: Current US incidence and projected increases based on changing demographics', *J Am Acad Dermatol*, 78: 457-63 e2.
- Perez-Mancera, P. A., C. Bermejo-Rodriguez, I. Gonzalez-Herrero, M. Herranz, T. Flores, R. Jimenez, and I. Sanchez-Garcia. 2007. 'Adipose tissue mass is modulated by SLUG (SNAI2)', *Hum Mol Genet*, 16: 2972-86.
- Petrelli, F., A. Ghidini, M. Torchio, N. Prinzi, F. Trevisan, P. Dalleria, A. De Stefani, A. Russo, E. Vitali, L. Bruschi, A. Costanzo, S. Seghezzi, M. Ghidini, A. Varricchio, M. Cabiddu, S. Barni, F. de Braud,

- and S. Pusceddu. 2019. 'Adjuvant radiotherapy for Merkel cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis', *Radiother Oncol*, 134: 211-19.
- Pettersson, A. T., N. Mejhert, M. Jernas, L. M. Carlsson, I. Dahlman, J. Laurencikiene, P. Arner, and M. Ryden. 2011. 'Twist1 in human white adipose tissue and obesity', *J Clin Endocrinol Metab*, 96: 133-41.
- Picelli, S., A. K. Bjorklund, O. R. Faridani, S. Sagasser, G. Winberg, and R. Sandberg. 2013. 'Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells', *Nat Methods*, 10: 1096-8.
- Pierga, J. Y., F. C. Bidard, C. Mathiot, E. Brain, S. Delaloge, S. Giachetti, P. de Cremoux, R. Salmon, A. Vincent-Salomon, and M. Marty. 2008. '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*, 14: 7004-10.
- Pilati, P., S. Mocellin, L. Bertazza, F. Galdi, M. Briarava, E. Mammano, E. Tessari, G. Zavagno, and D. Nitti. 2012. 'Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis', *Ann Surg Oncol*, 19: 402-8.
- Plaks, V., N. Kong, and Z. Werb. 2015. 'The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?', *Cell Stem Cell*, 16: 225-38.
- Poulet, G., J. Massias, and V. Taly. 2019. 'Liquid Biopsy: General Concepts', *Acta Cytol*, 63: 449-55.
- Qian, B. Z., J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L. R. Campion, E. A. Kaiser, L. A. Snyder, and J. W. Pollard. 2011. 'CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis', *Nature*, 475: 222-5.
- Que, Z., B. Luo, Z. Zhou, C. Dong, Y. Jiang, L. Wang, Q. Shi, and J. Tian. 2019. 'Establishment and characterization of a patient-derived circulating lung tumor cell line in vitro and in vivo', *Cancer Cell Int*, 19: 21.
- Rack, B., C. Schindlbeck, J. Juckstock, U. Andergassen, P. Hepp, T. Zwingers, T. W. Friedl, R. Lorenz, H. Tesch, P. A. Fasching, T. Fehm, A. Schneeweiss, W. Lichtenegger, M. W. Beckmann, K. Friese, K. Pantel, W. Janni, and Success Study Group. 2014. 'Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients', *J Natl Cancer Inst*, 106.
- Ramirez, J. M., T. Fehm, M. Orsini, L. Cayrefourcq, T. Maudelonde, K. Pantel, and C. Alix-Panabieres. 2014. 'Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients', *Clin Chem*, 60: 214-21.
- Rantalainen, M. 2018. 'Application of single-cell sequencing in human cancer', *Brief Funct Genomics*, 17: 273-82.
- Rees, J. 1997. 'Skin cancer', *J R Coll Physicians Lond*, 31: 246-50.
- Reichgelt, B. A., and O. Visser. 2011. 'Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993-2007', *Eur J Cancer*, 47: 579-85.
- Riethdorf, S., L. Hildebrandt, L. Heinzerling, E. Heitzer, N. Fischer, S. Bergmann, O. Mauermann, J. Waldispuhl-Geigl, C. Coith, G. Schon, S. Peine, G. Schuler, M. R. Speicher, I. Moll, and K. Pantel. 2019. 'Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells in Patients with Merkel Cell Carcinoma', *Clin Chem*.
- Robert, J. 2013. '[Biology of cancer metastasis]', *Bull Cancer*, 100: 333-42.
- Rolfo, C., P. C. Mack, G. V. Scagliotti, P. Baas, F. Barlesi, T. G. Bivona, R. S. Herbst, T. S. Mok, N. Peled, R. Pirker, L. E. Raez, M. Reck, J. W. Riess, L. V. Sequist, F. A. Shepherd, L. M. Sholl, D. S. W. Tan, H. A. Wakelee, Wistuba, II, M. W. Wynes, D. P. Carbone, F. R. Hirsch, and D. R. Gandara. 2018. 'Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC', *J Thorac Oncol*, 13: 1248-68.

- Rosenberg, R., R. Gertler, J. Friederichs, K. Fuehrer, M. Dahm, R. Phelps, S. Thorban, H. Nekarda, and J. R. Siewert. 2002. 'Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood', *Cytometry*, 49: 150-8.
- Saddozai, U. A. K., F. Wang, Y. Cheng, Z. Lu, M. U. Akbar, W. Zhu, Y. Li, X. Ji, and X. Guo. 2020. 'Gene expression profile identifies distinct molecular subtypes and potential therapeutic genes in Merkel cell carcinoma', *Transl Oncol*, 13: 100816.
- Samimi, M., L. Molet, M. Fleury, H. Laude, A. Carlotti, C. Gardair, M. Baudin, L. Gouguet, E. Maubec, M. Avenel-Audran, E. Esteve, E. Wierzbicka-Hainaut, N. Beneton, F. Aubin, F. Rozenberg, N. Dupin, M. F. Avril, G. Lorette, S. Guyetant, P. Coursaget, and A. Touze. 2016. 'Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma', *Br J Dermatol*, 174: 813-22.
- Saucedo-Zeni, N., S. Mewes, R. Niestroj, L. Gasiorowski, D. Murawa, P. Nowaczyk, T. Tomasi, E. Weber, G. Dworacki, N. G. Morgenthaler, H. Jansen, C. Propping, K. Sterzynska, W. Dyszkiewicz, M. Zabel, M. Kiechle, U. Reuning, M. Schmitt, and K. Lucke. 2012. '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*, 41: 1241-50.
- Sauer, C. M., A. M. Hagg, E. Chteinberg, D. Rennspiess, V. Winnepenninckx, E. J. Speel, J. C. Becker, A. K. Kurz, and A. Zur Hausen. 2017. 'Reviewing the current evidence supporting early B-cells as the cellular origin of Merkel cell carcinoma', *Crit Rev Oncol Hematol*, 116: 99-105.
- Savelieva, O. E., L. A. Tashireva, E. V. Kaigorodova, A. V. Buzenkova, R. K. Mukhamedzhanov, E. S. Grigoryeva, M. V. Zavyalova, N. A. Tarabanovskaya, N. V. Cherdyntseva, and V. M. Perelmuter. 2020. 'Heterogeneity of Stemlike Circulating Tumor Cells in Invasive Breast Cancer', *Int J Mol Sci*, 21.
- Saxena, A., M. Rubens, V. Ramamoorthy, and H. Khan. 2014. 'Risk of second cancers in merkel cell carcinoma: a meta-analysis of population based cohort studies', *J Skin Cancer*, 2014: 184245.
- Scadden, D. T. 2006. 'The stem-cell niche as an entity of action', *Nature*, 441: 1075-9.
- Schadendorf, D., C. Lebbe, A. Zur Hausen, M. F. Avril, S. Hariharan, M. Bharmal, and J. C. Becker. 2017. 'Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs', *Eur J Cancer*, 71: 53-69.
- Schmitt, M., U. Wieland, A. Kreuter, and M. Pawlita. 2012. 'C-terminal deletions of Merkel cell polyomavirus large T-antigen, a highly specific surrogate marker for virally induced malignancy', *Int J Cancer*, 131: 2863-8.
- Schwarzenbach, H., D. S. Hoon, and K. Pantel. 2011. 'Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients', *Nat Rev Cancer*, 11: 426-37.
- Sharma, S., R. Zhuang, M. Long, M. Pavlovic, Y. Kang, A. Ilyas, and W. Asghar. 2018. 'Circulating tumor cell isolation, culture, and downstream molecular analysis', *Biotechnol Adv*, 36: 1063-78.
- Sieuwert, A. M., and S. S. Jeffrey. 2012. 'Multiplex molecular analysis of CTCs', *Recent Results Cancer Res*, 195: 125-40.
- Soda, N., B. H. A. Rehm, P. Sonar, N. T. Nguyen, and M. J. A. Shiddiky. 2019. 'Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection', *J Mater Chem B*, 7: 6670-704.
- Soler, A., L. Cayrefourcq, T. Mazard, A. Babayan, P. J. Lamy, S. Assou, E. Assenat, K. Pantel, and C. Alix-Panabieres. 2018. 'Autologous cell lines from circulating colon cancer cells captured from sequential liquid biopsies as model to study therapy-driven tumor changes', *Sci Rep*, 8: 15931.
- Soler, A., L. Cayrefourcq, M. Mazel, and C. Alix-Panabieres. 2017. 'EpCAM-Independent Enrichment and Detection of Viable Circulating Tumor Cells Using the EPISPOT Assay', *Methods Mol Biol*, 1634: 263-76.

- Sosa, M. S., P. Bragado, and J. A. Aguirre-Ghiso. 2014. 'Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field', *Nat Rev Cancer*, 14: 611-22.
- Sourvinos, G., I. N. Mamas, and D. A. Spandidos. 2015. 'Merkel cell polyomavirus infection in childhood: current advances and perspectives', *Arch Virol*, 160: 887-92.
- Stang, A., J. C. Becker, P. Nghiem, and J. Ferlay. 2018. 'The association between geographic location and incidence of Merkel cell carcinoma in comparison to melanoma: An international assessment', *Eur J Cancer*, 94: 47-60.
- Starrett, G. J., M. Thakuria, T. Chen, C. Marcelus, J. Cheng, J. Nomburg, A. R. Thorner, M. K. Slevin, W. Powers, R. T. Burns, C. Perry, A. Piris, F. C. Kuo, G. Rabinowits, A. Giobbie-Hurder, L. E. MacConaill, and J. A. DeCaprio. 2020. 'Clinical and molecular characterization of virus-positive and virus-negative Merkel cell carcinoma', *Genome Med*, 12: 30.
- Strauss, D. C., and J. M. Thomas. 2010. 'Transmission of donor melanoma by organ transplantation', *Lancet Oncol*, 11: 790-6.
- Strilic, B., and S. Offermanns. 2017. 'Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells', *Cancer Cell*, 32: 282-93.
- Sun, J., F. Fei, M. Zhang, Y. Li, X. Zhang, S. Zhu, and S. Zhang. 2019. 'The role of (m)SEPT9 in screening, diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer', *BMC Cancer*, 19: 450.
- Sun, Y. F., X. R. Yang, J. Zhou, S. J. Qiu, J. Fan, and Y. Xu. 2011. 'Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance', *J Cancer Res Clin Oncol*, 137: 1151-73.
- Suo, Y., C. Xie, X. Zhu, Z. Fan, Z. Yang, H. He, and X. Wei. 2017. 'Proportion of circulating tumor cell clusters increases during cancer metastasis', *Cytometry A*, 91: 250-53.
- Szczerba, B. M., F. Castro-Giner, M. Vetter, I. Krol, S. Gkountela, J. Landin, M. C. Scheidmann, C. Donato, R. Scherrer, J. Singer, C. Beisel, C. Kurzeder, V. Heinzelmann-Schwarz, C. Rochlitz, W. P. Weber, N. Beerenwinkel, and N. Aceto. 2019. 'Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression', *Nature*, 566: 553-57.
- Tabachnick-Cherny, S., T. Pulliam, C. Church, D. M. Koelle, and P. Nghiem. 2020. 'Polyomavirus-driven Merkel cell carcinoma: Prospects for therapeutic vaccine development', *Mol Carcinog*, 59: 807-21.
- Talasaz, A. H., A. A. Powell, D. E. Huber, J. G. Berbee, K. H. Roh, W. Yu, W. Xiao, M. M. Davis, R. F. Pease, M. N. Mindrinos, S. S. Jeffrey, and R. W. Davis. 2009. '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*, 106: 3970-5.
- Tam, W. L., and R. A. Weinberg. 2013. 'The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer', *Nat Med*, 19: 1438-49.
- Tan, C. L., T. H. Lim, TKh Lim, D. S. Tan, Y. W. Chua, M. K. Ang, B. Pang, C. T. Lim, A. Takano, A. S. Lim, M. C. Leong, and W. T. Lim. 2016. 'Concordance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements between circulating tumor cells and tumor in non-small cell lung cancer', *Oncotarget*, 7: 23251-62.
- Tan, M. H., R. Kanesvaran, H. Li, H. L. Tan, P. H. Tan, C. F. Wong, K. S. Chia, B. T. Teh, J. Yuen, and T. W. Chong. 2010. 'Comparison of the UCLA Integrated Staging System and the Leibovich score in survival prediction for patients with nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma', *Urology*, 75: 1365-70; 70 e1-3.
- Tanaka, Y., T. Sano, Z. R. Qian, and M. Hirokawa. 2004. 'Expression of adhesion molecules and cytokeratin 20 in merkel cell carcinomas', *Endocr Pathol*, 15: 117-29.

- Taylor, M., J. Rossler, B. Georger, G. Vassal, and F. Farace. 2010. 'New anti-angiogenic strategies in pediatric solid malignancies: agents and biomarkers of a near future', *Expert Opin Investig Drugs*, 19: 859-74.
- Tayoun, T., V. Faugeroux, M. Oulhen, A. Aberlenc, P. Pawlikowska, and F. Farace. 2019. 'CTC-Derived Models: A Window into the Seeding Capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs)', *Cells*, 8.
- Teicher, B. A., and S. P. Fricker. 2010. 'CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer', *Clin Cancer Res*, 16: 2927-31.
- Thiery, J. P., and J. P. Sleeman. 2006. 'Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 131-42.
- Tinhofer, I., M. Saki, F. Niehr, U. Keilholz, and V. Budach. 2014. 'Cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells', *Int J Radiat Biol*, 90: 622-7.
- Toker, C. 1972. 'Trabecular carcinoma of the skin', *Arch Dermatol*, 105: 107-10.
- TR, Ashworth. 1869. 'A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death', *Australasian Medical Journal*, 14:146-147.
- Trapp, E., W. Janni, C. Schindlbeck, J. Juckstock, U. Andergassen, A. de Gregorio, M. Alunni-Fabbroni, M. Tzschaschel, A. Polasik, J. G. Koch, T. W. P. Friedl, P. A. Fasching, L. Haeberle, T. Fehm, A. Schneeweiss, M. W. Beckmann, K. Pantel, V. Mueller, B. Rack, C. Scholz, and Success Study Group. 2019. 'Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis', *J Natl Cancer Inst*, 111: 380-87.
- Valastyan, S., and R. A. Weinberg. 2011. 'Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms', *Cell*, 147: 275-92.
- Vandekerkhove, G., W. J. Struss, M. Annala, H. M. L. Kallio, D. Khalaf, E. W. Warner, C. Herberts, E. Ritch, K. Beja, Y. Loktionova, A. Hurtado-Coll, L. Fazli, A. So, P. C. Black, M. Nykter, T. Tammela, K. N. Chi, M. E. Gleave, and A. W. Wyatt. 2019. 'Circulating Tumor DNA Abundance and Potential Utility in De Novo Metastatic Prostate Cancer', *Eur Urol*, 75: 667-75.
- Vandeven, N., C. W. Lewis, V. Makarov, N. Riaz, K. G. Paulson, D. Hippe, A. Bestick, R. Doumani, T. Marx, S. Takagishi, T. A. Chan, J. Choi, and P. Nghiem. 2018. 'Merkel Cell Carcinoma Patients Presenting Without a Primary Lesion Have Elevated Markers of Immunity, Higher Tumor Mutation Burden, and Improved Survival', *Clin Cancer Res*, 24: 963-71.
- Vona, G., A. Sabile, M. Louha, V. Sitruk, S. Romana, K. Schutze, F. Capron, D. Franco, M. Pazzagli, M. Vekemans, B. Lacour, C. Brechot, and P. Paterlini-Brechot. 2000. 'Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells', *Am J Pathol*, 156: 57-63.
- Weber, J. A., D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. H. Huang, M. J. Lee, D. J. Galas, and K. Wang. 2010. 'The microRNA spectrum in 12 body fluids', *Clin Chem*, 56: 1733-41.
- Welch, D. R. 2006. 'Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions?', *Breast Dis*, 26: 3-12.
- White, M. K., M. Safak, and K. Khalili. 2009. 'Regulation of gene expression in primate polyomaviruses', *J Virol*, 83: 10846-56.
- Wooff, J. C., J. R. Trites, N. M. Walsh, and M. J. Bullock. 2010. 'Complete spontaneous regression of metastatic merkel cell carcinoma: a case report and review of the literature', *Am J Dermatopathol*, 32: 614-7.
- Wu, W., Z. Zhang, X. H. Gao, Z. Shen, Y. Jing, H. Lu, H. Li, X. Yang, X. Cui, Y. Li, Z. Lou, P. Liu, C. Zhang, and W. Zhang. 2017. 'Clinical significance of detecting circulating tumor cells in colorectal cancer using subtraction enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization (SE-iFISH)', *Oncotarget*, 8: 21639-49.

- Wyatt, A. W., M. Annala, R. Aggarwal, K. Beja, F. Feng, J. Youngren, A. Foye, P. Lloyd, M. Nykter, T. M. Beer, J. J. Alumkal, G. V. Thomas, R. E. Reiter, M. B. Rettig, C. P. Evans, A. C. Gao, K. N. Chi, E. J. Small, and M. E. Gleave. 2017. 'Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer', *J Natl Cancer Inst*, 109.
- Wyckoff, J. B., Y. Wang, E. Y. Lin, J. F. Li, S. Goswami, E. R. Stanley, J. E. Segall, J. W. Pollard, and J. Condeelis. 2007. 'Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors', *Cancer Res*, 67: 2649-56.
- Xenidis, N., M. Ignatiadis, S. Apostolaki, M. Perraki, K. Kalbakis, S. Agelaki, E. N. Stathopoulos, G. Chlouverakis, E. Lianidou, S. Kakolyris, V. Georgoulis, and D. Mavroudis. 2009. 'Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer', *J Clin Oncol*, 27: 2177-84.
- Xu, L., X. Mao, A. Imrali, F. Syed, K. Mutsvangwa, D. Berney, P. Cathcart, J. Hines, J. Shamash, and Y. J. Lu. 2015. 'Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System', *PLoS One*, 10: e0138032.
- Yan, Y., X. Wang, M. T. Veno, V. Bakholdt, J. A. Sorensen, A. Kroghdahl, Z. Sun, S. Gao, and J. Kjems. 2017. 'Circulating miRNAs as biomarkers for oral squamous cell carcinoma recurrence in operated patients', *Oncotarget*, 8: 8206-14.
- Yang, A., C. Cordoba, K. Cheung, and J. Konya. 2019. 'Merkel cell carcinoma in situ: New insights into the cells of origin', *Australas J Dermatol*.
- Ye, X., and R. A. Weinberg. 2015. 'Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression', *Trends Cell Biol*, 25: 675-86.
- Yu, M., A. Bardia, N. Aceto, F. Bersani, M. W. Madden, M. C. Donaldson, R. Desai, H. Zhu, V. Comaills, Z. Zheng, B. S. Wittner, P. Stojanov, E. Brachtel, D. Sgroi, R. Kapur, T. Shioda, D. T. Ting, S. Ramaswamy, G. Getz, A. J. Iafrate, C. Benes, M. Toner, S. Maheswaran, and D. A. Haber. 2014. 'Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility', *Science*, 345: 216-20.
- Zaalishvili, T. M., NSh Dzhaparidze, R. D. Michilashvili, and D. O. Margiani. 1990. '[The effect of the x-ray irradiation of rats on the NAD-pyrophosphorylase and poly(ADP-ribose)polymerase activities of brain nuclei and on the NAD content in nerve tissue]', *Radiobiologija*, 30: 36-9.
- Zahra Eslami-S, Luis Enrique Cortés-Hernández, Catherine Alix-Panabières. 2020. 'Circulating tumor cells: moving forward into clinical applications', *Precis Cancer Med*, 2020;3.4.
- Zamani, N., and C. W. Brown. 2011. 'Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure', *Endocr Rev*, 32: 387-403.
- Zavyalova, M. V., E. V. Denisov, L. A. Tashireva, O. E. Savelieva, E. V. Kaigorodova, N. V. Krakhmal, and V. M. Perelmuter. 2019. 'Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis', *Biochemistry (Mosc)*, 84: 762-72.
- Zeng, Q., B. P. Gomez, R. P. Viscidi, S. Peng, L. He, B. Ma, T. C. Wu, and C. F. Hung. 2012. 'Development of a DNA vaccine targeting Merkel cell polyomavirus', *Vaccine*, 30: 1322-9.
- Zervantonakis, I. K., S. K. Hughes-Alford, J. L. Charest, J. S. Condeelis, F. B. Gertler, and R. D. Kamm. 2012. 'Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 13515-20.
- Zhang, L., L. D. Ridgway, M. D. Wetzel, J. Ngo, W. Yin, D. Kumar, J. C. Goodman, M. D. Groves, and D. Marchetti. 2013. 'The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis', *Sci Transl Med*, 5: 180ra48.

- Zhao, J., Y. Jia, S. Shen, J. Kim, X. Wang, E. Lee, I. Brownell, J. H. Cho-Vega, C. Lewis, J. Homs, R. R. Sharma, and R. C. Wang. 2020. 'Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Activates Noncanonical NFkappaB Signaling to Promote Tumorigenesis', *Mol Cancer Res*.
- Ziegenhain, C., B. Vieth, S. Parekh, B. Reinius, A. Guillaumet-Adkins, M. Smets, H. Leonhardt, H. Heyn, I. Hellmann, and W. Enard. 2017. 'Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods', *Mol Cell*, 65: 631-43 e4.
- Zou, W., J. D. Wolchok, and L. Chen. 2016. 'PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations', *Sci Transl Med*, 8: 328rv4.

Titre : Détection et pertinence clinique des Cellules Tumorales Circulantes (CTC) dans le Carcinome à Cellules de Merkel - Détermination du statut viral MCPyV des CTC vs biopsies tissulaires.

Mots clés : Cellule tumorale circulante, Carcinome à cellules de Merkel, Biopsie liquide, Polyomavirus de Merkel

Résumé : Le Carcinome à cellules de Merkel (CCM) est une tumeur cutanée rare et agressive, de mauvais pronostic. La détection précoce de la tumeur primaire et des rechutes est un enjeu majeur pour améliorer la survie des patients. Les Cellules tumorales circulantes (CTC) peuvent se détacher des tumeurs solides, passer dans le sang et vont pouvoir former des métastases. Leur détection, la biopsie liquide, peut apporter de nombreuses informations cliniques pertinentes notamment pour identifier précocement les rechutes.

Le but de cette thèse a été l'identification des CTC dans le CCM grâce notamment à la mise au point d'une nouvelle méthode de détection. Cette méthode dite R-D a été comparée au CellSearch, Gold-Standard pour la détection des CTC chez 28 patients atteints de CCM. Ces deux méthodes apparaissent complémentaires dans la détection des CTC et les résultats sont corrélées au stade de la maladie. Un seuil de détection associé à la présence de métastases a été défini et doit être validé cliniquement pour la détection précoce de la dissémination de la maladie. Dans une seconde partie, l'objectif a été de rechercher la présence du polyomavirus du CCM (MCPyV), impliqué dans 80% des cas de CCM, dans les CTC individuelles ainsi que dans les cellules tumorales issues de biopsie tissulaire. Sa présence s'est révélée hétérogène à l'échelle cellulaire dans ces deux types d'échantillons, donnée non connue à ce jour. Enfin, nous avons tenté de mettre en culture *in-vitro* des CTC issues de prélèvements de patients, sans parvenir, pour le moment, à identifier les conditions idéales.

Ce travail fournit des bases solides pour de futures études cliniques incluant des cohortes plus larges, afin notamment de déterminer l'intérêt clinique des CTC comme marqueur pronostique et évolutif du CCM, mais également pour des études biologiques sur les mécanismes oncogéniques (dépendant notamment du MCPyV).

Title: Detection and clinical pertinence of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Merkel Cell Carcinoma - Determination of CTC their viral status vs tissues biopsies.

Key words: Circulating Tumor Cells, Merkel Cell Carcinoma, Liquid Biopsy, Merkel cell Polyomavirus

Abstract: Merkel Cell Carcinoma (MCC) is a rare and aggressive cancer with an unfavorable prognosis related to early metastatic dissemination. The early detection is a major issue to improve the patient's overall survival. Circulating Tumor Cells (CTCs) are cells that detached from solid tumor, go into the circulating system and can form distant metastasis. Their detection, the liquid biopsy, can bring many clinical information, including early detection of cancer relapse.

This thesis was aimed at detecting CTCs in CCM through the development of a new detection method in this malignancy. This R-D method was compared to CellSearch, Gold-Standard for CTC detection, in 28 MCC patients. These 2 methods appeared complementary for CTC detection and the results were correlated with tumor stage. A second objective was to investigate the expression pattern of the Merkel cell Polyomavirus (MCPyV), involved in 80% of CCM overall, in single CTCs vs single cells isolated from tumor biopsies. This expression was heterogeneous in both sample subsets, a data not previously established. Finally, we tried to establish *in-vitro* cultures of CTCs isolated from patients' blood samples but optimal conditions could not be set up to date.

This work provides robust grounds for future clinical investigations carried out on larger cohorts of patients especially regarding the clinical relevancy of CTC detection as prognostic factor and outcome predictor in CCM, and for biological studies investigating MCPyV role in oncogenesis and systemic dissemination patho-mechanisms in this malignancy.