



HAL
open science

Caractérisation des cellules tumorales circulantes de sarcomes osseux : identification de nouveaux marqueurs de la pathologie récidivante

Antoine Chalopin

► **To cite this version:**

Antoine Chalopin. Caractérisation des cellules tumorales circulantes de sarcomes osseux : identification de nouveaux marqueurs de la pathologie récidivante. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1028 . tel-03937416

HAL Id: tel-03937416

<https://theses.hal.science/tel-03937416v1>

Submitted on 13 Jan 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Biologie Santé

Par

Antoine CHALOPIN

Caractérisation des cellules tumorales circulantes de sarcomes osseux : Identification de nouveaux marqueurs de la pathologie récidivante

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 20 décembre 2022

Unité de recherche : CNRS UMR 6286

Rapporteurs avant soutenance :

Catherine BOISSON-VIDAL Directrice de Recherche au CNRS Paris
Sébastien PESENTI Professeur des Universités Praticien hospitalier, Université de Marseille

Composition du Jury :

Président : Antoine HAMEL Professeur des Universités Praticien hospitalier, Nantes Université

Examineurs : Catherine BOISSON-VIDAL Directrice de Recherche au CNRS Paris
Virginie GANDEMER Professeur des Universités Praticien hospitalier, Université de Rennes
Sébastien PESENTI Professeur des Universités Praticien hospitalier, Université de Marseille

Dir. de thèse : Dominique HEYMANN Professeur des Universités Praticien hospitalier, Nantes Université

Sommaire

1.	Introduction.....	4
1.1	Généralités sur les sarcomes.....	4
1.2	Généralités sur les sarcomes osseux.....	6
1.3	L'ostéosarcome	8
1.3.1	Epidémiologie	8
1.3.2	Présentation clinique.....	8
1.3.3	Diagnostic	9
1.3.4	Histologie de l'ostéosarcome	11
1.3.5	Traitement conventionnel.....	12
1.3.6	Biologie de l'ostéosarcome	15
1.3.7	Microenvironnement tumoral.....	23
1.3.8	Dissémination métastatique	30
1.3.9	Nouvelles approches thérapeutiques	33
2.	Les Cellules Tumorales Circulantes	41
2.1	Concept des cellules tumorales circulantes (CTCs)	41
2.2	Technologies de détection des CTCs	42
2.2.1	Isolement par microfiltration	43
2.2.2	Isolement par gradient de densité	44
2.2.3	Isolement par dispositifs microfluidiques	44
2.2.4	Isolement par immunoaffinité	46
2.2.5	Évaluation fonctionnelle des CTCs	47
2.2.6	Autres techniques.....	47
2.3	Analyse moléculaire des CTCs	48
2.4	Intérêt des CTCs.....	48
2.5	Applications cliniques.....	50
2.5.1	CTC versus ADNct en pratique clinique	51
2.5.2	CTCs et sarcomes.....	51
2.5.3	CTCs et ostéosarcomes.....	52
3.	Objectifs.....	54
4.	Matériel et Méthodes	56
4.1	Lignées cellulaires et réactifs.....	56
4.2	Modèle xénogénique d'ostéosarcome murin	57

4.3	Isolement ces CTCs	58
4.3.1	Isolement par cytométrie en flux	58
4.3.2	Isolement par DEPArray	59
4.4	Analyse histologique	61
4.5	Expérimentations <i>in vitro</i>	62
4.5.1	Analyse de la prolifération cellulaire.....	62
4.5.2	Analyse de la sensibilité aux drogues.....	63
4.5.3	Etude de la migration et de l'invasion cellulaire	63
4.5.4	PCR quantitative.....	64
4.6	Analyse statistique	65
5.	Résultats.....	66
5.1	Description et validation du modèle animal	66
5.2	Effet du traitement par Ifosfamide	68
5.3	Isolement et amplification des CTCs	72
5.4	Caractérisation <i>in vitro</i> des CTCs.....	73
5.4.1	Analyse de la prolifération cellulaire.....	73
5.4.2	Analyse de la sensibilité aux drogues.....	74
5.4.3	Etude de la migration et de l'invasion cellulaire	77
5.4.4	PCR Quantitative	78
6.	Discussion.....	80
6.1	Les enjeux de l'isolement des CTCs dans les sarcomes.....	80
6.2	Détection précoce des CTCs	81
6.3	CTCs et Ifosfamide.....	81
6.4	Caractérisation moléculaire des CTCs	83
6.5	CTCs et hétérogénéité tumorale	84
6.6	Perspectives.....	85
7.	Références.....	91
	Articles publiés	

1. Introduction

1.1 Généralités sur les sarcomes

Les sarcomes sont des cancers hétérogènes provenant de l'os, du cartilage ainsi que d'autres tissus mésenchymateux, tels que les muscles, la graisse, les nerfs périphériques, les tissus fibreux ou apparentés. Bien qu'ils ne représentent que 1 % de toutes les tumeurs malignes humaines, les sarcomes représentent le deuxième type de tumeurs solides chez les enfants et les adolescents et comprennent un groupe important de tumeurs malignes secondaires. Plus de 100 sous-types histologiques ont été caractérisés à ce jour, et de nombreux autres sont en cours de découverte grâce au profilage moléculaire. En raison de leur comportement biologique le plus souvent agressif, de leur rareté relative et de leur occurrence à se développer sur pratiquement tout site anatomique, de nombreux sous-types de sarcomes sont difficiles à traiter. Les concepts actuels de traitement multimodal associent la chirurgie, la polychimiothérapie (avec/sans hyperthermie locale), l'irradiation, les immunothérapies et/ou thérapies ciblées (Grünewald et al. 2020).

Les progrès scientifiques récents ont permis une caractérisation moléculaire plus précise des sous-types de sarcomes et ont révélé de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que de nouveaux biomarqueurs pronostiques et prédictifs (T. G. Grünewald et al. 2020).

Bien que les sarcomes soient rares parmi les tumeurs malignes de l'adulte, ils représentent 12 à 15 % de toutes les tumeurs pédiatriques (Stiller et al. 2013). Malgré la mise en œuvre et l'optimisation continue des thérapies multimodales, environ un tiers des patients atteints de sarcome succombent encore à la maladie. Historiquement, les sarcomes ont été regroupés en deux grands sous-groupes, selon le site anatomique d'occurrence - les sarcomes du squelette et les sarcomes des tissus mous (ci-après dénommés respectivement « sarcomes osseux » ou « sarcomes des tissus mous »). Les deux sous-groupes comprennent une variété de sous-types histologiques, et les avancées technologiques récentes ont permis de déchiffrer un nombre sans cesse croissant de sous-types au niveau moléculaire (Grünewald et al. 2020; Koelsche et al. 2021). (Figure 1)

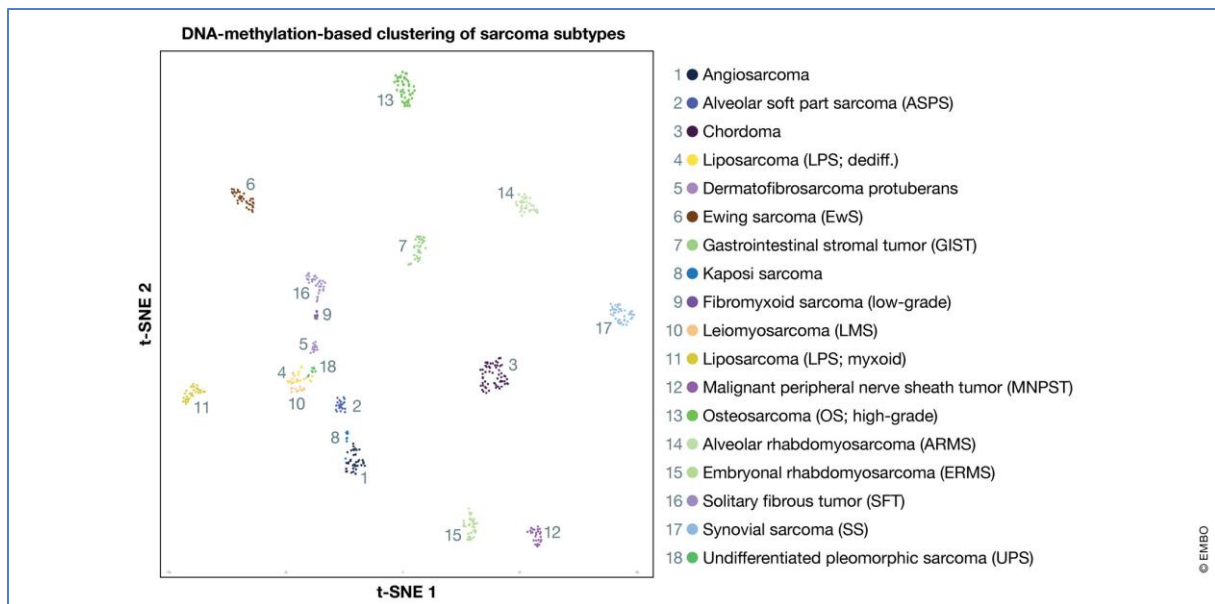


Figure 1 : Diversité des sarcomes mise en évidence par le profilage de la méthylation de l'ADN. 18 sous-types de sarcomes majeurs et de tumeurs des tissus mous basés sur le profilage de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome (d'après Grünewald et al. 2020).

Le développement du sarcome résulte d'un processus biologique complexe. Leur histoire naturelle combine l'émergence d'un premier évènement oncogénique (ex : mutation de *p53*, de *Rb*) suivi d'événements oncogéniques et épigénétiques secondaires (ex : régulation du processus de méthylation, miRNA) avec une conjoncture d'un microenvironnement permissif composé de types de cellules provenant de tissus mésodermiques, d'infiltrats immunitaires, de composants de matrice vasculaire et extracellulaire (Brown et al. 2017; Cortini, Avnet and Baldini 2017; Heymann et al. 2019; Shao et al. 2022; Crenn et al. 2022). Les analyses réalisées par séquençage « single cells » à partir de fragments de tissus frais d'ostéosarcome démontrent une très grande diversité moléculaire des cellules de ce microenvironnement (ex : cellules souches mésenchymateuses, cellules stromales, ostéoclastes, lymphocytes infiltrant les tumeurs, macrophages associés aux tumeurs) (Zhou et al. 2020).

Les cellules de sarcome interagissent avec leur environnement proche par contact direct, ou par communications paracrines impliquant des cytokine/facteurs de croissance/miARN sous une forme soluble ou encapsulée dans des vésicules extracellulaires et les voies de signalisation intracellulaire qui en résultent (Perut et al 2019). Les cellules d'ostéosarcome libèrent ainsi des vésicules extracellulaires contenant du TGF β qui agissent sur les cellules stromales du microenvironnement qui en retour libèrent des signaux pro-

inflammatoires comme l'IL-6 favorables à la croissance de la tumeur (Baglio et al. 2017). Les cellules d'ostéosarcome éduquent ainsi les cellules stromales pour la production d'un environnement qui leur est favorable. Les micro-ARN (miR-25-3p et miR-92a-3p) sont élevés chez les patients atteints de liposarcomes. miR-25-3p et miR-92a-3p ont modulé les macrophages dans le microenvironnement local, qui à leur tour ont libéré de l'IL-6, augmentant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Casadei et al. 2017).

Les cellules de sarcome sont caractérisées par une hétérogénéité phénotypique et génétique provenant des événements oncogéniques/épigénétiques successifs survenant au cours du développement tumoral et par des cellules cancéreuses acquérant des propriétés de souches qui deviennent progressivement quiescentes (Brown et al 2017; Menéndez et al. 2021; Jubelin et al. 2022). Les sarcomes sont susceptibles d'induire des foyers métastatiques distants propagés par les cellules tumorales circulantes et d'envahir après extravasation les niches métastatiques appropriées. Les cellules cancéreuses installées dans des organes distants peuvent se propager à nouveau et enrichir d'autres sites métastatiques augmentant l'hétérogénéité tumorale et potentiellement les résistances aux médicaments. Cet enrichissement des sites métastatiques par les cellules primaires et réciproquement, ainsi que des sites métastatiques entre eux a très bien été décrite dans le contexte du cancer de la prostate (Gundem et al. 2015).

Des cellules persistantes après résection de la tumeur primitive ou des cellules cancéreuses dormantes localisées dans des organes distants caractérisent la maladie résiduelle minimale et sont responsables de récurrences tumorales. Une sélection de traitements approuvés et expérimentaux visant à prévenir la croissance et/ou la dissémination tumorale est présentée par la suite.

1.2 Généralités sur les sarcomes osseux

Les tumeurs osseuses primitives sont des tumeurs rares, représentant moins de 0,2 % des tumeurs malignes enregistrées dans la base EUROCARE (Gatta et al. 2014).

Les sarcomes osseux sont des tumeurs appartenant à la famille des tumeurs mésenchymateuses et constituent un groupe tumoral très hétérogène. Les trois principaux

sarcomes osseux sont l'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing et le chondrosarcome chacun subdivisé en diverses entités histologiques.

L'ostéosarcome sera détaillé par la suite.

Le **sarcome d'Ewing**, dont l'histogénèse a longtemps été débattue, est la plus indifférenciée des tumeurs neuro-ectodermiques primitives (PNET). Le sarcome d'Ewing est la deuxième tumeur osseuse maligne la plus fréquente après l'ostéosarcome chez les adolescents et les jeunes adultes. Le sarcome d'Ewing touche environ 80 à 100 nouveaux patients par an en France. La majorité des cas (70%) surviennent chez des jeunes âgés de 5 à 25 ans. Cependant, ces tumeurs peuvent se rencontrer avant 5 ans et après 30 (Grünewald et al. 2018)

L'atteinte sur le membre inférieur représente la moitié des cas et le bassin est touché dans un quart des cas. Une translocation spécifique impliquant le gène EWSR1 (22q12.2) est présente dans 90 % des tumeurs sous forme, le plus souvent, d'une translocation t(11;22)(q24;q12). Dans sa forme classique, il s'agit d'une tumeur très cellulaire avec des cellules rondes de petite taille surexprimant le CD99 (Grünewald et al. 2018)

Le traitement repose le plus souvent sur une polychimiothérapie associée à une résection chirurgicale et de la radiothérapie.

Le **chondrosarcome** représente 10 à 25% des sarcomes osseux de l'adulte mais reste exceptionnel chez l'enfant. Il s'agit donc habituellement d'une tumeur survenant chez l'adulte de plus de 40 ans.

Concernant sa localisation, il s'agit le plus souvent d'une atteinte des os longs (50%) et du bassin (20%). Le chondrosarcome est soit une maladie primitive soit une dégénérescence de chondromes. Les cellules tumorales élaborent de la matrice chondroïde mais pas ostéoïde.

Le traitement repose exclusivement sur une chirurgie d'exérèse en raison de la chimiorésistance et la radiorésistance de ces tumeurs. Le risque de récurrence locale est important en particulier pour les localisations au bassin (Bruns et al. 2001)

D'une manière générale, les sarcomes osseux se caractérisent cliniquement par une morbidité et une mortalité relativement élevées, en particulier chez les enfants et les adolescents. Bien que ces tumeurs soient hétérogènes sur le plan histologique, moléculaire

et génétique, elles partagent une implication commune du microenvironnement local dans leur pathogenèse.

1.3 L'ostéosarcome

1.3.1 Epidémiologie

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses malignes chez les adolescents et les jeunes adultes. Il touche environ 100 à 150 nouveaux patients en France chaque année. Il existe une prédominance masculine (1 fille atteinte pour 1,4 garçon) (Gatta et al. 2014). Les causes de l'ostéosarcome primitif sont inconnues et aucun facteur environnemental n'a été mis en évidence.

1.3.2 Présentation clinique

Les erreurs ou les retards diagnostiques restent encore aujourd'hui assez fréquents car les signes cliniques d'appel des tumeurs malignes n'ont rien de spécifique. De plus le diagnostic est rarement évoqué en première intention.

La douleur est de loin le premier motif de découverte. Elle est souvent plus marquée la nuit. Elle est présente de façon isolée dans 70% des cas. Elle peut être discrète et ne se traduire que par une simple boiterie. Une tuméfaction palpable dans la région atteinte est peu fréquente (4% des ostéosarcomes). La survenue d'une fracture peut également faire évoquer le diagnostic en cas de bonne analyse du mécanisme et de la radiographie. D'autres signes peuvent être présents au diagnostic en lien avec la topographie de la lésion comme des troubles sphinctériens en cas d'atteinte du pelvis ou des troubles neurologiques en cas d'atteinte vertébrale.

Leur localisation se situe préférentiellement au niveau de la métaphyse des os longs (90% des cas). Les atteintes autour du genou (extrémité inférieure du fémur et extrémité supérieure du tibia) représentent plus de 50% des cas. L'humérus arrive en deuxième position (10%). Les localisations aux os plats sont plus rares. (Figure 2)

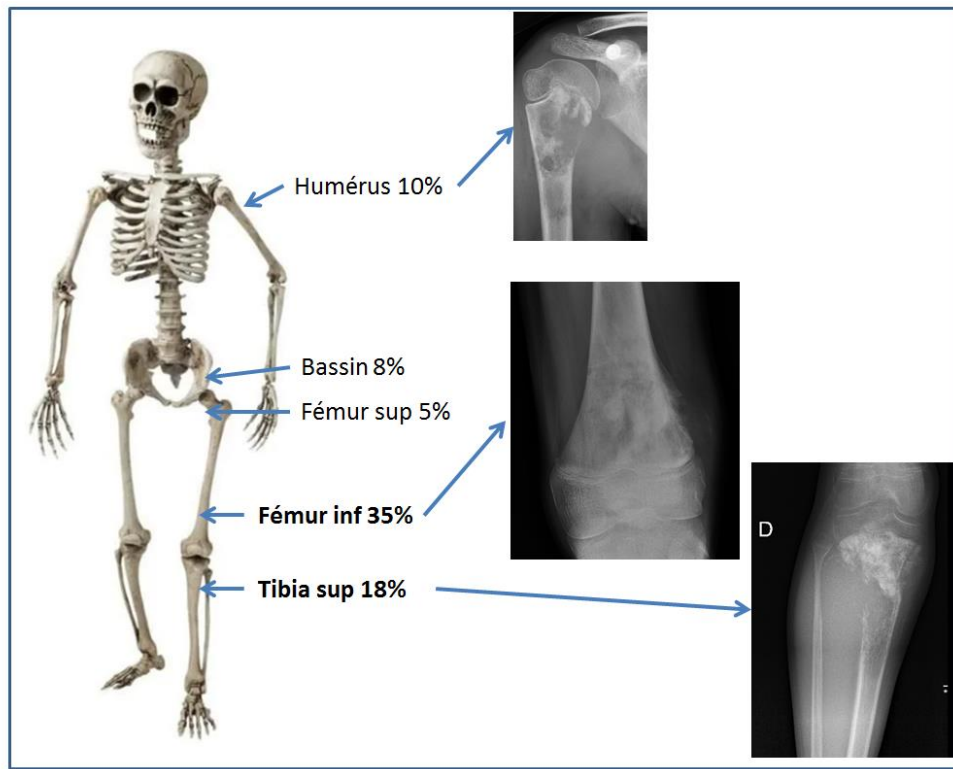


Figure 2 : Les localisations les plus fréquentes de l'ostéosarcome

1.3.3 Diagnostic

L'imagerie occupe une place importante dans le diagnostic. Les radiographies standards sont la première étape du diagnostic. Elles permettent souvent d'apprécier le caractère agressif, de formuler des hypothèses diagnostiques et de motiver la réalisation d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) en deuxième intention.

L'analyse des clichés s'attache à rechercher une modification de la structure de l'os, une réaction périostée, une réaction des parties molles adjacentes et à caractériser la matrice lésionnelle.

La modification de la structure de l'os sera le plus souvent une ostéolyse géographique à bords mal définis (type IC de Lodwick) ou une ostéolyse multi-lacunaire à bords flous (type II) ou ponctuée (type III). Une réaction périostée est le reflet d'un mécanisme de défense contre l'agression par une ostéogenèse de la face interne du périoste. Il existe différents aspects de cette réaction: continue ou discontinue, spiculaire, unilamellaire fine, ou encore multilamellaire. La rupture de cette réaction prend la forme d'un éperon ou triangle de Codman. (Figure 3)

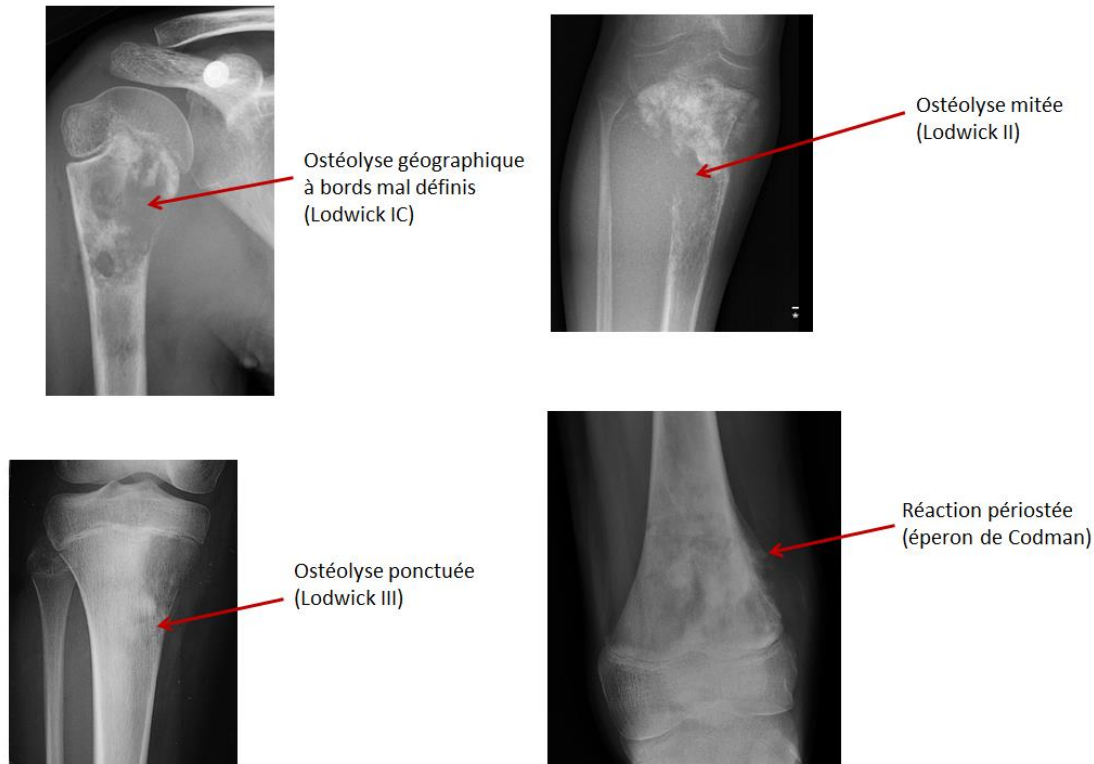


Figure 3 : Aspects radiographiques de l'ostéosarcome avec les différents types d'ostéolyse selon Lodwick. Une réaction périostée est très fréquemment retrouvée dans les ostéosarcomes témoignant de l'agressivité de la lésion.

La matrice tumorale correspond à la lésion elle-même. Elle peut être chargée en calcium dans les lésions ostéocondensantes. La présence de calcifications lobulées pourra orienter vers une origine cartilagineuse.

Ensuite, l'IRM va être indispensable avant d'envisager de réaliser une biopsie. Le champ d'exploration devra être suffisant large et couvrir tout le segment osseux pour rechercher d'éventuelles skip métastases. L'IRM va permettre d'étudier l'extension endoméduillaire, l'extension épiphysaire et articulaire, l'envahissement des tissus mous ou encore l'extension aux axes vasculo-nerveux. L'IRM au diagnostic servira de référence pour l'exérèse chirurgicale.

La biopsie est la dernière étape du diagnostic. Il s'agit d'un geste chirurgical majeur qui sera, au mieux, réalisé par l'équipe qui pratiquera la résection. Elle repose sur trois impératifs. Il faut utiliser pour la biopsie la même voie que celle de la chirurgie d'exérèse. Il faut privilégier un abord direct, trans-musculaire sans disséquer les vaisseaux et les nerfs

(Bickels et al. 1999). Enfin il faut veiller à utiliser des voies longitudinales parallèles à l'axe du membre aussi courtes que possible. Une mauvaise biopsie peut compromettre la survie du patient et le traitement conservateur. Les prélèvements sont ensuite adressés au laboratoire d'anatomie pathologique sous forme de pièce fraîche.

Une fois le diagnostic posé, il faudra ensuite réaliser un bilan d'extension comprenant une scintigraphie osseuse et un scanner pulmonaire à la recherche de localisations secondaires.

1.3.4 Histologie de l'ostéosarcome

Les ostéosarcomes sont des tumeurs osseuses malignes caractérisées par la production d'os ou d'ostéoïde par les cellules tumorales selon la classification OMS (Choi et Ro 2021; Sbaraglia et al. 2021).

Trois groupes sont identifiés en fonction de leur localisation : les ostéosarcomes de siège intra-médullaire, de surface ou intra cortical (très rare).

Le diagnostic d'ostéosarcome repose sur la mise en évidence de l'ostéoïde. Il s'agit d'une substance dense, rosée, amorphe. Les aspects cytologiques sont variables : fibroblastique, anaplasique, pléomorphe, épithélioïde, avec des cellules géantes mono ou multinucléées. Un ostéosarcome conventionnel peut produire une quantité variable de tissu fibreux ou de cartilage permettant de les subdiviser en ostéosarcome ostéoblastique, chondroblastique ou fibroblastique. On ne retrouve pas d'immunophénotype particulier (Choi et Ro 2021).

L'ostéosarcome télangiectasique est une tumeur pluri-kystique, à l'intérieur de la médullaire. Il s'agit d'une tumeur kystique, faite d'espaces remplis de sangs ou vides séparés par des septas fins. Les espaces sont bordés de cellules géantes plurinucléées dépourvues de bordures endothéliales. La quantité d'ostéoïde est en quantité variable selon les patients.

L'ostéosarcome paraostéal est un ostéosarcome de bas grade développé à la surface de l'os (à 70% au niveau de l'extrémité distale du fémur). Il s'agit d'une volumineuse masse dure lobulée, fixée à la corticale par une implantation large. Il est constitué de travées osseuses bien formées avec ou sans bordure ostéoblastique. Les cellules sont fusiformes sans atypie cytonucléaire importante (Figure 4).

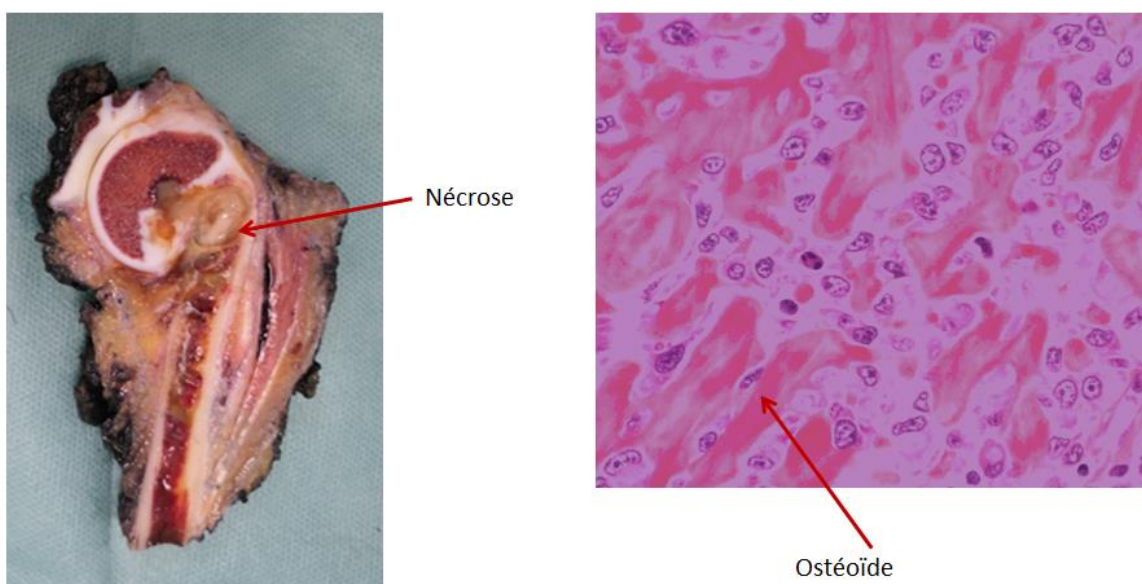


Figure 4 : Aspect macroscopique et microscopique d'un ostéosarcome. Pièce d'exérèse en bloc large de la tumeur montrant un territoire nécrotique suite au traitement par polychimiothérapie. L'image histologique montre les caractéristiques typiques de l'ostéosarcome avec une matrice extracellulaire minéralisée (ostéoïde) associée à de nombreuses cellules tumorales ici en apoptose sur la pièce d'exérèse.

1.3.5 Traitement conventionnel

Le traitement de référence repose sur une poly-chimiothérapie associée à un geste local de résection chirurgicale. Cette poly-chimiothérapie repose sur des cures alternées combinant différentes drogues dont les principales sont le méthotrexate à hautes doses ajustées selon le taux sanguin, l'ifosfamide, la doxorubicine et le cisplatine (Luetke et al. 2014). La chimiothérapie néo-adjuvante a pour objectifs d'arrêter l'évolution de la maladie, d'améliorer les douleurs et de faciliter l'acte chirurgical. Le traitement local comprend un premier temps de résection carcinologique large et dans la majorité des cas un temps de reconstruction (Figure 5).

Obtenir des marges claires est un défi pour les chirurgiens, tandis que la planification d'une résection vise à obtenir des marges suffisamment larges pour le contrôle oncologique, mais suffisamment étroites pour épargner la fonction. Tout d'abord, les marges obtenues

par résection chirurgicale sont reconnues comme ayant un facteur pronostique fort. La récurrence locale est fortement corrélée aux marges positives. Stoeckle *et al.* ont clairement défini l'adaptation de la classification de l'Union for International Cancer Control (UICC) des tumeurs résiduelles aux tumeurs sarcomateuses et l'évaluation de la qualité chirurgicale (Stoeckle et al. 2009). Cette classification repose sur un nombre limité de catégories (R0 = *in sano*, R1 = maladie résiduelle microscopique possible, R2 = maladie résiduelle macroscopique), et sur une étroite collaboration pathologiste-chirurgien. Les maladies R0 et R1 sont toutes deux définies après examen anatomopathologique, tandis que le statut R2 est défini par le chirurgien. L'obtention de marges adéquates signifie un taux élevé (90 % ou plus) de contrôle local après résection d'une tumeur osseuse primitive.

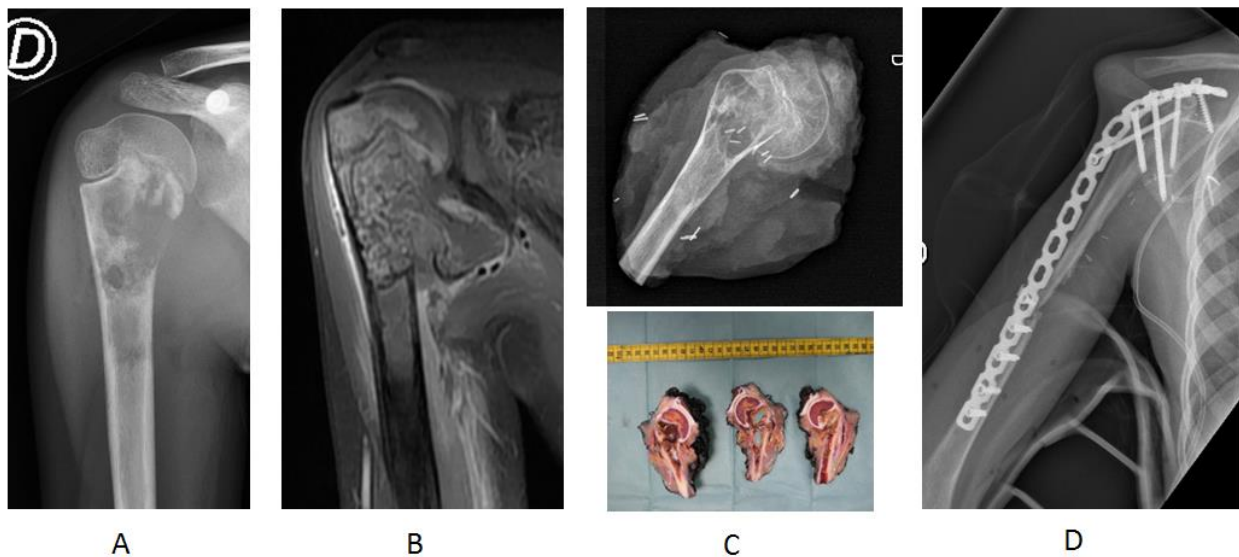


Figure 5 : **A.** Radiographie de face montrant un ostéosarcome de l'extrémité supérieure de l'humérus droit chez un enfant de 11 ans, **B.** Coupe frontale d'IRM montrant l'envahissement intra-médullaire et l'extension aux parties molles, **C.** Radiographie de la pièce opératoire et photographie de la pièce en cours d'analyse anatomopathologique, **D.** Reconstruction par arthrodeuse scapulo humérale et fibula vascularisée.

Le résultat de la réponse de la tumeur à la chimiothérapie est déterminé par le pourcentage de cellules nécrosées évalué selon le principe décrit par Huvos (Rosen et al. 1982) en 4 grades (Tableau 1). En fonction de cette réponse à la chimiothérapie pré-opératoire, on décrit des patients bons répondeurs (cellules résiduelles < 10%) et mauvais répondeurs (cellules résiduelles > 10%).

Score de HUVOS	% de cellules tumorales viables détectées
Grade I	> 50 %
Grade II	de 11 à 50 %
Grade III	de 1 à 10 %
Grade IV	0%

Tableau 1 : Score de Huvos en 4 grades. Le score de Huvos sur l'analyse histologique de la pièce tumorale d'exérèse et la numération des cellules tumorales viables résiduelles après polychimiothérapie.

Bien que cette évaluation histologique soit un paramètre clé dans le suivi des patients, l'enjeu clé a été de déterminer si la modification du traitement post-opératoire en fonction de la réponse thérapeutique analysée après la chimiothérapie néo-adjuvante peut améliorer la réponse thérapeutique des patients (Bielack et al. 2013). L'European and American Osteosarcoma Study Group (EURAMOS), composé du Children's Oncology Group (COG), du Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS), de l'European Osteosarcoma Intergroup (EOI) et du Scandinavian Sarcoma Group (SSG), a analysé l'impact de la nature de la chimiothérapie post-opératoire sur 2 260 patients inscrits (bons et mauvais répondeurs) (Whelan et al. 2015). Dans un vaste essai clinique appelé EURAMOS-1, ils ont comparé les avantages thérapeutiques des traitements MAP (Méthotrexate/Doxorubicine/Cisplatine) et MAPIE (MAP/ Ifosfamide/ Etoposide) chez les mauvais répondeurs, et MAP et MAPinf (MAP / Interféron- α) chez les bons répondeurs. Chez les mauvais répondeurs, la thérapie MAP vs MAPIE n'a montré aucune différence significative dans la survie sans événement. De même, chez les bons répondeurs, MAPinf n'était pas statistiquement différent de MAP seul (Bielack et al. 2015). Dans l'ensemble, ces résultats infirment l'hypothèse de choisir la chimiothérapie post-opératoire en fonction de la réponse histologique.

Les ostéosarcomes sont globalement résistants à la radiothérapie (Schwarz et al. 2009). Cependant, la radiothérapie est utilisée lorsqu'une intervention chirurgicale adéquate est impossible, par exemple lorsque la tumeur est située dans une zone à haut risque (par exemple, colonne vertébrale, bassin, tête et cou). La radiothérapie peut ainsi contribuer à stériliser les marges microscopiques, puis contribuer au contrôle local de la croissance de l'ostéosarcome chez les patients dont la résection chirurgicale ne peut pas conduire à des marges négatives (Errani et al. 2011). De plus, la radiothérapie est un outil palliatif utile pour les patients pédiatriques, en particulier lorsqu'il s'agit de contrôler les douleurs osseuses

(Rahn et al. 2015).

Malheureusement le pronostic de ces tumeurs reste sombre et dans de nombreux cas, une absence de réponse aux drogues anti-tumorales est observée conduisant au développement de métastases (surtout pulmonaires) puis au décès du patient. Peu d'éléments diagnostiques permettent d'adapter le traitement mais de nombreuses études sont en cours pour rechercher des marqueurs spécifiques permettant d'affiner le diagnostic, le pronostic et le dépistage des récidives.

1.3.6 Biologie de l'ostéosarcome

1.3.6.1 Biologie osseuse / physiologie du remodelage osseux

L'os est un tissu conjonctif spécialisé qui forme le squelette du corps. Il est composé d'une matrice extracellulaire (avec des phases organiques et minérales) et d'une phase cellulaire. Le tissu osseux a un rôle primordial dans la biomécanique du mouvement du corps, dans le métabolisme minéral et l'hématopoïèse.

La matrice extracellulaire est composée de deux fractions : organique (25%) et minérale (65%). La fraction organique est principalement composée de fibres de collagène de type I parallèles disposés au sein de structures lamellaires osseuses. Ces fibres sont entourées d'une couche inter-fibrillaire de glycosaminoglycanes, protéoglycanes et glycoprotéines (Katsimbri 2017). L'ostéocalcine est la protéine non collagène la plus abondante et elle est chargée par chimiotactisme d'attirer les ostéoclastes vers les sites de résorption. D'autres protéines telles que l'ostéopontine, la sialoprotéine et la fibronectine présentent un domaine arginine-glycine-acide aspartique (RGD), permettant la liaison aux intégrines (Barczyk et al. 2010). D'autres composants importants sont présents en faible quantité tels que les cytokines ou les facteurs de croissances, se lient aux protéoglycanes et glycoaminoglycanes et sont libérées lors des phases de résorption de remodelage osseux contrôlant ainsi finement les interactions entre les cellules osseuses (ex. TGF- β). Ces facteurs sont également très fortement impliqués dans la maturation et la différenciation des cellules hématopoïétiques (de Baat et al. 2005)(Tableau 2).

La fraction minérale représente le réservoir minéral le plus important de l'organisme. La fraction minérale osseuse disponible dans l'organisme est composée de 99% de calcium, de 85% de phosphore et de 40-60% du sodium et du magnésium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Cela offre une résistance mécanique aux os.

L'os cortical représente environ 80% du tissu osseux et il est responsable de la résistance mécanique du squelette. Il est composé d'unités de base, les ostéons qui contiennent les cellules (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes) et de la matrice extra cellulaire organisée en motifs lamellaires, entourant le canal haversien dans lequel les nerfs et les vaisseaux s'organisent.

L'os spongieux ou trabéculaire est poreux et moins dense. Il est formé de trabécules, avec de la moelle osseuse intercalée rendant l'os spongieux adapté à l'activité métabolique comme les échanges d'ions.

L'os est un tissu dynamique qui subit une adaptation continue au cours de la vie de l'adulte pour préserver la taille du squelette, l'intégrité structurelle et réguler l'homéostasie minérale. Le remodelage osseux continu est assuré par les activités synchronisées de plusieurs participants cellulaires pour s'assurer que la formation osseuse et la résorption osseuse se produisent séquentiellement au même niveau anatomique pour préserver la masse osseuse. Les principales populations de cellules impliquées dans ces processus sont les ostéoblastes (responsables de la formation osseuse) et les ostéoclastes (responsables de la résorption osseuse).

L'ostéoblaste est le principal type cellulaire responsable de la sécrétion des composés de la matrice organique. Ils expriment des récepteurs à la parathormone (PTH) et ont plusieurs rôles importants dans le remodelage osseux : expression de facteurs ostéoclastogènes, production de protéines de la matrice osseuse et minéralisation osseuse. Les ostéoblastes proviennent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes qui ont le potentiel de se différencier en adipocytes, myocytes, chondrocytes et ostéoblastes selon différents facteurs de transcription régulateurs (Pittenger et al. 1999). RUNX2 (runt-related

		Les fonctions
Phase cellulaire (5%)	Ostéoclastes	Remodelage osseux Synthèse des protéines de la fraction organique de la MEC
	Ostéoblastes	
Ostéocytes		
Ostéoprogéniteurs		
Matrice extracellulaire (95%)	<i>Phase organique (25%)</i>	Eau (10%)
		Fibrillaire (90%)
		Inter-fibrillaire (10%)
	<i>Phase minérale (65%)</i>	Hydroxyapatite
		ions
	Collagène de type I	de construction
	Fibronectine	Cellules d'adhérence / matrice
	Elastine	de construction
	Protéoglycanes	Diffusion des nutriments
	Glycosaminoglycanes	
	Glycoprotéines	
	Ostéocalcine	
	Ostéopontine	
	Sialoprotéine osseuse	Minéralisation
		Adhérence
		Minéralisation

Tableau 2 : Composants du tissu osseux

transcription factor 2) est un facteur de transcription contrôlant le processus de différenciation ostéoblastique. Les ostéoblastes sont normalement positionnés sur la matrice extracellulaire constituée de fibres de collagène et des protéines non collagéniques qui ne sont pas encore minéralisées ; l'ostéoïde. Chez l'homme, la minéralisation aura lieu environ 10 à 20 jours après le dépôt de la matrice. Au cours de ce processus certains ostéoblastes subissent une différenciation terminale et s'emmurent dans la matrice extracellulaire en cours de minéralisation ; ces cellules sont appelées ostéocytes. Ils présentent des prolongements cytoplasmiques qui permettent des connexions avec d'autres ostéocytes et également avec d'autres cellules à la surface osseuse (Kamioka et al. 2001). A la fin de la minéralisation de la matrice, les ostéoblastes entrent dans une phase de repos sans perdre leur capacité de devenir actif si nécessaire. Ces ostéoblastes se reposent comme des cellules de revêtement osseux sur la surface osseuse nouvellement formée garantissant la communication entre la surface cellulaire, l'environnement cellulaire et les ostéocytes inclus (Miller et al. 1989).

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées qui proviennent des cellules hématopoïétiques et plus particulièrement de précurseurs de la lignée monocyte/macrophage localisés dans la moelle osseuse. Les pré-ostéoclastes migrent vers la surface osseuse et sous l'influence du microenvironnement de la moelle osseuse. Ils se différencient en ostéoclastes spécialisés dans la résorption osseuse. Les données *in vitro* ont révélé que le CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1; également connu sous le nom de Macrophage Colony Stimulating Factor) et RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) sont des cytokines nécessaires à la survie, à l'expansion et la différenciation des précurseurs d'ostéoclastes (Théoleyre et al., 2004).

Ce partenariat CSF-1/RANKL définit la voie canonique de la différenciation ostéoclastique. Plusieurs voies non canoniques ont été identifiées dans lesquelles le CSF-1 est substitué par une autre cytokine telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor), V-EGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'IL34 (Interleukin-34), etc (Knowles et Athanasou 2009; Théoleyre et al. 2004; Baud'huin et al. 2010). Le facteur de transcription NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1) contrôle le processus de différenciation ostéoclastique (Mohseny et al. 2009; Mohseny et Hogendoorn 2011).

1.3.6.2 Origine de l'ostéosarcome

L'ostéosarcome provient d'une anomalie de différenciation d'une cellule mésenchymateuse localisée dans la moelle osseuse et engagée dans la lignée ostéoblastique (Mohseny et al. 2009). Le niveau de différenciation de la cellule en cours de transformation peut varier et pourrait expliquer les différents sous types d'ostéosarcomes plus ou moins différenciés rencontrés.

L'analyse de l'hétérogénéité tumorale nous permet de déchiffrer les étapes qui ont été franchies depuis la cellule initiatrice jusqu'au développement d'une masse tumorale hétérogène composée d'un ensemble de sous-clones distincts. En effet, l'ostéosarcome débute comme une maladie monoclonale, qui évolue rapidement vers une maladie polyclonale. L'ostéosarcome est considéré comme l'un des cancers les plus complexes en termes d'aberrations moléculaires (Kovac et al. 2015; Rickel et al. 2017). Une meilleure compréhension de cette diversité est donc très prometteuse pour identifier les marqueurs associés aux cellules tumorales les plus agressives au sein d'une masse tumorale. La grande hétérogénéité trouvée dans l'ostéosarcome est montrée dans une étude de séquençage d'exomes dans laquelle plusieurs voies (14 gènes « conducteurs ») ont été identifiées (Kovac et al. 2015). Les auteurs suggèrent qu'aucun gène pilote unique ne peut être identifié comme étant la cause de la majorité des tumeurs étudiées et que plusieurs voies oncogènes provoquent une instabilité génétique dans le développement de l'ostéosarcome (Brown et al. 2017). Cependant ce travail a démontré que de nombreux ostéosarcomes présentent donc des signatures d'instabilité génomique à grande échelle caractéristiques des tumeurs déficientes en BRCA1/2 qui pourraient être exploités sur un plan thérapeutique (ex : inhibiteurs de PARP) (Kovac et al. 2015)..

La connaissance croissante du génome du cancer grâce à une analyse approfondie utilisant par exemple le séquençage profond a considérablement amélioré la compréhension de l'hétérogénéité intra-tumorale et un schéma évolutif d'un sous ensemble de clones au sein d'une tumeur a été rapporté (Hiley et al. 2014). Les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) nous permettent désormais de visualiser l'hétérogénéité également au niveau d'une seule cellule.

1.3.6.3 Genèse de l'ostéosarcome

La genèse du sarcome osseux peut s'expliquer par une conjonction entre au moins un événement oncogénique et un microenvironnement adéquat conduisant à l'émergence du cancer, suivi de sa croissance et de sa migration potentielle vers des organes distants (Figure 6).

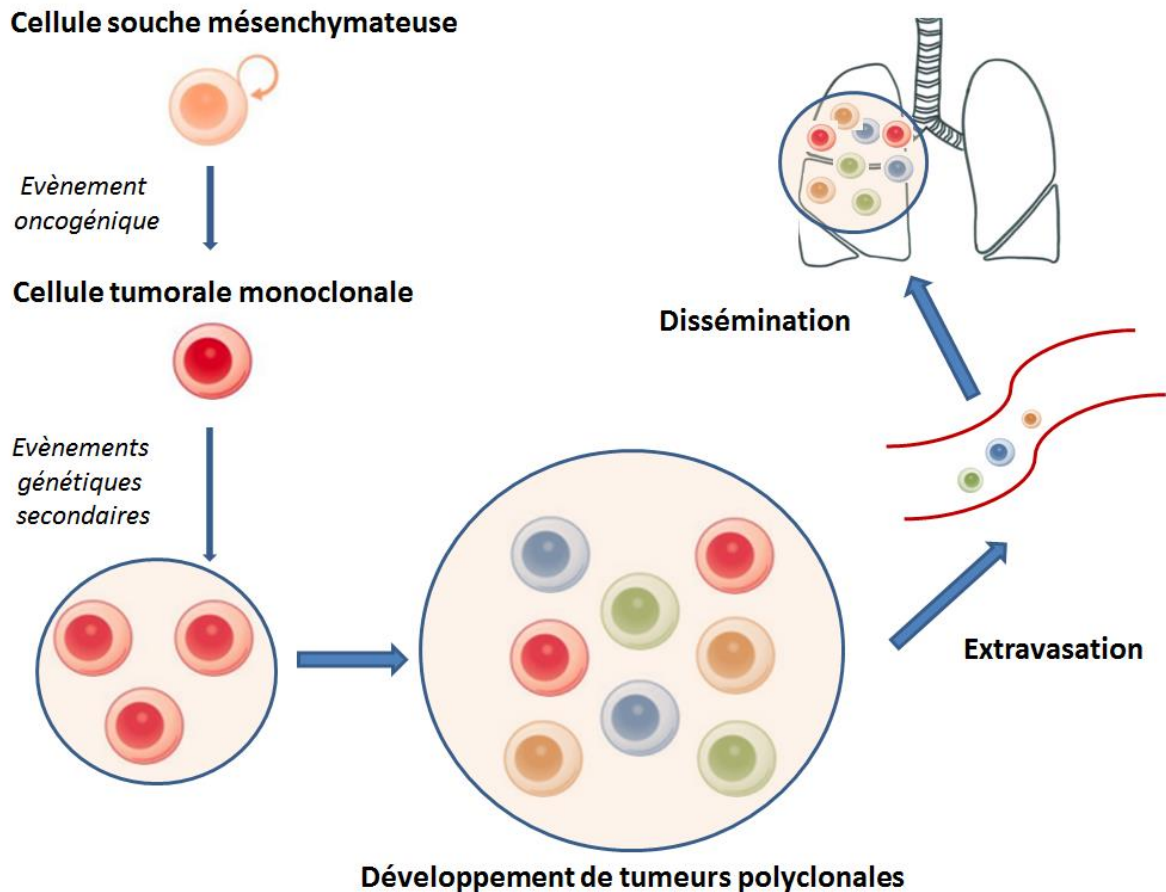


Figure 6 : Genèse de l'ostéosarcome. Initié à par d'un clone cellule pathologique, l'ostéosarcome évolue progressivement vers une maladie polyclonale suite à des évènements oncogéniques secondaires et l'enrichissement de sites distants principalement pulmonaires par des cellules tumorales circulantes.

Les événements oncogéniques au niveau de l'expression des gènes (par exemple mutation, duplication, translocation) survenant au cours de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses augmentent le risque de leur transformation en cellules cancéreuses et entraînent l'émergence de cellules malignes ostéoblastiques ou chondroblastiques malignes. En effet, les cellules d'ostéosarcome et de chondrosarcome

expriment *runx2* et *sox9* de la même manière que leurs « homologues cellulaires bénins » (ostéoblastes et chondroblastes) (Mohseny et al. 2009; Mohseny et Hogendoorn 2011; Wagner et al. 2011; Tang et al. 2010).

Les ostéosarcomes sont des tumeurs osseuses agressives avec un degré élevé d'hétérogénéité génétique. Au vu de l'expression de ces gènes, plusieurs modèles de cellules d'origine ont été proposés, notamment la transformation de cellules souches mésenchymateuses (MSC) indifférenciées ainsi que de progéniteurs ostéogéniques plus engagés. Par conséquent, les cellules d'ostéosarcome peuvent exprimer des marqueurs ostéoblastiques tels que la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine (Corre et al. 2020) ou la sialoprotéine osseuse, montrent une forte capacité à former du tissu ostéoïde et à induire la minéralisation de la matrice extracellulaire.

Les biopsies tumorales montrant des cellules mésenchymateuses produisant de l'ostéoïde et/ou de l'os tissé irrégulier sont classées comme ostéosarcomes (Gambera et al. 2018). La découverte histologique de ce processus ostéogénique incomplet est une exigence pour le diagnostic de la tumeur même si d'autres sous-types cellulaires directement dérivés de la tumeur sont présents. Cette définition pathologique est utilisée car l'étiologie de l'ostéosarcome est pour la plupart inconnue. Les maladies génétiques, telles que le syndrome de Li-Fraumeni (mutation germinale de *TP53*) et le rétinoblastome familial (mutation germinale de *RB1*), sont des facteurs de risque d'ostéosarcome (Gianferante et al. 2017; Gorlick 2009; Hicks et al. 2007)

Le Pediatric Cancer Genome Project (PCGP) a identifié des mutations germinales fréquentes du gène *TP53* dans les ostéosarcomes, similaires au taux de mutation *TP53* de 50% des cancers infantiles (Downing et al. 2012; J. Zhang et al. 2015), et le séquençage du génome entier et de l'exome entier a révélé que ces altérations des voies p53 et Rb sont plus fréquentes qu'on ne le pensait auparavant avec 70% des tumeurs mutées pour *RB1* (Perry et al. 2014; Chen et al. 2014). Par conséquent, ces syndromes sont principalement associés à des mutations de gènes qui participent au maintien de l'intégrité du génome et à la stabilité chromosomique. Contrairement à de nombreux sarcomes, qui sont caractérisés par des translocations chromosomiques spécifiques, l'ostéosarcome présente un caryotype complexe avec une instabilité génomique et chromosomique élevées (Martin et al. 2012), il se caractérise également par de multiples réarrangements à travers le génome.

1.3.6.4 Instabilité chromosomique

Le cancer se caractérise par le développement et la croissance de populations cellulaires anormales (par exemple, mutations, altération de la prolifération et/ou de la différenciation) (Tellez-Gabriel et al 2019). L'ADN étant le seul composant cellulaire capable d'accumuler et de transmettre des modifications tout au long de la vie, il a été admis que le processus de carcinogenèse nécessite l'accumulation progressive de multiples modifications de l'ADN (Paget 1989). Le modèle actuel et généralement accepté de la carcinogenèse est la théorie de la mutation somatique ou de l'évolution clonale (Tellez-Gabriel et al. 2017; Wee et al. 2019).

Les mutations du gène tumoral exprimé par les cellules des lésions pré-néoplasiques (par exemple *TP53*, *Rb*) conduisent à la formation de foyers néoplasiques caractérisés au stade précoce par des expansions monoclonales de cellules mutées. Ce type de mutation entraîne des instabilités génomiques caractérisées par une forte sensibilité aux cassures chromosomiques et par conséquent une nouvelle série de mutations, délétions et amplifications (Mitelman et al. 2019). Les cassures chromosomiques aléatoires et les événements génétiques secondaires contribuent clairement au développement de cellules cancéreuses avec un nouveau génotype et phénotype, puis au stade d'expansion polyclonale de la maladie. Les modifications épigénétiques complètent le cadre de la cartographie de l'hétérogénéité. Comme le révèlent les lignées cellulaires génétiquement homogènes, les altérations épigénétiques intercellulaires (par exemple, la méthylation de l'ADN, l'expression des miARN, etc.) renforcent l'hétérogénéité tumorale et la réponse aux médicaments (Grzywa et al. 2017; Vallette et al. 2019; Brown et al. 2019).

Comme les cellules embryonnaires, les cellules cancéreuses ne sont pas bloquées dans un état défini et adaptent en permanence leur phénotype en fonction du microenvironnement et de la pression thérapeutique. En effet, la plasticité phénotypique et fonctionnelle est un mécanisme commun observé au cours du développement embryonnaire (Bedzhov et al. 2014).

Toutes ces cellules peuvent basculer entre différents états cellulaires grâce à un haut degré de plasticité. De même, les cellules cancéreuses présentent une plasticité marquée comme illustré par la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans laquelle les cellules cancéreuses acquièrent progressivement un phénotype mésenchymateux et perdent leurs

propriétés épithéliales, conduisant ainsi au processus métastatique. La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un programme cellulaire par lequel les cellules épithéliales perdent leur polarité cellulaire et leur adhésion cellule-cellule, et acquièrent des propriétés migratoires et invasives pour devenir des cellules mésenchymateuses. Ce processus de transition peut être régulé par un large éventail de cytokines et de facteurs de croissance, tels que le TGF- β dont les activités sont dérégulées au cours de la progression tumorale maligne (Singh et al. 2010).

Le développement de l'ostéosarcome peut donc se résumer comme suit :

1) Apparition d'un premier événement oncogène tel qu'une mutation de *TP53* et/ou *RB1* (Velletri et al. 2016) ;

2) Ces mutations sont associées à une augmentation de l'instabilité génomique qui accroît les anomalies génétiques et chromosomiques dans les cellules tumorales au fur et à mesure des divisions cellulaires (Kovac et al. 2015; Bousquet et al. 2016) (confère paragraphe ci-dessous) ;

3) D'une population monoclonale, la maladie évolue vers une tumeur oligoclonale puis polyclonale (Gambera et al. 2018) ;

4) ces modifications sont à associer à une transformation du microenvironnement tumorale qui devient permissif à la croissance tumorale et à la migration des cellules (Alfranca et al. 2015);

5) Migration des cellules du site primaire vers les sites métastatiques (confère paragraphe ci-dessous).

1.3.7 Microenvironnement tumoral

Le microenvironnement du sarcome osseux ne se limite pas aux cellules souches mésenchymateuses et présente un caractère dynamique. Cet environnement peut être décrit comme des « niches » comprenant des niches osseuses, vasculaires et immunitaires et

des niches plus spécifiques telles que les muscles et le parenchyme pulmonaire pour les cellules métastatiques (Brown et al., 2017).

En raison de la corrélation entre la densité des vaisseaux et le processus métastatique dans les sarcomes osseux, les cellules endothéliales sont fortement impliquées dans l'intra/extravasation des cellules cancéreuses.

Depuis peu, de nouveaux régulateurs dont le cerveau, le réseau neuronal et les facteurs neurotrophiques devraient être ajoutés à la liste. Il est maintenant bien reconnu que le cerveau peut agir comme un maître régulateur de la masse osseuse (Karsenty et Oury 2010; Corr et al. 2017). Le remodelage osseux est en effet régulé par une riche innervation, source de facteurs neurotrophiques, hormones et neurotransmetteurs (Dimitri et Rosen 2017). Libérés localement ou dans la circulation sanguine, ces facteurs solubles pourraient cibler les cellules du sarcome osseux (Kondo et al. 2001; Broadhead et al. 2012). (Figure 7)

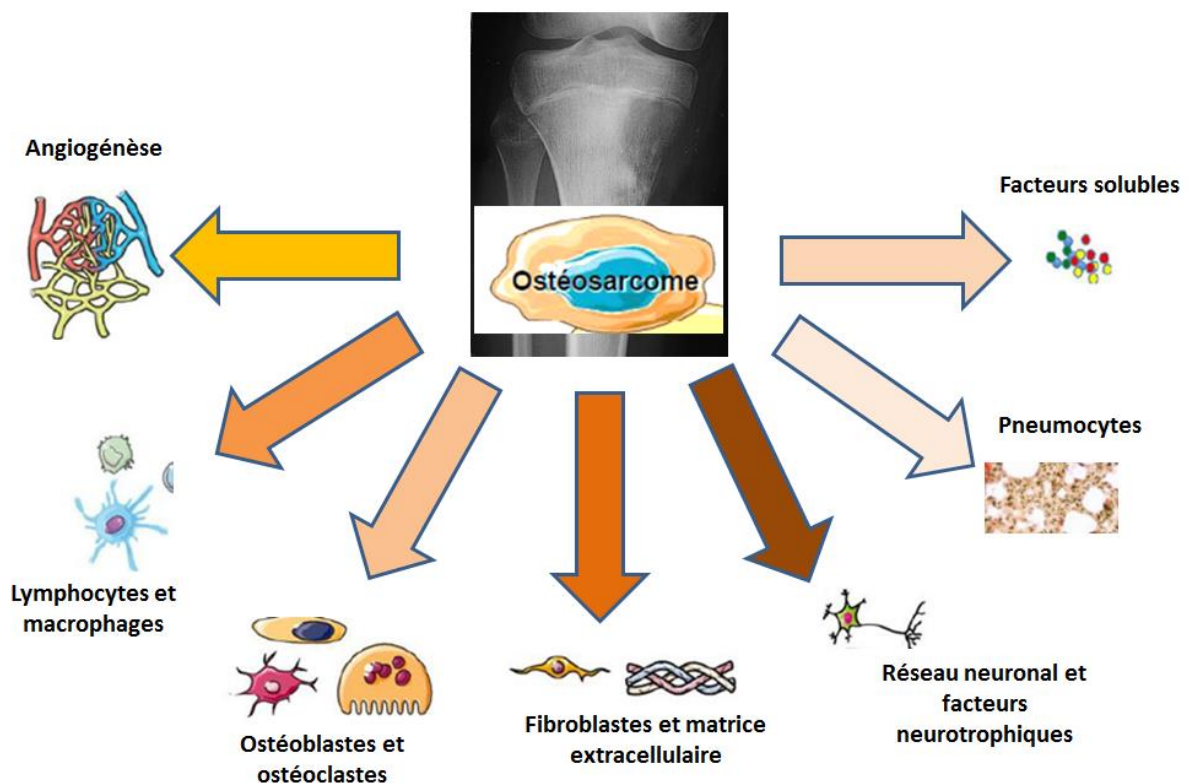


Figure 7 : Micro-environnement de l'ostéosarcome. Les cellules tumorales se développent dans un environnement permissif défini par plusieurs « niches » immunitaire, vasculaire, osseuse (pour la tumeur primaire), nerveuse et pulmonaire (pour les foyers métastatiques). Des facteurs solubles (cytokines, facteurs de croissance), des vésicules extracellulaires, et des composants de la matrice extracellulaire régulent l'ensemble des activités cellulaires de ces niches et les relations inter-niches.

1.3.7.1 Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Des interactions entre le parenchyme tumoral et le stroma non tumoral sont nécessaires au cours du développement tumoral et de la progression métastatique (Petrovito et al. 2018). Ils modulent également leur microenvironnement en sécrétant des composants de la matrice extracellulaire et une grande variété de facteurs de croissance mitogènes, de cytokines, de chimiokines et de métalloprotéinases (MMP). Plusieurs études ont confirmé que les cellules souches mésenchymateuses favorisent la prolifération des cellules d'ostéosarcome à la fois *in vitro* et *in vivo* (Perrot et al. 2010; Ibáñez et al. 2016; Cortini et al. 2016; Yan Wang et al. 2017). Contrairement aux ostéoblastes différenciés, les CSM, précurseurs peu différenciés de divers types cellulaires, dont les ostéoblastes (Katsimbri 2017), semblent incapables de communiquer avec les cellules d'ostéosarcome par l'établissement de jonctions lacunaires fonctionnelles (Yu et al. 2015). Cependant, ce dernier point reste controversé. En effet, Tellez-Gabriel et al. ont étudié les interactions entre des cellules d'ostéosarcome et des cellules souches mésenchymateuses en cours de différenciation à l'échelle de la cellule unique (Tellez-Gabriel et al Eur J Cell Biol 2017). Ces auteurs démontrent que les CSM indifférenciées, les ostéoblastes et ostéocytes ne communiquent pas avec les cellules d'ostéosarcome contrairement aux CSM en cours de différenciation. Par opposition, les ostéoclastes ne communiquent avec les cellules d'ostéosarcome par des systèmes de jonction. Les cellules d'ostéosarcome communiquent entre elles pas des systèmes de jonction de type Gap.

Quoi qu'il en soit, plusieurs groupes ont démontré que les vésicules extracellulaires représentent une autre importante voie de communication entre les cellules souches mésenchymateuses et les cellules d'ostéosarcome (Vallabhaneni et al. 2016; Tellez-Gabriel et al. 2017). Dans un environnement de stress tel qu'une acidose locale associée à la croissance tumorale et à l'ostéolyse péri-tumorale, les CSM pourraient sécréter des vésicules extracellulaires portant des protéines, des ARNm et des microARN modulant la prolifération des cellules souches d'ostéosarcome (Vallabhaneni et al. 2016; Brown et al. 2017; Tellez-Gabriel et al. 2017). Les propriétés de souches acquises (par exemple la capacité à former des sarcosphères, l'expression de gènes associés aux souches tels que Nanog et Oct4) par les cellules d'ostéosarcome sont apparues médiées par l'IL-6 sécrétée par les CSM (Vallabhaneni et al. 2016).

1.3.7.2 Ostéoblastes et ostéoclastes

Le développement de l'ostéosarcome est associé à une ostéolyse para-tumorale, provoquant une fragilité osseuse douloureuse fréquente au moment de la détection d'un ostéosarcome chez les patients. L'agressivité de l'ostéosarcome a été associée à des marqueurs d'ostéolyse dans quelques cas clinique. Notamment, la liaison de la molécule soluble Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL), alias TNFSF11, à son récepteur (RANK) alias TNFRSF11, régule principalement l'ostéolyse par régulation paracrine (Boyle et al. 2003). RANKL est produit par les ostéoblastes et les ostéocytes dans l'environnement osseux tandis que RANK est exprimé à la surface cellulaire des précurseurs des ostéoclastes. L'expression de RANK par les cellules d'ostéosarcome a été décrite dans plusieurs études (Mori et al. 2007; Marley et al. 2015).

Dans les ostéosarcomes, l'activité des ostéoclastes est responsable de la mise en place d'un cercle vicieux entre la prolifération des cellules tumorales et la dégradation osseuse, conduisant à la libération de facteurs pro-tumoraux tels que l'insulin-like growth factor 1 (IGF1) ou le transforming growth factor- β (TGF- β) piégé dans la matrice extracellulaire du tissu osseux osseuse (K. Mori et al. 2007 ; Corre et al. 2020). (Figure 8)

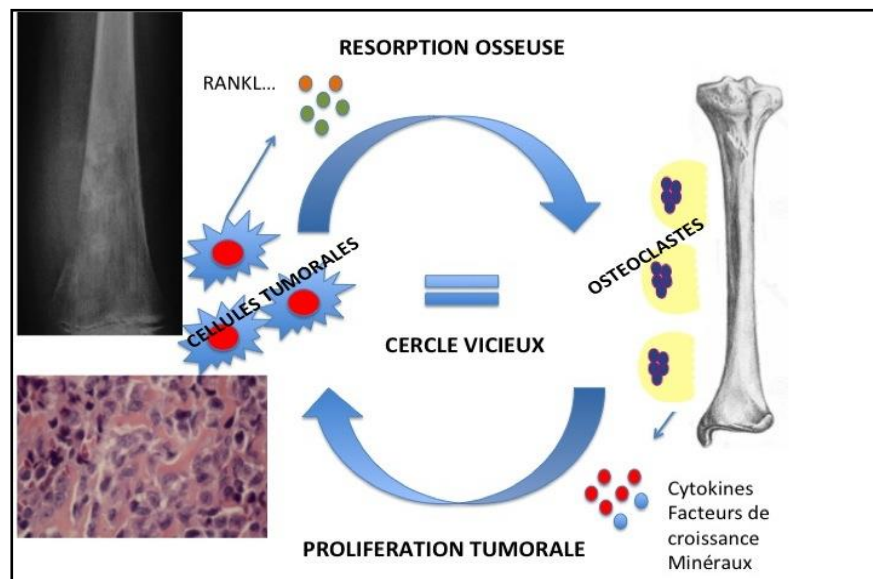


Figure 8 : Cercle vicieux responsable de la prolifération des cellules d'ostéosarcome en site osseux en associant avec une activation de la différenciation ostéoclastique et de la résorption osseuse qui en retour libère des facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire (ex TGF- β) activant la prolifération des cellules tumorales.

L'ostéosarcome se caractérise par la formation d'une matrice ostéoïde entourant des cellules tumorales anaplasiques (Toledo et al. 2010; Yoshikawa et al. 1994). Ce processus est principalement dû à un dérèglement du remodelage osseux et en partie à l'activité des ostéoblastes non tumoraux, comme observé dans les modèles d'ostéosarcomes de souris.

Les progéniteurs ostéoblastiques sont des CSM principalement présentes dans la moelle osseuse, et plus spécifiquement les cellules souches squelettiques multipotentes, qui sont un sous-ensemble de CSM récemment identifiées (Chan et al. 2018). Sous le contrôle de différents facteurs de transcription spécifiques, les CSM sont capables de se différencier en ostéoblastes.

L'expression du facteur de transcription Runx2 et SOX9 conduit à une différenciation des CSM, respectivement vers les lignées ostéoblastiques et chondroblastiques (Marie 2008). La différenciation des CSM en ostéoblastes matures implique une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation. En bref, RUNX2 est un facteur de transcription qui se lie à un site consensus, appelé OSE2, présent le long de la partie proximale de promoteurs de nombreux gènes dont ceux de la chaîne 1 du collagène de type I (COL1A1), de la sialoprotéine osseuse (BSP), de l'ostéocalcine (OCN) et de l'ostéopontine (OPN) (Ducy et al. 1997). RUNX2 est crucial pour les premières étapes de différenciation des CSM en pré-ostéoblastes et maintien de la fonction ostéoblastique.

En amont de ces facteurs de transcription, une cascade de transduction du signal doit être activée par des cytokines ou des facteurs de croissance tels que les TGF- β , le Fibroblast Growth Factor (FGF).

1.3.7.3 Cellules immunitaires

La population cellulaire immunitaire du microenvironnement des ostéosarcomes est principalement composée de macrophages associés aux tumeurs (TAM), avec un nombre important de cellules dendritiques, lymphoïdes et myéloïdes.

Les macrophages sont au carrefour de l'homéostasie et de l'immunité osseuse et ont des fonctions centrales en ostéoimmunologie. Le rôle de macrophages dans la biologie osseuse a été largement illustré (Sicco et al. 2017).

Ces cellules sont impliquées dans la résorption osseuse en jouant le rôle de précurseurs ostéoclastiques en présence de M-CSF et de RANKL (Michalski et McCauley 2017). En effet, les macrophages contrôlent l'ostéogenèse à partir de cellules souches mésenchymateuses, mécanisme dépendant de la signalisation Oncostatine M (Michalski et al. 2017). Le rôle des macrophages présents au voisinage des cellules tumorales, nommés « Macrophages Associés aux Tumeurs » (TAM), a été largement étudié (Lewis et Pollard 2006; Gordon et Martinez 2010; Guihard et al. 2012). Les TAM contrôlent l'immunité locale, l'angiogenèse et régulent la migration et l'invasion des cellules tumorales. De plus, les TAM participent à la fixation des cellules cancéreuses au site métastatique. Les TAM sont composés d'une grande variété de sous-populations classées initialement en sous-types M1 et M2 selon leur différenciation et leurs activités. Les macrophages polarisés M1 sont classés comme cellules anti-tumorales et les macrophages polarisés M2 comme régulateurs pro-tumoraux (Lewis et Pollard 2006; Noy et Pollard 2014). Les macrophages vont envahir massivement les tissus d'ostéosarcome (Liu et al. 2015) et établir un environnement immuno-tolérant pendant la croissance tumorale (Noy et Pollard 2014). Buddingh *et al.* ont montré que les ostéosarcomes présentaient à la fois des macrophages M1 et M2 et que le nombre total de macrophages était associée à une bonne survie globale. Cependant, le phénotype M2 était associé à un mauvais pronostic (Buddingh et al. 2011).

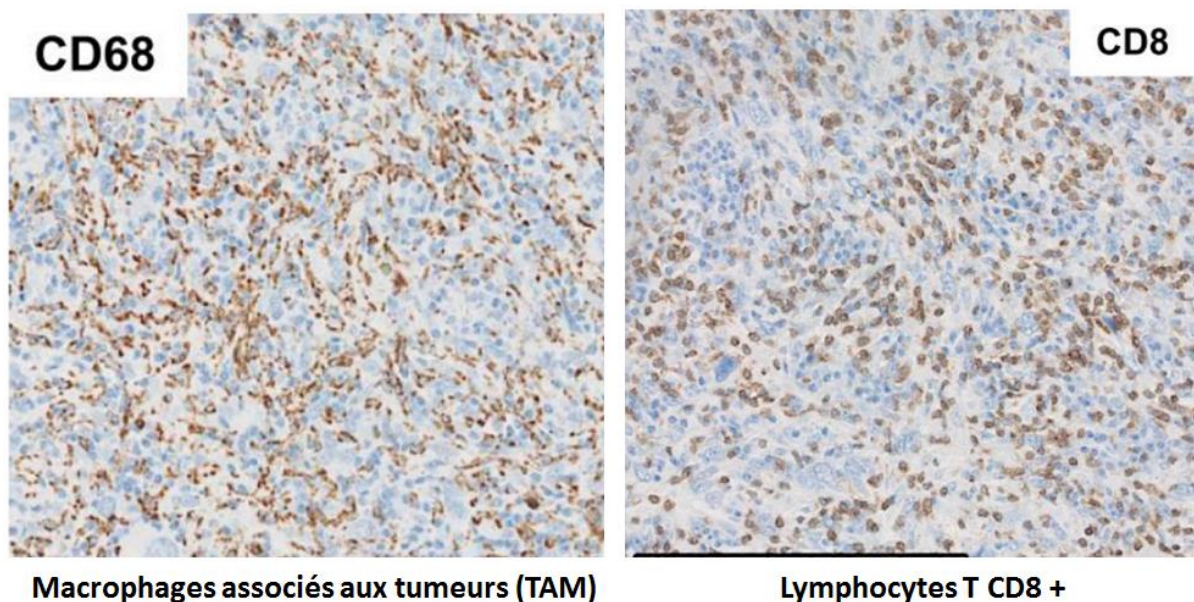


Figure 9 : Analyse de l'filtrat immunitaire des ostéosarcomes par immunohistochimie. Aspect microscopique des TAM identifiés par un marquage CD68⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ (d'après Heymann MF et al 2019). Grossissement original : X100.

Les lymphocytes T constituent le deuxième type cellulaire le plus représenté en filtrat dans les tissus d'ostéosarcome (Liu et al. 2015). Une estimation récente a montré que les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) sont détectables dans 75 % des ostéosarcomes avec un pic autour de 86 % dans les métastases (Muthana et al. 2013). L'identification des lymphocytes spécifiques des tumeurs a conduit au développement d'approches immunothérapeutiques basées sur la récupération d'une réponse immunitaire anti-tumorale soutenue chez les patients (Biller et al. 2010).

Même si les macrophages ou les lymphocytes (Figure 9) jouent un rôle important, les ostéosarcomes comme les autres sarcomes sont considérées comme des tumeurs froides peu immunogènes (Heymann et al. 2019).

1.3.7.4 Angiogenèse

Au cours du développement normal et des processus de régénération, les vaisseaux sanguins sont des acteurs majeurs de la biologie osseuse, fournissant tous les nutriments et l'oxygène nécessaires au tissu osseux hautement dynamique.

Outre leur rôle de réseau de transport efficace pour les molécules et les cellules hématopoïétiques, les vaisseaux sanguins soutiennent également la formation osseuse et l'homéostasie (Sivaraj et Adams 2016). Dans les os longs, le système vasculaire a une architecture complexe unique, composée d'un ensemble d'artères pénétrant dans la zone corticale et formant un réseau hétérogène de capillaires, drainé par une veine centrale (Watson et Adams 2018).

La vascularisation est un facteur essentiel pour la croissance et la dissémination de la tumeur, fournissant de l'oxygène et des nutriments, et soutenant l'intravasation et l'extravasation des cellules cancéreuses. L'élaboration d'un environnement vasculaire dédié à la tumeur est l'une des principales caractéristiques du cancer (Hanahan et Weinberg 2011) et la formation d'un réseau vasculaire tumoral repose principalement sur le détournement tumoral des mécanismes physiologiques de néoangiogenèse à partir des vaisseaux existants. Néanmoins, des processus supplémentaires comme la vasculogenèse et le mimétisme vasculaire peuvent également contribuer à l'expansion d'un réseau vasculaire tumoral (Carmeliet et Jain 2011).

L'angiogenèse tumorale est initiée par des stress environnementaux (hypoxie, acidose) conduisant à un déséquilibre de la balance pro-/anti-angiogénique, et par conséquent à l'expression élevée de facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur induit par l'hypoxie (HIF) et le VEGF (Crenn et al. 2022). Les ostéosarcomes sont des tumeurs osseuses hautement vascularisées, situées dans un microenvironnement osseux hypoxique et acide. La façon dont la néovascularisation se produit dans l'ostéosarcome reste mal comprise. Néanmoins, les ostéosarcomes apparaissent préférentiellement dans la région de croissance osseuse proche de la métaphyse, où se situent les cellules endothéliales de type H (forte expression de CD31 et d'endomucine) favorisant l'angiogenèse suggérant une possible implication de ces cellules dans la néo-angiogenèse des ostéosarcomes (Kusumbe et al., 2014).

Plusieurs analyses de cohortes de patients atteints d'ostéosarcomes ont révélé l'importance des marqueurs de néo-vascularisation dans les échantillons de patients. L'amplification des gènes de la voie du VEGF, en particulier du VEGF-A, a été décrite chez des patients atteints d'ostéosarcome, et a été confirmée au niveau protéique (Yang et al. 2011). L'expression d'un VEGF élevé est positivement associée aux stades tumoraux et aux métastases (Lammli et al. 2012). En conséquence, une augmentation significative de la densité de la vascularisation semble être une caractéristique de la tumeur primaire chez les patients métastatiques par rapport aux patients non métastatiques (Dumars et al. 2016).

1.3.8 Dissémination métastatique

Les cellules tumorales d'ostéosarcomes montrent une forte propension à disséminer et à induire la formation de foyers métastatiques, ce qui semble être le facteur intrinsèque le plus important de mauvais pronostic des patients (Bielack et al. 2002). L'ostéosarcome peut pratiquement métastaser dans n'importe quel site ou organe, cependant les sites privilégiés sont les poumons et parfois dans les os ou les ganglions lymphatiques (Kager et al. 2003; Isakoff et al. 2015). Les cellules d'ostéosarcomes métastatiques subissent une série d'étapes critiques pour coloniser et se développer dans le deuxième site et finalement évoluer vers des lésions cliniquement détectables (Sheng et al.

2021). Le comportement biologique de la métastase est assez différent de celui de la tumeur primaire en ce qui concerne le cycle cellulaire, la différenciation, le caryotype, le métabolisme et le microenvironnement environnant, qui est causé par des gènes exprimés de manière différentielle, un déplacement des profils moléculaires et une interaction avec le microenvironnement (DeBoer et al. 2011).

La dissémination des cellules cancéreuses de la tumeur primaire vers un site secondaire nécessite un ensemble d'étapes multiples, et ces cellules métastatiques présentent des caractéristiques complètement distinctes de la tumeur primaire. Le processus de métastase pulmonaire peut être divisé en trois étapes, comprenant la fuite des cellules cancéreuses de la tumeur primaire, le transit dans le système circulatoire, et la colonisation et l'établissement de lésions métastatiques dans le poumon. Bien qu'un grand nombre de cellules tumorales puissent avoir le potentiel d'entrer dans cette cascade métastatique, seules quelques cellules peuvent survivre pour former avec succès des métastases en raison de l'efficacité limitée à chaque étape de la cascade métastatique (Sheng et al. 2021).

La dissémination à partir de la tumeur primaire est le premier stade de la métastase, les cellules d'ostéosarcomes avec un phénotype invasif migrent loin de la tumeur primaire puis envahissent les tissus environnants. Un tel processus d'invasion est lié à la destruction et à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, qui est catalysée par des protéases péricellulaires et extracellulaires, principalement de la famille des métalloprotéases matricielles (MMP) (Sheng et al. 2021). De plus, les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement telles que les cellules endothéliales (29) et les cellules souches mésenchymateuses (Xu et al. 2009; Bian et al. 2010) peuvent favoriser la tumorigénicité. Cette première étape repose donc sur la transition épithélio-mésenchymateuse.

Ensuite les cellules tumorales vont pénétrer dans le système circulatoire. Tout d'abord, les cellules d'ostéosarcomes doivent pénétrer dans la microcirculation en traversant les cellules endothéliales et la membrane basale, puis se déplacer dans le flux sanguin. Les cellules tumorales circulantes s'arrêtent et finissent par s'extravaser du sang dans l'organe secondaire cible. Plusieurs études ont étudié les interactions entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales et ont identifié quelques molécules apparentées, notamment le facteur de transcription (RUNX-2), l'ostéopontine (OPN), l'activateur du

plasminogène de type urokinase (uPAR) et le récepteur de peptide formyle de type 1 (FPR1), dont il est en outre démontré qu'ils facilitent la métastase *in vivo* (Sheng et al. 2021). Afin de survivre dans les vaisseaux sanguins, les cellules d'ostéosarcomes doivent acquérir la propriété de résistance à l'anoikis, qui est régulée par de nombreux gènes tels que FASN et ID1 (Tan et al. 2013). De plus, les cellules tumorales rencontrent également diverses forces hémodynamiques physiques (par exemple, la contrainte de cisaillement des fluides) pendant l'intravasation (Sheng et al. 2021).

Le troisième stade est l'extravasation de métastases dans les poumons selon un mécanisme mal défini. La majorité des cellules tumorales circulantes arrivent et s'arrêtent dans la microvascularisation pulmonaire et s'extravasent ensuite dans les tissus pulmonaires, alors que seule une minorité de cellules tumorales peut survivre et éventuellement générer des métastases détectables (Cameron et al. 2000). Par rapport au site primaire, le microenvironnement du site secondaire présente de nombreuses différences, notamment la tension en oxygène, l'apport nutritionnel et d'autres caractéristiques physico-chimiques. Le poumon est un microenvironnement étranger, où les cellules tumorales auront un sort différent : l'apoptose ou la mort, la dormance et la prolifération en micrométastases. En termes de micrométastases, elles peuvent soit entrer en dormance angiogénique, soit régresser, soit proliférer pour former des lésions macrométastatiques vascularisées (Almog et al. 2009).

Le mécanisme par lequel les cellules d'ostéosarcomes métastasent préférentiellement aux poumons reste mal compris. La restriction mécanique des cellules tumorales circulantes dans la microvascularisation pulmonaire pourrait jouer un rôle crucial dans le tropisme pulmonaire (Chambers et al., 2002). Une autre explication possible du tropisme pulmonaire est la notion de niche prémétastatique (Liu et Cao 2016). En effet, les vésicules extracellulaires, en particulier les exosomes libérés du cancer et des cellules stromales, constitueraient un scénario favorable pour initier des métastases. Quelques revues ont discuté du rôle des exosomes dans l'organotropisme métastatique (Guo et al. 2019) dont une publication portant sur les sarcomes osseux (Chicón-Bosch et Tirado 2020).

1.3.9 Nouvelles approches thérapeutiques

Malgré leur rare incidence, les sarcomes osseux sont caractérisés par un taux de mortalité élevé. La résection chirurgicale extensive avec des marges adéquates dans les tissus sains est la procédure thérapeutique centrale pour l'ostéosarcome, associée à une chimiothérapie adjuvante et néo-adjuvante composée d'un cocktail de quatre molécules (doxorubicine, cisplatine, méthotrexate et ifosfamide).

La surveillance immunitaire est un processus biologique complexe qui associe la reconnaissance des cellules tumorales par des cellules effectrices spécifiques étroitement contrôlées par des cellules immunitaires régulatrices. A leur tour, les cellules tumorales peuvent sécréter des facteurs solubles (par exemple des cytokines) pour moduler à la baisse les marqueurs de surface immunitaire et affaiblir le système immunitaire (Heymann MF et al. , 2021).

La double fonction du système immunitaire dans le contrôle de la surveillance des tumeurs implique trois étapes (Heymann MF et al., 2021). La première, nommée « élimination », se caractérise par l'infiltration tumorale par des cellules immunitaires innées et adaptatives qui éradiquent les cellules cancéreuses sensibles. La deuxième étape est définie par un « équilibre » dynamique entre les cellules néoplasiques survivantes et l'infiltrat immunitaire, qui exerce une pression sélective dynamique sur les cellules cancéreuses. Cette sélection induit l'émergence de sous-populations de cellules cancéreuses avec des propriétés spécifiques d'échappement immunitaire ou/et d'immunosuppression et une capacité d'expansion au micro-environnement immunocompétent. L'« évasion » immunitaire est par conséquent la troisième étape qui est considérée comme une caractéristique du cancer. Le système immunitaire joue alors une double fonction, ralentissant la progression tumorale dans un premier temps puis facilitant la croissance tumorale après la phase de modélisation du phénotype immunogène des cellules tumorales (Alfranca et al. 2015; Corre et al. 2020; Heymann MF et al. 2021).

Même si les approches immunothérapeutiques en sont encore à leurs débuts dans les sarcomes, la première preuve d'une intervention immunitaire fonctionnelle dans les sarcomes a été rapportée par Coley, il y a plus de 120 ans. Coley a observé une rémission complète chez 10 % des patients après inoculation de *Streptococcus pyogenes* inactivé par la chaleur et de *Serratia marcescens*, connue sous le nom de toxine de Coley (Starnes 1992).

Une étude récente a analysé par immunohistochimie la présence de la protéine de liaison au lipopolysaccharide (LPS)(LBP-1), dans des biopsies diagnostiques d'ostéosarcome associées à une maladie locale en comparaison de patients souffrant d'un maladie métastatique. LBP-1 est considéré comme un marqueur d'exposition au LPS. Cette étude suggère fortement la présence de bactéries Gram-négatives dans les tissus d'ostéosarcome et montre leur niveau différentiel significatif en fonction du statut (Heymann CJF et al. 2022). Ce travail souligne le rôle important que pourrait avoir l'immunité locale des ostéosarcomes et son rôle dans le contrôle de la dissémination métastatique. L' infiltration immunitaire est une caractéristique commune du sarcome osseux et comprend les lymphocytes T et B, les cellules tueuses naturelles (NK) et les macrophages (Heymann MF et al. 2019; Crenn et al. 2022).

Les différentes nouvelles approches thérapeutiques vont être détaillées (Figure 10).

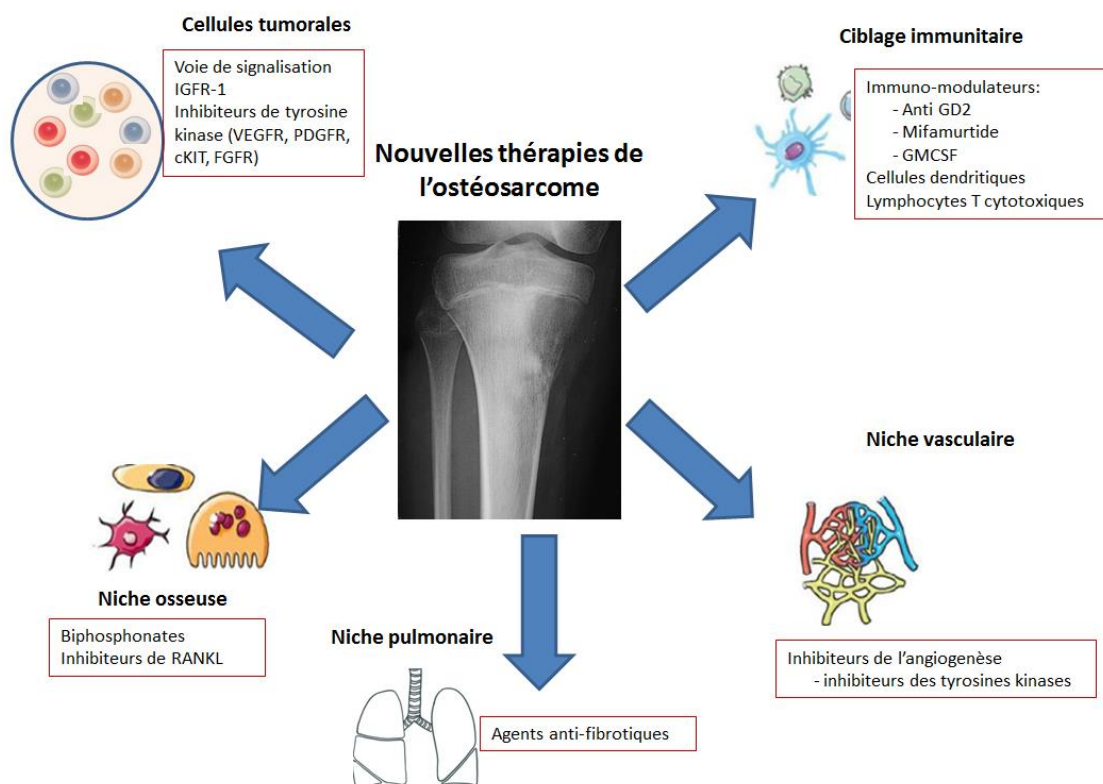


Figure 10 : Nouvelles cibles thérapeutiques dans l'ostéosarcome. Les niches tumorales décrites dans la physiopathologie de l'ostéosarcome identifient de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'ostéosarcome.

1.3.9.1 Ciblage des macrophages

Les macrophages et les lymphocytes T sont les deux principales populations cellulaires immunitaires des sarcomes osseux (Majzner et al. 2017). Les TAM sont très hétérogènes. Ce sont des effecteurs immunitaires, capables de moduler étroitement la réponse immunitaire locale et par conséquent la mort/survie des cellules tumorales. Ils ont également un impact sur la progression tumorale et le processus métastatique en agissant sur l'angiogenèse. Le concept basé sur une réponse anti-tumorale déclenchée par des produits bactériens tels que les endotoxines et l'activation des cellules immunitaires de l'hôte a été révisée dans les années 1980.

Un analogue synthétique d'un composant de la paroi cellulaire bactérienne (liposome encapsulé muramyl tripeptide phosphatidyle éthanolamine ou L-MTP-PE, maintenant connu sous le nom de mifamurtide) a été développé et évalué dans des modèles précliniques et des essais cliniques (Mori et al. 2008; Ando et al. 2011). Il a été utilisé seul et en association avec une chimiothérapie. Cet immunomodulateur a amélioré la survie globale de 70 à 78% ($p = 0,003$) en association avec la chimiothérapie et a entraîné une réduction d'un tiers du risque de décès par ostéosarcome (Meyers et al. 2008).

Pour clarifier ce bénéfice potentiel du mifamurtide, qui avait montré des effets prometteurs, un récent essai clinique de phase II (Sarcome-13/OS2016) a été récemment mis en place et prévoit d'évaluer l'efficacité du mifamurtide comme traitement d'appoint à la chimiothérapie post-opératoire par rapport à la chimiothérapie post-opératoire seule (Brard et al. 2019).

1.3.9.2 Disialoganglioside (GD2)

En 1987, Heiner et al. décrit l'accumulation préférentielle d'un anticorps monoclonal (mAb) anti-GD2 (3F8, une IgG3 murine) au niveau du site tumoral dans un modèle préclinique d'ostéosarcome (Heiner et al. 1987). Une étude immunohistochimique a démontré que toutes les tumeurs d'ostéosarcomes analysées étaient positives pour GD2 dans une série composée de 44 patients (Shibuya et al. 2012) et cette expression a persisté en cas de récurrence (Poon et al. 2015). *In vitro*, GD2 a été suspecté de renforcer l'agressivité

de l'ostéosarcome (Roth et al. 2014). Sur la base de ces observations, plusieurs essais cliniques ont été activés très récemment. Fait intéressant, le récepteur de l'endothéline A, qui a été impliqué dans la progression de l'ostéosarcome et le processus métastatique, potentialise les effets inhibiteurs de l'anticorps anti-GD2 sur le caractère invasif et la viabilité des cellules tumorales, ouvrant un nouveau d'applications cliniques (B. Liu et al. 2014).

1.3.9.3 *Nivolumab et pembrozilumab*

Le nivolumab et le pembrozilumab sont des immunomodulateurs qui agissent en bloquant l'activation de la mort cellulaire programmée-1 (PD-1), induite par son ligand sur les lymphocytes T activés et les pro-B lymphocytes (Hamanishi et al. 2016). PD-1 fait partie de la superfamille des immunoglobulines qui interagit avec le ligand de mort cellulaire programmée 1 (PDL1), qui est une protéine de surface cellulaire exprimée dans de nombreux cellules cancéreuses dont l'ostéosarcome (Shen et al. 2014).

De nombreuses investigations précliniques ont démontré que l'inhibition de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 améliore la réponse des lymphocytes T, entraînant une augmentation de l'activité antitumorale.

1.3.9.4 *Immunité et cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques ont la capacité spécifique d'initier et de moduler les réponses immunitaires adaptatives (Constantino et al. 2016). Cette spécificité, associée à leur rôle dans la présentation antigénique, a conduit à leur utilisation dans des approches vaccinales contre le cancer. Des cellules dendritiques autologues matures chargées de lysats tumoraux dérivés de tissu tumoral ont été utilisées comme produit vaccinal. Dans un modèle préclinique d'ostéosarcome, il a été démontré que les cellules dendritiques tueuses étaient capables d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale adaptative avec une diminution du développement tumoral après présentation croisée de l'antigène dérivé des cellules tumorales (Chauvin et al. 2008). En 2012, 12 patients atteints d'ostéosarcome ont été vaccinés avec des cellules dendritiques pulsées par un lysat tumoral, mais des preuves d'un bénéfice clinique ont été observées chez seulement deux de ces patients (Himoudi et al.

2012). Ces auteurs ont conclu que les patients atteints d'ostéosarcome peuvent être relativement insensibles aux traitements vaccinaux à base de cellules dendritiques (DC).

1.3.9.5 Radiothérapie alpha ciblée : radium-223

Le principe de la radiothérapie alpha est d'induire des cassures double brin de l'ADN (Allen 2013). Le radium-223 (^{223}Ra) est un émetteur alpha qui a été largement étudié dans des modèles précliniques (Anderson et al. 2014). Sa demi-vie est de 11,4 jours. Sa biodistribution chez la souris a révélé que la matrice osseuse est son lieu de rétention préféré. Le radium-223 est bien toléré, avec des doses de 50 à 250 kBq/kg, et a des effets antitumoraux dans des modèles murins précliniques (Henriksen et al. 2003) . Un premier essai clinique de phase I a confirmé son intérêt clinique potentiel dans les métastases osseuses (Nilsson et al. 2005) . Compte tenu de la forte rétention du radium-223 dans la matrice osseuse, un essai de phase I a été mis en place pour l'ostéosarcome afin de déterminer la dose maximale tolérée.

1.3.9.6 Ciblage du microenvironnement osseux

Les cellules d'ostéosarcome sont capables de déréguler le microenvironnement osseux en activant la différenciation et la résorption des ostéoclastes, qui à leur tour stimulent la croissance tumorale en libérant des facteurs stockés dans la matrice extracellulaire (Berman et al. 2008). Des investigations précliniques ont montré que les bisphosphonates azotés diminuent la prolifération des lignées cellulaires d'ostéosarcome *in vitro* et induit la mort cellulaire (Heymann et al. 2004). Dans les modèles murins, l'acide zolédronique a diminué le volume de la tumeur primitive (Heymann et al. 2005) ainsi que le nombre de métastases pulmonaires induites (Ory et al. 2005) . De plus, son association avec la chimiothérapie a révélé son intérêt pour améliorer la réparation tissulaire et prévenir la récurrence tumorale. Les mécanismes d'action de l'acide zolédronique s'expliquent par ses effets pléiotropes sur l'ostéosarcome, en particulier modulant l'angiogenèse, et l'environnement osseux et immunitaire (Ohba et al. 2014). Cependant, en 2010, Endo Munoz et al. ont remis en cause les avantages thérapeutiques de l'acide zolédronique, montrant qu'un blocage de

l'ostéoclastogénèse a joué un rôle dans le développement de métastases pulmonaires dans l'ostéosarcome (Endo-Munoz et al. 2010) . Un essai clinique de phase III appelé OS 2006 (« Chimiothérapie combinée avec ou sans acide zolédronique pour les patients atteints d'ostéosarcome ») a recruté 318 malades (enfants et adultes). Cet essai clinique a été arrêté prématurément en raison de l'absence de toute différence significative entre les groupes avec ou sans acide zolédronique. L'hypothèse émise pour expliquer cette absence d'effet est un effet spécifique de l'acide zolédronique sur le recrutement et la différenciation de sous populations de macrophages impliqués dans le contrôle de la croissance tumorale qui restent à déterminer.

RANKL et son récepteur RANK contrôlent clairement la différenciation/activation des ostéoclastes et par conséquent le remodelage osseux. RANK n'est pas seulement exprimé par la lignée des monocytes (par exemple, les macrophages, les cellules dendritiques et les ostéoclastes) et par les cellules endothéliales, mais également exprimé par les cellules d'ostéosarcome, comme l'ont révélé la transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT qPCR) et l'immunomarquage. Selon les séries publiées, 18 à 69 % des cellules d'ostéosarcome expriment RANK (Mori et al. 2007; Trieb et Windhager 2015; Bago-Horvath et al. 2014). Une corrélation inverse entre l'expression de RANK et la survie globale des patients atteints d'ostéosarcome a été démontrée, mais pas avec la réponse à la chimiothérapie (Trieb et Windhager 2015).

1.3.9.7 Médicaments multi-cibles

Les mauvais résultats obtenus avec les approches thérapeutiques conventionnelles ont conduit à explorer de nouveaux traitements plus efficaces et moins toxiques (Heymann MF et al. 2016). Dans ce contexte, de nombreux essais cliniques ont été proposés, ciblant directement les cellules cancéreuses et/ou leur microenvironnement. Le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1) et son récepteur (IGF1-R) sont exprimés par les cellules d'ostéosarcome (Burrow et al. 1998). L'expression de l'IGF-1 a été associée à l'agressivité de la maladie (Jentsch et al. 2014). Les anticorps anti-IGF1-R ont été bien tolérés bien qu'un nombre extrêmement limité de réponses tumorales ait été rapporté lorsqu'il était utilisé en monothérapie ou en association (Bagatell et al. 2011) . Ces résultats

peuvent s'expliquer par l'existence de voies de signalisation alternatives qui contrôlent la prolifération cellulaire (Avnet et al. 2008) et/ou par l'échappement thérapeutique.

De nombreuses cytokines et facteurs de croissance agissent par l'activation des récepteurs tyrosine kinases (RTK) et contrôlent la prolifération, la survie et la migration des cellules (Ségally et al. 2015). Par conséquent, la plupart des inhibiteurs de la RTK (par exemple, le mésylate d'imatinib, le dasatinib et le sunitinib) considérés comme des thérapies multi-cibles ont été évalués bien que leur efficacité soit malheureusement faible (Ségally et al. 2015).

Le pazopanib, qui cible le récepteur du facteur de croissance vasculaire-endothélial (VEGFR), le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et le récepteur du facteur de cellules souches (SCFR ou cKIT) (Keir et al. 2012) et le sorafénib, qui cible le RET et le VEGFR, montrent des avantages dans les sarcomes osseux pédiatriques en affectant l'angiogenèse (Navid et al. 2013). Safwat et al. ont rapporté des réponses cliniques significatives chez trois patients atteints d'ostéosarcome métastatique traités avec 800 mg de pazopanib oral par jour (Safwat et al. 2014). Le sorafénib a démontré une activité en deuxième ou troisième ligne de traitement en termes de survie sans progression à 4 mois ; cependant, la principale limite de cette étude était l'absence d'un groupe témoin.

De même, le régorafénib est un inhibiteur multikinase oral des kinases angiogéniques [VEGFR1-3 et tyrosine kinase avec les domaines d'homologie Ig et EGF 2 (TIE2)], et stromales [récepteur du Platelet Derived Growth Factor (PDGFR) et récepteur du Fibroblast Growth Factor (FGFR)]. Un essai clinique de phase I a révélé des preuves préliminaires de l'activité antitumorale chez les patients atteints de tumeurs solides, y compris l'ostéosarcome (Grignani et al. 2015).

Le nintedanib est un inhibiteur oral de la tyrosine kinase ciblant le PDGFR et il actuellement en cours d'évaluation dans les sarcomes (Schöffski et al. 2021).

1.3.9.8 Médicaments ciblant la fibrose pulmonaire

Aucune stratégie de traitement efficace n'a été établie pour les métastases pulmonaires des ostéosarcomes. Les effets supprimeurs des agents anti-fibrotiques sur les métastases pulmonaires d'ostéosarcome sont peu clairs. Dans l'étude de Yui, les chercheurs

ont recherché si la fibrose était une cible thérapeutique pour supprimer les métastases d'ostéosarcome (Yui et al. 2022). Les ostéosarcomes doivent s'adapter à des changements considérables en ce qui concerne la rigidité de l'environnement et la fibrose au cours de la dissémination métastatique pulmonaire et peuvent donc être vulnérables à des agents antifibrotiques. En effet, ils proviennent d'un osseux très dense avec une fibrose considérable. Des échantillons de tissus pulmonaires de patients et un modèle de souris (modèle LM8-Dunn) ont montré que la colonisation métastatique pulmonaire des cellules d'ostéosarcome s'accompagnait d'une fibrose pulmonaire massive. Les cellules d'ostéosarcome métastatique LM8 ont proliféré d'une manière dépendante de la fibrose. Les agents antifibrotiques pirfénidone et nintedanib ont supprimé les métastases pulmonaires dans le modèle LM8-Dunn. Les cellules d'ostéosarcome n'ont pas montré de prolifération accrue, comme cela a été rapporté dans le cancer du sein. Les agents anti-fibrotiques ont donc le potentiel de supprimer les métastases pulmonaires de l'ostéosarcome (Yui et al. 2022).

2. Les Cellules Tumorales Circulantes

2.1 Concept des cellules tumorales circulantes (CTCs)

Depuis quelques années, le concept des CTCs a principalement été décrit dans les cancers épithéliaux tels que les cancers du sein, de la prostate ou encore du colon. En effet, les CTCs sont des cellules clés du processus métastatique, elles ont un intérêt pronostique important (Botteri et al. 2010) et constituent une véritable « biopsie liquide » peu invasive (Broersen et al. 2014). La dissémination hématogène des cellules cancéreuses de la tumeur primaire s'avère donc être une étape clé de l'évolution de la maladie d'autant qu'il existe des différences morphologiques, immuno-histochimiques et génétiques entre les CTCs et les cellules de la tumeur primaire (Park et al. 2014). Plus que la simple détection des CTCs, leur caractérisation moléculaire permettrait d'expliquer les variations pronostiques ou encore les différences de réponse aux traitements (Somlo et al. 2011; Nadal et al. 2012). L'expression de marqueurs membranaires comme EpCAM à la surface des CTCs semble être corrélée à la chimio résistance dans certaines formes métastatiques de carcinomes (Ni et al. 2013; 2012). L'expression de ces marqueurs spécifiques par les CTCs offre donc la possibilité de développer des thérapeutiques ciblées (Roop et al. 2013; Stebbing et al. 2013). Les perspectives thérapeutiques sont donc nombreuses. Les CTCs sont décrites comme un marqueur prédictif de l'évolution de la maladie et pourraient être également un marqueur pronostique (Cohen et al. 2009). Contrairement à la caractérisation des tumeurs primaires, qui ne fournit qu'une analyse statique au diagnostic, l'étude des CTCs peut améliorer la compréhension des différentes étapes impliquées dans le processus métastatique. Même s'il s'agit d'une approche prometteuse, les CTCs sont des événements rares, présentes à de très faibles concentrations sanguines (entre 5 et 30 CTCs pour 7,5 ml de sang prélevé). Cela représente une cellule tumorale pour 10^6 - 10^8 normales cellules sanguines. Leur détection nécessite donc des technologies spécifiques, fiables et reproductibles.

2.2 Technologies de détection des CTCs

Les CTCs sont des événements cellulaires voyageant seuls et/ou en grappes parmi des leucocytes, des thrombocytes et des érythrocytes abondants (Aceto et al. 2014; Au et al. 2016; Sawabata 2017).

Les amas (« clusters ») de CTCs sont rares par rapport aux CTCs uniques, bien qu'Aceto et al. ont démontré un potentiel métastatique élevé, multiplié par 23 à 50 de ces clusters de cellules en comparaison des cellules individuelles (Aceto et al. 2014). Plus récemment, en utilisant des approches microfluidiques, Au *et al.* ont démontré que les clusters de CTCs se réorganisent rapidement et de manière réversible en forme de chaîne à file unique, réduisant leur résistance thermodynamique et permettant aux clusters de CTC de traverser des constriction de la taille d'un capillaire (Au et al. 2016). Les auteurs ont émis l'hypothèse que les « microembolies » tumorales circulantes par les clusters de CTCs sont un processus important de dissémination tumorale.

En raison de leur rareté (1 à 10 cellules par ml de sang), l'analyse des CTCs nécessite des approches fiables avec une efficacité et une spécificité élevées. Le nombre d'outils techniques pour l'isolement des CTCs a explosé au cours de la dernière décennie (Sharma et al. 2018; Alix-Panabières et Pantel 2014; Krebs et al. 2014; Gabriel et al. 2016) Les principales techniques disponibles sont basées sur les propriétés physiques ou biologiques des CTCs. Une liste non exhaustive des méthodes les plus récentes est présentée dans le tableau 3, et celles-ci peuvent être utilisées séparément ou en combinaison selon les objectifs

Certaines peuvent être utilisées comme étape de pré-enrichissement et comprennent une gamme de techniques basées sur les différentes propriétés des CTCs permettant la séparation des cellules cancéreuses des cellules hématopoïétiques (par exemple, sélection par billes magnétiques négatives). D'autres sont plus adaptés pour l'isolement d'une seule cellule (par exemple, DEPArray) (Brown et al. 2019).

Principales techniques de détection des CTCs

Technologie	Nom	Avantages	Limites
<i>Méthodes basées sur les propriétés physiques</i>			
Gradient de densité	Percoll; Ficoll-Hypaque, Onco Quick	Faible coût, fiable	Faible pureté
Microfiltration	ScreenCell; ISET; CellCyto	Rapide, efficace	Faible pureté, risque de perte
Microfluidique	Apostream; ClearCell FX; CTC iChip; DEP; DEPArray; Parsortix	Viabilité cellulaire Efficacité, sensibilité Possibilité d'évaluer le contenu en ADN (DEPArray)	Coût élevé, long, étape de pré enrichissement
<i>Méthodes basées sur les caractéristiques biologiques</i>			
Anticorps conjugué Magnétique nanoparticules ou microbilles	AdnaTest; CellSearch, Dynabeads EasySep; IsoFlux; MACS MagSweeper; MojoSort CellCollector	Viabilité cellulaire, haute efficacité,	Dépendant du biomarqueur
Propriétés fonctionnelles	EPISPOT; Telomescan	Haute sensibilité et spécificité	Nécessite une liaison antigénique

Tableau 3 : Liste des méthodes actuelles d'isolement des CTCs

2.2.1 Isolement par microfiltration

Les caractéristiques cytologiques des CTCs ont conduit au développement de dispositifs de microfiltration pour capter ces événements cellulaires rares (Gabriel et al. 2016; Khetani et al. 2018). La microfiltration est un procédé simple permettant l'enrichissement de gros volumes de sang en quelques minutes avec un taux de récupération élevé (taux > 85% selon l'appareil utilisé) et est indépendant de tous les biomarqueurs exprimés par les CTCs.

Plusieurs appareils sont dédiés à des analyses ciblées en aval et ont été développées comme ScreenCell (Sarcelles, France) et ISET (isolement par la taille des cellules tumorales) (RareCells, France). Les dispositifs Screen Cell couvrent trois principaux systèmes de filtration. Le premier est ScreenCell® Cyto qui nécessite des cellules fixes et est dédié aux techniques moléculaires. Le deuxième est ScreenCell® CC qui permet la récupération de CTC pour les cultures cellulaires. Le troisième est ScreenCell® MB et est adapté aux analyses d'ARN ou d'ADN (Desitter et al. 2011; Freidin et al. 2014). Cependant, la pureté finale des CTCs collectés est relativement faible (10%), les CTCs simples et les grappes de CTCs sont capturées simultanément et, en fonction du débit et de la pression utilisés, les cellules peuvent être endommagées. En outre, le détachement des CTC capturés sur la filtration sur

membrane peut être difficile, limitant ainsi les analyses en aval. De plus, le signal de fond sur les filtres après que l'immunocytochimie utilisée pour la détection des CTCs peut limiter leur utilisation.

2.2.2 Isolement par gradient de densité

Les CTCs, semblables à la plupart des cellules cancéreuses, présentent des anomalies cytologiques caractéristiques, y compris une taille plus grande et une forme nucléaire hétérogène, conduisant à des propriétés biomécaniques et électriques différentes par rapport aux cellules saines. Ces caractéristiques physiques modifiées constituent la base des méthodes utilisées pour leur isolement. Leur plus haut rapport nucléaire / cytoplasme permet leur isolement par gradient de densité comme Ficoll-Hypaque, Percoll et OncoQuick® (Greiner Bio-One international, France) basés sur les différences de leurs coefficients de sédimentation. Gerter et al. ont comparé le système de centrifugation à gradient de densité OncoQuick® avec le gradient de densité standard Ficoll-Hypaque et a montré que les deux méthodes ont conduit à des taux de récupération de cellules cancéreuses similaires (Gertler et al. 2003). La cytotoxicité du milieu peut avoir un impact sur la viabilité des cellules. Ainsi, la centrifugation à gradient de densité doit être considérée comme une méthode de pré-enrichissement et doit être associée à une technique d'isolement des CTCs.

2.2.3 Isolement par dispositifs microfluidiques

Plusieurs dispositifs microfluidiques conçus pour isoler les CTCs ont été développés : ApoStream® (ApoCell, États-Unis); ClearCell® FX (Clear bridge Biomedics, Singapour); CTC-iChip technology (DA Harber, Harvard Medical School, États-Unis) ; DEPARray® (Silicon Biosystem, Italie); et Parsortix® (Angle, Royaume-Uni). Une variété de micropuces ont été développées pour fractionner les cellules dans le sang selon leur taille, leur déformabilité et/ou élasticité, leur surface de charges électriques, et/ou leur expression de biomarqueurs

Les approches sont relativement coûteuses et nécessitent l'utilisation de cassettes et/ou cartouches spécifiques ; cependant, leurs principaux avantages sont leur grande sensibilité et leur grande efficacité. Certains appareils ont la capacité de traiter ou même

nécessitent de faibles volumes de sang et/ou d'autres fluides, expliquant la nécessité de méthodes de pré-enrichissement pour réduire l'échantillon initial en cas de grands volumes. De plus, ces systèmes offrent aux chercheurs la possibilité d'isoler des cellules individuellement.

L'isolement des CTC basé sur des systèmes microfluidiques implique souvent une étape de pré-enrichissement et une étape d'isolement et/ou de capture. Pour exemple, le dispositif Parsortix® enrichit les CTC dans le sang (de 10 ml à 200 ml) en fonction de leur taille différentielle et de leur capacité de déformation. Une cassette microfluidique est utilisée dans laquelle les CTCs contenant des leucocytes contaminants peuvent être immunocolorés et récupérés (Tan et al. 2009). Les pools de CTC capturés par Parsortix® peuvent être traités par les Systèmes DEParray® ou ApoStream® pour l'isolement de CTC pures. Ces systèmes fonctionnent sur la base du différentiel de charge électrique des cellules et ont une efficacité de récupération rapportée de plus de 70 % associée à une excellente viabilité cellulaire (97 %) (Becker et al. 1995). La technologie DEParray® fournit une sélection de cellules basée sur l'image permettant l'isolement de CTC pures et unicellulaires (colorés pour des biomarqueurs sélectionnés) et une évaluation du contenu en ADN cellulaire par coloration DAPI ("DNA index") (Becker et al. 1995; Bolognesi et al. 2016). La technologie CTC-iChip combine l'exclusion basée sur la taille des érythrocytes et des thrombocytes, une déplétion immunomagnétique des leucocytes et le positionnement des CTCs dans les microcanaux. Plus récemment, Wu et al. a développé un système combinant microfluidique et acoustique pour l'isolation des CTCs (Wu et al. 2018). L'acoustique à haut débit a un taux de récupération décrit supérieur à 85% et permet une enquête phénotypique et une culture cellulaire post-séparation. Ces techniques sont relativement coûteuses (par exemple, en termes d'appareil et de consommables) et prennent du temps. Globalement, la microfluidique se caractérise par une excellente pureté de récupération (> 80% selon le dispositif utilisé), avec des perturbations limitées des CTCs, et permet d'isoler des CTCs simples et/ou des clusters purs à partir de petits volumes. La reproductibilité est acceptable, mais peut être affectée par le risque de perte de cellules lors du chargement des échantillons dans les cartouches (Peeters et al. 2013). Cependant, la validation de ces dispositifs dans de grands essais cliniques et la mise en place de méthodes standardisées sont deux conditions préalables pour assurer l'acceptation des CTCs comme biomarqueurs dans les pratiques cliniques.

2.2.4 Isolement par immunoaffinité

L'isolement de CTCs par immunoaffinité (sélection négative ou positive) est l'une des méthodes les plus anciennes utilisées pour isoler des populations de cellules pures. Les systèmes EasySep® ou RosetteSep® (CELL Tech, UK), MojoSort® (Biolegend, USA), Dynabeads® (ThermoFisher, USA), IsoFlux® (Fluxion Biosciences, USA) et AdnaTest® (Qiagen, Allemagne) sont basés sur les propriétés biologiques de CTC, qui expriment des biomarqueurs cytoplasmiques et/ou membranaires (par exemple, EpCAM). Certaines méthodes ont été améliorées en ajoutant un filtre activé pour capturer et retenir les cellules marquées (par exemple, MACS® (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) et MagniSort® (eBioscience, USA)] ou en ajoutant un bras robotique avec une tige magnétique qui lie les cellules marquées (MagSweeper® (Jeffrey's Laboratory, États-Unis)]. Leurs principaux avantages sont leur haute efficacité, leur haute viabilité cellulaire et leur grande pureté ; cependant, l'isolement immunomagnétique dépend des marqueurs exprimés par les CTC et de la spécificité de l'antigène ciblé, et ces systèmes ne permettent pas l'isolement de cellules individuelles pures. Le dispositif CellSearch® (Menarini / Silicon Biosystems) combine l'affinité des anticorps pour la sélection des CTCs et un système de sélection cellulaire basé sur l'image (Andreopoulou et al. 2012). CellSearch® est actuellement le seul dispositif approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour la détection des CTCs dans les cancers métastatiques du sein, de la prostate et colorectal.

Plusieurs dispositifs combinent l'isolement microfluidique et immunoaffinitaire à travers des microcanaux recouverts d'anticorps dirigés contre des antigènes ciblés spécifiques exprimés par les CTCs [par exemple, OnQChip® (On-Q-ity Inc., États-Unis); Puce OncoCEEO (Biocept Laboratories, USA)]. CellCollector® (Gilupi, Allemagne) a été développé pour l'isolement de CTC in vivo et est approuvé par la commission européenne. Ce collecteur de cellules est un fil en acier inoxydable recouvert d'anticorps anti-EpCAM (longueur : 16 cm; diamètre : 0,5 mm) implanté par voie intraveineuse pendant 30 min pour entrer en contact avec un volume important de sang contenant des CTCs. Chez plus de 2 000 patients, le taux de détection était de 70 % aux stades précoces et/ou tardifs du cancer. Son implantation d'une durée de 30 minutes augmente les chances d'isoler les CTCs, mais ce dispositif est actuellement réservé aux cellules exprimant EpCAM (Brown et al. 2019).

2.2.5 Évaluation fonctionnelle des CTCs

Deux approches ont récemment été proposées pour identifier et caractériser les CTCs : TelomeScan® (Oncolys Biopharma, Japon) et EPISPOT. TelomeScan® est un adénovirus de type 5 génétiquement modifié avec une séquence promotrice du gène de la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT) dans la région en amont du gène viral E1, qui est responsable de la réplication de l'adénovirus (Brown et al. 2019; Tazawa et al. 2020). Par conséquent, la réplication virale ne peut se produire que dans les cellules ayant une activité télomérase active, telles que les cellules cancéreuses. Dans la région E3 du vecteur se trouve un gène GFP sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus, permettant la détection visuelle des cellules cancéreuses contenant le virus en cours de réplication. EPISPOT est un test ELISPOT dédié à la détection des protéines sécrétées par les cellules cancéreuses épithéliales (Ramirez et al. 2014). Les CTC isolés sont cultivés pendant une courte période sur une membrane enduite avec des anticorps qui capturent les protéines sécrétées correspondantes, qui sont ensuite détectées par des anticorps secondaires marqués avec des fluorochromes. Ainsi, EPISPOT permet la détection et la caractérisation des CTCs sur la base de leur sécrétome.

2.2.6 Autres techniques

Özkayar *et al.* ont décrit une nouvelle stratégie pour enrichir efficacement les CTCs à partir de sang total en fonction de la taille, en utilisant un canal microfluidique en spirale intégré à une structure hydroptère en aval du canal en spirale. L'hydroptère augmente la distance entre les flux de CTCs et les cellules sanguines périphériques, qui sont déjà réparties autour de deux axes focaux par le canal en spirale, améliorant ainsi la résolution de la séparation. La viabilité cellulaire (> 80%) a été préservée après un processus en deux étapes. La nouvelle puce microfluidique est un bon candidat pour les applications d'isolement de CTC nécessitant un taux de récupération et une viabilité élevés (Özkayar et al. 2020).

Le système de microfiltration à basse pression et exclusion de taille CellSieve™ (Hayashi et al. 2017) a également permis d'isoler des CTCs. Cette approche a plusieurs avantages puisque les cellules sont peu traitées et aucun antigène de surface spécifique

n'est nécessaire. Les CTCs sont donc collectées après une manipulation minimale permettant des analyses moléculaires.

2.3 Analyse moléculaire des CTCs

C'est le développement des technologies unicellulaires au cours de la dernière décennie qui a permis une interrogation complète des CTCs de patients atteints de divers types de cancers (Castro-Giner et Aceto 2020). Combiné aux technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) et de cytométrie de masse, il est désormais possible de caractériser le génome, le transcriptome, le méthylome (Wang et Navin 2015) et le protéome (Abouleila et al. 2019) des cellules individuelles.

Ces approches ont déjà généré des observations intéressantes, comme l'identification de l'oligoclonalité dans les CTCs, la définition de molécules spécifiques, de profils de comparaisons de tumeurs primaires et métastatiques et la découverte de signatures d'expression génique qui permettent de caractériser les précurseurs métastatiques ou les différences entre sous-populations de CTCs (Aceto et al. 2014). De plus, les approches multi-omiques permettent maintenant l'interrogation parallèle de l'ARN et de l'ADN de cellules individuelles, visant à une meilleure compréhension globale des processus cellulaires qui surviennent dans les cellules cancéreuses (Angermueller et al. 2016; Macaulay et al. 2017).

2.4 Intérêt des CTCs

L'hétérogénéité des tumeurs a remis en question les avantages potentiels de la médecine de précision. Les méthodes actuelles d'analyse des masses tumorales et de conception thérapeutique sont basées sur une vision globale des caractéristiques des tissus cancéreux, correspondant à une image moyenne de tous les clones tumoraux et de leur micro-environnement sans tenir compte de leur diversité (Chatterjee et al. 2018). Cette variabilité limite le pouvoir prédictif d'un biomarqueur. De plus, les différences dans l'évolution des cellules tumorales et des microenvironnements au niveau des sites métastatiques remettent en question l'utilité des biomarqueurs précédemment identifiés

dans la tumeur primaire pour le traitement de la maladie métastatique (Noone et al. 2017; Vertii et al. 2018). La surveillance des changements dans les populations cellulaires au cours de la progression de la maladie et du traitement améliorera à la fois le diagnostic du cancer et la conception thérapeutique. Les protocoles actuels pour vérifier la cohérence des biomarqueurs, établir les diagnostics et définir le traitement sont basés sur de très petites biopsies (par exemple des biopsies à l'aiguille) de la tumeur primaire et des sites métastatiques. La principale limite est que la plupart des métastases sont difficiles d'accès, et les biopsies sont invasives, peu pratiques, coûteuses et ne permettent pas un suivi longitudinal de l'hétérogénéité tumorale. Pour surmonter ces problèmes, la détection et la caractérisation de l'hétérogénéité dans les CTCs pourraient être une bonne alternative et une opportunité.

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études cliniques dans les carcinomes ont révélé le lien entre le nombre de CTCs et le pronostic métastatique (Alix-Panabières et Pantel 2014; Bidard et al. 2018). De même, les propriétés phénotypiques des CTCs peuvent être liées à la survie globale des patients (de Wit et al. 2018). Récemment, en combinant plus de 20 études publiées, le nombre de CTCs s'est avéré être un facteur pronostique indépendant et quantitatif chez les patientes atteintes d'un cancer du sein précoce (Munzone et al. 2010). Au niveau protéique, il existe quelques écarts selon les séries analysées. Dans le cancer du sein par exemple, l'expression de HER2 entre les tissus tumoraux initiaux et les CTCs correspondantes est contradictoire, avec une concordance de l'ordre de 90 % pour certains (Munzone et al. 2010), des incohérences pour d'autres (Beije et al. 2016) ou des variations fluctuantes au cours de la maladie (Wallwiener et al. 2015). Semblable à EpCAM, la grande plasticité des cellules cancéreuses entraîne des variations dans l'expression de HER2 et reflète un instantané de l'hétérogénéité tumorale à un moment précis.

Bingham *et al.* ont montré que les CTCs étaient représentatives de l'ensemble du spectre des mutations présentes dans la tumeur primitive et les métastases distales chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Bingham et al. 2017). Leurs découvertes suggèrent l'utilité des CTCs pour identifier les mutations pouvant être ciblées et pour être utilisées comme biomarqueur pour révéler les populations cellulaires sensibles aux thérapies actuelles ou antérieures (Tomasetti et al. 2017).

Par ailleurs, il a également été démontré que les profils CTCs évoluent au fur et à mesure de la progression de la maladie, illustrant l'hétérogénéité temporelle des maladies cancéreuses.

Les tumeurs primaires ainsi que les foyers métastatiques sont réorganisés en permanence, entraînant dynamiquement la différenciation et la libération de nouveaux clones de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine, expliquant le chevauchement génomique partiel des CTCs et des foyers tumoraux à un moment précis. Par conséquent, même les CTCs ne peuvent pleinement refléter l'hétérogénéité tumorale : ils sont le miroir et l'instantané de la progression de la maladie ainsi que de l'évolution clonale des foyers tumoraux.

Une analyse des CTCs pourrait révéler efficacement la forte hétérogénéité, les changements stochastiques et les mutations motrices dans les populations de cellules cancéreuses afin de détecter la résistance aux médicaments et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques personnalisées ainsi que leur utilisation comme marqueurs de prédiction. Miyamoto *et al.* ont analysé les profils de séquençage d'ARN unicellulaire (ARN-Seq) dans le cancer de la prostate et ont conclu qu'il y avait une hétérogénéité CTC dans les voies de signalisation qui pourrait contribuer à l'échec du traitement (Brown *et al.* 2019). Les clusters de CTCs enrichissent l'hétérogénéité des CTCs et ont un potentiel métastatique accru (Castro-Giner *et Aceto* 2020). En plus des CTCs uniques détectables dans la circulation sanguine, les CTCs peuvent être observées en grappes composées de cellules cancéreuses et/ou en association avec des cellules non malignes. Des découvertes récentes suggèrent que les clusters de CTCs pourraient avoir une plus grande contribution au processus métastatique pour les caractéristiques mécaniques et immunitaires.

2.5 Applications cliniques

Des essais cliniques ont démontré que la présence de CTCs détectables est associée à un mauvais pronostic dans le carcinome (Lucci *et al.* 2012; Alix-Panabières *et Pantel* 2016). Des études préliminaires ont montré une tendance (Gallego *et al.* 2006) ou des preuves claires de la valeur pronostique de la détection des CTCs même dans le sarcome (Avigad *et*

al. 2004). Cependant, les recherches concernant l'utilité de la détection des CTC dans le sarcome restent insuffisantes et seuls quelques essais cliniques ont été mis en place sur cet item.

2.5.1 CTC versus ADNct en pratique clinique

L'ADNct est dérivé de cellules tumorales qui ont subi une apoptose ou nécrose et représente une fraction (souvent < 1 %) de l'ADN acellulaire circulant total dans le sang, qui est largement dérivé du remodelage des tissus physiologiques). L'analyse de l'ADNct a été optimisée pour une utilisation diagnostique dans le suivi de cancers du sein métastatiques (Dawson et al. 2013) et pour l'identification de mutations (par exemple la détection des mutations de l'EGFR dans le cancer du poumon non à petites cellules (Kwapisz 2017). Généralement, l'utilisation de l'ADNct fournit un outil rentable et très sensible. Cependant l'ADNct dérive de cellules tumorales mortes et ne reflète pas forcément la progression de la maladie contrairement aux CTCs qui dérivent de la masse tumorale de manière active (cellules vivantes) ou passive (cellules mortes après traitement). De plus, les CTCs sont porteuses d'une quantité beaucoup plus importante de matériel dérivé de la tumeur, tel que l'ARN, les marques épigénétiques ou encore les protéines (Alix-Panabières et Pantel 2016).

2.5.2 CTCs et sarcomes

Des CTCs aneuploïdes ont été identifiés chez des patients présentant des sarcomes des tissus mous (STS), dans une étude pilote en 2020. Une analyse par FISH a été réalisée et des CTCs ont été identifiés chez les quatre patients STS métastatiques testés, avec une valeur médiane de 4 pour 7 mL de sang (Napolitano et al. 2020).

Chez des patients atteints de sarcomes métastatiques, l'impact pronostique des CTCs et l'expression de l'EGFR dans ces cellules, qui sont associées à une diminution de la survie dans les tumeurs solides (Hynes et Lane 2005) a été analysé avant la chimiothérapie (Braun et al. 2018). Les CTCs ont été détectés par la technologie ISET chez 94,4 % des patients, avec un nombre médian de 2,0 CTC/mL. La présence de CTCs indique une survie médiane moins bonne chez les patients, mais sans signification statistique.

Récemment, des CTCs ont été isolés chez 18 patients diagnostiqués avec un sarcome d'Ewing, sur la base de la séparation immunomagnétique des cellules tumorales CD99-positives (Benini et al. 2018). Des CTCs ont été détectés chez ces patients atteints de sarcome d'Ewing, indépendamment du réarrangement moléculaire spécifique. Ces techniques améliorent potentiellement la stratification des risques et l'évaluation de la réponse précoce, à des fins pronostiques et prédictives dans le sarcome d'Ewing. L'isolement des CTCs positives pour le CD99 aidera à orienter les nouvelles thérapies diagnostiques et les options pronostiques lors du suivi thérapeutique des patients atteints de sarcome d'Ewing, pour la prise de décision clinique (Benini et al. 2018; Agnoletto et al. 2021).

2.5.3 CTCs et ostéosarcomes

Dans les résultats préliminaires de Satelli et *al.* (Satelli et al. 2014), l'amplification de MDM-2 et de KRAS a été testée dans des CTCs d'ostéosarcomes. Ces altérations génomiques ont été observées dans les métastases pulmonaires, alors qu'elles sont absentes dans les tumeurs localisées. Les amplifications de MDM-2 et de KRAS ayant déjà été documentées dans l'ostéosarcome métastatique (Yokoyama et al. 1998), la détection de cette amplification dans le CTC pourrait prédire l'apparition de lésions métastatiques à distance.

Le dénombrement des CTCs chez les patients atteints d'ostéosarcome a une valeur pronostique dans les tumeurs primaires et métastatiques, puisque la présence de CTCs est associée à de mauvais résultats cliniques (Zhang et al. 2017) il est peu invasif de récupérer des échantillons et il faut un protocole simple pour dénombrer les cellules. De plus, il peut être utilisé comme outil de suivi thérapeutique personnalisé pour sélectionner des stratégies de traitement efficaces dans l'ostéosarcome précoce et avancé.

Minghui *et al.* ont analysé les relations entre l'expression de la protéine associée aux métastases (MTA1), le phénotype des CTCs et les métastases à travers une étude prospective monocentrique de patients atteints d'ostéosarcome nouvellement diagnostiqué, afin d'étudier la signification clinique des CTC dans l'ostéosarcome (Li et al. 2019). Au total, 30 patients atteints d'ostéosarcome diagnostiqués entre mars 2015 et juin 2016 ont été inclus de manière prospective dans l'étude. Tous les patients ont reçu une chimiothérapie

néoadjuvante. Un seuil de 7 CTCs par 5,0 mL après la chirurgie devrait être adopté comme la valeur pour distinguer le pronostic défavorable ou favorable du patient (Li et al. 2019).

D'autres études sont actuellement en cours dans l'ostéosarcome mais les résultats ne sont pas encore disponibles.

3. Objectifs

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses malignes chez l'adolescent et les jeunes adultes. Malgré l'amélioration importante du pronostic autour de 70% dans les ostéosarcomes localisés, le pronostic des ostéosarcomes métastatiques reste sombre. Actuellement peu d'éléments diagnostiques permettent d'adapter le traitement, d'affiner le pronostic ou de dépister les récives. Parce qu'elles peuvent être détectées par méthodes non invasives, les CTCs constituent une approche prometteuse dans le but d'évaluer le risque de récive ou encore d'évaluer les mécanismes de résistance aux médicaments.

La détection et le dénombrement des cellules tumorales circulantes (CTC) peuvent prédire le pronostic du patient (1), permettre un suivi en temps réel de la réponse au traitement tumoral et offrir la possibilité de mettre en œuvre des thérapies ciblées en l'absence de biopsies. Bien que les CTCs aient le potentiel de révéler la complexité moléculaire et phénotypique des tumeurs, les principaux obstacles à leur étude sont la rareté, leur hétérogénéité des CTCs et l'absence de marqueurs spécifiques d'identification liée à leur caractère mésenchymateux. Une nouvelle approche potentielle pour la détection précoce des rechutes consiste à capturer les CTC du sang périphérique des patients atteints de sarcome qui sont en rémission

La détection et la caractérisation de ces cellules présentent des enjeux multiples :

- la détection précoce de ces cellules dans la circulation sanguine permettrait d'identifier les patients présentant un risque élevé de récive,
- la caractérisation moléculaire de ces cellules circulantes permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'initiation du processus métastatique avec un diagnostic plus précoce de ces métastases,
- le développement de thérapies ciblées.

L'objectif global de ce travail vise à isoler et à caractériser les CTCs d'ostéosarcomes afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs de la pathologie récidivante selon la stratégie suivante :

- Décrire, isoler et amplifier des CTCs dans un modèle pré-clinique d'ostéosarcome,
- Etudier l'impact de l'Ifosfamide sur le nombre de CTCs dans un modèle préclinique,
- Caractériser in vitro sur le plan moléculaire des CTCs et effectuer une comparaison avec des cellules de la tumeur primitive

Ce travail pré-clinique a pour objectif la mise en place à court terme d'un essai clinique visant à isoler et caractériser les CTCs dans une cohorte de patients.

4. Matériel et Méthodes

4.1 Lignées cellulaires et réactifs

Les lignées cellulaires utilisées comprenaient des cellules humaines d'ostéosarcome de type HOS 1547 (ATCC) et des cellules HOS génétiquement modifiées surexprimant la GFP. Les cellules surexprimant la GFP ont été préalablement obtenues par une transduction réalisée à l'aide de particules lentivirales. Ces particules étaient obtenues à partir de cellules d'encapsulation de type 293 FT, des plasmides pLP1, pLP-VSV-G, pLP2 et pLenti-transgène (Maxiprep Qiagen des plasmides), de PEI (8,6 g/L) et de NaCl filtré (0,22 µm) à 150 mM. Les lignées cellulaires sont cultivées en présence de milieu de type DMEM (Lonza) supplémenté en sérum bovin fœtal à 10% et en antibiotiques à 1% (Pénicilline et streptomycine) dans une atmosphère humide à 37°C. Les manipulations cellulaires ont été effectuées sous hotte PSM à flux laminaire. Avant l'inoculation des cellules HOS GFP positives, une analyse par cytométrie en flux a été réalisée pour confirmer la fluorescence à l'aide d'un cytomètre FC 500 (Beckman Coulter). Deux populations cellulaires ont été étudiées, l'une correspondait aux cellules HOS issues de la transfection du gène de la GFP et une autre correspondait à une population contrôle de cellules HOS transfectées avec un vecteur vide. 200×10^3 cellules de chaque population ont été décollées à l'aide d'une solution de trypsine / EDTA puis lavées en solution tampon phosphate salin (PBS) ont été resuspendues en PBS à la concentration souhaitée. Cette analyse a confirmé que 100% des cellules HOS exprimaient la GFP avant l'inoculation (Figure 11).

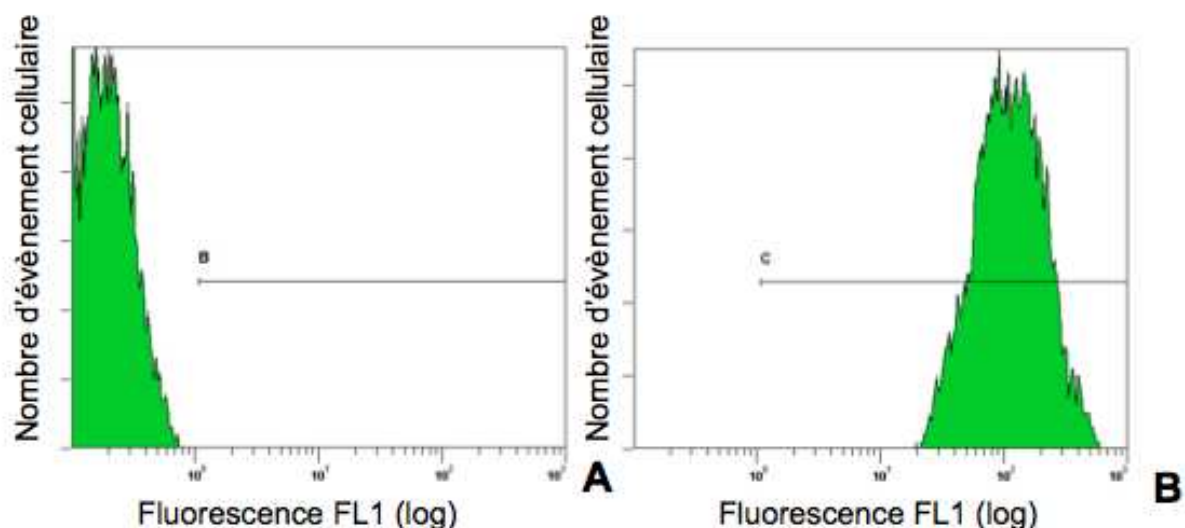


Figure 11 : Résultats de cytométrie en flux. A : Contrôle négatif / cellules HOS 1547. B : HOS exprimant la GFP / 100% de fluorescence

Les drogues utilisées *in vitro* étaient le Cisplatine (composé d'alkylants de l'ADN capables d'inhiber la réplication et d'induire la mort cellulaire) à des concentrations variant de 0,09 à 50 μM et le mafosfamide à des concentrations croissantes 7 à 1000 $\mu\text{g/ml}$. Le mafosfamide est un dérivé actif de l'ifosfamide qui exerce son activité sans recours à une pré-activation hépatique et peut donc être utilisé *in vitro*.

4.2 Modèle xénogénique d'ostéosarcome murin

Le laboratoire d'accueil développe depuis plusieurs années des modèles murins d'ostéosarcomes. Ces modèles consistent à inoculer en site paratibial des cellules humaines d'ostéosarcome surexprimant la GFP. Ils miment la pathologie humaine et sont caractérisés par la formation d'une tumeur en site osseux avant le développement de métastases pulmonaires après 35 jours suivant l'inoculation des cellules. Les expérimentations animales ont été réalisées sur des souris Nude NMRi femelles âgées de 4 semaines à l'Unité de Thérapie Expérimentale (Faculté de Médecine) après accord du comité d'éthique. Les cellules tumorales (HOS-GFP) décollées à l'aide d'une solution de trypsine / EDTA puis lavées en solution tampon phosphate salin (PBS) ont été resuspendues en PBS à la concentration souhaitée. L'inoculation a été réalisée en conditions d'asepsie rigoureuse sous anesthésie

générale (Isoflurane-air 1,5%, 1L/min). $1,5 \times 10^6$ cellules ont été inoculées en site para-tibial après avivement du périoste à l'aiguille. La cinétique de croissance tumorale a été étudiée par mesure précise et régulière du volume tumoral tous les 2 à 3 jours au pied à coulisse pendant 45 jours. Les tumeurs étaient palpables à partir du 20^{ième} jour post-injection. Le volume était calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Volume tumoral (en mm}^3\text{)} = (\text{Largeur (mm)} \times \text{Longueur (mm)}^2) / 2$$

Selon le protocole et les résultats attendus, une ponction intra-cardiaque était réalisé sous anesthésie générale pour chaque souris (Isoflurane-air 1,5%, 1L/min). Les souris étaient ensuite sacrifiées par dislocation cervicale. Le volume moyen par souris de sang récupéré était de 1 ml.

La drogue utilisée in vivo était de l'Ifosfamide (Holoxan) préparée à l'aide de PBS à des doses variant de 15 mg/kg à 30 mg/kg par jour sur des cycles de 3 jours successifs de traitement. L'Ifosfamide est la drogue de référence utilisée en pratique clinique et la dose de 30 mg/kg est celle considérée comme ayant un effet thérapeutique démontré y compris chez l'animal. Les injections étaient réalisées en intra péritonéal.

4.3 Isolement ces CTCs

4.3.1 Isolement par cytométrie en flux

La première méthode d'isolement des CTCs était un tri par cytométrie en flux. Chaque échantillon de sang prélevé a été dilué dans une solution tamponnée d'EDTA à 0,2 mM afin d'éviter tout processus de coagulation. Deux étapes de lyses des globules rouges étaient réalisées à l'aide d'un tampon préparé au laboratoire de lyse des globules rouges (8,26g NH₄Cl, 1g de KHCO₃ et 200 µL d'EDTA à 0,5 molaire) pendant 10 minutes à température ambiante. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 600 g pendant 7 minutes. Une suspension cellulaire a ainsi été obtenue dans un tampon composé de PBS, de 2 mM d'EDTA et de 2% de BSA.

Les CTCs exprimant la GFP ont été isolées par cytométrie en flux (plateforme de cytométrie et de tri cellulaire CYTOCELL (SFR Bonamy, Nantes) à l'aide d'un trieur multi-paramétrique haut débit FACS Aria III (Becton Dickinson). Le logiciel BD FACS Diva (Version 8.0.1) a été utilisé pour l'acquisition des données. Les CTCs triées ont été remises en culture dans des plaques 96 puits avec des volumes de 100 μ L de milieu. Pour chaque tri cellulaire, des contrôles positifs (HOS GFP) et négatifs (HOS 1547) étaient préparés et utilisés pour le tri.

4.3.2 Isolement par DEPArray

La seconde méthode utilisée a été un tri utilisant le système DEPArray (<http://www.siliconbiosystems.com/depararray-system>, Silicon Biosystem, Italie), plateforme de tri et d'évènements cellulaires rares. Cette méthode permet également l'isolement de cellules en vue de leur mise en culture et amplification *in vitro*. La technologie DEPArray repose sur l'utilisation de cages diélectrophorétiques qui permettent de déplacer une par une les cellules identifiées et de les isoler. Ces cages correspondent à des champs électriques qui permettent de déplacer les cellules fluorescentes d'intérêt selon leurs charges membranaires de surface. Il s'agit donc d'une technique couplant des approches de microscopie et de microfluidique.

Pour chaque analyse, quatre échantillons de sang issus de 4 souris et prélevés sur anticoagulant souris étaient poolés dans un tube de 50 mL. La première étape consistait en une déplétion de la fraction du plasma par une centrifugation à 1600 g pendant 10 minutes à température ambiante sans frein. Une lyse de globules rouges était ensuite réalisée à l'aide du tampon décrit précédemment. Pour terminer la déplétion des globules rouges et blancs, les billes magnétiques du kit Milteny étaient ajoutées à la suspension cellulaire (antiCD45 pour les globules blancs et antiTERT119 pour les globules rouges). Un marquage des globules blancs de souris était réalisé à l'aide d'un anticorps APC-CD45 anti-souris à l'aide du protocole MILTENY. L'échantillon destiné à l'analyse au DEPArray, on réalisait une suspension cellulaire dans du DMEM associé à 1% de BSA. 13 μ L de solution était injecté

dans une cartouche avant analyse (Figure 12). Les cellules d'intérêt GFP positives étaient alors isolées et remises en culture (Figure 13).

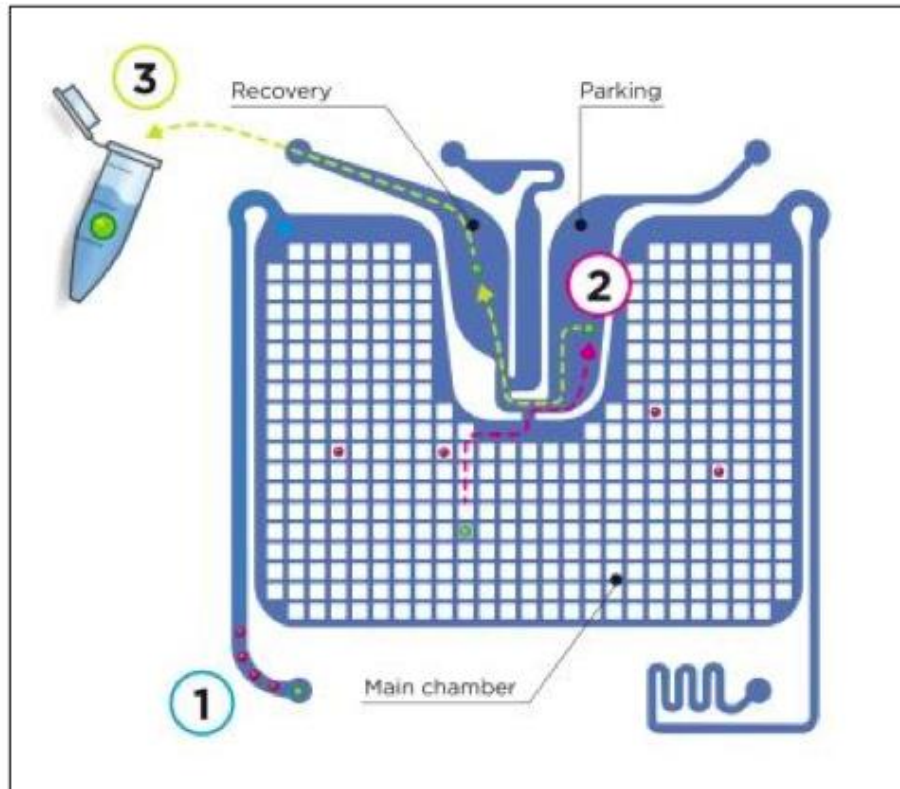


Figure 12 : Description d'une cartouche d'analyse du système DEPArray. Les suspensions cellulaires sont déposées dans la chambre principale (1). Chaque carré du quadrillage de la chambre correspond à une cage diélectrophorétique, les cellules d'intérêt sont déplacés par l'opérateur de cage en cage puis stockées dans la zone de parking (2) avant d'être collectées (3) une par une ou en groupe de 1 à 20. Source : www.siliconbiosystems.org

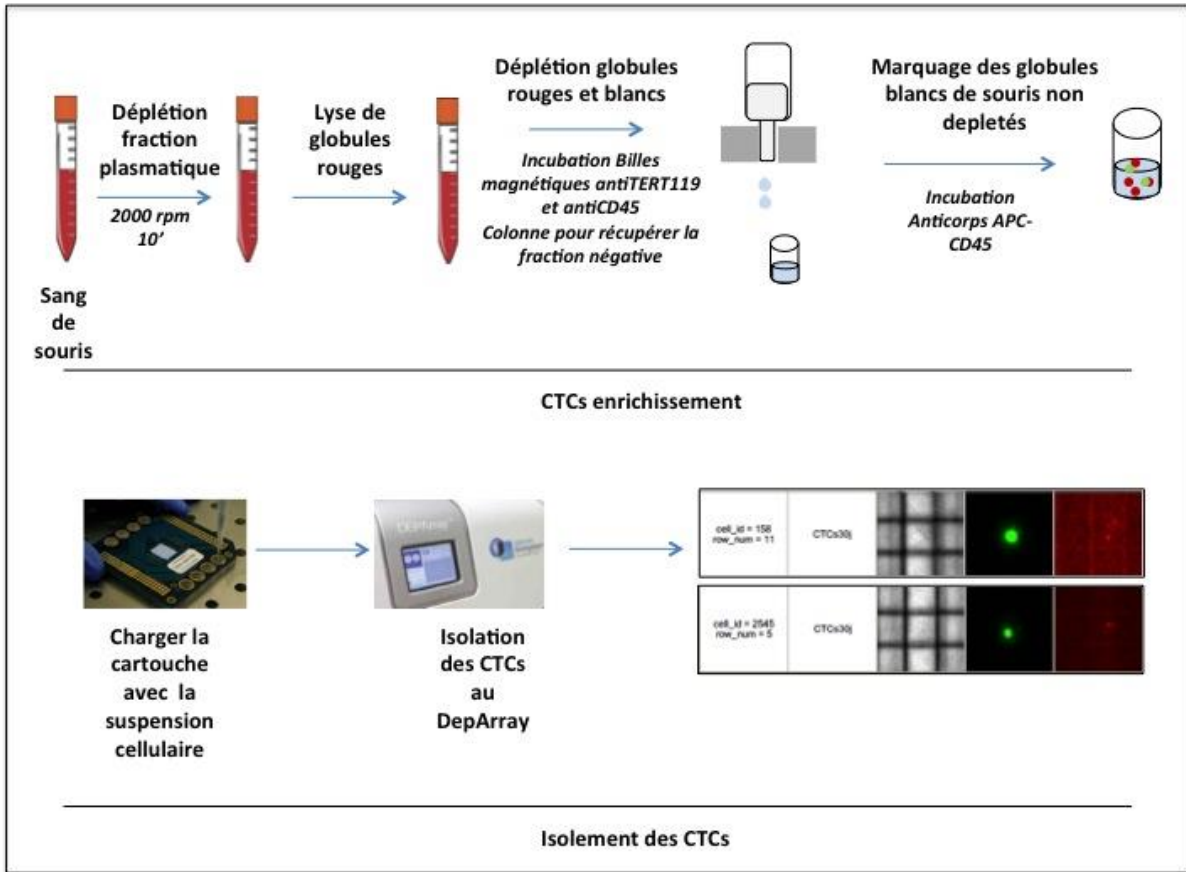


Figure 13.: Protocole d'analyse des échantillons à l'aide du système DEPArray. La première étape consiste à la préparation de la suspension cellulaire avec une déplétion des globules blancs et rouges et d'un marquage CD45. La seconde étape est l'isolement des CTCs à l'aide du DEPArray.

4.4 Analyse histologique

Une analyse histologique des tissus tumoraux a été réalisée chez tous les animaux sacrifiés. Lorsque les tumeurs étaient palpables et mesurables, un échantillon tumoral a été prélevé puis fixé dans solution de formaldéhyde 4% tamponnée pH 7,4. Lorsque le volume des tumeurs n'était pas mesurable, les pattes entières des animaux étaient conservées sans la peau et fixées en solution tamponnée de formaldéhyde 4%, et décalcifiées en solution d'EDTA 4% et 0,2% de paraformaldéhyde à pH 7,4, au microonde à température contrôlé (KOS, MM France). Un contrôle radiographique a été réalisé pour s'assurer d'une décalcification totale pour chaque échantillon. Chaque prélèvement a ensuite été inclus en paraffine et des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Leica,

RM2255) puis montées entre lames (superfrost+, ThermoScientific) et lamelles avant coloration. Tous les poumons ont également été conservés. Une analyse macroscopique était systématiquement réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire pour rechercher la présence de métastases macroscopiques puis les échantillons étaient fixés, inclus, coupés et montés sur lame de verre.

Immunohistochimie :

Une analyse immunohistochimique a été réalisée pour l'ensemble des échantillons montés sur lame afin de mettre en évidence la présence de cellules GFP caractéristiques des cellules tumorales inoculées. Après un démasquage antigénique en tampon citrate à pH 6 pendant 20 minutes à 95°, l'anticorps primaire anti-GCF (anticorps polyclonal de lapin, ab290, Abcam, France) a été déposé au 1:2000 en solution de blocage à température ambiante pendant 1h. Un anticorps secondaire couplé à l'HRP a été déposé au 1:300 pendant 1h à température ambiante (Anticorps anti-lapin de chèvre, ref 111-035-144, Jackson Immuno Research, USA) puis révélé à l'aide d'un substrat (DAB, DAKO) pendant quelques secondes à température ambiante dans l'obscurité en contrôlant la cinétique pour limiter au maximum le bruit de fond. Après un lavage à l'eau bidistillée, une contre-coloration nucléaire à l'hématoxyline (Gill-2, ThermoScientific) et une étape de déshydratation ont été réalisées à l'aide de l'automate HMS 740. Enfin, les lames sont montées entre lames et lamelles à l'aide de Pertex (HistoLab). Toutes les lames ont été scannées au NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu (SZK, Japon) et analysées à l'aide du logiciel NanoZoomer Digital Pathology (Hamamatsu).

4.5 Expérimentations *in vitro*

4.5.1 Analyse de la prolifération cellulaire

La première étape a été une étude de la prolifération cellulaire entre les cellules HOS GFP positives et les CTCs isolées par comptage manuel et par un test WST-1. Le comptage manuel a été réalisé à l'aide de plaques 12 puitsensemencées de 50000 cellules par puits en vue d'évaluer la prolifération à 24h, 48h et 72h. Après la période d'incubation, les cellules

étaient décollées à l'aide d'une solution de trypsine (0,5 g/L) / EDTA (0,2 g/L) et un comptage cellulaire était réalisé manuellement sur une cellule de Malassez par la méthode d'exclusion au bleu Trypan. Un minimum de 4 puits pour chaque temps a été réalisé. Le temps de doublement (T_d) a donc pu être calculé à partir de la formule suivante :

$$T_d = (t_2 - t_1) * \log(2) / \log(q_2 - q_1)$$

où q_1 et q_2 correspondent à la quantité de cellules comptées aux temps t_1 et t_2

Un test colorimétrique WST-1 (Takara, Japon) a également été réalisé à 24h, 48h et 72h à partir de plaques 96 puits (fond plat)ensemencées de 2000 cellules par puits. Ce test colorimétrique est basé sur le clivage du sel de tétrazolium (rouge clair) par la déshydrogénase mitochondriale, formant ainsi un dérivé formazan de couleur jaune-orange. Après 3h d'incubation à 37°C, la quantification de l'absorbance par spectrophotométrie à 450 nm (lecteur de microplaque Wallac 1420 VICTOR2, Perkin Elmer) est alors directement proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives.

4.5.2 Analyse de la sensibilité aux drogues

La deuxième étape consistait à évaluer la sensibilité aux principaux agents de chimiothérapie utilisés dans le traitement l'ostéosarcome. Afin de déterminer la sensibilité des deux lignées cellulaires aux drogues (mafosfamide, cisplatine), les cellules étaient ensemencées en plaque 96-puits (fond plat), à raison de 1500 cellules par puits. Après 24h d'adhérence, les cellules ont été incubées à 37°C avec des doses croissantes de chaque agent de chimiothérapie. Les cellules étaient incubées à 37°C. Un test colorimétrique WST-1 (Takara) était réalisé à 48h et 72h et permettait de déterminer le taux de prolifération cellulaire par rapport au contrôle non traité.

4.5.3 Etude de la migration et de l'invasion cellulaire

La troisième étape a été de comparer les capacités d'invasion et de migration entre les cellules HOS GFP positives et les CTCs à l'aide de chambres de Boyden. Des plaques 24

puits ont été utilisées. Pour l'étude de la migration, une suspension cellulaire de 50×10^3 cellules de chaque type cellulaire dans 200 μL de DMEM supplémenté en sérum bovin foetal à 10% ont été déposées au fond de la chambre de Boyden de 8 microns. Cinq cents μl de DMEM supplémenté en sérum bovin foetal à 20% étaient déposés dans le compartiment inférieur de chaque puits. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 6 heures. Les cellules n'ayant pas migrées à travers les pores du filtre de la chambre ont été éliminées à l'aide d'un coton tige. Un lavage minutieux à l'eau distillée de la chambre de Boyden a été fait. 600 μl de Glutamine 10% ont été déposés et laissés en contact 10 minutes à température ambiante. Après un second lavage, 600 μL de Crystal Violet étaient déposés et laissés en contact 10 minutes à température ambiante. Plusieurs lavages à l'eau de robinet ont alors été réalisés pour enlever tout l'excès du crystal violet, et les chambres ont séchées à température ambiante avant d'être analysées. Pour analyser la capacité d'invasion, des photos ont été prises à la loupe binoculaire et le nombre de cellules colorées ayant migrées ont été déterminé à l'aide du logiciel ImageJ (nih.gov).

Pour l'étude de l'invasion des cellules, une procédure similaire a été utilisée. Cependant la suspension cellulaire a été déposée sur un filtre préalablement recouvert de Matrigel (BD Biosciences). Cent microlitres de Matrigel 9% ont été déposés au fond de chaque chambre avant de polymériser 2h à 37°C, puis d'être déshydrater pendant 12h à température ambiante avant d'être réhydrater pendant 24h à 37°C. 20×10^3 cellules ont alors été déposées dans les chambres et laissés incubées 24h à 37°C. L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ.

4.5.4 PCR quantitative

Une comparaison des profils d'expression génique avait été préalablement réalisée à ce travail et avait permis d'identifier un profil de gènes exprimés de manière différentielle entre les cellules tumorales de la tumeur primitive et les CTCs. Nous avons ici analysé l'expression de ces gènes par RT-PCR quantitative en temps réel comparant les cellules HOS surexprimant la GFP aux cellules provenant des CTCs isolées par cytométrie en flux. Les gènes ainsi étudiés ont été : ADAM8, CD99, IFNAR1, IL13, JAMB, ENDRA et LTK (Annexe 1) et

le gène de référence utilisé a été le gène Hprt1. L'extraction d'ARN a été effectuée selon le protocole NucléoSpin® RNA II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) à partir de 5×10^6 cellules. Puis la quantification d'ARN a été effectuée par spectrophotométrie au Nanodrop (Thermo Scientific). La quantité d'ARN obtenue a alors été évaluée par la mesure de l'absorbance par rapport à l'eau RNase free seule, le rapport DO260/280 devant être compris entre 1,8 et 2. Une reverse transcription à partir des ARN messagers obtenus était réalisée à l'aide du kit Maxima H Minus (Thermo Scientific). L'objectif de la RT est de transformer l'ARN issu des cellules en ADN complémentaire (ADNc). Pour cela, 1µg d'ARN par condition (concentration finale 50 ng/µL) est ajouté à un mélange composé d'amorces oligo dT (à une concentration finale de 5pmol/µL), qui s'apparieront avec la queue poly-A des ARN messagers (excluant ainsi les autres ARNs), et des nucléotides substrats de la reverse transcriptase (à une concentration finale de 0.5 mM). Les échantillons sont incubés à 65°C pendant 5 minutes. Puis 1µL de reverse transcriptase (Maxima H Minus Enz Mix) diluée dans son tampon au 1/5^e est ajouté. La réaction de transcription s'effectue ensuite à 50° pendant 30 minutes puis les doubles brins sont dénaturés à 85°C pendant 5 minutes. L'amplification des gènes d'intérêt et la quantification en temps réel ont ensuite été effectuées grâce au thermocycleur CFX96 real Time System (BioRad). Le cycle suivant est répété 40 fois : dénaturation de l'ADN double brin à 95°C pendant 15 secondes, appariement des amorces à 60°C pendant 30 secondes, puis élongation à 72°C. L'analyse des résultats est ensuite effectuée sur le logiciel CFX-Manager Biorad.

4.6 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.00 pour windows. Des tests de comparaison de moyennes (Test de Student) ont été réalisés pour l'analyse du nombre de CTCs et des volumes tumoraux entre les groupes traités et contrôle. La corrélation entre volume tumoral et le nombre de CTCs a été mesurée par un test de corrélation de Pearson pour petits échantillons.

Seuls les résultats présentant un risque de première espèce inférieur à 5% étaient considérés comme statistiquement significatifs.

5. Résultats

5.1 Description et validation du modèle animal

Pour éviter tout biais lié au mode d'injection des cellules cancéreuses et valider les méthodes utilisées pour isoler les cellules tumorales circulantes exprimant la GFP dans notre modèle, la première étape a été d'invalider l'hypothèse du passage dans la circulation sanguine de cellules HOS-GFP lors de l'inoculation des souris. Pour cela, nous avons utilisé deux groupes de 8 souris Nude. Dans le premier groupe, $1,5 \times 10^6$ de cellules étaient injectées en site paratibial selon le protocole habituel (Volume de 50 μ L de PBS) chez 4 souris et 1,5 millions de cellules étaient injectées après resuspension dans une solution de Matrigel chez les 4 autres souris. Dans le second groupe, 20×10^6 de cellules étaient inoculées selon les mêmes modalités. Les souris ont été sacrifiées 24h après l'injection et un tri cellulaire par cytométrie en flux a été réalisé échantillon par échantillon. Aucune cellule GFP positive n'a été détectée excluant tout artéfact associé à une fuite immédiate de cellules tumorales dans la circulation sanguine lors de l'inoculation.

Afin de valider le modèle animal utilisé et d'étudier les relations entre le nombre de CTCs et le volume tumoral ou le nombre de métastases, 40 souris ont été réparties en 4 groupes et sacrifiées respectivement à J10, J15, J30 et J45 post injection. Pour chaque groupe, 4 échantillons de sang de souris récupérés par ponction intra-cardiaque étaient destinés à une analyse au DEPArray (sauf pour J15) pour détecter les CTCs, les 6 autres échantillons étaient analysés individuellement par cytométrie en flux et triés.

A J10, le nombre moyen de CTCs par souris isolées par cytométrie en flux a été de 0,4 CTCs par souris et par DEPArray de 9 CTCs par souris. Les tumeurs n'ont pu être mesurées à ce temps précoce et aucune macro ou micro métastase n'a été mise en évidence. A J15, le nombre moyen de CTCs par souris isolées par cytométrie en flux a été de 56,2 CTCs par souris. Les tumeurs n'étaient pas mesurables et aucune macro ou micro métastase n'a été mise en évidence. A J30, le nombre moyen de CTCs par souris isolées par cytométrie en flux a été de 2,3 CTCs par souris et par DEPArray de 3,7 CTCs par souris. Le volume tumoral moyen était de 350,4 mm^3 . A J45, le nombre moyen de CTCs par souris isolées par

cytométrie en flux a été de 20 CTCs par souris et de 4,7 CTCs par souris par DEPArray. Le volume tumoral moyen était de 1324 mm³. L'ensemble de ces données est rassemblé dans la Figure 14.

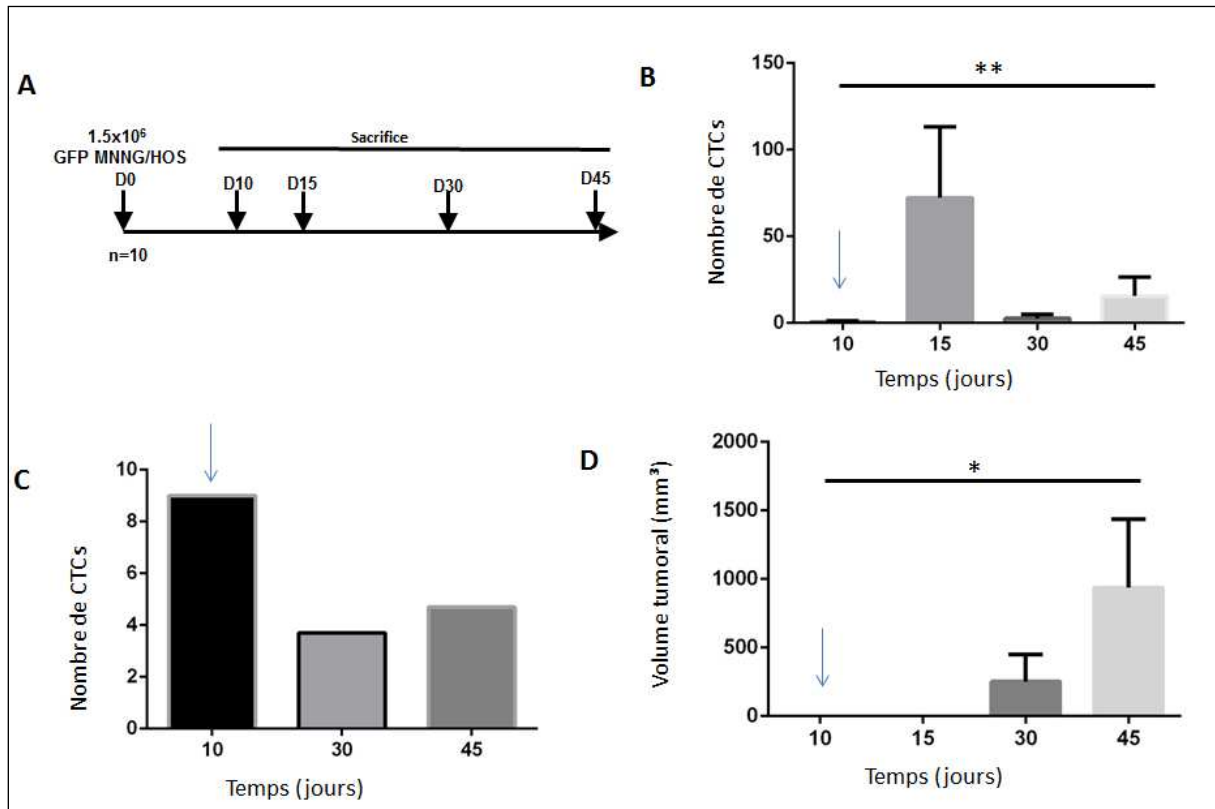


Figure 14: Protocole de la validation du modèle (A). Nombre moyen de CTCs isolées aux différents temps. Cytométrie en flux (B), $n = 6$. DEPArray (C), $n = 4$. Moyenne des volumes tumoraux aux différents temps, $n = 10$ (D). Les CTCs sont détectables avant toute tumeur palpable. * $p < 0,05$; $p < 0,01$.

Les CTCs sont donc détectables avant l'apparition de toute tumeur palpable et cette détection précoce a été confirmée par les deux méthodes utilisées : cytométrie en flux et DEPArray™.

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le nombre de CTCs et le volume tumoral à J30 alors qu'une corrélation existe entre le nombre de CTCs et le volume tumoral à J45 ($R = 0,9224$). Les analyses histologiques ont confirmé le développement de la tumeur tibiale et des micro-métastases ont été mises en évidence à J30 et J45 (Figure 7).

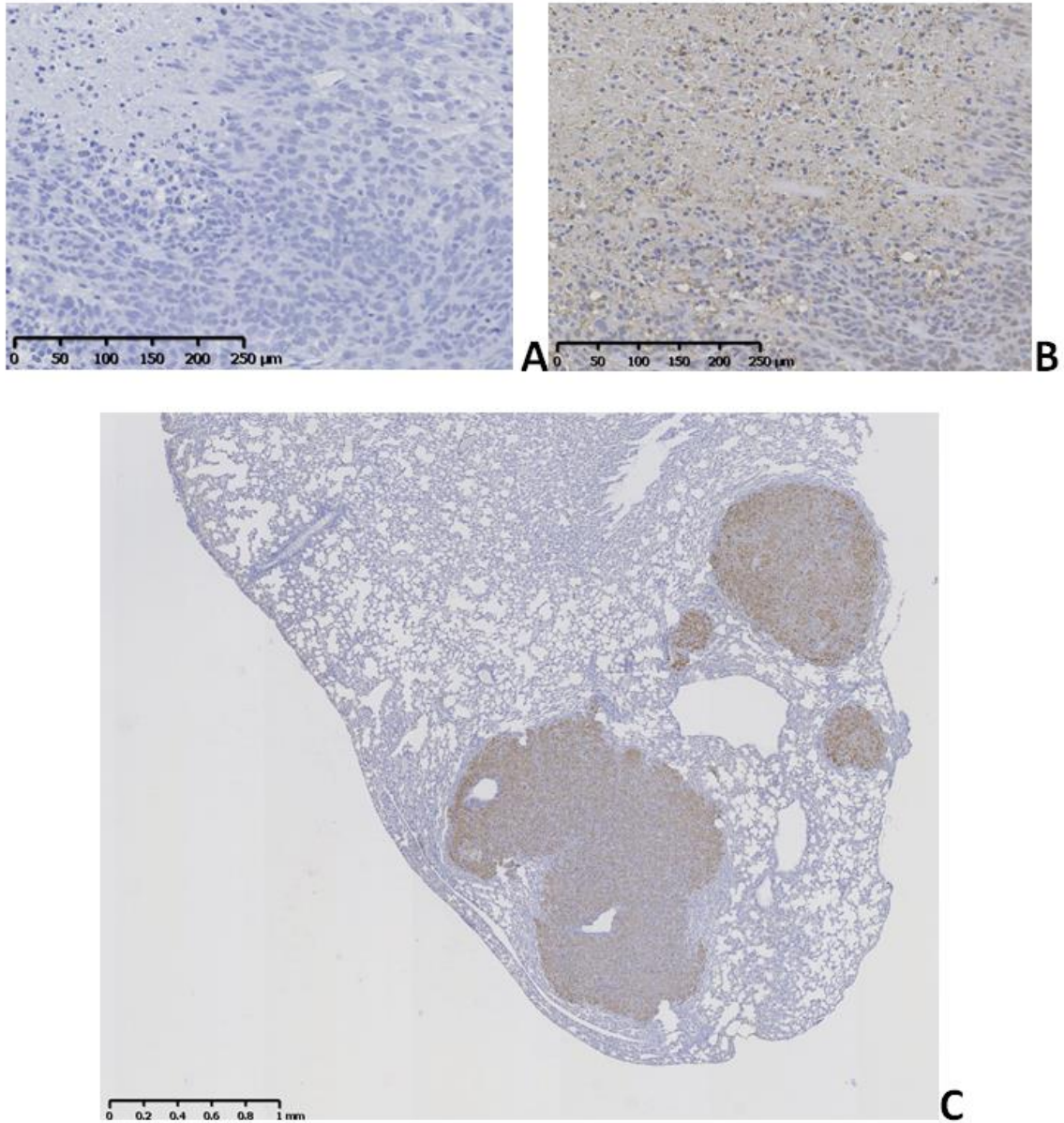


Figure 15: Analyse immunohistochimique d'une masse tumorale tibiale et d'une coupe pulmonaire à J30 de l'inoculation de cellules HOS GFP positives. A : Contrôle négatif d'une tumeur tibiale (grossissement x100) B : Tumeur tibiale avec marquage GFP (grossissement x100) C : Micro-métastase avec marquage GFP (grossissement x20)

5.2 Effet du traitement par Ifosfamide

L'ifosfamide est l'un des médicaments conventionnels utilisés dans l'ostéosarcome. Nous avons évalué les effets de l'ifosfamide et plus précisément le nombre de CTC, le volume tumoral et le nombre de métastases lorsque le médicament était administré à des

stades précoces de la maladie dans le modèle murin (c'est-à-dire 10 jours après la provocation tumorale). Quinze souris, préalablement injectées avec des cellules GFP MNNG/HOS, ont été réparties en 3 groupes : groupe 1, cinq jours après l'inoculation des cellules, les souris ont reçu 1 cycle d'ifosfamide à la dose de 15 mg/kg (1 cycle = administration du médicament trois jours consécutifs) ; groupe 2, cinq jours après l'inoculation cellulaire, les souris ont reçu 1 cycle d'ifosfamide à une dose de 30 mg/kg ; groupe 3 (groupe témoin) : les souris ont reçu un volume équivalent de PBS (Fig. 16A). Les souris ont été sacrifiées au jour 25 et des échantillons de sang ont été prélevés et traités individuellement pour isoler les CTC par tri cellulaire. Comme le montre la figure 16, il n'y avait pas de différences statistiquement significatives dans les volumes de tumeurs (Fig. 16B). Cependant, le nombre de CTC était plus élevé dans les groupes traités par rapport au groupe témoin ($p < 0,01$), et étonnamment, le nombre de métastases a significativement diminué au cours de la même période ($p < 0,05$) (Fig. 16C).

Dans le groupe dont la dose d'ifosfamide administrée était de 30 mg/kg/jour, le nombre moyen de CTCs par souris a été de 13 et le nombre moyen de macrométastase par souris a été de 1,2. Le volume tumoral moyen était de 204,4 mm³ à J25.

Dans le groupe dont la dose d'ifosfamide administrée était de 15 mg/kg/jour, le nombre moyen de CTCs par souris a été de 8 et le nombre moyen de macrométastase par souris a été de 1,6. Le volume tumoral moyen était de 354,2 mm³ à J25.

Dans le groupe contrôle recevant du sérum physiologique le nombre moyen de CTCs par souris a été de 3 et le nombre moyen de macrométastase par souris a été de 5,7. Le volume tumoral moyen était de 358,8 mm³ à J25.

Il n'existe pas de différence significative entre les groupes pour les volumes tumoraux à J25 ($p=0,1478$) et pour le nombre de CTCs ($p=0,1430$).

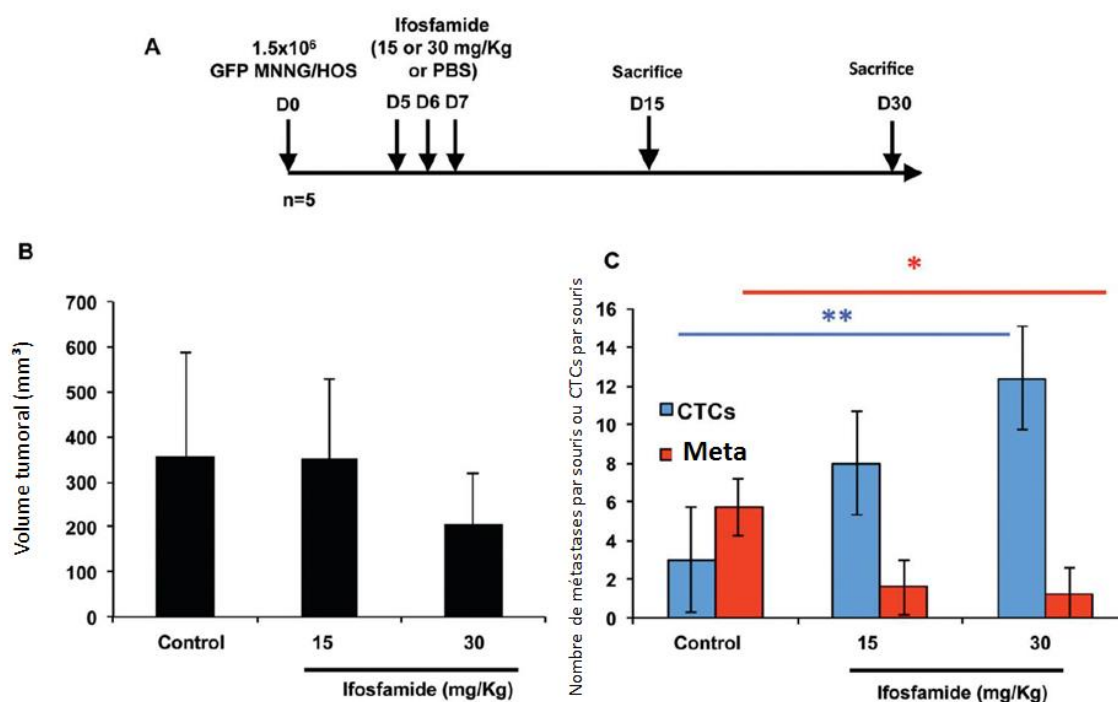


Figure 16 : Effet opposé d'un cycle d'ifosfamide sur le nombre de métastases pulmonaires et de CTCs au stade précoce du développement de l'ostéosarcome. (A) Résumé du protocole expérimental. Des cellules d'ostéosarcome humain GFP-MMNG/HOS ont été inoculées dans le site paratibial de souris nude. Trois jours après l'inoculation des cellules d'ostéosarcome, les souris ont été traitées avec de l'ifosfamide à des doses de 15 mg/kg ou 30 mg/kg par jour, 3 jours consécutifs. Des souris témoins ont été injectées dans les mêmes conditions avec un volume équivalent de PBS. Le volume tumoral (B), le nombre de métastases pulmonaires/souris (Meta) (C) et les CTC (C) ont été dénombrés 15 et 30 jours après l'inoculation des cellules cancéreuses.

Ensuite, nous avons étudié l'effet de l'administration de plusieurs doses d'ifosfamide. Trente-deux souris injectées avec des cellules GFP-MNNG/HOS, randomisées avant traitement en deux groupes A et B. Lorsque la masse tumorale était palpable (J24), les souris du groupe A (n = 8/sous-groupe) ont reçu 1 cycle d'ifosfamide à 30 mg/Kg ou solution PBS comme sous-groupe témoin. Dans le groupe B, les souris ont été traitées avec 2 cycles d'ifosfamide à 30 mg/kg, à une semaine d'intervalle ou avec du PBS comme groupe témoin (Fig. 17A). Comme le montre la figure 17B, un cycle d'ifosfamide réduit significativement la croissance tumorale (volume tumoral moyen à J33 : 498,3 mm³ pour les souris traitées

contre 1220,5 mm³ pour le contrôle ; $p < 0,001$) mais ne réduit pas significativement le nombre de CTC (Fig .17B). Comme attendu, dans le groupe B, les souris traitées ont montré une diminution significative des volumes tumoraux (volumes tumoraux moyens à J45 : 663,9 mm³ chez les souris traitées contre 1454,9 mm³ chez les souris témoins ; $p < 0,01$). Cependant, deux cycles d'ifosfamide n'ont eu aucun impact sur le nombre de CTC par rapport au groupe contrôle (Fig. 17C). L'ensemble de ces résultats a révélé l'effet différentiel de l'ifosfamide sur la libération des cellules tumorales selon le stade de développement tumoral.

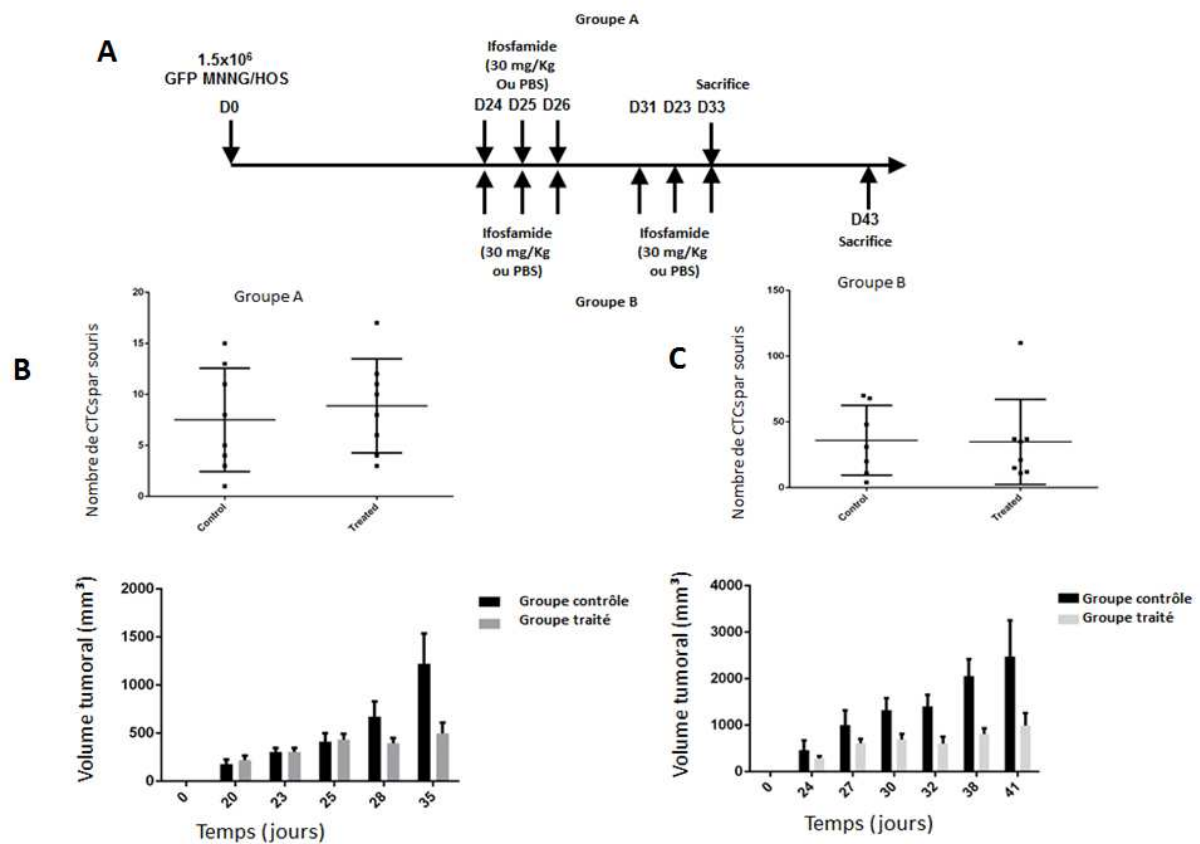


Figure 17 : Effets d'un ou deux cycles d'ifosfamide sur le nombre de CTCs et le volume tumoral. Au stade tardif du développement de l'ostéosarcome, un cycle ou deux cycles d'ifosfamide ralentissent le volume tumoral sans aucun impact sur la libération de CTC dans la circulation sanguine. (A) Résumé du protocole expérimental. Des cellules d'ostéosarcome humain GFP-MMNG/HOS ont été inoculées dans le site paratibial de souris nude. Trois semaines après l'inoculation des cellules d'ostéosarcome, les souris ont été traitées avec un (B) ou deux cycles (C) de 30 mg/kg/jour d'ifosfamide administrés 3 jours consécutifs. Des souris témoins ont été injectées dans les mêmes

conditions avec un volume équivalent de PBS. Le volume tumoral et les CTCs ont été mesurés au point final.

5.3 Isolement et amplification des CTCs

Plusieurs lignées de CTCs issues d'un tri cellulaire par cytométrie ont pu être amplifiées *in vitro* (Figure 18). Elles ont été amplifiées à partir de 3, 5 ou 10 cellulesensemencées dans des puits de plaque 96 puits. Ces amplifications se sont produites en moyenne 10 jours après le tri cellulaire.

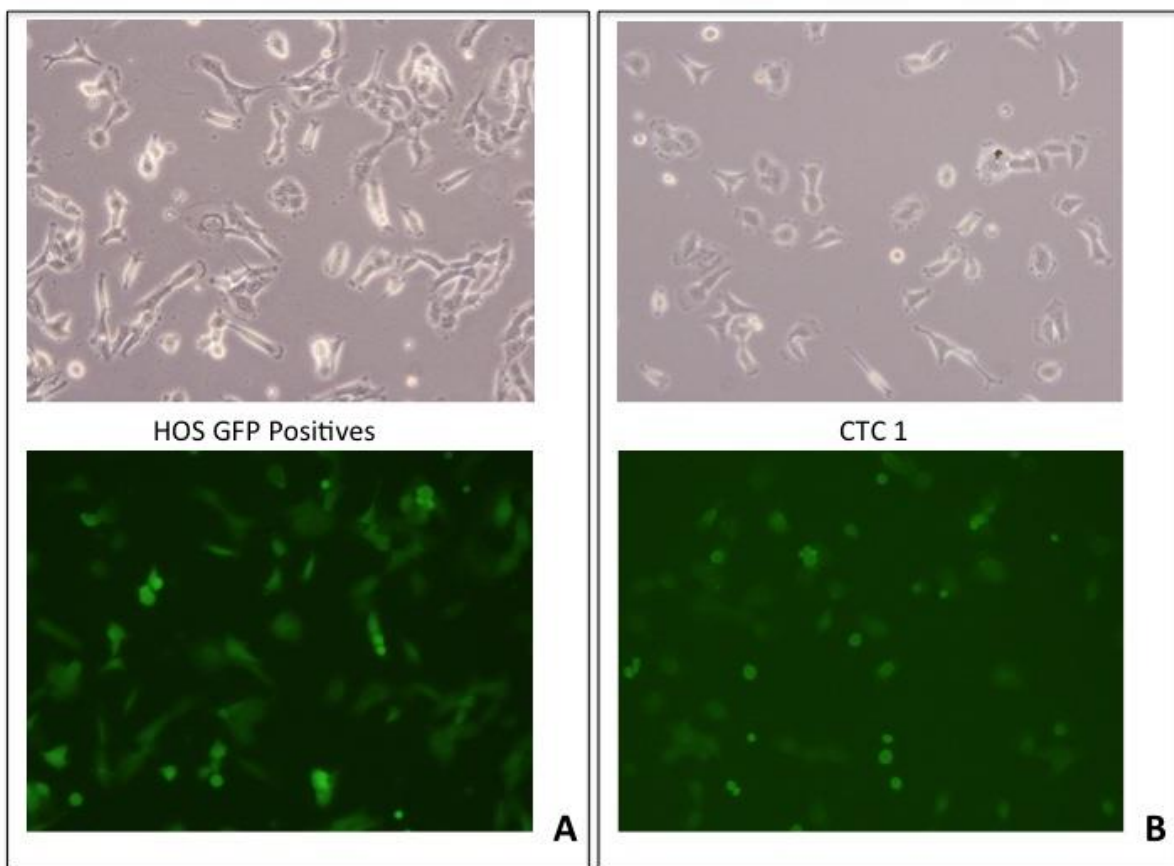


Figure18: CTCs isolées observées sous microscope photonique à fluorescence et comparées à la lignée cellulaire initiale. A : Lignée de cellule HOS GFP positives initiale (x10) B : Lignée issue de la CTC 1 (x10)

5.4 Caractérisation *in vitro* des CTCs

5.4.1 Analyse de la prolifération cellulaire

Le taux de prolifération des CTCs (lignées 1 et 2) et des cellules HOS GFP positives a été mis en évidence par comptage manuel et par un test WST-1. Le temps de doublement des HOS est de 1,090. Celui des CTCs 1 est de 0,9883 et des CTCs 2 de 1,133. Les deux méthodes n'ont pas mis en évidence de différence significative des taux de prolifération entre les deux groupes de cellules (Figure 19).

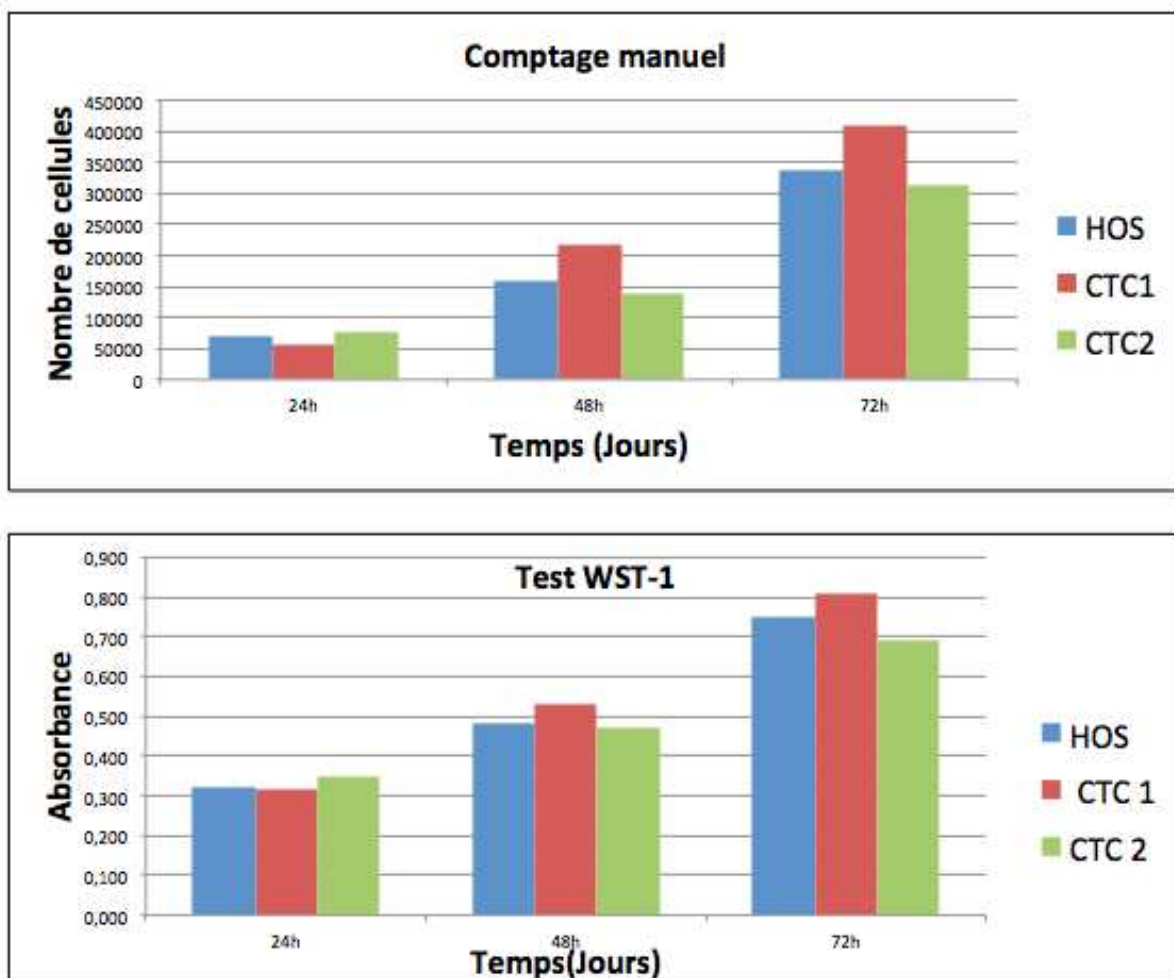
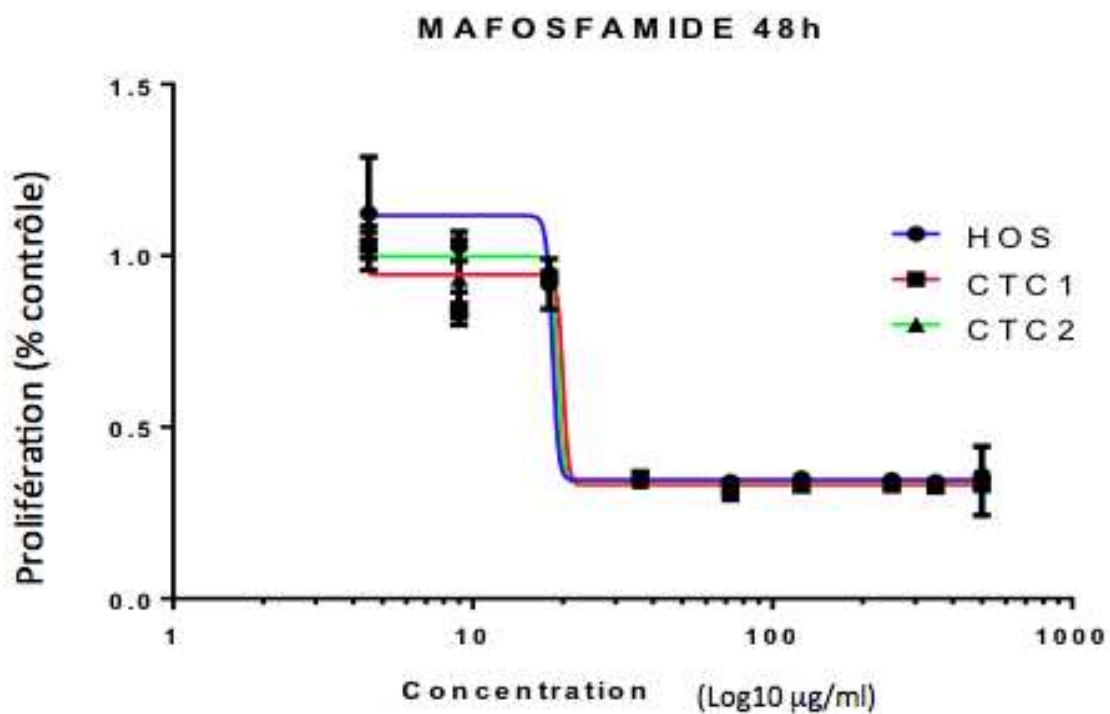


Figure 19 : Résultats de l'analyse de la prolifération cellulaire par comptage manuel et par test colorimétrique WST1 à 24h, 48h et 72h

5.4.2 Analyse de la sensibilité aux drogues

Une gamme de concentration croissante de Mafosfamide de 0 à 500 µg/ml a été utilisée pour tester la sensibilité des cellules HOS GFP positives et des CTCs 1 et 2. Les résultats du test colorimétrique WST-1 à 48h et 72h avec les courbes dose-réponse sont illustrés dans la Figure 20. Les profils de sensibilité au Mafosfamide sont variables selon les lignées cellulaires. Nous avons déterminé pour chaque lignée l'IC50 et ainsi la lignée la plus sensible au traitement. Plus l'IC50 est basse, plus la lignée est sensible au traitement. Le Log IC50 était mesuré respectivement à 13,875, 14,359 et 14,1275 pour les lignées HOS GFP positives, les CTCs 1 et les CTCs 2. Les cellules HOS GFP étaient donc plus sensibles au mafosfamide que les CTCs 1 et 2 mais sans différence significative ($p=0,3667$).



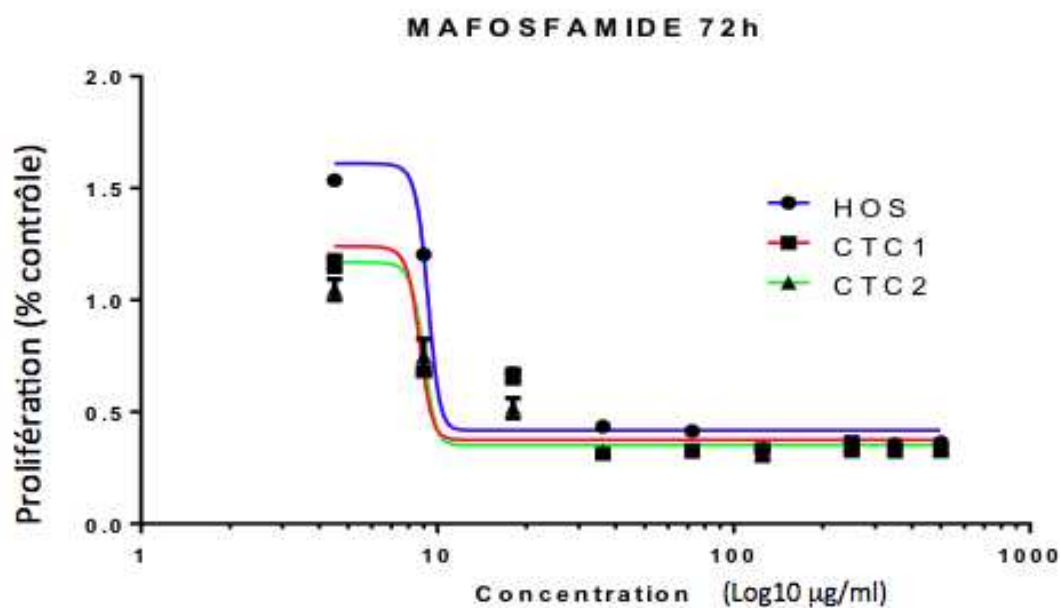


Figure 20. Courbe de dose-réponse au Mafosfamide des lignées HOS GFP, CTC 1 et 2 (les échelles de concentration sont logarithmiques). Test WST-1

Une gamme de concentration croissante de Cisplatine de 0 à 50 μ M a été utilisée pour tester la sensibilité des cellules HOS GFP positives et des CTCs 1 et 2. Les résultats du test colorimétrique WST-1 à 48h et 72h avec les courbes dose-réponse sont illustrés dans la Figure 21. Les profils de sensibilité au Cisplatine sont variables selon les lignées cellulaires. Le Log IC50 était mesuré respectivement à 3,1925, 3,062 et 3,2325 pour les lignées HOS GFP positives, les CTCs 1 et les CTCs 2. La sensibilité au Cisplatine est donc comparable pour les 3 lignées cellulaires ($p=0,4532$).

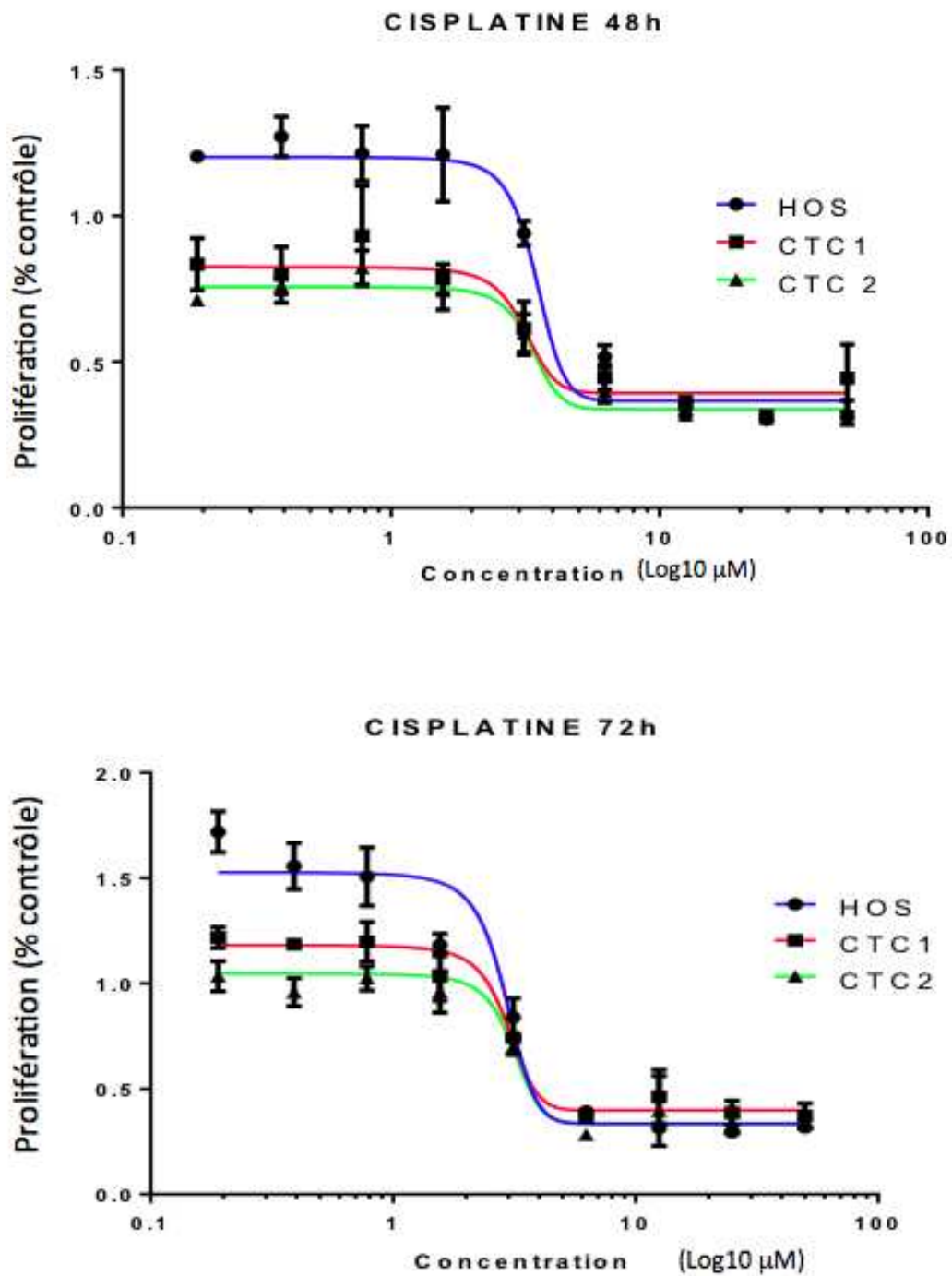


Figure 21 : Courbe de dose-réponse au Cisplatine des lignées HOS GFP, CTC 1 et 2 (les échelles de concentration sont logarithmiques). Test WST-1

5.4.3 Etude de la migration et de l'invasion cellulaire

L'analyse des résultats à l'aide du logiciel ImageJ a mis en évidence une différence de capacité migratoire entre les CTCs 1 et 2 (Figure 22) alors que le pourcentage de cellules ayant migrées était comparable pour les cellules HOS GFP positives et les CTCs1. Les pourcentages de cellules colorées dans les trois groupes contrôles sont comparables ($p=0,6534$).

Concernant l'invasion, on note une différence de pourcentage ayant migrées à travers le Matri gel entre les CTCs 1 et les HOS GFP positives et les CTCs 2. Les pourcentages de cellules colorées après 24h dans les trois groupes contrôles sont comparables ($p=0,5456$) (Figure 23)

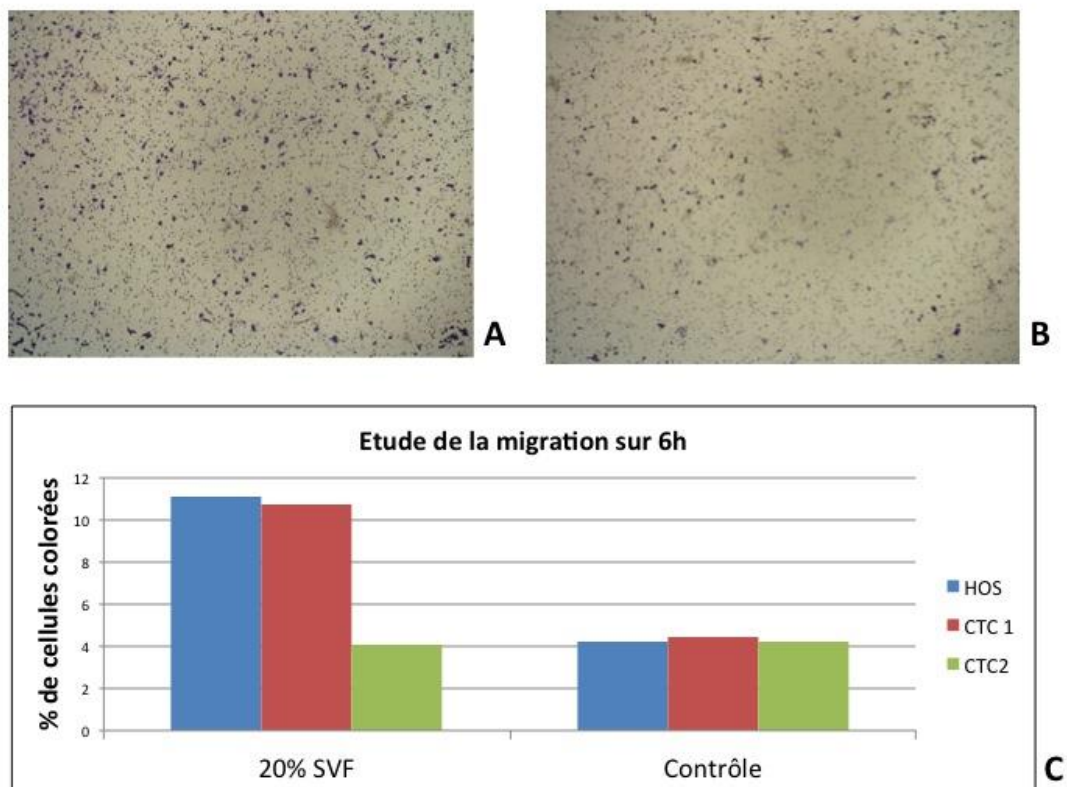


Figure 22: Analyse de la migration cellulaire après 6 heures de culture déterminée par une coloration au Crystal Violet (grossissement x4). (A) CTC 1 ; (B) : CTC 2 ; (C) Etude de la migration des trois lignées cellulaires

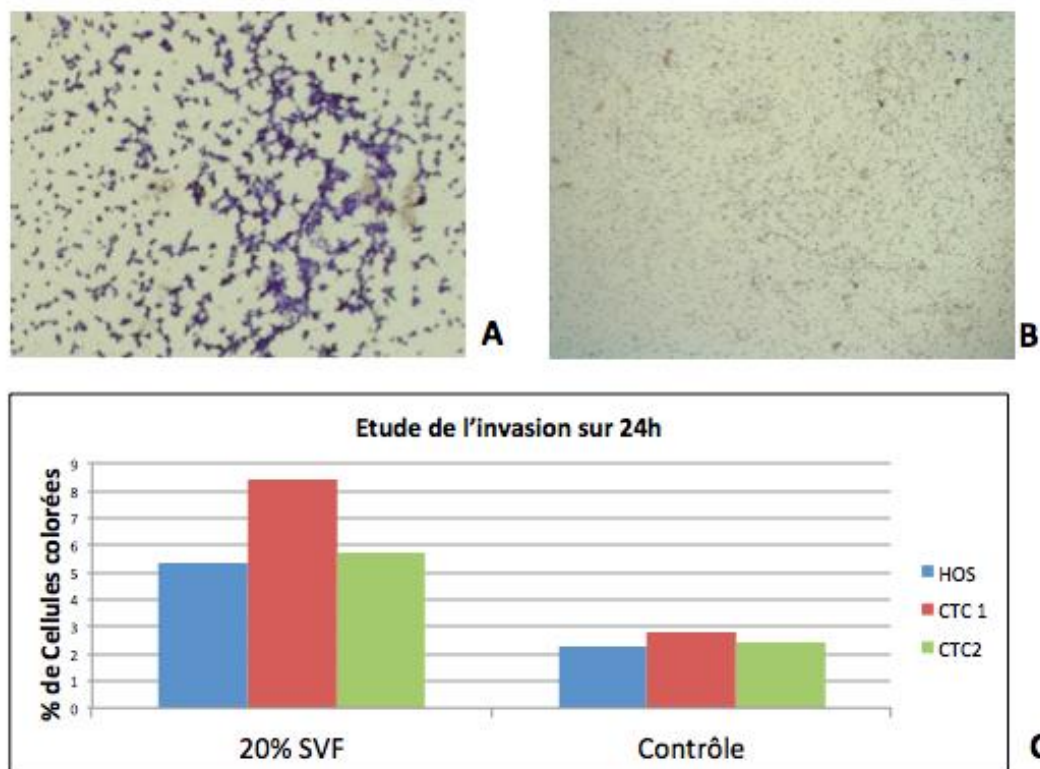


Figure 23: Analyse de l'invasion cellulaire sur 24h Coloration au Crystal Violet (grossissement x4). A) CTC 1 ; B) CTC 2 ; C: Etude de l'invasion des trois lignées cellulaires.

5.4.4 PCR Quantitative

Les profils d'expression étaient comparables entre les 3 lignées cellulaires pour les gènes JAMB, IFNRA1 et IL 13. Le gène CD99 était plus amplifié chez les CTC 1 et 2 comparativement aux cellules HOS GFP positives. Il existait une différence significative d'amplification pour les gènes ADAM 8 et ENDRA entre les CTCs 1 et 2 et les cellules HOS GFP positives. Enfin, l'expression du gène LTK était variable d'une lignée à l'autre. (Figure 24)

L'analyse des gènes préalablement identifiés a permis de montrer que le gène CD 99 était plus amplifié chez les CTC 1 et 2 comparativement aux cellules HOS GFP positives, respectivement à 2,820 et 2,3 2-DDCt chez les CTCs 1 et 2 et à 1 2-DDCt chez les HOS GFP positives.

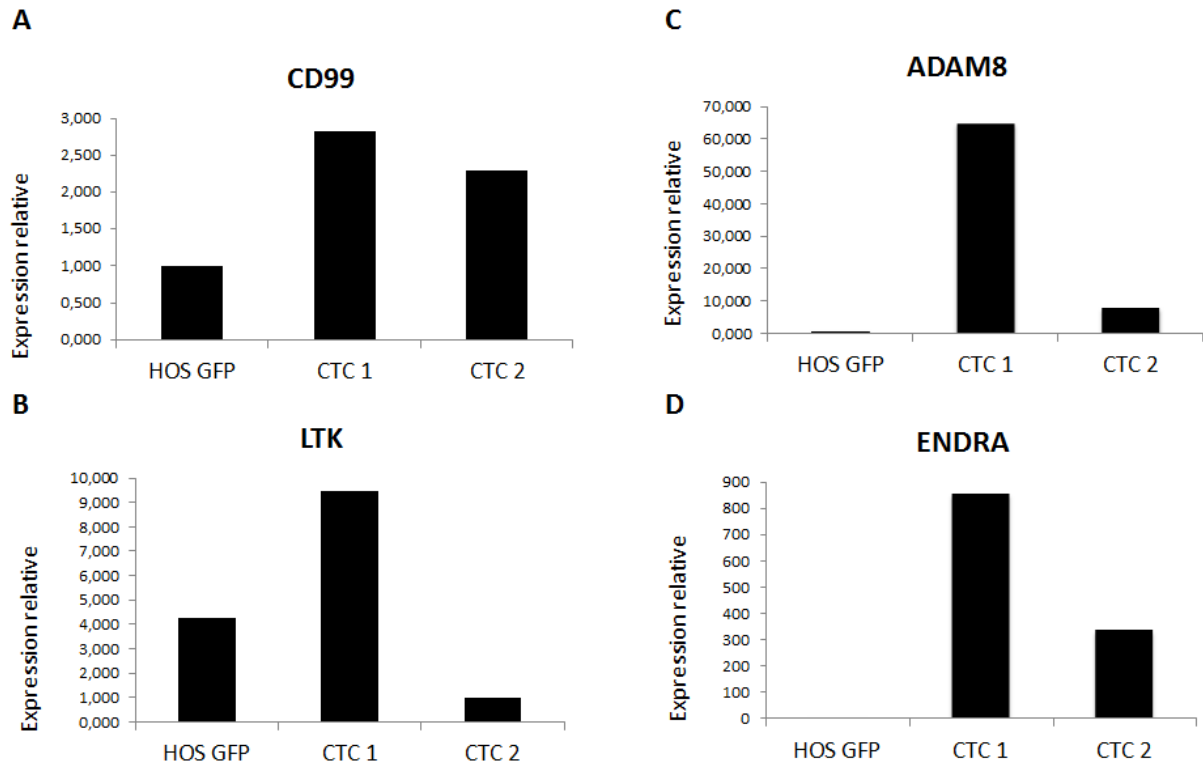


Figure 24: Etude de l'expression de gènes par la lignée cellulaire d'ostéosarcome MMNG/HOS et des CTCs isolées. Le niveau d'expression des gènes à été déterminé par RT-PCR quantitative. **(A)** CD99, **(B)** LTK, **(C)** ADAM 8, **(D)** ENDRA

6. Discussion

6.1 Les enjeux de l'isolement des CTCs dans les sarcomes

La maladie métastatique est le facteur le plus important qui détermine la survie de la grande majorité des patients nouvellement diagnostiqués avec un sarcome (Amankwah, Conley, et Reed 2013). Même si l'incidence est faible, le sarcome présente un taux de mortalité élevé en raison d'un potentiel métastatique élevé, d'un diagnostic tardif et d'un risque de récurrence (Woll et al. 2012).

Avant de s'implanter dans un autre organe pour donner naissance à des métastases, des cellules de la tumeur primitive sont libérées dans la circulation sanguine : ce sont les cellules tumorales circulantes. Les repérer, les caractériser constitue un enjeu capital pour la compréhension du processus de dissémination métastatique. La détection des CTCs a prouvé une utilité clinique et thérapeutique significative dans les carcinomes épithéliaux. En effet, plusieurs études ont mis en évidence dans les cancers épithéliaux que les patients atteints d'un carcinome au stade métastatique chez qui les CTCs sont détectables ont un plus mauvais pronostic que les patients dont les CTCs sont indétectables (Cristofanilli et al. 2005; Danila et al. 2007). Le nombre de CTCs détectées semble aussi être corrélé au stade de la maladie ou encore à la présence de métastase (Hou et al. 2009).

L'ostéosarcome est le sarcome osseux le plus fréquent chez les adolescents. Malheureusement, une mauvaise réponse thérapeutique à la chimiothérapie conventionnelle est fréquemment observée conduisant au développement de foyers métastatiques et soulignant la nécessité d'améliorer les schémas thérapeutiques actuels et d'identifier des biomarqueurs précoces de la maladie récurrente et/ou métastatique. La présente étude a analysé la valeur biologique des CTCs dans la circulation sanguine dans un modèle préclinique d'ostéosarcome.

Les travaux portant sur la détection et la capture des CTC dans l'ostéosarcome ont été entravés en raison de l'absence de marqueurs spécifiques exprimés par les cellules cancéreuses mésenchymateuses (Satelli et al. 2014).

6.2 Détection précoce des CTCs

Compte tenu de la rareté des CTCs et de la difficulté de les isoler chez les patients, de nombreuses équipes ont développé des modèles xénogéniques pré-cliniques semblables à notre modèle pré-clinique d'ostéosarcome murin pour étudier et isoler des CTCs (Yu et al. 2011). Ces modèles possèdent comme principale limite de ne pas mimer le micro environnement vasculaire qui semble jouer un rôle majeur dans la dissémination hématogène des cellules cancéreuses. Nos résultats montrent que l'extravasation de cellules tumorales d'ostéosarcome dans la circulation sanguine est un processus précoce intervenant dès le 10^{ième} jour dans notre modèle murin confirmant des résultats similaires dans un modèle murin xénogénique de cancer du sein (Hüsemann et al. 2008). Les données de cette étude suggèrent que des CTCs sont présentes dans la circulation sanguine avant que la tumeur ne soit palpable ou mesurable dans leur modèle murin. Il existe très peu de données chez l'homme sur le moment de la présence des CTCs dans la circulation (Stott et al. 2010).

6.3 CTCs et Ifosfamide

Cette étude est la première étude portant sur la régulation de la libération de CTCs après une chimiothérapie dans l'ostéosarcome.

L'ifosfamide est un agent alkylant qui intéragit directement avec l'ADN pour former des liaisons covalentes par l'intermédiaire de radicaux alcoyles aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. L'action de l'ifosfamide est cycle-dépendante. L'ifosfamide est une chimiothérapie néo-adjuvante de référence dans l'ostéosarcome administrée à la dose de 30 mg/kg par cycles de 3 jours (Jürgens et al. 1989).

Quelque soit le protocole de notre étude utilisant l'ifosfamide, nous avons systématiquement constaté un effet sur le volume tumoral avec parfois une différence significative avec le groupe contrôle et toujours un ralentissement de la croissance tumorale observé.

Au stade précoce du développement de l'ostéosarcome, un cycle d'ifosfamide (15 ou 30 mg/Kg) n'a eu aucun effet significatif sur la croissance de la tumeur primaire. Cependant, un fort impact sur le processus métastatique a été observé et a été caractérisé par une

diminution du nombre de métastases pulmonaires et, de manière surprenante, par une augmentation du nombre total de CTCs viables.

À un stade ultérieur, un ou deux cycles d'ifosfamide ont eu un effet bénéfique significatif sur la croissance des tumeurs primaires et aucun impact sur la libération de CTC dans la circulation sanguine.

Nous avons observé un effet opposé de l'ifosfamide sur le nombre de CTCs et la formation de métastases pulmonaires au stade précoce du développement tumoral. En effet, l'ifosfamide a diminué le nombre de nodules pulmonaires alors que le nombre de CTCs a augmenté sur la période de temps et peut être considéré comme un nouvel outil biologique pour surveiller la réponse thérapeutique.

Sur les tumeurs établies, l'ifosfamide quel que soit le schéma posologique, a eu un bénéfice thérapeutique démontré par un ralentissement de la progression tumorale après administration du médicament. Les effets différentiels de l'ifosfamide sur le volume tumoral entre les stades précoces et tardifs du développement tumoral pourraient s'expliquer par le réseau vasculaire formé dans les tumeurs établies conduisant à une biodisponibilité plus élevée de l'ifosfamide à proximité des tissus tumoraux. Après inoculation, les cellules cancéreuses établissent un contact cellulaire avec leur microenvironnement et prolifèrent progressivement et élaborent une matrice ostéoïde (Luetke et al. 2014; Alfranca et al. 2015; Heymann et al. 2016). La fragilité de l'interface entre les cellules cancéreuses et leur environnement à un stade précoce pourrait expliquer la libération importante de CTCs après une cure d'ifosfamide non observée aux stades ultérieurs. Le nombre de CTCs était plus élevé dans les grosses tumeurs qu'au stade précoce de la maladie et n'était pas modulé par l'ifosfamide révélant un état potentiel « d'équilibre » ou « de saturation » dans le processus métastatique de l'ostéosarcome. Cependant, les CTCs détectables après traitement à l'ifosfamide semblent incapables d'induire la formation de métastases pulmonaires. Cette augmentation pourrait s'expliquer par une libération de cellules cancéreuses phénotypiquement altérées à partir de la tumeur primitive induite par la chimiothérapie et aux propriétés réduites d'induction de métastases pulmonaires.

Le nombre de CTCs peut refléter la réponse thérapeutique suggérant un fort intérêt clinique dans le suivi des patients atteints d'ostéosarcome. Ainsi, par exemple un inhibiteur de MTH1 inhibe la croissance tumorale des tumeurs primaires et le processus métastatique

dans un modèle similaire à celui utilisé dans nos travaux. Cet effet est corrélé avec une réduction du nombre de CTCs dans la circulation sanguine (Moukengue et al. 2020).

L'extravasation des CTCs est un mécanisme complexe mélangeant les propriétés physiques des cellules cancéreuses (déformabilité) et des aspects biologiques tels que les propriétés génétiques et les molécules d'adressage spécifiques qui conduisent à la reconnaissance réciproque des parois des vaisseaux lymphatiques/sanguins d'organes distants par les CTCs. Par conséquent, l'hétérogénéité des CTCs et les spécificités phénotypiques entraînent leur extravasation dans le site métastatique et la formation de nodules métastatiques (Luetke et al. 2014; Micalizzi et al. 2017).

6.4 Caractérisation moléculaire des CTCs

Globalement, notre étude renforce l'intérêt potentiel de dénombrer et de caractériser les CTCs dans l'ostéosarcome. L'index de prolifération des CTCs dans notre étude diffère selon les lignées confirmant l'hétérogénéité de l'index de prolifération des CTCs retrouvée dans les cancers de prostate métastatiques (Stott et al. 2010). Ces auteurs ont montré que selon le traitement réalisé (chirurgie d'exérèse ou castration progressive), le taux de prolifération des CTCs était plus élevé chez les patients non opérés. Il n'existe cependant pas de différence significative entre les HOS GFP positives et les CTCs 1 et 2 concernant le temps de doublement.

Le mafosfamide a été utilisé à la place de l'ifosfamide qui nécessite une métabolisation hépatique pour agir rendant son utilisation *in vitro* impossible. Il existe une différence de sensibilité des CTC 1 et 2 avec les HOS pour le Mafosfamide. Cette variabilité de sensibilité aux traitements des CTCs a déjà été mise en évidence dans la littérature pour les carcinomes avec le plus souvent une résistance aux traitements (Polyak et Weinberg 2009). Cette variabilité est liée aux différences phénotypiques existant entre les cellules de la tumeur primaire et les CTCs. Cela confirme les résultats de nos protocoles *in vivo*.

Dans une étude précédente, des différences d'expression génique ont été observées entre les cellules de tumeur primitive et les cellules des métastases pulmonaires dans notre modèle pré-clinique d'ostéosarcome pour les gènes ADAM8, LTK, IFNRA1, ENDRA, JAMB, CD 99 et IL13 (Tellez-Gabriel et al., données non publiées). Plusieurs de ces gènes sont impliqués

dans les phénomènes d'adhérence cellulaire. Il nous a donc semblé intéressant de comparer le profil d'expression génique entre les cellules de la tumeur primitive et les CTCs pour ces différents gènes. Plusieurs études dans les carcinomes ont confirmé des variations d'expression génique entre les cellules de la tumeur primaire, les CTCs et les métastases (Attard et al. 2009). Il existe dans notre étude une différence significative d'expression du gène ADAM 8 entre les cellules HOS GFP positives et les CTCs 1 et 2. Le gène ADAM 8 code pour une désintégrine et une métalloprotéase impliqué dans l'adhérence cellulaire. Il existe également une différence d'expression pour le gène CD 99 qui est lui aussi impliqué dans les phénomènes d'adhésion cellulaire. Le CD 99 est un marqueur utilisé pour la détection des CTCs dans les sarcomes d'Ewing (Dubois et al. 2010). Une étude récente a également mis en évidence un rôle du CD99 dans la différenciation terminale des cellules tumorales de l'ostéosarcome (Sciandra et al. 2014). En effet, l'expression du CD99 augmenterait l'expression de certains marqueurs membranaires et de certains facteurs de transcription ostéogéniques. De plus, il existe également des variations d'expression génique entre les CTC 1 et 2 confirmant une hétérogénéité entre les différentes populations de CTCs.

En plus de valider l'importance de l'étude de CTCs dans l'ostéosarcome, Li *et al.* ont suggéré que les caractéristiques moléculaires des CTCs devraient également représenter des marqueurs diagnostiques et pronostiques (Li et al. 2019). La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique par lequel les cellules épithéliales perdent leur polarité cellulaire, augmentent leur motilité et gagnent en propriétés pour devenir mésenchymateuses (Dai et al. 2019). L'événement majeur de l'EMT est la perte de marqueurs épithéliaux et l'augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux, y compris la vimentine (Wang et al. 2017).

A l'aide du DEPAarray, nous envisageons d'élargir le choix de marqueurs membranaires des CTCs d'ostéosarcomes afin d'essayer de mettre en évidence de nouveaux marqueurs pronostiques.

6.5 CTCs et hétérogénéité tumorale

Plus de 200 essais cliniques focalisés sur les CTCs sont enregistrés dans la base de données du NIH (clinical trial.gov) et 79 sont en cours de recrutement, illustrant

l'extraordinaire engouement pour la biologie des CTCs et leur potentielle valeur biologique et/ ou clinique (Brown et al. 2019). Le nombre de CTC est corrélé dans la plupart des études avec la progression de la maladie. Cependant, il a également été démontré que le phénotype des CTCs (par exemple, le profil des miARN) n'est pas toujours corrélé au nombre de CTC en raison de leur grande hétérogénéité et qu'il pourrait être modulé au cours du traitement (Joosse et al. 2018). Par conséquent, il est nécessaire de déterminer si les CTCs pourraient refléter la tumeur primaire ou les foyers métastatiques et comment les CTCs sont modulés au cours de la progression tumorale.

De Luca *et al.* ont effectué un séquençage nouvelle génération des CTCs de quatre patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique et a trouvé une discordance entre les statut mutationnel de la tumeur primitive et des CTCs chez 3 patientes (De Luca et al. 2016) renforçant les données obtenues par Jabokova *et al.*, selon lesquelles le statut HER2 et ESR des CTCs différait du statut des tumeurs primitives (Jordan et al. 2016). Il va donc falloir étudier les CTCs des ostéosarcomes à l'aide du séquençage nouvelle génération.

6.6 Perspectives

Des approches répétables, peu invasives et rentables pour l'évaluation en temps réel des biomarqueurs pertinents et le suivi des thérapies anticancéreuses dans la circulation sanguine ont été développées pour surmonter les limites intrinsèques des biopsies de tumeurs primaires et de métastases. Ce domaine d'investigation a été appelé «biopsie liquide» et comprend les CTCs.

Les caractéristiques des CTCs peuvent être considérées comme un instantané du volume global de la tumeur (tumeur primaire et métastases). Par rapport à d'autres biopsies liquides, les CTCs sont un peu plus difficiles à isoler mais peuvent être analysés au niveau de l'ADN, de l'ARN et des protéines.

La modélisation de CTC dérivés de patients sous forme de sphère en 3D pourrait ainsi permettre de tester différentes thérapeutiques surtout en cas de progression tumorale en cours de chimiothérapie conventionnelle. Ainsi, les CTCs sont un matériel biologique facilement accessible et un outil utile dans l'étude fonctionnelle de la progression tumorale.

Une combinaison d'isolement de CTC avec des analyses génomiques complètes et d'ARN en aval est une approche prometteuse pour mieux refléter la réponse thérapeutique,

anticiper la résistance aux médicaments et s'adapter traitement au jour le jour, patient par patient (Markou et al. 2018). Un profil cinétique des CTCs par rapport au tissu tumoral complétera le tableau complet de la progression de la maladie et pourrait être la base d'une future médecine personnalisée en oncologie (Brown et al. 2019).

Dans étude récente dans le cancer du sein, la cinétique de libération des CTCs a été étudiée. Diamantopoulou et al. ont observé chez deux patientes atteintes d'un cancer du sein que la plupart des événements spontanés d'intravasation de CTCs dans la circulation surviennent pendant le sommeil. De plus, ils ont démontré que les CTCs en phase de repos sont plus susceptibles de générer des métastases. Ils ont pu mettre en évidence que les principales hormones du rythme circadien telles que la mélatonine, la testostérone, les glucocorticoïdes ou encore l'insuline dictent la dynamique de production de CTCs en particulier durant la phase de repos de la personne affectée (Diamantopoulou et al. 2022).

La prochaine étape de cette étude de preuve de concept consistera à déterminer la valeur des CTCs dans l'ostéosarcome, à la fois d'un point de vue biologique et clinique, il sera donc nécessaire d'énumérer et de caractériser les CTC dans une grande série de patients métastatiques et non métastatiques. Il est également prévu d'évaluer la cinétique de libération des CTCs pendant la chimiothérapie.

Ce futur essai clinique s'inscrit donc dans la continuité de ce travail et s'appuie sur les nouvelles technologies dont nous disposons. En effet, notre équipe a validé un protocole de détection de CTCs chez des patients atteints d'ostéosarcome (Cochonneau D et al, données non publiées). Il repose sur une étape d'enrichissement des échantillons sanguins reposant sur l'utilisation de cassettes microfluidiques PARSORTIX™. Cette méthode permet de pré-enrichir les échantillons sanguins (de 10 mL de sang total prélevé sur tube STRECK™ ou EDTA, obtention d'une fraction enrichie de moins de 200 µL) selon une méthode physique (grande taille et faible déformabilité des CTCs en comparaison des cellules saines. Cette méthode permet de s'affranchir d'une pré-sélection reposant sur un marqueur biologique. L'étape d'isolement repose sur l'utilisation de la version NEXT du DEPArray (Figure 25). L'utilisation combinée de la détection de la vimentine, de la cytokératine, du CD45 et de la détermination de l'index ADN par un marquage DAPI permet d'isoler les CTCs (vimentine⁺, cytokératine^{+/-}, CD45⁻, index ADN élevé). L'extraction de l'ADN des CTCs suivie

par un séquençage basse profondeur permet de démontrer les altérations des CNV (Copy Number Variation) et de suivre l'évolution clonales des CTCs chez les patients.

Les CTCs isolées ont montré de nombreuses altérations génomiques et ce séquençage confirme une grande hétérogénéité des CTCs (Figure 26).

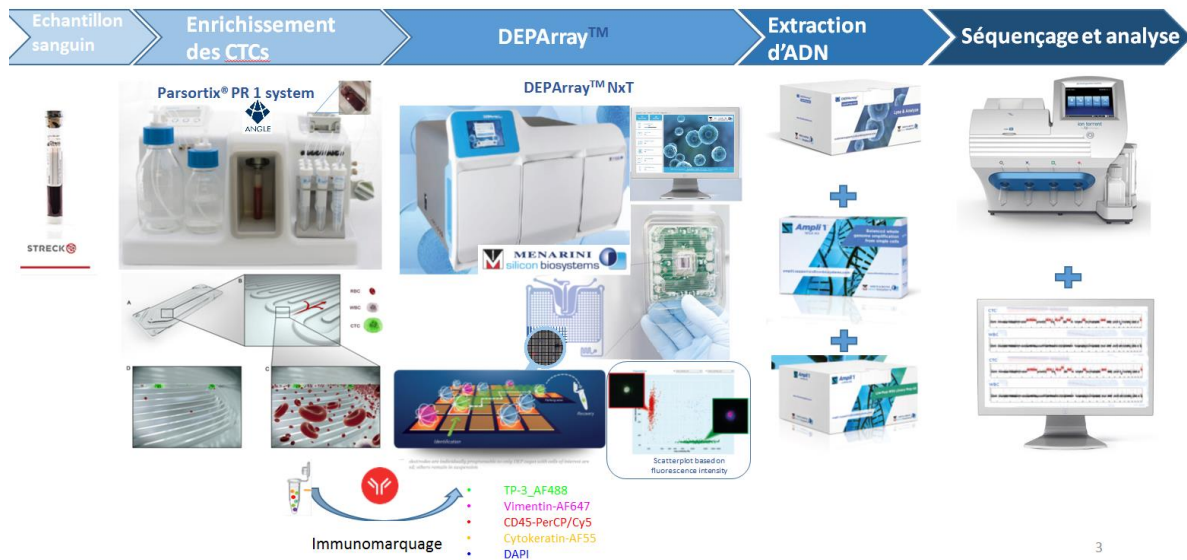


Figure 25: Nouveau protocole d'isolement et de caractérisation des CTCs à partir d'échantillons sanguins de patients atteints d'ostéosarcome. (Source : Cochonneau D et al.)

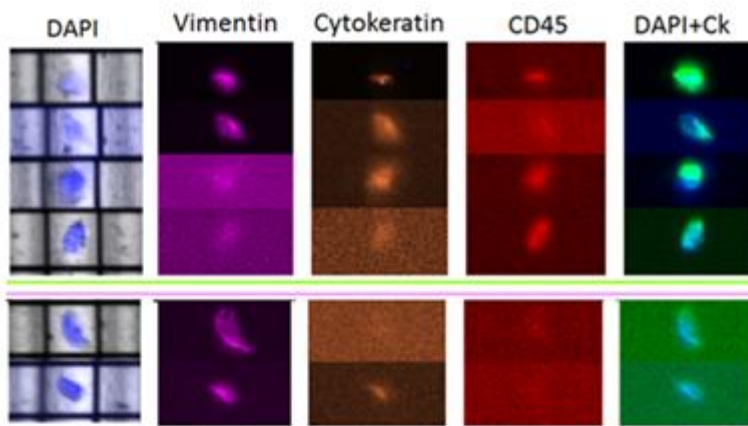
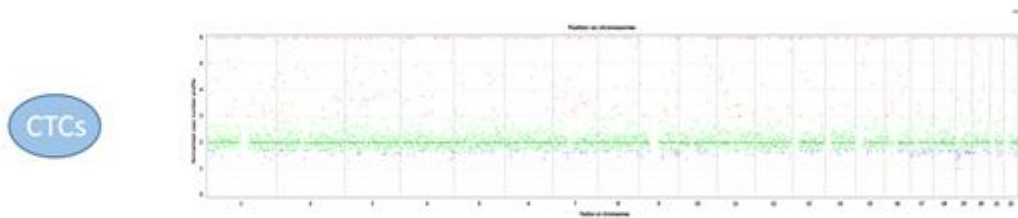
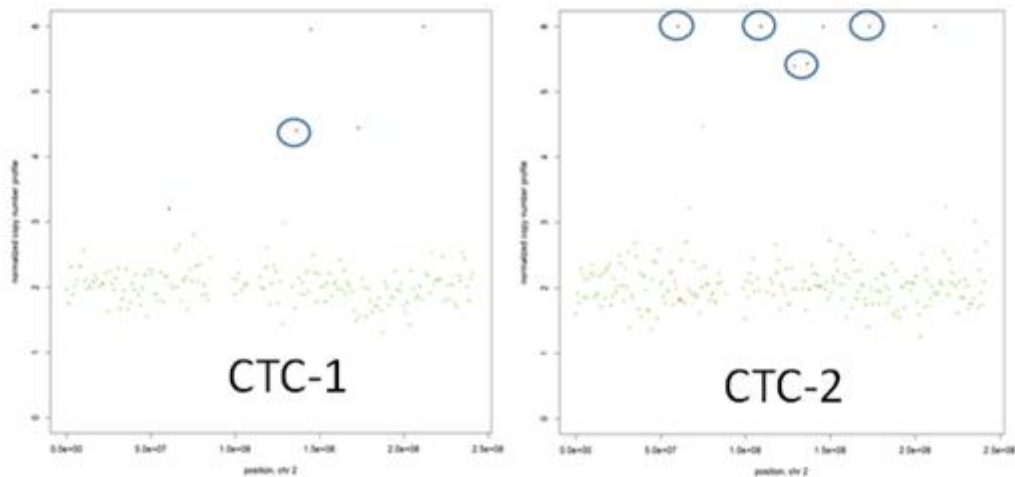
A**B****C**

Figure 26 : A : Isolement de CTCs à l'aide du DEPArray, CTCs CD45⁻, Vimentine⁺, Cytokératine^{+/-}, Index ADN anormal. **B :** Variation du nombre de copies après séquençage d'une lignée de CTCs. **C :** Variation du nombre de copies au niveau du chromosome 2 pour deux lignées de CTCs chez un même patient (Source : Cochonneau D et al.)

Notre équipe participe actuellement à l'essai *ICONIC* (Improving Outcomes Through Collaboration in Osteosarcoma) comme co-investigateur (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04132895). Notre équipe est impliquée dans la détection et la caractérisation des CTCs afin de définir leur valeur pour prédire la réponse au traitement et détecter la maladie résiduelle. *ICONIC* est le tout premier registre de patients et la toute première étude clinique du Royaume-Uni visant à recueillir des échantillons de patients et des données médicales complètes auprès de patients atteints d'ostéosarcomes de tous âges. L'étude combinée de ces deux éléments offre les meilleures chances de découvrir de nouveaux traitements et de comprendre quels patients en bénéficieront. L'étude est dirigée par le Dr Sandra Strauss, basée à l'University College London et regroupe 15 centres cliniques. Les objectifs de ce projet sont :

- découvrir et valider des biomarqueurs circulants et tumoraux qui nous permettent de mieux déterminer quels patients sont susceptibles de bénéficier d'un traitement spécifique et quels patients présentent un risque plus élevé,

- d'établir une corrélation entre les caractéristiques moléculaires des tumeurs et les résultats cliniques afin d'identifier les patients à haut risque et de contribuer à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques,

- de décrire les variations dans le traitement que les patients reçoivent au Royaume-Uni et utiliser ces informations pour développer de nouveaux protocoles ou de meilleures stratégies de gestion,

- de bénéficier de données en sciences humaines et sociales en particulier de mieux appréhender le ressenti des patients au cours de leur traitement,

- d'utiliser les connaissances acquises pour développer de nouveaux essais cliniques.

L'inclusion des 240 patients a débuté en Octobre 2019 et se poursuit. *ICONIC* inclut des patients pédiatriques et adultes.

Notre objectif est de mettre en place un essai clinique chez les patients pédiatriques souffrant d'ostéosarcomes associant l'isolement des CTCs comme précédemment et leur caractérisation par séquençage de l'ARN et analyse du profil de méthylation de ces cellules au cours du traitement.

7. Références

- Abouleila, Yasmine, Kaoru Onidani, Ahmed Ali, Hirokazu Shoji, Takayuki Kawai, Chwee Teck Lim, Vipin Kumar, et al. 2019. « Live Single Cell Mass Spectrometry Reveals Cancer-Specific Metabolic Profiles of Circulating Tumor Cells ». *Cancer Science* 110 (2): 697-706. <https://doi.org/10.1111/cas.13915>.
- Aceto, Nicola, Aditya Bardia, David T. Miyamoto, Maria C. Donaldson, Ben S. Wittner, Joel A. Spencer, Min Yu, et al. 2014. « Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis ». *Cell* 158 (5): 1110-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>.
- Agnoletto, Chiara, Chiara Caruso, et Cecilia Garofalo. 2021. « Heterogeneous Circulating Tumor Cells in Sarcoma: Implication for Clinical Practice ». *Cancers* 13 (9): 2189. <https://doi.org/10.3390/cancers13092189>.
- Alfranca, Arantzazu, Lucia Martinez-Cruzado, Juan Tornin, Ander Abarrategi, Teresa Amaral, Enrique de Alava, Pablo Menendez, Javier Garcia-Castro, et Rene Rodriguez. 2015. « Bone Microenvironment Signals in Osteosarcoma Development ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 72 (16): 3097-3113. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1918-y>.
- Alix-Panabières, Catherine, et Klaus Pantel. 2014. « Challenges in Circulating Tumour Cell Research ». *Nature Reviews. Cancer* 14 (9): 623-31. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>.
- . 2016. « Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy ». *Cancer Discovery* 6 (5): 479-91. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>.
- Allen, Bj. 2013. « Systemic Targeted Alpha Radiotherapy for Cancer ». *Journal of Biomedical Physics & Engineering* 3 (3): 67-80.
- Almog, Nava, Lili Ma, Raktima Raychowdhury, Christian Schwager, Ralf Erber, Sarah Short, Lynn Hlatky, et al. 2009. « Transcriptional Switch of Dormant Tumors to Fast-Growing Angiogenic Phenotype ». *Cancer Research* 69 (3): 836-44. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2590>.
- Amankwah, Ernest K., Anthony P. Conley, et Damon R. Reed. 2013. « Epidemiology and Therapies for Metastatic Sarcoma ». *Clinical Epidemiology* 5: 147-62. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S28390>.
- Anderson, Peter M., Vivek Subbiah, et Eric Rohren. 2014. « Bone-Seeking Radiopharmaceuticals as Targeted Agents of Osteosarcoma: Samarium-153-EDTMP and Radium-223 ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 804: 291-304. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04843-7_16.
- Ando, Kosei, Kanji Mori, Nedège Corradini, Françoise Redini, et Dominique Heymann. 2011. « Mifamurtide for the Treatment of Nonmetastatic Osteosarcoma ». *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 12 (2): 285-92. <https://doi.org/10.1517/14656566.2011.543129>.
- Andreopoulou, E., L.-Y. Yang, K. M. Rangel, J. M. Reuben, L. Hsu, S. Krishnamurthy, V. Valero, H. A. Fritsche, et M. Cristofanilli. 2012. « Comparison of Assay Methods for Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ System ». *International Journal of Cancer* 130 (7): 1590-97. <https://doi.org/10.1002/ijc.26111>.
- Angermueller, Christof, Stephen J. Clark, Heather J. Lee, Iain C. Macaulay, Mabel J. Teng, Tim Xiaoming Hu, Felix Krueger, et al. 2016. « Parallel Single-Cell Sequencing Links Transcriptional and Epigenetic Heterogeneity ». *Nature Methods* 13 (3): 229-32. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3728>.
- Attard, Gerhardt, Joost F. Swennenhuis, David Olmos, Alison H. M. Reid, Elaine Vickers, Roger A'Hern, Rianne Levink, et al. 2009. « Characterization of ERG, AR and PTEN Gene Status in Circulating

- Tumor Cells from Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Cancer Research* 69 (7): 2912-18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3667>.
- Au, Sam H., Brian D. Storey, John C. Moore, Qin Tang, Yeng-Long Chen, Sarah Javaid, A. Fatih Sarioglu, et al. 2016. « Clusters of Circulating Tumor Cells Traverse Capillary-Sized Vessels ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (18): 4947-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524448113>.
- Avigad, Smadar, Ian J. Cohen, Julia Zilberstein, Ella Liberzon, Yacov Goshen, Shifra Ash, Isaac Meller, et al. 2004. « The Predictive Potential of Molecular Detection in the Nonmetastatic Ewing Family of Tumors ». *Cancer* 100 (5): 1053-58. <https://doi.org/10.1002/cncr.20059>.
- Avnet, Sofia, Alessandra Longhi, Manuela Salerno, Jussi M. Halleen, Francesca Perut, Donatella Granchi, Stefano Ferrari, Franco Bertoni, Armando Giunti, et Nicola Baldini. 2008. « Increased Osteoclast Activity Is Associated with Aggressiveness of Osteosarcoma ». *International Journal of Oncology* 33 (6): 1231-38.
- Baat, P. de, M. P. Heijboer, et C. de Baat. 2005. « [Development, physiology, and cell activity of bone] ». *Nederlands Tijdschrift Voor Tandheelkunde* 112 (7): 258-63.
- Bagatell, R., C. E. Herzog, T. M. Trippett, J. F. Grippo, G. Cirrincione-Dall, E. Fox, M. Macy, et al. 2011. « Pharmacokinetically Guided Phase 1 Trial of the IGF-1 Receptor Antagonist RG1507 in Children with Recurrent or Refractory Solid Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (3): 611-19. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1731>.
- Baglio, S. Rubina, Tonny Lagerweij, Maria Pérez-Lanzón, Xuan Dung Ho, Nicolas Léveillé, Sonia A. Melo, Anne-Marie Cleton-Jansen, et al. 2017. « Blocking Tumor-Educated MSC Paracrine Activity Halts Osteosarcoma Progression ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 23 (14): 3721-33. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2726>.
- Bago-Horvath, Zsuzsanna, Katharina Schmid, Fabian Rössler, Katalin Nagy-Bojarszky, Philipp Funovics, et Irene Sulzbacher. 2014. « Impact of RANK Signalling on Survival and Chemotherapy Response in Osteosarcoma ». *Pathology* 46 (5): 411-15. <https://doi.org/10.1097/PAT.000000000000116>.
- Barczyk, Malgorzata, Sergio Carracedo, et Donald Gullberg. 2010. « Integrins ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 269-80. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.
- Baud'huin, Marc, Romain Renault, Céline Charrier, Anne Riet, Anne Moreau, Régis Brion, François Gouin, Laurence Duplomb, et Dominique Heymann. 2010. « Interleukin-34 Is Expressed by Giant Cell Tumours of Bone and Plays a Key Role in RANKL-Induced Osteoclastogenesis ». *The Journal of Pathology* 221 (1): 77-86. <https://doi.org/10.1002/path.2684>.
- Becker, F. F., X. B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal, et P. R. Gascoyne. 1995. « Separation of Human Breast Cancer Cells from Blood by Differential Dielectric Affinity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (3): 860-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.860>.
- Bedzhov, Ivan, Sarah J. L. Graham, Chuen Yan Leung, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2014. « Developmental Plasticity, Cell Fate Specification and Morphogenesis in the Early Mouse Embryo ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369 (1657): 20130538. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0538>.
- Beije, Nick, Wendy Onstenk, Jaco Kraan, Anieta M. Sieuwerts, Paul Hamberg, Luc Y. Dirix, Anja Brouwer, et al. 2016. « Prognostic Impact of HER2 and ER Status of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with a HER2-Negative Primary Tumor ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 18 (11): 647-53. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.08.007>.
- Benini, Stefania, Gabriella Gamberi, Stefania Cocchi, Jessica Garbetta, Laurent Alberti, Alberto Righi, Marco Gambarotti, Piero Picci, et Stefano Ferrari. 2018. « Detection of Circulating Tumor Cells in Liquid Biopsy from Ewing Sarcoma Patients ». *Cancer Management and Research* 10: 49-60. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S141623>.

- Berman, Seth D., Eliezer Calo, Allison S. Landman, Paul S. Danielian, Emily S. Miller, Julie C. West, Borel Djouedjong Fonhoue, et al. 2008. « Metastatic Osteosarcoma Induced by Inactivation of Rb and P53 in the Osteoblast Lineage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33): 11851-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805462105>.
- Bian, Zhen-Yu, Qi-Ming Fan, Gang Li, Wen-Ting Xu, et Ting-Ting Tang. 2010. « Human Mesenchymal Stem Cells Promote Growth of Osteosarcoma: Involvement of Interleukin-6 in the Interaction between Human Mesenchymal Stem Cells and Saos-2 ». *Cancer Science* 101 (12): 2554-60. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01731.x>.
- Bickels, J., J. S. Jelinek, B. M. Shmookler, R. S. Neff, et M. M. Malawer. 1999. « Biopsy of Musculoskeletal Tumors. Current Concepts ». *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n° 368 (novembre): 212-19.
- Bidard, François-Clément, Stefan Michiels, Sabine Riethdorf, Volkmar Mueller, Laura J. Esserman, Anthony Lucci, Bjørn Naume, et al. 2018. « Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-Analysis ». *Journal of the National Cancer Institute* 110 (6): 560-67. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy018>.
- Bielack, S., B. Kempf-Bielack, T. Von Kalle, R. Schwarz, T. Wirth, L. Kager, et J. Whelan. 2013. « Controversies in Childhood Osteosarcoma ». *Minerva Pediatrica* 65 (2): 125-48.
- Bielack, Stefan S., Beate Kempf-Bielack, Günter Delling, G. Ulrich Exner, Silke Flege, Knut Helmke, Rainer Kotz, et al. 2002. « Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (3): 776-90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.776>.
- Bielack, Stefan S., Sigbjørn Smeland, Jeremy S. Whelan, Neyssa Marina, Gordana Jovic, Jane M. Hook, Mark D. Krailo, et al. 2015. « Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (20): 2279-87. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0734>.
- Biller, B. J., A. Guth, J. H. Burton, et S. W. Dow. 2010. « Decreased Ratio of CD8+ T Cells to Regulatory T Cells Associated with Decreased Survival in Dogs with Osteosarcoma ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 (5): 1118-23. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0557.x>.
- Bingham, Catherine, Sandra V. Fernandez, Patricia Fittipaldi, Paul W. Dempsey, Karen J. Ruth, Massimo Cristofanilli, et R. Katherine Alpaugh. 2017. « Mutational Studies on Single Circulating Tumor Cells Isolated from the Blood of Inflammatory Breast Cancer Patients ». *Breast Cancer Research and Treatment* 163 (2): 219-30. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4176-x>.
- Bolognesi, Chiara, Claudio Forcato, Genny Buson, Francesca Fontana, Chiara Mangano, Anna Doffini, Valeria Sero, et al. 2016. « Digital Sorting of Pure Cell Populations Enables Unambiguous Genetic Analysis of Heterogeneous Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tumors by Next Generation Sequencing ». *Scientific Reports* 6 (février): 20944. <https://doi.org/10.1038/srep20944>.
- Botteri, Edoardo, Maria Teresa Sandri, Vincenzo Bagnardi, Elisabetta Munzone, Laura Zorzino, Nicole Rotmensz, Chiara Casadio, et al. 2010. « Modeling the Relationship between Circulating Tumour Cells Number and Prognosis of Metastatic Breast Cancer ». *Breast Cancer Research and Treatment* 122 (1): 211-17. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0668-7>.
- Bousquet, M., C. Noirot, F. Accadbled, J. Sales de Gauzy, M. P. Castex, P. Brousset, et A. Gomez-Brouchet. 2016. « Whole-Exome Sequencing in Osteosarcoma Reveals Important

- Heterogeneity of Genetic Alterations ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (4): 738-44. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw009>.
- Boyle, William J., W. Scott Simonet, et David L. Lacey. 2003. « Osteoclast Differentiation and Activation ». *Nature* 423 (6937): 337-42. <https://doi.org/10.1038/nature01658>.
- Brard, Caroline, Sophie Piperno-Neumann, Jessy Delaye, Laurence Brugières, Lisa V. Hampson, Gwénaél Le Teuff, Marie-Cécile Le Deley, et Nathalie Gaspar. 2019. « Sarcome-13/OS2016 Trial Protocol: A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase II Trial of Mifamurtide Combined with Postoperative Chemotherapy for Patients with Newly Diagnosed High-Risk Osteosarcoma ». *BMJ Open* 9 (5): e025877. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-025877>.
- Braun, Alexcia Camila, Celso Abdon Lopes de Mello, Marcelo Corassa, Emne Ali Abdallah, Ana Cláudia Urvanegia, Vanessa Silva Alves, Bianca C. T. C. P. Flores, et al. 2018. « EGFR Expression in Circulating Tumor Cells from High-Grade Metastatic Soft Tissue Sarcomas ». *Cancer Biology & Therapy* 19 (6): 454-60. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1433498>.
- Broadhead, Matthew L., Peter F. M. Choong, et Crispin R. Dass. 2012. « Efficacy of Continuously Administered PEDF-Derived Synthetic Peptides against Osteosarcoma Growth and Metastasis ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012: 230298. <https://doi.org/10.1155/2012/230298>.
- Broersen, Leonie H. A., Gabi W. van Pelt, Rob A. E. M. Tollenaar, et Wilma E. Mesker. 2014. « Clinical Application of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer ». *Cellular Oncology (Dordrecht)* 37 (1): 9-15. <https://doi.org/10.1007/s13402-013-0160-6>.
- Brown, Hannah K., Marta Tellez-Gabriel, Pierre-François Cartron, François M. Vallette, Marie-Francoise Heymann, et Dominique Heymann. 2019. « Characterization of Circulating Tumor Cells as a Reflection of the Tumor Heterogeneity: Myth or Reality? ». *Drug Discovery Today* 24 (3): 763-72. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.11.017>.
- Brown, Hannah K., Marta Tellez-Gabriel, et Dominique Heymann. 2017. « Cancer Stem Cells in Osteosarcoma ». *Cancer Letters* 386 (février): 189-95. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.019>.
- Bruns, J., M. Elbracht, et O. Niggemeyer. 2001. « Chondrosarcoma of Bone: An Oncological and Functional Follow-up Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 12 (6): 859-64. <https://doi.org/10.1023/a:1011162118869>.
- Buddingh, Emilie P., Marieke L. Kuijjer, Ronald A. J. Duim, Horst Bürger, Konstantin Agelopoulos, Ola Myklebost, Massimo Serra, et al. 2011. « Tumor-Infiltrating Macrophages Are Associated with Metastasis Suppression in High-Grade Osteosarcoma: A Rationale for Treatment with Macrophage Activating Agents ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (8): 2110-19. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2047>.
- Burrow, S., I. L. Andrusis, M. Pollak, et R. S. Bell. 1998. « Expression of Insulin-like Growth Factor Receptor, IGF-1, and IGF-2 in Primary and Metastatic Osteosarcoma ». *Journal of Surgical Oncology* 69 (1): 21-27. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9098\(199809\)69:1<21::aid-jso5>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9098(199809)69:1<21::aid-jso5>3.0.co;2-m).
- Cameron, M. D., E. E. Schmidt, N. Kerkvliet, K. V. Nadkarni, V. L. Morris, A. C. Groom, A. F. Chambers, et I. C. MacDonald. 2000. « Temporal Progression of Metastasis in Lung: Cell Survival, Dormancy, and Location Dependence of Metastatic Inefficiency ». *Cancer Research* 60 (9): 2541-46.
- Carmeliet, Peter, et Rakesh K. Jain. 2011. « Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis ». *Nature* 473 (7347): 298-307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- Casadei, Lucia, Federica Calore, Chad J. Creighton, Michele Guescini, Kara Batte, O. Hans Iwenofu, Abeba Zewdu, et al. 2017. « Exosome-Derived MiR-25-3p and MiR-92a-3p Stimulate Liposarcoma Progression ». *Cancer Research* 77 (14): 3846-56. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2984>.

- Castro-Giner, Francesc, et Nicola Aceto. 2020. « Tracking Cancer Progression: From Circulating Tumor Cells to Metastasis ». *Genome Medicine* 12 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00728-3>.
- Chambers, Ann F., Alan C. Groom, et Ian C. MacDonald. 2002. « Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites ». *Nature Reviews. Cancer* 2 (8): 563-72. <https://doi.org/10.1038/nrc865>.
- Chan, Charles K. F., Gunsagar S. Gulati, Rahul Sinha, Justin Vincent Tompkins, Michael Lopez, Ava C. Carter, Ryan C. Ransom, et al. 2018. « Identification of the Human Skeletal Stem Cell ». *Cell* 175 (1): 43-56.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.029>.
- Chatterjee, Aniruddha, Euan J. Rodger, et Michael R. Eccles. 2018. « Epigenetic Drivers of Tumorigenesis and Cancer Metastasis ». *Seminars in Cancer Biology* 51 (août): 149-59. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.004>.
- Chauvin, Camille, Jean-Marie Philippeau, Caroline Hémond, Francois-Xavier Hubert, Yohann Wittrant, Francois Lamoureux, Benjamin Trinité, Dominique Heymann, Françoise Rédini, et Régis Josien. 2008. « Killer Dendritic Cells Link Innate and Adaptive Immunity against Established Osteosarcoma in Rats ». *Cancer Research* 68 (22): 9433-40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0104>.
- Chen, Xiang, Armita Bahrami, Alberto Pappo, John Easton, James Dalton, Erin Hedlund, David Ellison, et al. 2014. « Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma ». *Cell Reports* 7 (1): 104-12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.003>.
- Chicón-Bosch, Mariona, et Oscar M. Tirado. 2020. « Exosomes in Bone Sarcomas: Key Players in Metastasis ». *Cells* 9 (1): E241. <https://doi.org/10.3390/cells9010241>.
- Choi, Joon Hyuk, et Jae Y. Ro. 2021. « The 2020 WHO Classification of Tumors of Bone: An Updated Review ». *Advances in Anatomic Pathology* 28 (3): 119-38. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000293>.
- Cohen, S. J., C. J. A. Punt, N. Iannotti, B. H. Saidman, K. D. Sabbath, N. Y. Gabrail, J. Picus, et al. 2009. « Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 20 (7): 1223-29. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn786>.
- Constantino, João, Célia Gomes, Amílcar Falcão, Maria T. Cruz, et Bruno M. Neves. 2016. « Antitumor Dendritic Cell-Based Vaccines: Lessons from 20 Years of Clinical Trials and Future Perspectives ». *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 168 (février): 74-95. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.07.008>.
- Corr, Alexander, James Smith, et Paul Baldock. 2017. « Neuronal Control of Bone Remodeling ». *Toxicologic Pathology* 45 (7): 894-903. <https://doi.org/10.1177/0192623317738708>.
- Corre, Isabelle, Franck Verrecchia, Vincent Crenn, Françoise Redini, et Valérie Trichet. 2020. « The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex But Targetable Ecosystem ». *Cells* 9 (4): E976. <https://doi.org/10.3390/cells9040976>.
- Cortini, Margherita, Sofia Avnet, et Nicola Baldini. 2017. « Mesenchymal Stroma: Role in Osteosarcoma Progression ». *Cancer Letters* 405 (octobre): 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.024>.
- Cortini, Margherita, Annamaria Massa, Sofia Avnet, Gloria Bonuccelli, et Nicola Baldini. 2016. « Tumor-Activated Mesenchymal Stromal Cells Promote Osteosarcoma Stemness and Migratory Potential via IL-6 Secretion ». *PLoS One* 11 (11): e0166500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166500>.
- Crenn, Vincent, Jérôme Amiaud, Anne Gomez-Brouchet, Vincent Potiron, François Guin, Philippe Rosset, Louis-Romée Le Nail, et al. 2022. « Signature of the Vascular Tumor Microenvironment as a Marker of the Therapeutic Response to Doxorubicin in a Preclinical Model of Osteosarcoma ». *American Journal of Cancer Research* 12 (4): 1843-54.

- Cristofanilli, Massimo, Daniel F. Hayes, G. Thomas Budd, Mathew J. Ellis, Alison Stopeck, James M. Reuben, Gerald V. Doyle, et al. 2005. « Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (7): 1420-30. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.140>.
- Dai, Jun, Liang Qin, Yan Chen, Huan Wang, Guanlin Lin, Xiao Li, Hui Liao, et Huang Fang. 2019. « Matrix Stiffness Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition via Cytoskeletal Remodeling and MRTF-A Translocation in Osteosarcoma Cells ». *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 90 (février): 226-38. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.10.012>.
- Danila, Daniel C., Glenn Heller, Gretchen A. Gignac, Rita Gonzalez-Espinoza, Aseem Anand, Erika Tanaka, Hans Lilja, et al. 2007. « Circulating Tumor Cell Number and Prognosis in Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (23): 7053-58. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1506>.
- Dawson, Sarah-Jane, Dana W. Y. Tsui, Muhammed Murtaza, Heather Biggs, Oscar M. Rueda, Suet-Feung Chin, Mark J. Dunning, et al. 2013. « Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 368 (13): 1199-1209. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213261>.
- De Luca, Francesca, Giada Rotunno, Francesca Salvianti, Francesca Galardi, Marta Pestrin, Stefano Gabellini, Lisa Simi, et al. 2016. « Mutational Analysis of Single Circulating Tumor Cells by next Generation Sequencing in Metastatic Breast Cancer ». *Oncotarget* 7 (18): 26107-19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8431>.
- Desitter, Isabelle, Bella S. Guerrouahen, Naoual Benali-Furet, Janine Wechsler, Pasi A. Jänne, Yanan Kuang, Masahiko Yanagita, et al. 2011. « A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells ». *Anticancer Research* 31 (2): 427-41.
- Diamantopoulou, Zoi, Francesc Castro-Giner, Fabienne Dominique Schwab, Christiane Foerster, Massimo Saini, Selina Budinjas, Karin Strittmatter, et al. 2022. « The Metastatic Spread of Breast Cancer Accelerates during Sleep ». *Nature* 607 (7917): 156-62. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04875-y>.
- Dimitri, Paul, et Cliff Rosen. 2017. « The Central Nervous System and Bone Metabolism: An Evolving Story ». *Calcified Tissue International* 100 (5): 476-85. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0179-6>.
- Downing, James R., Richard K. Wilson, Jinghui Zhang, Elaine R. Mardis, Ching-Hon Pui, Li Ding, Timothy J. Ley, et William E. Evans. 2012. « The Pediatric Cancer Genome Project ». *Nature Genetics* 44 (6): 619-22. <https://doi.org/10.1038/ng.2287>.
- Dubois, Steven G., C. Lorrie Epling, Juli Teague, Katherine K. Matthay, et Elizabeth Sinclair. 2010. « Flow Cytometric Detection of Ewing Sarcoma Cells in Peripheral Blood and Bone Marrow ». *Pediatric Blood & Cancer* 54 (1): 13-18. <https://doi.org/10.1002/pbc.22245>.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, et G. Karsenty. 1997. « Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation ». *Cell* 89 (5): 747-54. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80257-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80257-3).
- Dumars, Clotilde, Jean-Michel Ngyuen, Aurélie Gaultier, Rachel Lanel, Nadège Corradini, François Gouin, Dominique Heymann, et Marie-Françoise Heymann. 2016. « Dysregulation of Macrophage Polarization Is Associated with the Metastatic Process in Osteosarcoma ». *Oncotarget* 7 (48): 78343-54. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13055>.
- Endo-Munoz, Liliana, Andrew Cumming, Danny Rickwood, Danielle Wilson, Claudia Cueva, Charlotte Ng, Geoffrey Stratton, et al. 2010. « Loss of Osteoclasts Contributes to Development of Osteosarcoma Pulmonary Metastases ». *Cancer Research* 70 (18): 7063-72. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4291>.

- Errani, Costantino, Alessandra Longhi, Giuseppe Rossi, Eugenio Rimondi, Alessio Biazzo, Angelo Toscano, Nikolin Alì, et al. 2011. « Palliative Therapy for Osteosarcoma ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 11 (2): 217-27. <https://doi.org/10.1586/era.10.172>.
- Freidin, Maxim B., Andee Tay, Dasha V. Freydina, Dimple Chudasama, Andrew G. Nicholson, Alexandra Rice, Vladimir Anikin, et Eric Lim. 2014. « An Assessment of Diagnostic Performance of a Filter-Based Antibody-Independent Peripheral Blood Circulating Tumour Cell Capture Paired with Cytomorphologic Criteria for the Diagnosis of Cancer ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 85 (2): 182-85. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.05.017>.
- Gabriel, Marta Tellez, Lidia Rodriguez Calleja, Antoine Chalopin, Benjamin Ory, et Dominique Heymann. 2016. « Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation ». *Clinical Chemistry* 62 (4): 571-81. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249706>.
- Gallego, Soledad, Anna Llorc, Josep Roma, Constantino Sabado, Luis Gros, et Josep Sanchez de Toledo. 2006. « Detection of Bone Marrow Micrometastasis and Microcirculating Disease in Rhabdomyosarcoma by a Real-Time RT-PCR Assay ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132 (6): 356-62. <https://doi.org/10.1007/s00432-006-0083-y>.
- Gambera, Stefano, Ander Abarrategi, Fernando González-Camacho, Álvaro Morales-Molina, Josep Roma, Arantzazu Alfranca, et Javier García-Castro. 2018. « Clonal Dynamics in Osteosarcoma Defined by RGB Marking ». *Nature Communications* 9 (1): 3994. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06401-z>.
- Gatta, Gemma, Laura Botta, Silvia Rossi, Tiiu Aareleid, Magdalena Bielska-Lasota, Jacqueline Clavel, Nadya Dimitrova, et al. 2014. « Childhood Cancer Survival in Europe 1999-2007: Results of EUROCARE-5--a Population-Based Study ». *The Lancet. Oncology* 15 (1): 35-47. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70548-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70548-5).
- Gertler, Ralf, Robert Rosenberg, Katrin Fuehrer, Michael Dahm, Hjalmar Nekarda, et Joerg Ruediger Siewert. 2003. « Detection of Circulating Tumor Cells in Blood Using an Optimized Density Gradient Centrifugation ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 162: 149-55. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59349-9_13.
- Gianferante, D. Matthew, Lisa Mirabello, et Sharon A. Savage. 2017. « Germline and Somatic Genetics of Osteosarcoma - Connecting Aetiology, Biology and Therapy ». *Nature Reviews. Endocrinology* 13 (8): 480-91. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.16>.
- Gordon, Siamon, et Fernando O. Martinez. 2010. « Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions ». *Immunity* 32 (5): 593-604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>.
- Gorlick, Richard. 2009. « Current Concepts on the Molecular Biology of Osteosarcoma ». *Cancer Treatment and Research* 152: 467-78. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_27.
- Grignani, Giovanni, Emanuela Palmerini, Virginia Ferraresi, Lorenzo D'Ambrosio, Rossella Bertulli, Sebastian Dorin Asaftei, Angela Tamburini, et al. 2015. « Sorafenib and Everolimus for Patients with Unresectable High-Grade Osteosarcoma Progressing after Standard Treatment: A Non-Randomised Phase 2 Clinical Trial ». *The Lancet. Oncology* 16 (1): 98-107. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71136-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71136-2).
- Grünewald, Thomas G. P., Florencia Cidre-Aranaz, Didier Surdez, Eleni M. Tomazou, Enrique de Álava, Heinrich Kovar, Poul H. Sorensen, Olivier Delattre, et Uta Dirksen. 2018. « Ewing Sarcoma ». *Nature Reviews. Disease Primers* 4 (1): 5. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0003-x>.
- Grünewald, Thomas Gp, Marta Alonso, Sofia Avnet, Ana Banito, Stefan Burdach, Florencia Cidre-Aranaz, Gemma Di Pompo, et al. 2020. « Sarcoma Treatment in the Era of Molecular Medicine ». *EMBO Molecular Medicine* 12 (11): e11131. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911131>.

- Grzywa, Tomasz M., Wiktor Paskal, et Paweł K. Włodarski. 2017. « Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma ». *Translational Oncology* 10 (6): 956-75. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.09.007>.
- Guihard, Pierre, Yannic Danger, Bénédicte Brounais, Emmanuelle David, Régis Brion, Joël Delecrin, Carl D. Richards, et al. 2012. « Induction of Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells by Activated Monocytes/Macrophages Depends on Oncostatin M Signaling ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (4): 762-72. <https://doi.org/10.1002/stem.1040>.
- Gundem, Gunes, Peter Van Loo, Barbara Kremeyer, Ludmil B. Alexandrov, Jose M. C. Tubio, Elli Papaemmanuil, Daniel S. Brewer, et al. 2015. « The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer ». *Nature* 520 (7547): 353-57. <https://doi.org/10.1038/nature14347>.
- Guo, Yaxin, Xiang Ji, Jinbo Liu, Dandan Fan, Quanbo Zhou, Chen Chen, Weiwei Wang, et al. 2019. « Effects of Exosomes on Pre-Metastatic Niche Formation in Tumors ». *Molecular Cancer* 18 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0995-1>.
- Hamanishi, Junzo, Masaki Mandai, Noriomi Matsumura, Kaoru Abiko, Tsukasa Baba, et Ikuo Konishi. 2016. « PD-1/PD-L1 Blockade in Cancer Treatment: Perspectives and Issues ». *International Journal of Clinical Oncology* 21 (3): 462-73. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hayashi, Masanori, Peixuan Zhu, Gregory McCarty, Christian F. Meyer, Christine A. Pratilas, Adam Levin, Carol D. Morris, et al. 2017. « Size-Based Detection of Sarcoma Circulating Tumor Cells and Cell Clusters ». *Oncotarget* 8 (45): 78965-77. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20697>.
- Heiner, J. P., F. Miraldi, S. Kallick, J. Makley, J. Neely, W. H. Smith-Mensah, et N. K. Cheung. 1987. « Localization of GD2-Specific Monoclonal Antibody 3F8 in Human Osteosarcoma ». *Cancer Research* 47 (20): 5377-81.
- Henriksen, Gjermund, Darrell R. Fisher, John C. Roeske, Øyvind S. Bruland, et Roy H. Larsen. 2003. « Targeting of Osseous Sites with Alpha-Emitting ²²³Ra: Comparison with the Beta-Emitter ⁸⁹Sr in Mice ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 44 (2): 252-59.
- Heymann, Clément J. F., Christine Bobin-Dubigeon, Javier Muñoz-Garcia, Denis Cochonneau, Emilie Ollivier, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann. 2022. « Lipopolysaccharide-Binding Protein Expression Is Associated to the Metastatic Status of Osteosarcoma Patients ». *Journal of Bone Oncology* 36 (octobre): 100451. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2022.100451>.
- Heymann, D., B. Ory, F. Blanchard, M.-F. Heymann, P. Coipeau, C. Charrier, S. Couillaud, J. P. Thiery, F. Gouin, et F. Redini. 2005. « Enhanced Tumor Regression and Tissue Repair When Zoledronic Acid Is Combined with Ifosfamide in Rat Osteosarcoma ». *Bone* 37 (1): 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.02.020>.
- Heymann, Dominique, Benjamin Ory, François Gouin, Jonathan R. Green, et Françoise Rédini. 2004. « Bisphosphonates: New Therapeutic Agents for the Treatment of Bone Tumors ». *Trends in Molecular Medicine* 10 (7): 337-43. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.05.007>.
- Heymann, Marie-Françoise, Hannah K. Brown, et Dominique Heymann. 2016. « Drugs in Early Clinical Development for the Treatment of Osteosarcoma ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 25 (11): 1265-80. <https://doi.org/10.1080/13543784.2016.1237503>.
- Heymann, Marie-Françoise, Frédéric Lézot, et Dominique Heymann. 2019. « The Contribution of Immune Infiltrates and the Local Microenvironment in the Pathogenesis of Osteosarcoma ». *Cellular Immunology* 343 (septembre): 103711. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.10.011>.
- Heymann, Marie-Françoise, Kristina Schiavone, et Dominique Heymann. 2021. « Bone Sarcomas in the Immunotherapy Era ». *British Journal of Pharmacology* 178 (9): 1955-72. <https://doi.org/10.1111/bph.14999>.

- Hicks, M. John, Jill R. Roth, Claudia A. Kozinetz, et Lisa L. Wang. 2007. « Clinicopathologic Features of Osteosarcoma in Patients with Rothmund-Thomson Syndrome ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (4): 370-75. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.4558>.
- Hiley, Crispin, Elza C. de Bruin, Nicholas McGranahan, et Charles Swanton. 2014. « Deciphering Intratumor Heterogeneity and Temporal Acquisition of Driver Events to Refine Precision Medicine ». *Genome Biology* 15 (8): 453. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0453-8>.
- Himoudi, N., R. Wallace, K. L. Parsley, K. Gilmour, A.-U. Barrie, K. Howe, R. Dong, et al. 2012. « Lack of T-Cell Responses Following Autologous Tumour Lysate Pulsed Dendritic Cell Vaccination, in Patients with Relapsed Osteosarcoma ». *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 14 (4): 271-79. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0795-1>.
- Hou, Jian-Mei, Alastair Greystoke, Lee Lancashire, Jeff Cummings, Tim Ward, Ruth Board, Eitan Amir, et al. 2009. « Evaluation of Circulating Tumor Cells and Serological Cell Death Biomarkers in Small Cell Lung Cancer Patients Undergoing Chemotherapy ». *The American Journal of Pathology* 175 (2): 808-16. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090078>.
- Hüsemann, Yves, Jochen B. Geigl, Falk Schubert, Piero Musiani, Manfred Meyer, Elke Burghart, Guido Forni, et al. 2008. « Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer ». *Cancer Cell* 13 (1): 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.003>.
- Hynes, Nancy E., et Heidi A. Lane. 2005. « ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (5): 341-54. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>.
- Ibáñez, Lidia, Grazia Abou-Ezzi, Thomas Ciucci, Vanessa Amiot, Nourhène Belaïd, Dorian Obino, Anna Mansour, Matthieu Rouleau, Abdelilah Wakkach, et Claudine Blin-Wakkach. 2016. « Inflammatory Osteoclasts Prime TNF α -Producing CD4⁺ T Cells and Express CX3 CR1 ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31 (10): 1899-1908. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2868>.
- Isakoff, Michael S., Stefan S. Bielack, Paul Meltzer, et Richard Gorlick. 2015. « Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (27): 3029-35. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4895>.
- Jentsch, Thorsten, Bernhard Robl, Maren Husmann, Beata Bode-Lesniewska, et Bruno Fuchs. 2014. « Worse Prognosis of Osteosarcoma Patients Expressing IGF-1 on a Tissue Microarray ». *Anticancer Research* 34 (8): 3881-89.
- Josse, Simon A., François-Régis Souche, Anna Babayan, Christin Gasch, Ron M. Kerkhoven, Jeanne Ramos, Jean-Michel Fabre, et al. 2018. « Chromosomal Aberrations Associated with Sequential Steps of the Metastatic Cascade in Colorectal Cancer Patients ». *Clinical Chemistry* 64 (10): 1505-12. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.289819>.
- Jordan, Nicole Vincent, Aditya Bardia, Ben S. Wittner, Cyril Benes, Matteo Ligorio, Yu Zheng, Min Yu, et al. 2016. « HER2 Expression Identifies Dynamic Functional States within Circulating Breast Cancer Cells ». *Nature* 537 (7618): 102-6. <https://doi.org/10.1038/nature19328>.
- Jubelin, Camille, Javier Muñoz-Garcia, Denis Cochonneau, Emilie Moranton, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann. 2022. « Biological Evidence of Cancer Stem-like Cells and Recurrent Disease in Osteosarcoma ». *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)* 5 (1): 184-98. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.130>.
- Jürgens, H., J. Treuner, K. Winkler, et U. Göbel. 1989. « Ifosfamide in Pediatric Malignancies ». *Seminars in Oncology* 16 (1 Suppl 3): 46-50.
- Kager, Leo, Andreas Zoubek, Ulrike Pötschger, Ulrike Kastner, Silke Flege, Beate Kempf-Bielack, Detlev Branscheid, et al. 2003. « Primary Metastatic Osteosarcoma: Presentation and Outcome of Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (10): 2011-18. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.08.132>.

- Kamioka, H., T. Honjo, et T. Takano-Yamamoto. 2001. « A Three-Dimensional Distribution of Osteocyte Processes Revealed by the Combination of Confocal Laser Scanning Microscopy and Differential Interference Contrast Microscopy ». *Bone* 28 (2): 145-49. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00421-x](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00421-x).
- Karsenty, Gerard, et Franck Oury. 2010. « The Central Regulation of Bone Mass, the First Link between Bone Remodeling and Energy Metabolism ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (11): 4795-4801. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1030>.
- Katsimbri, P. 2017. « The Biology of Normal Bone Remodelling ». *European Journal of Cancer Care* 26 (6). <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>.
- Keir, Stephen T., Christopher L. Morton, Jianrong Wu, Raushan T. Kurmasheva, Peter J. Houghton, et Malcolm A. Smith. 2012. « Initial Testing of the Multitargeted Kinase Inhibitor Pazopanib by the Pediatric Preclinical Testing Program ». *Pediatric Blood & Cancer* 59 (3): 586-88. <https://doi.org/10.1002/pbc.24016>.
- Khetani, Sultan, Mehdi Mohammadi, et Amir Sanati Nezhad. 2018. « Filter-Based Isolation, Enrichment, and Characterization of Circulating Tumor Cells ». *Biotechnology and Bioengineering* 115 (10): 2504-29. <https://doi.org/10.1002/bit.26787>.
- Knowles, H. J., et N. A. Athanasou. 2009. « Canonical and Non-Canonical Pathways of Osteoclast Formation ». *Histology and Histopathology* 24 (3): 337-46. <https://doi.org/10.14670/HH-24.337>.
- Koelsche, Christian, Daniel Schrimpf, Damian Stichel, Martin Sill, Felix Sahm, David E. Reuss, Mirjam Blattner, et al. 2021. « Sarcoma Classification by DNA Methylation Profiling ». *Nature Communications* 12 (1): 498. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20603-4>.
- Kondo, A., M. Mogi, Y. Koshihara, et A. Togari. 2001. « Signal Transduction System for Interleukin-6 and Interleukin-11 Synthesis Stimulated by Epinephrine in Human Osteoblasts and Human Osteogenic Sarcoma Cells ». *Biochemical Pharmacology* 61 (3): 319-26. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00544-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00544-x).
- Kovac, Michal, Claudia Blattmann, Sebastian Ribí, Jan Smida, Nikola S. Mueller, Florian Engert, Francesc Castro-Giner, et al. 2015. « Exome Sequencing of Osteosarcoma Reveals Mutation Signatures Reminiscent of BRCA Deficiency ». *Nature Communications* 6 (décembre): 8940. <https://doi.org/10.1038/ncomms9940>.
- Krebs, Matthew G., Robert L. Metcalf, Louise Carter, Ged Brady, Fiona H. Blackhall, et Caroline Dive. 2014. « Molecular Analysis of Circulating Tumour Cells-Biology and Biomarkers ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 11 (3): 129-44. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.253>.
- Kusumbe, Anjali P., Saravana K. Ramasamy, et Ralf H. Adams. 2014. « Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis by a Specific Vessel Subtype in Bone ». *Nature* 507 (7492): 323-28. <https://doi.org/10.1038/nature13145>.
- Kwapisz, Dorota. 2017. « The First Liquid Biopsy Test Approved. Is It a New Era of Mutation Testing for Non-Small Cell Lung Cancer? ». *Annals of Translational Medicine* 5 (3): 46. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.01.32>.
- Lammlí, John, Minyan Fan, Howard G. Rosenthal, Meghan Patni, Elizabeth Rinehart, Gerardo Vergara, Elizabeth Ablah, Paul H. Wooley, George Lucas, et Shang-You Yang. 2012. « Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Correlates with the Advance of Clinical Osteosarcoma ». *International Orthopaedics* 36 (11): 2307-13. <https://doi.org/10.1007/s00264-012-1629-z>.
- Lewis, Claire E., et Jeffrey W. Pollard. 2006. « Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments ». *Cancer Research* 66 (2): 605-12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005>.
- Li, Minghui, Yajie Lu, Zuoyao Long, Mengyang Li, Jing Kong, Guojing Chen, et Zhen Wang. 2019. « Prognostic and Clinicopathological Significance of Circulating Tumor Cells in Osteosarcoma ». *Journal of Bone Oncology* 16 (juin): 100236. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2019.100236>.

- Liu, Bo, Yi Wu, Yu Zhou, et Dan Peng. 2014. « Endothelin A Receptor Antagonism Enhances Inhibitory Effects of Anti-Ganglioside GD2 Monoclonal Antibody on Invasiveness and Viability of Human Osteosarcoma Cells ». *PLoS One* 9 (4): e93576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093576>.
- Liu, Tao, Xuan-Cheng Fang, Zhen Ding, Ze-Gan Sun, Li-Ming Sun, et Yi-Lian Wang. 2015. « Pre-Operative Lymphocyte-to-Monocyte Ratio as a Predictor of Overall Survival in Patients Suffering from Osteosarcoma ». *FEBS Open Bio* 5: 682-87. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2015.08.002>.
- Liu, Yang, et Xuetao Cao. 2016. « Characteristics and Significance of the Pre-Metastatic Niche ». *Cancer Cell* 30 (5): 668-81. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.011>.
- Lo Sicco, Claudia, Daniele Reverberi, Carolina Balbi, Valentina Ulivi, Elisa Principi, Luisa Pascucci, Pamela Becherini, et al. 2017. « Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization ». *Stem Cells Translational Medicine* 6 (3): 1018-28. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0363>.
- Lucci, Anthony, Carolyn S. Hall, Ashutosh K. Lodhi, Anirban Bhattacharyya, Amber E. Anderson, Lianchun Xiao, Isabelle Bedrosian, Henry M. Kuerer, et Savitri Krishnamurthy. 2012. « Circulating Tumour Cells in Non-Metastatic Breast Cancer: A Prospective Study ». *The Lancet. Oncology* 13 (7): 688-95. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70209-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70209-7).
- Luetke, Anja, Paul A. Meyers, Ian Lewis, et Heribert Juergens. 2014. « Osteosarcoma Treatment - Where Do We Stand? A State of the Art Review ». *Cancer Treatment Reviews* 40 (4): 523-32. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.006>.
- Macaulay, Iain C., Chris P. Ponting, et Thierry Voet. 2017. « Single-Cell Multiomics: Multiple Measurements from Single Cells ». *Trends in Genetics: TIG* 33 (2): 155-68. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.12.003>.
- Majzner, Robbie G., Jason S. Simon, Joseph F. Grosso, Daniel Martinez, Bruce R. Pawel, Mariarita Santi, Melinda S. Merchant, et al. 2017. « Assessment of Programmed Death-Ligand 1 Expression and Tumor-Associated Immune Cells in Pediatric Cancer Tissues ». *Cancer* 123 (19): 3807-15. <https://doi.org/10.1002/cncr.30724>.
- Marie, Pierre J. 2008. « Transcription Factors Controlling Osteoblastogenesis ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.030>.
- Markou, Athina, Marifili Lazaridou, Panagiotis Paraskevopoulos, Shukun Chen, Monika Świerczewska, Joanna Budna, Andra Kuske, et al. 2018. « Multiplex Gene Expression Profiling of In Vivo Isolated Circulating Tumor Cells in High-Risk Prostate Cancer Patients ». *Clinical Chemistry* 64 (2): 297-306. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.275503>.
- Marley, Kevin, Shay Bracha, et Bernard Seguin. 2015. « Osteoprotegerin Activates Osteosarcoma Cells That Co-Express RANK and RANKL ». *Experimental Cell Research* 338 (1): 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.08.001>.
- Martin, Jeff W., Jeremy A. Squire, et Maria Zielenska. 2012. « The Genetics of Osteosarcoma ». *Sarcoma* 2012: 627254. <https://doi.org/10.1155/2012/627254>.
- Menéndez, Sofía T., Borja Gallego, Dzohara Murillo, Aida Rodríguez, et René Rodríguez. 2021. « Cancer Stem Cells as a Source of Drug Resistance in Bone Sarcomas ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (12): 2621. <https://doi.org/10.3390/jcm10122621>.
- Meyers, Paul A., Cindy L. Schwartz, Mark D. Krailo, John H. Healey, Mark L. Bernstein, Donna Betcher, William S. Ferguson, et al. 2008. « Osteosarcoma: The Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy Improves Overall Survival--a Report from the Children's Oncology Group ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (4): 633-38. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.14.0095>.
- Micalizzi, Douglas S., Shyamala Maheswaran, et Daniel A. Haber. 2017. « A Conduit to Metastasis: Circulating Tumor Cell Biology ». *Genes & Development* 31 (18): 1827-40. <https://doi.org/10.1101/gad.305805.117>.

- Michalski, Megan N., et Laurie K. McCauley. 2017. « Macrophages and Skeletal Health ». *Pharmacology & Therapeutics* 174 (juin): 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.017>.
- Miller, S. C., L. de Saint-Georges, B. M. Bowman, et W. S. Jee. 1989. « Bone Lining Cells: Structure and Function ». *Scanning Microscopy* 3 (3): 953-60; discussion 960-961.
- Mitelman, Felix, Bertil Johansson, Fredrik Mertens, Tommy Schyman, et Nils Mandahl. 2019. « Cancer Chromosome Breakpoints Cluster in Gene-Rich Genomic Regions ». *Genes, Chromosomes & Cancer* 58 (3): 149-54. <https://doi.org/10.1002/gcc.22713>.
- Mohseny, Alexander B., et Pancras C. W. Hogendoorn. 2011. « Concise Review: Mesenchymal Tumors: When Stem Cells Go Mad ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (3): 397-403. <https://doi.org/10.1002/stem.596>.
- Mohseny, Alexander B., Karoly Szuhai, Salvatore Romeo, Emilie P. Buddingh, Inge Briaire-de Bruijn, Daniëlle de Jong, Melissa van Pel, Anne-Marie Cleton-Jansen, et Pancras C. W. Hogendoorn. 2009. « Osteosarcoma Originates from Mesenchymal Stem Cells in Consequence of Aneuploidization and Genomic Loss of Cdkn2 ». *The Journal of Pathology* 219 (3): 294-305. <https://doi.org/10.1002/path.2603>.
- Mori, K., B. Le Goff, M. Berreur, A. Riet, A. Moreau, F. Blanchard, C. Chevalier, et al. 2007. « Human Osteosarcoma Cells Express Functional Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B ». *The Journal of Pathology* 211 (5): 555-62. <https://doi.org/10.1002/path.2140>.
- Mori, Kanji, Kosei Ando, et Dominique Heymann. 2008. « Liposomal Muramyl Tripeptide Phosphatidyl Ethanolamine: A Safe and Effective Agent against Osteosarcoma Pulmonary Metastases ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 8 (2): 151-59. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.2.151>.
- Moukengue, Brice, Hannah K. Brown, Céline Charrier, Séverine Battaglia, Marc Baud'huin, Thibaut Quillard, Therese M. Pham, et al. 2020. « TH1579, MTH1 Inhibitor, Delays Tumour Growth and Inhibits Metastases Development in Osteosarcoma Model ». *EBioMedicine* 53 (mars): 102704. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102704>.
- Munzone, Elisabetta, Franco Nolè, Aron Goldhirsch, Edoardo Botteri, Angela Esposito, Laura Zorzino, Giuseppe Curigliano, et al. 2010. « Changes of HER2 Status in Circulating Tumor Cells Compared with the Primary Tumor during Treatment for Advanced Breast Cancer ». *Clinical Breast Cancer* 10 (5): 392-97. <https://doi.org/10.3816/CBC.2010.n.052>.
- Muthana, Munitta, Samuel Rodrigues, Yung-Yi Chen, Abigail Welford, Russell Hughes, Simon Tazzyman, Magnus Essand, Fiona Morrow, et Claire E. Lewis. 2013. « Macrophage Delivery of an Oncolytic Virus Abolishes Tumor Regrowth and Metastasis after Chemotherapy or Irradiation ». *Cancer Research* 73 (2): 490-95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3056>.
- Nadal, Rosa, Ana Fernandez, Pedro Sanchez-Rovira, Marta Salido, María Rodríguez, José Luis García-Puche, Marta Macià, et al. 2012. « Biomarkers Characterization of Circulating Tumour Cells in Breast Cancer Patients ». *Breast Cancer Research: BCR* 14 (3): R71. <https://doi.org/10.1186/bcr3180>.
- Napolitano, Andrea, Alessandro Minelli, Daniele Santini, Giuseppe Tonini, et Bruno Vincenzi. 2020. « Identification of Aneuploid Circulating Tumor Cells in Soft-Tissue Sarcoma Patients: A Pilot Study ». *Oncology* 98 (12): 893-96. <https://doi.org/10.1159/000509326>.
- Navid, Fariba, Sharyn D. Baker, M. Beth McCarville, Clinton F. Stewart, Catherine A. Billups, Jianrong Wu, Andrew M. Davidoff, et al. 2013. « Phase I and Clinical Pharmacology Study of Bevacizumab, Sorafenib, and Low-Dose Cyclophosphamide in Children and Young Adults with Refractory/Recurrent Solid Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (1): 236-46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1897>.
- Ni, Jie, Paul Cozzi, Jingli Hao, Julia Beretov, Lei Chang, Wei Duan, Sarah Shigdar, et al. 2013. « Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) Is Associated with Prostate Cancer Metastasis

- and Chemo/Radioresistance via the PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (12): 2736-48.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.09.008>.
- Ni, Jie, Paul J. Cozzi, Wei Duan, Sarah Shigdar, Peter H. Graham, Kearsley H. John, et Yong Li. 2012. « Role of the EpCAM (CD326) in Prostate Cancer Metastasis and Progression ». *Cancer Metastasis Reviews* 31 (3-4): 779-91. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9389-1>.
- Nilsson, Sten, Roy H. Larsen, Sophie D. Fosså, Lise Balteskard, Kari W. Borch, Jan-Erik Westlin, Gro Salberg, et Oyvind S. Bruland. 2005. « First Clinical Experience with Alpha-Emitting Radium-223 in the Treatment of Skeletal Metastases ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (12): 4451-59.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2244>.
- Noone, Anne-Michelle, Kathleen A. Cronin, Sean F. Altekruze, Nadia Howlader, Denise R. Lewis, Valentina I. Petkov, et Lynne Penberthy. 2017. « Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013 ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 26 (4): 632-41. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0520>.
- Noy, Roy, et Jeffrey W. Pollard. 2014. « Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy ». *Immunity* 41 (1): 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>.
- Ohba, Tetsuro, Justin M. M. Cates, Heather A. Cole, David A. Slosky, Hirotaka Haro, Jiro Ichikawa, Takashi Ando, Herbert S. Schwartz, et Jonathan G. Schoenecker. 2014. « Pleiotropic Effects of Bisphosphonates on Osteosarcoma ». *Bone* 63 (juin): 110-20.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.005>.
- Ory, Benjamin, Marie-Françoise Heymann, Akira Kamijo, François Gouin, Dominique Heymann, et Françoise Redini. 2005. « Zoledronic Acid Suppresses Lung Metastases and Prolongs Overall Survival of Osteosarcoma-Bearing Mice ». *Cancer* 104 (11): 2522-29.
<https://doi.org/10.1002/cncr.21530>.
- Özkayar, Gürhan, Ege Mutlu, Şebnem Şahin, Yağmur Demircan Demircan Yalçın, Taylan Töral, Haluk Külah, Ender Yıldırım, Özge Zorlu, et Ebru Özgür. 2020. « A Novel Microfluidic Method Utilizing a Hydrofoil Structure to Improve Circulating Tumor Cell Enrichment: Design and Analytical Validation ». *Micromachines* 11 (11): E981. <https://doi.org/10.3390/mi11110981>.
- Paget, S. 1989. « The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. 1889 ». *Cancer Metastasis Reviews* 8 (2): 98-101.
- Park, Sunyoung, Richard R. Ang, Simon P. Duffy, Jenny Bazov, Kim N. Chi, Peter C. Black, et Hongshen Ma. 2014. « Morphological Differences between Circulating Tumor Cells from Prostate Cancer Patients and Cultured Prostate Cancer Cells ». *PloS One* 9 (1): e85264.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085264>.
- Peeters, D. J. E., B. De Laere, G. G. Van den Eynden, S. J. Van Laere, F. Rothé, M. Ignatiadis, A. M. Sieuwerts, et al. 2013. « Semiautomated Isolation and Molecular Characterisation of Single or Highly Purified Tumour Cells from CellSearch Enriched Blood Samples Using Dielectrophoretic Cell Sorting ». *British Journal of Cancer* 108 (6): 1358-67.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2013.92>.
- Perrot, Pierre, Julie Rousseau, Anne-Laure Bouffaut, Françoise Rédini, Elisabeth Cassagnau, Frédéric Deschaseaux, Marie-Françoise Heymann, et al. 2010. « Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence ». *PloS One* 5 (6): e10999.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010999>.
- Perry, Jennifer A., Adam Kiezun, Peter Tonzi, Eliezer M. Van Allen, Scott L. Carter, Sylvan C. Baca, Glenn S. Cowley, et al. 2014. « Complementary Genomic Approaches Highlight the PI3K/MTOR Pathway as a Common Vulnerability in Osteosarcoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (51): E5564-5573.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1419260111>.

- Perut, Francesca, Laura Roncuzzi, et Nicola Baldini. 2019. « The Emerging Roles of Extracellular Vesicles in Osteosarcoma ». *Frontiers in Oncology* 9: 1342. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01342>.
- Pietrovito, Laura, Angela Leo, Valentina Gori, Matteo Lulli, Matteo Parri, Valentina Becherucci, Luisa Piccini, Franco Bambi, Maria Letizia Taddei, et Paola Chiarugi. 2018. « Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Invasiveness and Transendothelial Migration of Osteosarcoma Cells via a Mesenchymal to Amoeboid Transition ». *Molecular Oncology* 12 (5): 659-76. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12189>.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, et D. R. Marshak. 1999. « Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143-47. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- Polyak, Kornelia, et Robert A. Weinberg. 2009. « Transitions between Epithelial and Mesenchymal States: Acquisition of Malignant and Stem Cell Traits ». *Nature Reviews. Cancer* 9 (4): 265-73. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>.
- Poon, Vincent I., Michael Roth, Sajida Piperdi, David Geller, Jonathan Gill, Erin R. Rudzinski, Douglas S. Hawkins, et Richard Gorlick. 2015. « Ganglioside GD2 Expression Is Maintained upon Recurrence in Patients with Osteosarcoma ». *Clinical Sarcoma Research* 5 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/s13569-014-0020-9>.
- PosthumaDeBoer, J., M. A. Witlox, G. J. L. Kaspers, et B. J. van Royen. 2011. « Molecular Alterations as Target for Therapy in Metastatic Osteosarcoma: A Review of Literature ». *Clinical & Experimental Metastasis* 28 (5): 493-503. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9384-x>.
- Rahn, Douglas A., Arno J. Mundt, James D. Murphy, Deborah Schiff, John Adams, et Kevin T. Murphy. 2015. « Clinical Outcomes of Palliative Radiation Therapy for Children ». *Practical Radiation Oncology* 5 (3): 183-87. <https://doi.org/10.1016/j.prro.2014.08.015>.
- Ramirez, Jean-Marie, Tanja Fehm, Mattea Orsini, Laure Cayrefourcq, Thierry Maudelonde, Klaus Pantel, et Catherine Alix-Panabières. 2014. « Prognostic Relevance of Viable Circulating Tumor Cells Detected by EPISPOT in Metastatic Breast Cancer Patients ». *Clinical Chemistry* 60 (1): 214-21. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.215079>.
- Rickel, Kirby, Fang Fang, et Jianning Tao. 2017. « Molecular Genetics of Osteosarcoma ». *Bone* 102 (septembre): 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.017>.
- Roop, Ryan P., Michael J. Naughton, Catherine Van Poznak, Jochen G. Schneider, Philip E. Lammers, Timothy J. Pluard, Farley Johnson, Charles S. Eby, et Katherine N. Weilbaecher. 2013. « A Randomized Phase II Trial Investigating the Effect of Platelet Function Inhibition on Circulating Tumor Cells in Patients with Metastatic Breast Cancer ». *Clinical Breast Cancer* 13 (6): 409-15. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2013.08.006>.
- Rosen, G., B. Caparros, A. G. Huvos, C. Kosloff, A. Nirenberg, A. Cacavio, R. C. Marcove, J. M. Lane, B. Mehta, et C. Urban. 1982. « Preoperative Chemotherapy for Osteogenic Sarcoma: Selection of Postoperative Adjuvant Chemotherapy Based on the Response of the Primary Tumor to Preoperative Chemotherapy ». *Cancer* 49 (6): 1221-30. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19820315\)49:6<1221::aid-cnrcr2820490625>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19820315)49:6<1221::aid-cnrcr2820490625>3.0.co;2-e).
- Roth, Michael, Marissa Linkowski, John Tarim, Sajida Piperdi, Rebecca Sowers, David Geller, Jonathan Gill, et Richard Gorlick. 2014. « Ganglioside GD2 as a Therapeutic Target for Antibody-Mediated Therapy in Patients with Osteosarcoma ». *Cancer* 120 (4): 548-54. <https://doi.org/10.1002/cncr.28461>.
- Safwat, Akmal, Anders Boysen, Arne Lücke, et Philip Rossen. 2014. « Pazopanib in Metastatic Osteosarcoma: Significant Clinical Response in Three Consecutive Patients ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 53 (10): 1451-54. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2014.948062>.
- Satelli, Arun, Abhisek Mitra, Jeffry J. Cutrera, Marcos Devarie, Xueqing Xia, Davis R. Ingram, Denada Dibra, et al. 2014. « Universal Marker and Detection Tool for Human Sarcoma Circulating

- Tumor Cells ». *Cancer Research* 74 (6): 1645-50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1739>.
- Sawabata, Noriyoshi. 2017. « Circulating Tumor Cells in Lung Cancer: Cluster Circulating Tumor Cells as Hybrid Epithelial-Mesenchymal Transition/Mesenchymal-Epithelial Transition (E/M) ». *Journal of Thoracic Disease* 9 (10): 3547-50. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.09.63>.
- Sbaraglia, Marta, Elena Bellan, et Angelo P. Dei Tos. 2021. « The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: News and Perspectives ». *Pathologica* 113 (2): 70-84. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-213>.
- Schöffski, Patrick, Maud Toulmonde, Anna Estival, Gloria Marquina, Monika Dudzisz-Śledź, Mehdi Brahmi, Neeltje Steeghs, et al. 2021. « Randomised Phase 2 Study Comparing the Efficacy and Safety of the Oral Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib with Single Agent Ifosfamide in Patients with Advanced, Inoperable, Metastatic Soft Tissue Sarcoma after Failure of First-Line Chemotherapy: EORTC-1506-STBSG "ANITA" ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 152 (juillet): 26-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.04.015>.
- Schwarz, Rudolf, Oyvind Bruland, Anna Cassoni, Paula Schomberg, et Stefan Bielack. 2009. « The Role of Radiotherapy in Osteosarcoma ». *Cancer Treatment and Research* 152: 147-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_7.
- Sciandra, Marika, Maria Teresa Marino, Maria Cristina Manara, Clara Guerzoni, Maria Grano, Angela Oranger, Enrico Lucarelli, et al. 2014. « CD99 Drives Terminal Differentiation of Osteosarcoma Cells by Acting as a Spatial Regulator of ERK 1/2 ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 29 (5): 1295-1309. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2141>.
- Ségaliny, Aude I., Marta Tellez-Gabriel, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann. 2015. « Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancers ». *Journal of Bone Oncology* 4 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>.
- Shao, Haiyu, Meng Ge, Jun Zhang, Tingxiao Zhao, et Shuijun Zhang. 2022. « Osteoclasts Differential-Related Prognostic Biomarker for Osteosarcoma Based on Single Cell, Bulk Cell and Gene Expression Datasets ». *BMC Cancer* 22 (1): 288. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09380-z>.
- Sharma, Sandhya, Rachel Zhuang, Marisa Long, Mirjana Pavlovic, Yunqing Kang, Azhar Ilyas, et Waseem Asghar. 2018. « Circulating Tumor Cell Isolation, Culture, and Downstream Molecular Analysis ». *Biotechnology Advances* 36 (4): 1063-78. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.007>.
- Shen, Jacson K., Gregory M. Cote, Edwin Choy, Pei Yang, David Harmon, Joseph Schwab, G. Petur Nielsen, et al. 2014. « Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Osteosarcoma ». *Cancer Immunology Research* 2 (7): 690-98. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0224>.
- Sheng, Gaohong, Yuan Gao, Yong Yang, et Hua Wu. 2021. « Osteosarcoma and Metastasis ». *Frontiers in Oncology* 11: 780264. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.780264>.
- Shibuya, Hidenobu, Kazunori Hamamura, Hiroshi Hotta, Yasuyuki Matsumoto, Yoshihiro Nishida, Hisashi Hattori, Keiko Furukawa, Minoru Ueda, et Koichi Furukawa. 2012. « Enhancement of Malignant Properties of Human Osteosarcoma Cells with Disialyl Gangliosides GD2/GD3 ». *Cancer Science* 103 (9): 1656-64. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02344.x>.
- Singh, A., et J. Settleman. 2010. « EMT, Cancer Stem Cells and Drug Resistance: An Emerging Axis of Evil in the War on Cancer ». *Oncogene* 29 (34): 4741-51. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>.
- Sivaraj, Kishor K., et Ralf H. Adams. 2016. « Blood Vessel Formation and Function in Bone ». *Development (Cambridge, England)* 143 (15): 2706-15. <https://doi.org/10.1242/dev.136861>.
- Somlo, George, Sean K. Lau, Paul Frankel, H. Ben Hsieh, Xiaohe Liu, Lixin Yang, Robert Krivacic, et Richard H. Bruce. 2011. « Multiple Biomarker Expression on Circulating Tumor Cells in Comparison to Tumor Tissues from Primary and Metastatic Sites in Patients with Locally

- Advanced/Inflammatory, and Stage IV Breast Cancer, Using a Novel Detection Technology ». *Breast Cancer Research and Treatment* 128 (1): 155-63. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1508-0>.
- Starnes, C. O. 1992. « Coley's Toxins ». *Nature* 360 (6399): 23. <https://doi.org/10.1038/360023b0>.
- Stebbing, Justin, Rachel Payne, Justine Reise, Adam E. Frampton, Miranda Avery, Laura Woodley, Angelo Di Leo, Marta Pestrin, Jonathan Krell, et R. Charles Coombes. 2013. « The Efficacy of Lapatinib in Metastatic Breast Cancer with HER2 Non-Amplified Primary Tumors and EGFR Positive Circulating Tumor Cells: A Proof-of-Concept Study ». *PLoS One* 8 (5): e62543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062543>.
- Stiller, C. A., A. Trama, D. Serraino, S. Rossi, C. Navarro, M. D. Chirlaque, P. G. Casali, et RARECARE Working Group. 2013. « Descriptive Epidemiology of Sarcomas in Europe: Report from the RARECARE Project ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 49 (3): 684-95. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.09.011>.
- Stoeckle, Eberhard, Jean-Michel Coindre, Michèle Kind, Guy Kantor, et Binh N. Bui. 2009. « Evaluating Surgery Quality in Soft Tissue Sarcoma ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 179: 229-42. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77960-5_14.
- Stott, Shannon L., Richard J. Lee, Sunitha Nagrath, Min Yu, David T. Miyamoto, Lindsey Ulkus, Elizabeth J. Inserra, et al. 2010. « Isolation and Characterization of Circulating Tumor Cells from Patients with Localized and Metastatic Prostate Cancer ». *Science Translational Medicine* 2 (25): 25ra23. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000403>.
- Tan, Kevin, David Goldstein, Philip Crowe, et Jia-Lin Yang. 2013. « Uncovering a Key to the Process of Metastasis in Human Cancers: A Review of Critical Regulators of Anoikis ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139 (11): 1795-1805. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1482-5>.
- Tan, Swee Jin, Levent Yobas, Gabriel Yew Hoe Lee, Choon Nam Ong, et Chwee Teck Lim. 2009. « Microdevice for the Isolation and Enumeration of Cancer Cells from Blood ». *Biomedical Microdevices* 11 (4): 883-92. <https://doi.org/10.1007/s10544-009-9305-9>.
- Tang, Xiaodong, Xinchang Lu, Wei Guo, Tingting Ren, Hui Zhao, Fulong Zhao, et Guoqing Tang. 2010. « Different Expression of Sox9 and Runx2 between Chondrosarcoma and Dedifferentiated Chondrosarcoma Cell Line ». *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 19 (6): 466-71. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32833d942f>.
- Tazawa, Hiroshi, Joe Hasei, Shuya Yano, Shunsuke Kagawa, Toshifumi Ozaki, et Toshiyoshi Fujiwara. 2020. « Bone and Soft-Tissue Sarcoma: A New Target for Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy ». *Cancers* 12 (2): E478. <https://doi.org/10.3390/cancers12020478>.
- Tellez-Gabriel, Marta, Céline Charrier, Bénédicte Brounais-Le Royer, Mathilde Mullard, Hannah K. Brown, Franck Verrecchia, et Dominique Heymann. 2017. « Analysis of Gap Junctional Intercellular Communications Using a Dielectrophoresis-Based Microchip ». *European Journal of Cell Biology* 96 (2): 110-18. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.003>.
- Tellez-Gabriel, Marta, Marie-Françoise Heymann, et Dominique Heymann. 2019. « Circulating Tumor Cells as a Tool for Assessing Tumor Heterogeneity ». *Theranostics* 9 (16): 4580-94. <https://doi.org/10.7150/thno.34337>.
- Theoleyre, Sandrine, Yohann Wittrant, Steeve Kwan Tat, Yannick Fortun, Françoise Redini, et Dominique Heymann. 2004. « The Molecular Triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the Orchestration of Pathophysiological Bone Remodeling ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (6): 457-75. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.06.004>.
- Toledo, Sílvia Regina Caminada, Indhira Dias Oliveira, Oswaldo Keith Okamoto, Marco Antonio Zago, Maria Teresa de Seixas Alves, Reynaldo Jesus Garcia Filho, Carla Renata Pacheco Donado Macedo, et Antonio Sergio Petrilli. 2010. « Bone Deposition, Bone Resorption, and

- Osteosarcoma ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 28 (9): 1142-48. <https://doi.org/10.1002/jor.21120>.
- Tomasetti, Cristian, Lu Li, et Bert Vogelstein. 2017. « Stem Cell Divisions, Somatic Mutations, Cancer Etiology, and Cancer Prevention ». *Science (New York, N.Y.)* 355 (6331): 1330-34. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>.
- Trieb, Klemens, et Reinhard Windhager. 2015. « Receptor Activator of Nuclear Factor KB Expression Is a Prognostic Factor in Human Osteosarcoma ». *Oncology Letters* 10 (3): 1813-15. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3489>.
- Vallabhaneni, Krishna C., Meeves-Yoni Hassler, Anu Abraham, Jason Whitt, Yin-Yuan Mo, Azeddine Atfi, et Radhika Pochampally. 2016. « Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Stress Increase Osteosarcoma Migration and Apoptosis Resistance via Extracellular Vesicle Mediated Communication ». *PloS One* 11 (11): e0166027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166027>.
- Vallette, François M., Christophe Olivier, Frédéric Lézot, Lisa Oliver, Denis Cochonneau, Lisenn Lalier, Pierre-François Cartron, et Dominique Heymann. 2019. « Dormant, Quiescent, Tolerant and Persister Cells: Four Synonyms for the Same Target in Cancer ». *Biochemical Pharmacology* 162 (avril): 169-76. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.004>.
- Velletri, T., N. Xie, Y. Wang, Y. Huang, Q. Yang, X. Chen, Q. Chen, et al. 2016. « P53 Functional Abnormality in Mesenchymal Stem Cells Promotes Osteosarcoma Development ». *Cell Death & Disease* 7 (janvier): e2015. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.367>.
- Vertii, Anastassiia, Paul D. Kaufman, Heidi Hehnlly, et Stephen Doxsey. 2018. « New Dimensions of Asymmetric Division in Vertebrates ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 75 (3): 87-102. <https://doi.org/10.1002/cm.21434>.
- Wagner, Eric R., Gaurav Luther, Gaohui Zhu, Qing Luo, Qiong Shi, Stephanie H. Kim, Jian-Li Gao, et al. 2011. « Defective Osteogenic Differentiation in the Development of Osteosarcoma ». *Sarcoma* 2011: 325238. <https://doi.org/10.1155/2011/325238>.
- Wallwiener, Markus, Andreas Daniel Hartkopf, Sabine Riethdorf, Juliane Nees, Martin Ronald Sprick, Birgitt Schönfisch, Florin-Andrei Taran, et al. 2015. « The Impact of HER2 Phenotype of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: A Retrospective Study in 107 Patients ». *BMC Cancer* 15 (mai): 403. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1423-6>.
- Wang, Songgang, Dong Zhang, Shasha Han, Peng Gao, Changying Liu, Jianmin Li, et Xin Pan. 2017. « Fibulin-3 Promotes Osteosarcoma Invasion and Metastasis by Inducing Epithelial to Mesenchymal Transition and Activating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway ». *Scientific Reports* 7 (1): 6215. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06353-2>.
- Wang, Yan, Yijing Chu, Bin Yue, Xuexiao Ma, Guoqing Zhang, Hongfei Xiang, Yong Liu, Tianrui Wang, Xiaolin Wu, et Bohua Chen. 2017. « Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Osteosarcoma Proliferation and Metastasis by Activating the STAT3 Pathway ». *Oncotarget* 8 (14): 23803-16. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15866>.
- Wang, Yong, et Nicholas E. Navin. 2015. « Advances and Applications of Single-Cell Sequencing Technologies ». *Molecular Cell* 58 (4): 598-609. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.005>.
- Watson, Emma C., et Ralf H. Adams. 2018. « Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (7): a031559. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031559>.
- Wee, Ian, Nicholas Syn, Gautam Sethi, Boon Cher Goh, et Lingzhi Wang. 2019. « Role of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Metastasis ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1871 (1): 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.10.004>.
- Whelan, J. S., S. S. Bielack, N. Marina, S. Smeland, G. Jovic, J. M. Hook, M. Krailo, et al. 2015. « EURAMOS-1, an International Randomised Study for Osteosarcoma: Results from Pre-Randomisation Treatment ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (2): 407-14. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu526>.

- Wit, Sanne de, Mariangela Manicone, Elisabetta Rossi, Rita Lampignano, Liwen Yang, Beate Zill, Alvera Rengel-Puertas, et al. 2018. « EpCAMhigh and EpCAMlow Circulating Tumor Cells in Metastatic Prostate and Breast Cancer Patients ». *Oncotarget* 9 (86): 35705-16. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26298>.
- Woll, Penella J., Peter Reichardt, Axel Le Cesne, Sylvie Bonvalot, Alberto Azzarelli, Harald J. Hoekstra, Michael Leahy, et al. 2012. « Adjuvant Chemotherapy with Doxorubicin, Ifosfamide, and Lenograstim for Resected Soft-Tissue Sarcoma (EORTC 62931): A Multicentre Randomised Controlled Trial ». *The Lancet. Oncology* 13 (10): 1045-54. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70346-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70346-7).
- Wu, Mengxi, Po-Hsun Huang, Rui Zhang, Zhangming Mao, Chuyi Chen, Gabor Kemeny, Peng Li, et al. 2018. « Circulating Tumor Cell Phenotyping via High-Throughput Acoustic Separation ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 14 (32): e1801131. <https://doi.org/10.1002/smll.201801131>.
- Xu, Wen-ting, Zhen-yu Bian, Qi-ming Fan, Gang Li, et Ting-ting Tang. 2009. « Human Mesenchymal Stem Cells (HMSCs) Target Osteosarcoma and Promote Its Growth and Pulmonary Metastasis ». *Cancer Letters* 281 (1): 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.022>.
- Yang, Jilong, Da Yang, Yan Sun, Baocun Sun, Guowen Wang, Jonathan C. Trent, DeJka M. Araujo, Kexin Chen, et Wei Zhang. 2011. « Genetic Amplification of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway Genes, Including VEGFA, in Human Osteosarcoma ». *Cancer* 117 (21): 4925-38. <https://doi.org/10.1002/cncr.26116>.
- Yokoyama, R., R. Schneider-Stock, K. Radig, T. Wex, et A. Roessner. 1998. « Clinicopathologic Implications of MDM2, P53 and K-Ras Gene Alterations in Osteosarcomas: MDM2 Amplification and P53 Mutations Found in Progressive Tumors ». *Pathology, Research and Practice* 194 (9): 615-21. [https://doi.org/10.1016/s0344-0338\(98\)80096-4](https://doi.org/10.1016/s0344-0338(98)80096-4).
- Yoshikawa, H., K. Shimizu, T. Nakase, et K. Takaoka. 1994. « Periosteal Sunburst Spiculation in Osteosarcoma. A Possible Role for Bone Morphogenetic Protein ». *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n° 308 (novembre): 213-19.
- Yu, Fu-Xiang, Wei-Jian Hu, Bin He, Yi-Hu Zheng, Qi-Yu Zhang, et Lin Chen. 2015. « Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Osteosarcoma Cell Proliferation and Invasion ». *World Journal of Surgical Oncology* 13 (février): 52. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0465-1>.
- Yu, Min, Shannon Stott, Mehmet Toner, Shyamala Maheswaran, et Daniel A. Haber. 2011. « Circulating Tumor Cells: Approaches to Isolation and Characterization ». *The Journal of Cell Biology* 192 (3): 373-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010021>.
- Yui, Yoshihiro, Jun Kumai, Kenta Watanabe, Toru Wakamatsu, et Satoru Sasagawa. 2022. « Lung Fibrosis Is a Novel Therapeutic Target to Suppress Lung Metastasis of Osteosarcoma ». *International Journal of Cancer* 151 (5): 739-51. <https://doi.org/10.1002/ijc.34008>.
- Zhang, Haoqiang, Peng Gao, Xin Xiao, Michal Heger, Lei Geng, Bo Fan, Yulin Yuan, et al. 2017. « A Liquid Biopsy-Based Method for the Detection and Quantification of Circulating Tumor Cells in Surgical Osteosarcoma Patients ». *International Journal of Oncology* 50 (4): 1075-86. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3905>.
- Zhang, Jinghui, Michael F. Walsh, Gang Wu, Michael N. Edmonson, Tanja A. Gruber, John Easton, Dale Hedges, et al. 2015. « Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 373 (24): 2336-46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508054>.
- Zhou, Yan, Dong Yang, Qingcheng Yang, Xiaobin Lv, Wentao Huang, Zhenhua Zhou, Yaling Wang, et al. 2020. « Single-Cell RNA Landscape of Intratumoral Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Advanced Osteosarcoma ». *Nature Communications* 11 (1): 6322. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20059-6>.

Annexe 1 : Amorces PCR :

Gène humain	Amorces	Séquences Amorces
Hprt1	Sens	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC
	Anti-sens	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
ADAM 8	Sens	GTATGAACCAGTGCCCGAG
	Anti-sens	ACTCCTGCTTGTGGTTGC
JAMB	Sens	CCTGGGAAACGAATGCAAGTAGA
	Anti-sens	ACCAAGGCCACAAACGGAAA
IFNRA 1	Sens	TTGACTCATTTACACCATTTTCGC
	Anti-sens	CATCCAAAGCCCACATAACAC
CD 99	Sens	CTGATTCCACCGGGGATGAC
	Anti-sens	GCATGTACGAGCCTCCATCA
LTK	Sens	GGTGTATGAGGGACTGGTAATTG
	Anti-sens	GTTCTGATGGCGAACTTGC
ENDRA	Sens	TGCCCTCAGTGAACATCTTAAG
	Anti-sens	CATCGGTTCTTGTCCATCTCG
IL-13	Sens	TGGTATTTTAGTCATTTTGGCGAC
	Anti-sens	GCTAGGCTTCTCACTCTCATTG

Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation

Marta Tellez Gabriel,^{1,2} Lidia Rodriguez Calleja,^{1,2} Antoine Chalopin,^{1,2,3}
Benjamin Ory,^{1,2} and Dominique Heymann^{1,2,3,4*}

BACKGROUND: Circulating tumor cells (CTCs) are biomarkers for noninvasively measuring the evolution of tumor genotypes during treatment and disease progression. Recent technical progress has made it possible to detect and characterize CTCs at the single-cell level in blood.

CONTENT: Most current methods are based on epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) detection, but numerous studies have demonstrated that EpCAM is not a universal marker for CTC detection because it fails to detect both carcinoma cells that undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT) and CTCs of mesenchymal origin. Moreover, EpCAM expression has been found in patients with benign diseases. A large proportion of the current studies and reviews about CTCs describe EpCAM-based methods, but there is evidence that not all tumor cells can be detected using this marker. Here we describe the most recent EpCAM-independent methods for enriching, isolating, and characterizing CTCs on the basis of physical and biological characteristics and point out the main advantages and disadvantages of these methods.

SUMMARY: CTCs offer an opportunity to obtain key biological information required for the development of personalized medicine. However, there is no universal marker of these cells. To strengthen the clinical utility of CTCs, it is important to improve existing technologies and develop new, non-EpCAM-based systems to enrich and isolate CTCs.

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

Circulating tumor cells (CTCs)⁵ are defined as cells that originate in primary tumors, recurrences, or metastases. They circulate freely in peripheral blood and have antigenic and genetic characteristics specific to the tumor of origin (1). CTCs are important because the majority of deaths from cancer are linked to the development of disseminated metastases (2). In the last few years, emerging data have challenged the traditional theory of sequential metastasis development (3) (see Fig. 1 in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol62/issue4>). Several studies have pointed out that CTCs can be isolated in patients at relatively early stages of tumor growth (4, 5), even before the primary tumor mass is detected by conventional methods (6). Furthermore, current high-resolution imaging technology is not sensitive enough to detect micrometastases or early tumor cell dissemination, which are the key events in tumor progression (see online Supplemental Fig. 1).

Because they can be obtained by noninvasive methods, CTCs can be used as therapeutic markers for monitoring treatment effectiveness in real time and for detecting recurrent disease. CTCs also have potential for use in evaluating drug resistance mechanisms and may have utility in estimation of the risk of metastatic relapse and progression. Unlike the characterization of primary tumors, which provides only a static view at the time of diagnosis, analyzing CTCs may improve understanding of the different steps involved in the metastatic cascade, from invasion of tumor cells into the bloodstream to the formation of clinically detectable metastases (7).

Although studying circulating tumor cells is a promising approach for better characterizing cancer, there are certain issues inherent to the nature of CTCs that should be considered. CTCs are rare events, which are present at very low concentrations in the blood (i.e., one tumor cell in a background of millions of blood cells) (8). In addition, only a restricted number of CTCs has the ability to generate metastases (9) and consequently it is necessary

¹ INSERM, UMR 957, Equipe LIGUE Nationale Contre le Cancer 2012, Nantes, France;

² Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Pathophysiology of Bone Resorption and Therapy of Primary Bone Tumours, Nantes, France; ³ CHU de Nantes, Nantes, France; ⁴ Department of Oncology and Metabolism, University of Sheffield, Sheffield, UK.

* Address correspondence to this author at: University of Sheffield, Department of Oncology and Metabolism, The Medical School, Beech Hill Rd., S10 2RX England. E-mail: dominique.heyman@sheffield.ac.uk.

Received September 22, 2015; accepted January 4, 2016.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2015.249706

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

⁵ Nonstandard abbreviations: CTC, circulating tumor cell; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; EMT, epithelial-mesenchymal transition; DEP, dielectrophoresis.

to characterize them precisely to be able to distinguish metastatic and nonmetastatic CTCs. Numerous methods have been developed to isolate tumor cells, most of which are based on epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) detection. Indeed, EpCAM is a conventional marker expressed by cancer cells of epithelial origin and has been used for carcinoma cell isolation. However, as described below, EpCAM is not expressed by all CTCs and alternative approaches need to be considered. There are multiple recent useful reviews on CTC isolation methods (10–12) but none of them have exclusively focused on non-EpCAM-based methods. The aim of this review is to provide an overview of the most recent EpCAM-independent methods for enriching, isolating, and characterizing CTCs.

EpCAM Is Not a Universal Biomarker for Isolating CTCs

Extensive effort and resources have been invested into developing methods for detecting CTCs in peripheral blood. In the last decade, several methods have emerged for detecting and characterizing CTCs. However, these methods and consequently the biological characterization of CTCs are still technically challenging. The first step in the detection of CTCs was the discovery that EpCAMs were expressed at variable degrees on epithelial-derived carcinomas and related cancers but were absent in peripheral blood cells (13). This finding resulted in the investigation and development of different methods for enriching and isolating CTCs on the basis of the EpCAM marker (14, 15) and led to the first and only automated EpCAM-based system (CellSearch®) currently approved for clinical use by the US Food and Drug Administration for the detection of CTCs. CellSearch is thus considered the gold standard for CTC detection methods (16, 17). However, recent evidence has challenged the suitability of this method; EpCAM-positive circulating epithelial cells have been reported in patients with benign colon diseases (18) and are a potential source of false-positive findings. In addition, carcinoma cells can undergo epithelial–mesenchymal transition (EMT), which results in decreased expression of epithelial markers, such as EpCAM and cytokeratin (19), and the appearance of mesenchymal markers. The loss of epithelial markers may therefore result in false-negative findings. In this context, the EpCAM marker is not suitable for isolating CTCs from carcinomas that have undergone EMT or those cancers with primary mesenchymal origin. Consequently EpCAM cannot be considered a universal marker for CTC detection. This highlights the need to develop non-EpCAM-based technologies for isolating and detecting CTCs.

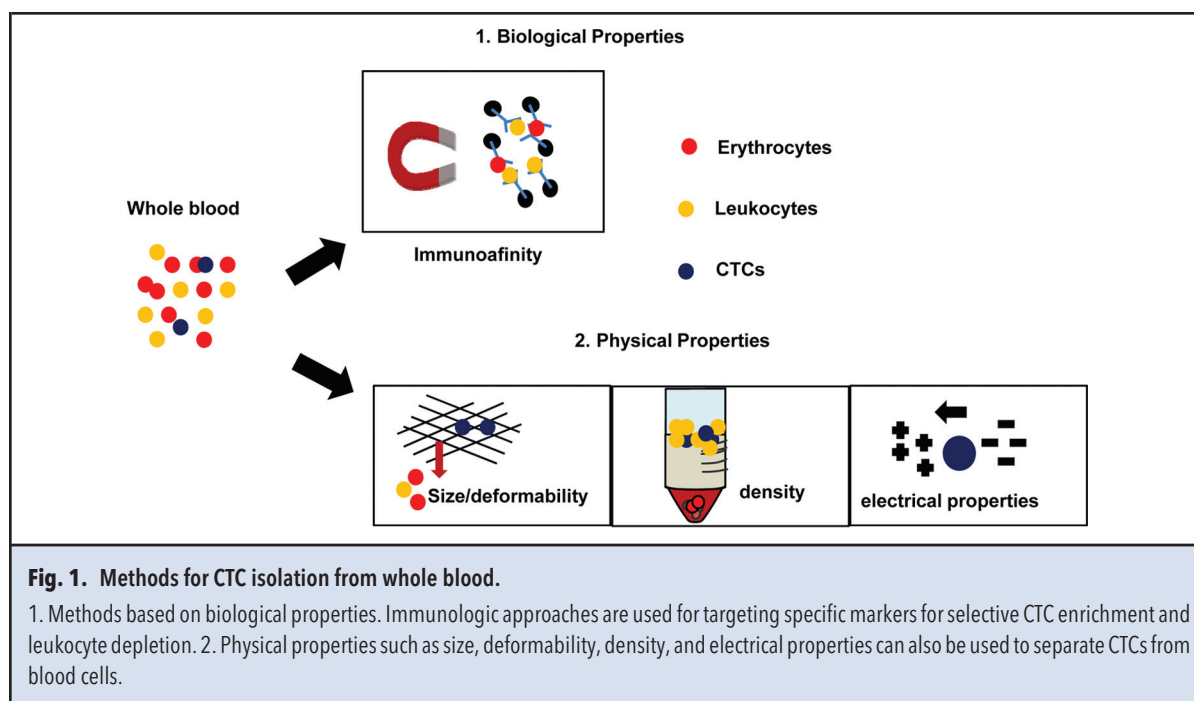
Enrichment of Circulating Tumor Cells: Conventional Methods

The major challenge for isolating and characterizing CTCs is their low concentration compared to the other cell types in the peripheral blood. Enrichment approaches take into consideration several parameters: capture efficiency/recovery rate, purity, cell viability, processing speed, blood sample capacity, sample pre-processing requirements, cost of consumables and equipment, repeatability, and reliability. The optimal enrichment solution may require a compromise between these performance parameters and the intended downstream application. Current enrichment approaches include a wide range of technologies based on the different properties of CTCs that distinguish them from surrounding normal hematopoietic cells, including biological properties (cell surface protein expression, viability, invasive capacity) and physical properties (size, density, electric charges, deformability) (Fig. 1).

METHODS BASED ON PHYSICAL PROPERTIES

Cytological analyses have revealed that CTCs exhibit a greater nucleus-to-cytoplasm ratio, are larger in size, and have different nuclear morphology than normal cells (20). These cytological alterations result in the differences of their mechanical properties, providing CTCs with several capabilities. The cytoskeletal stiffness of CTCs is dynamically modified. This flexibility may facilitate their invasion to distal sites from the primary tumor and may confer their resistance to damage from fluid shear stress within the blood vessels during the metastatic process (21). These modifications in the stiffness alter the conservation of the membrane structure, which in turn affects their surface charge and electrical properties (21). Various approaches have been used to exploit the differences in physical properties between tumor cells and blood cells as a means of enriching and separating CTCs from blood samples (Fig. 1).

Density gradient centrifugation is a conventional approach for separating blood components on the basis of differences in their sedimentation coefficients. As whole blood is deposited in the liquid gradient and subjected to centrifugation, cells will distribute along the gradient depending on their density (Fig. 1, Table 1). Erythrocytes or polymorphonuclear leukocytes migrate to the bottom, whereas mononuclear leukocytes and CTCs remain at the top as a buffy coat (22). Percoll, Ficoll-Hypaque® (GE Healthcare Life Sciences), and OncoQuick® (Greiner Bio-One) are the most commonly used density gradient media in preclinical and clinical research. Ficoll-HyPaque, formed by the copolymerization of sucrose and epichlorohydrin, is mainly used in biology laboratories to recover peripheral blood mononuclear cells. Despite its long history of use in lab-



oratories, there are some pitfalls associated to this technique, such as the possible loss of tumor cells that migrate either to the plasma fraction or to the bottom of the gradient due to the formation of aggregates (22). It has been suggested that this cell loss may be due to the cytotoxicity of the density medium (23). An alternative to Ficoll is Percoll density (GE Healthcare Life Sciences) gradient medium made of a colloidal silica particle suspension. The main advantages over Ficoll include reduced toxicity and a wider density gradient range (23). There are certain discrepancies in the literature regarding the use of Percoll because some studies have demonstrated a high purity rate (24) while others have shown low isolation efficiencies compared to Ficoll (25). A third density system named OncoQuick is composed of a 50-mL tube with a porous barrier inserted above a separation medium. Cells are separated and pass through the barrier depending on their different buoyancy densities during centrifugation. CTCs, together with lymphocytes, will remain above the porous barrier, making them easily accessible for subsequent collection. OncoQuick has a mildly higher reported recovery rate compared to that of Ficoll density gradient (87% and 84%, respectively) (26). Moreover, the mononuclear cell depletion obtained using the OncoQuick system is significantly higher than that of Ficoll; this facilitates processing of higher sample volumes, which is beneficial for CTC characterization (26, 27). However, during the isolation process, CTCs migrate into the plasma fraction and are frequently lost (28). Overall, the major advantages of all the

density centrifugation methods are that they are inexpensive and reliable (Table 1). However, the disadvantages include the loss of large CTCs and CTC aggregates that fall to the bottom (29), as well as the fact that leukocytes cannot easily be eliminated, resulting in very low purity. It is therefore necessary to combine centrifugation with another enrichment method.

Microfiltration enrichment methods process circulating cells through an array of microscale constrictions to capture target cells on the basis of their size or a combination of size and deformability. There are multiple different microfiltration devices; some are available on the market and others currently remain prototypes (Fig. 2).

Membrane microfilters are composed of a semipermeable membrane with a 2D array of micropores. A membrane with a pore size diameter of 8 μm has been demonstrated to be optimal for CTC retention (30). The typical configuration used for microfiltration is dead-end filtration (Fig. 2A), in which the blood flow is perpendicular to the membrane. The main limitation of this strategy is that the layer of cells retained on the membrane can reduce the efficiency of recovery due to the buildup of filtration resistance (31) (Table 1). To overcome this issue, Zheng et al. created a 3D membrane microfilter consisting of 2 pored layers (Fig. 2B), between which CTCs are retained (32). In contrast to conventional microfiltration devices, this system reduces the tension stress on the cell plasma membrane and demonstrates a

Table 1. Major advantages and disadvantages of CTC enrichment methods.

Method	Advantages	Disadvantages
Density gradient centrifugation	Inexpensive Reliable	Loss of large CTCs and cell aggregates Low purity Additional enrichment techniques required
Microfiltration	Rapid processing of large volumes High efficiency	Low purity Membrane clogging Different size of CTCs Difficult to detach CTCs from the filter
Microfluidics	Excellent purity High capture rates Little cell disturbance	Long, time-consuming process Sample preprocessing requirement to reduce volume
Dielectrophoresis	Single cell isolation High cell viability High efficiency	Limited volume Low purity in some devices Cell electrical properties can be affected during the procedure Large number of parameters must be controlled simultaneously
Immunoaffinity-based methods	High recovery High purity rates High cell viability using negative selection	Lack of cancer-specific markers Heterogeneous expression of markers in cells Problems with the antibody affinity or specificity

high recovery rate (86% with a theoretically fast throughput of 3.75 mL/min) (32).

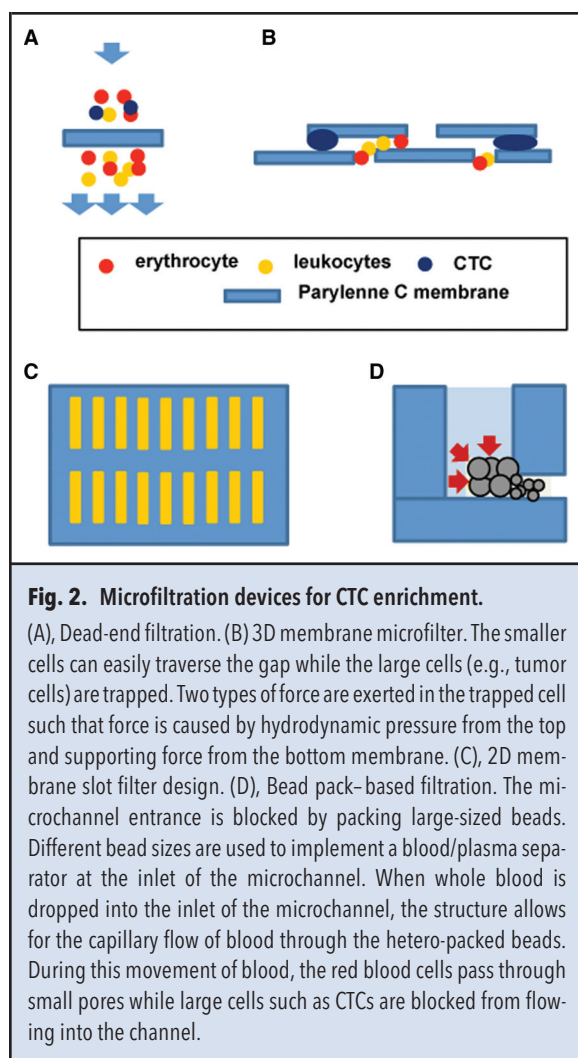
Another system based on a 2D membrane slot filter (Fig. 2C) was proposed by Lu et al., in which the forces exerted on the cells are reduced, reaching viability of 90% with a high recovery (33). The bead-packed filtration device consists of a chamber where uniform beads measuring 45 μm in diameter and nonuniform beads (with diameters ranging from 15 to 100 μm) are packed and act as the filtration element (Fig. 2D) that retains CTCs and allows red and white blood cells to pass through (33). Studies performed by Lin et al. demonstrated a low recovery rate (between 21% and 40%) in contrast to filtration performed using membrane systems (34).

There are systems available that make it possible to enrich and isolate CTCs in a single step. For example, ScreenCell[®] technology (ScreenCell), is an innovative single-use and low-cost device. It is based on a filter that isolates and sorts tumor cells by size. There are 3 different types of device, depending on the downstream analysis: ScreenCell Cyto (molecular techniques that require fixed cells), ScreenCell CC (cell culture), and ScreenCell MB (RNA or DNA analysis) (35, 36). The main advantages of this system are its low cost, small format, and ease of use. Another platform in development is the parylene-C slot microfilter that measures telomerase activity from captured, viable CTCs. It has a 90% recovery rate (36).

The 90% of cells recovered are viable and yield 200-fold sample enrichment (36). In contrast to ScreenCell, parylene-C detects only viable CTCs and can be reused.

Filtration allows for rapid CTC enrichment from large volumes of blood in minutes, with minimal processing. Recovery rates are around 90%, but further processing is required for certain downstream applications, because the final purity is typically around 10% or less. The main disadvantages associated with filtration are the heterogeneity in CTC size, cluster formation, the possibility of membrane clogging, and difficulties in the detachment of cells retained in the filter, as well as the background signal on the filters after immunostaining for CTC detection.

Microfluidics includes several separation methods, which makes it possible to manipulate very small volumes of biological fluids. The past decade has seen many new technologies proposed for biological cell sorting and analysis on microchips. Arrays with pillars of varying geometries have been used to fractionate cells in blood and capture tumor cells (37). Similarly, crescent-shaped trap arrays with a fixed 5- μm gap width within microfluidic chambers have been used to enrich CTCs from whole blood without preprocessing (38). The Parsortix system (Angle) (Fig. 3A) is microfluidic technology that captures CTCs based on their less deformable nature and larger size compared to other blood components. With



this system, it has been reported that a higher number and purity of isolated CTCs in patient samples were obtained than with the Cell Search. Moreover, the processing time of 7.5 mL of whole blood is 2 h in contrast to the 4 h reported for the Cell Search (Cell Search, Jansen Diagnostic). It is worth noting that with the second version of Parsortix 10 mL can be processed in 2.5 h. The main drawback of this technique is the difficulty of eliminating all leukocytes owing to size overlap with CTCs (39).

In addition to the previous devices described above, ClearCell[®] FX (Clearbridge Biomedics) recovers viable cells in small sample volumes and in a short period of time (e.g., 1 mL of blood in 10 min) (Fig. 3B) (40). ClearCell FX does not require preprocessing of the blood; this decreases the possibility of losing cells of interest (Table 1). This system takes advantage of the inertial and centrifugal forces causing the smaller red and white blood cells to flow along the channel's outer wall

and the larger CTCs to flow along the inner wall, recovering both fractions in different channels of the system. Unfortunately, CTCs of different sizes may escape through the white/red cell channels, and certain white blood cells can be captured in the CTC fraction.

To limit CTC loss to white and red cell channels, CTC-iChip technology (D.A. Harber, Massachusetts General Hospital Cancer Center; M. Toner, Harvard Medical School, Boston, MA) was developed (Fig. 3C). CTC-iChip technology combines continuous deterministic lateral displacement for size-based separation of red blood cells/platelets from tumor cells obtained from whole blood, inertial focusing for precise positioning of cells in a microchannel, and microfluidic magnetophoresis for immunomagnetic depletion of white blood cells. This system allows the rapid recovery of any viable cancer cell types, which are accordingly available for characterization. It can process 8 mL of blood per hour. Unfortunately, in the deterministic lateral displacement step, small CTCs are lost, and undesired large cells and aggregates pass on to the next step due to particle deformability and can limit the usefulness of this device (41).

Carefully applied microfluidic approaches are capable of achieving both excellent purity of more than 80% and high recovery rates with little disturbance to the CTCs. However, these advantages come at the expense of lower throughput requiring either reduced sample volumes or prolonged periods of time to process samples (e.g., several hours to process a full tube of blood).

Dielectrophoresis (DEP) was initially described by Pohl as "the translational motion of neutral matter caused by polarization effects in a nonuniform electric field" (42). To move a particle by DEP, the particle must be polarizable once an electrical field is applied (43). This phenomenon has inspired new approaches for the separation of cells on the basis of their electrical properties. Because the DEP force is inversely proportional to the length scale (44), microscale chambers named microchips have been developed for isolating rare cell events. These microchips integrate arrays of electrodes to generate a nonuniform alternating current field characteristic of the DEP technology.

Interdigitated gold electrodes have been used to separate cancer cells from blood cells (45). Tumor cells were attracted toward the electric field generated by the electrodes by means of positive DEP, whereas other cells were flushed away. When the electric field was turned off, the cells initially retained were released and recovered with an approximate rate of 95%. Moon et al. created a system with a DEP module integrated into a size-based hydrodynamic step, used as the enrichment stage to remove excess blood cells (46). The first commercial instrument based on DEP field flow fractionation was the ApoStream[™] system (ApoCell) (Fig. 4A). To use this methodology, an initial enrichment step is required. Re-

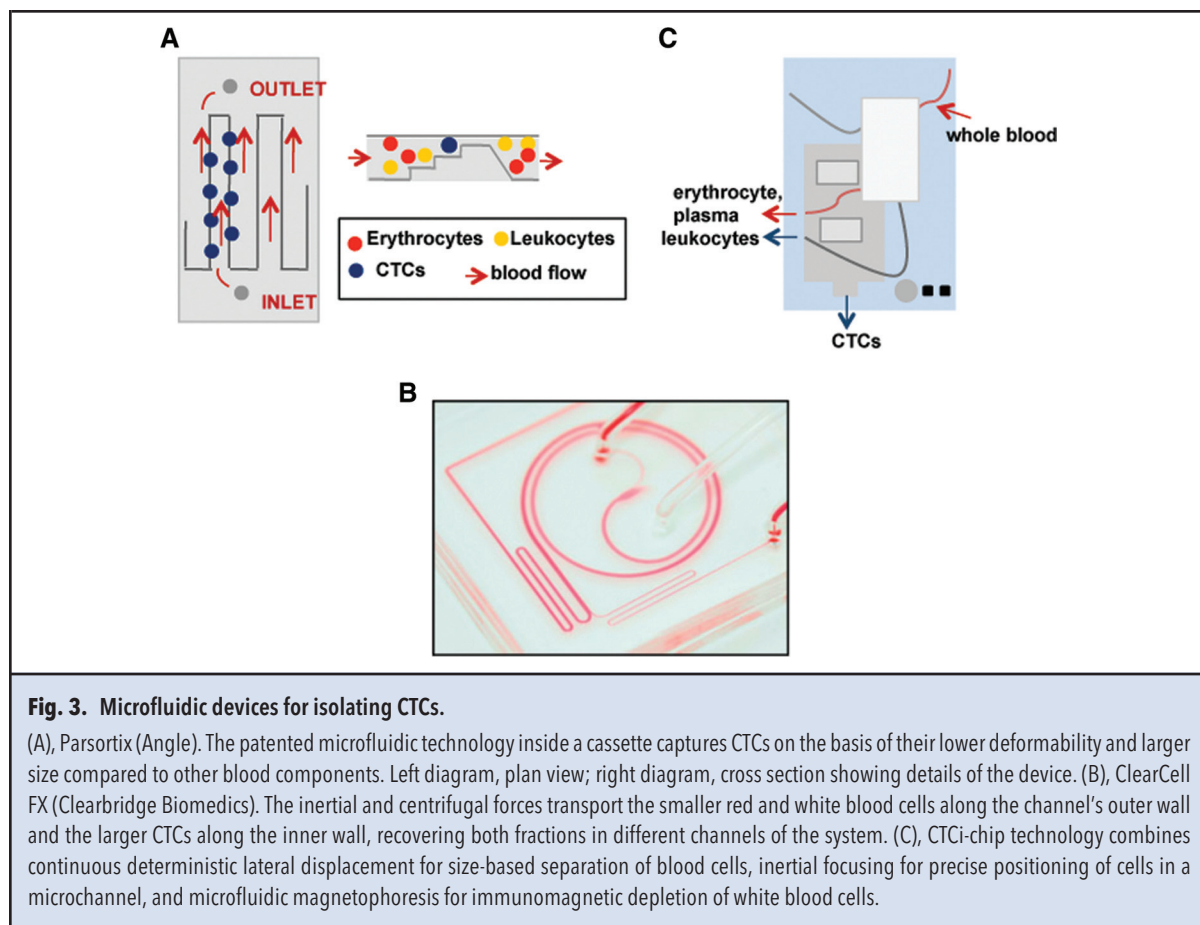


Fig. 3. Microfluidic devices for isolating CTCs.

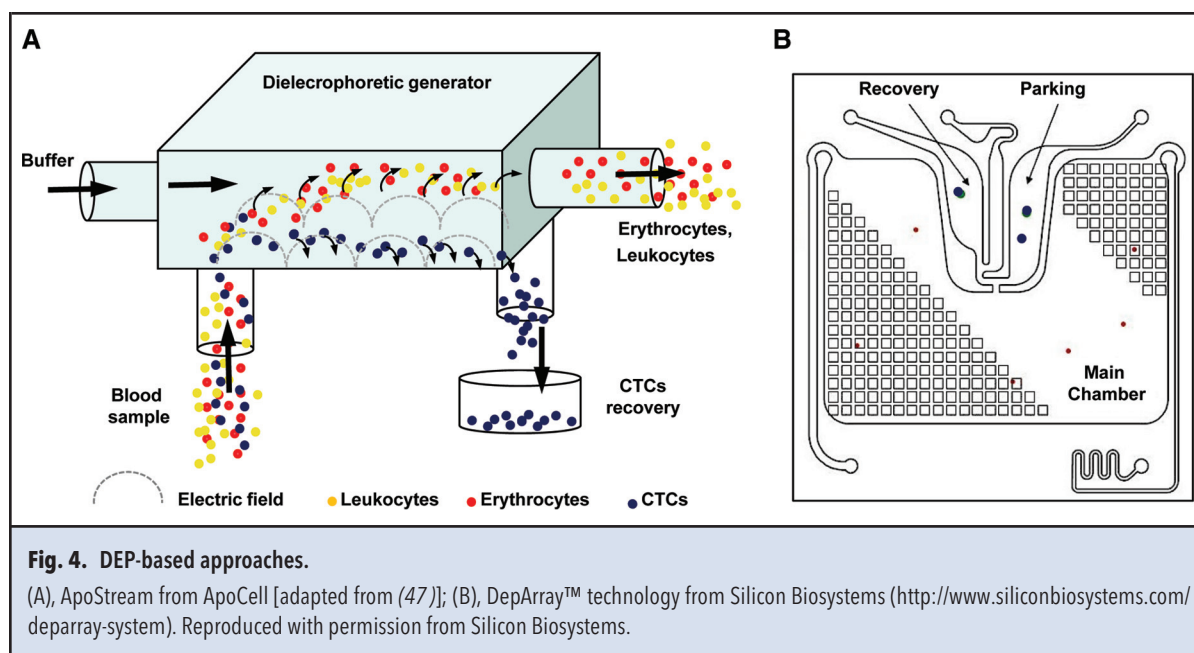
(A), Parsortix (Angle). The patented microfluidic technology inside a cassette captures CTCs on the basis of their lower deformability and larger size compared to other blood components. Left diagram, plan view; right diagram, cross section showing details of the device. (B), ClearCell FX (Clearbridge Biomedics). The inertial and centrifugal forces transport the smaller red and white blood cells along the channel's outer wall and the larger CTCs along the inner wall, recovering both fractions in different channels of the system. (C), CTCi-chip technology combines continuous deterministic lateral displacement for size-based separation of blood cells, inertial focusing for precise positioning of cells in a microchannel, and microfluidic magnetophoresis for immunomagnetic depletion of white blood cells.

covery rate is over 70% and the viability more than 97%; however, the purity obtained is $<1\%$, although this can be significantly improved with additional enrichment stages at the risk of reduced recovery rate (47). The DEPArray™ technology (Silicon Biosystems) combines the ability to manipulate individual cells using DEP technology with high-quality image-based cell selection (Fig. 4B). The most attractive characteristics of this technology are the single-cell resolution, high-fidelity recovery, cell viability and, in the most recent version, the possibility of isolating individual cells from paraffin-embedded samples (48).

Despite the many advantages presented by DEP-based enrichment methods, there are also some limitations, such as low sample volumes that are processed in a noncontinuous manner (Table 1). Furthermore, the dielectric characteristics of cells can gradually change due to ion leakage; this requires the isolation to be completed within a short period of time after the sample processing starts (49). In addition, the electric conductivity of the medium used must be low, which is not achievable for all samples studied.

METHODS BASED ON BIOLOGICAL PROPERTIES

Antibody-based CTC isolation takes advantage of highly specific affinity reactions between capture antibodies and the target antigens present on the cells of interest. CTCs can be captured directly (positive selection) or indirectly (negative selection). Various antigens have been used to detect or isolate CTCs. The most commonly used antibody is EpCAM, because it is expressed in all epithelial cells but is absent from blood cells (13, 50). However, the universality of EpCAM may be reduced when carcinoma cells have undergone the EMT process or when detecting tumor cells of mesenchymal origin. Results from our laboratory have revealed the presence of EpCAM-expressing and -nonexpressing CTCs after the injection of either EpCAM-expressing or -nonexpressing tumoral cells in mouse paratibias (see online Supplemental Fig. 2). Several organ- or tumor-specific markers, such as CEA (carcinoembryonic antigen), EGFR (epidermal growth factor receptor), PSA (prostate-specific antigen), HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2), MUC-1 (mucin 1), EphB4 (ephrin type-B receptor 4), IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor), cadherin-



11, and CSV (cell-surface vimentin) have also been reported for antibody-based isolation of CTCs (see online Supplemental Table 1).

Immunoaffinity-based CTC isolation is based on antibody-conjugated magnetic nanoparticles or microbeads that often bind to a specific surface antigen (51, 52). After antigen–antibody interaction, the sample is exposed to a nonuniform magnetic field to capture labeled cells. This method can attain high recovery and purity rates, with single-step detection and isolation of CTCs (51, 53). The performance of the immunomagnetic method depends directly on both the expression and specificity of the target antigen, as well as on the binding quality of the associated antibody, the efficiency of the immunomagnetic labeling process and magnetic particles, and the separation mechanism designed to isolate labeled cells. A “cocktail” of antibodies targeting multiple antigens can also be used to partially overcome the lack of specificity of current tumor markers (51, 54). Another approach is negative isolation of CTCs by first lysing erythrocytes and then using specific markers to magnetically deplete leukocytes. CD45 is the most frequently used marker for leukocyte depletion. The RosetteSep® (STEMCELL Tech) is a CTC-negative selection system based on a mixture of antibodies that specifically crosslink red blood cells to each other and to white blood cells, forming cell rosettes consisting of multiple red and white blood cells. Due to the higher density of these clusters, they can effectively be separated from CTCs by a single centrifugation step. Negative selection methods are completely independent with regard to CTC phenotype, so they are not biased by a particular

CTC marker. Negative selection also leaves CTCs untouched, which may result in higher viability. To achieve an acceptable degree of CTC purity, this separation method requires a very high specificity to remove all the leukocytes and needs to avoid nonspecific CTC binding. The binding between primary antibody and magnetic particles can be a direct (single-step) or indirect (2-step) method. The latter is composed of secondary antibodies that are already bound to magnetic particles and can specifically bind to an epitope on the primary antibody, potentially reaching higher labeling efficiency. This indirect approach shows a 15-fold increase in labeling efficiency compared to direct methods (55).

Regarding the use of the magnetic separation procedure to recover labeled cells, there are many different alternatives. In the batch separation approach, the whole labeled sample is subjected to a magnetic field at once, resulting in the migration of labeled cells to the regions of higher magnetic frequency (56). The EasySep™ system (STEMCELL Tech), MojoSort™ (Biolegend), and Dynabeads® (ThermoFisher) are based on this principle. Variations of these systems have been developed to increase the processed volume. Thus, continuous-flow separation can be used in which the sample is continuously fed through the separation module. This module can have an activated filter to capture and retain the labeled cells, like the commercially available MACS® (Miltenyi Biotec) and MagniSort™ (eBioscience). Alternatively, the magnetophoresis mode can be used to selectively manipulate the direction of labeled cells within the flow and collect them at designated outputs (57, 58). Reported recovery rates using these magnetic enrichment systems

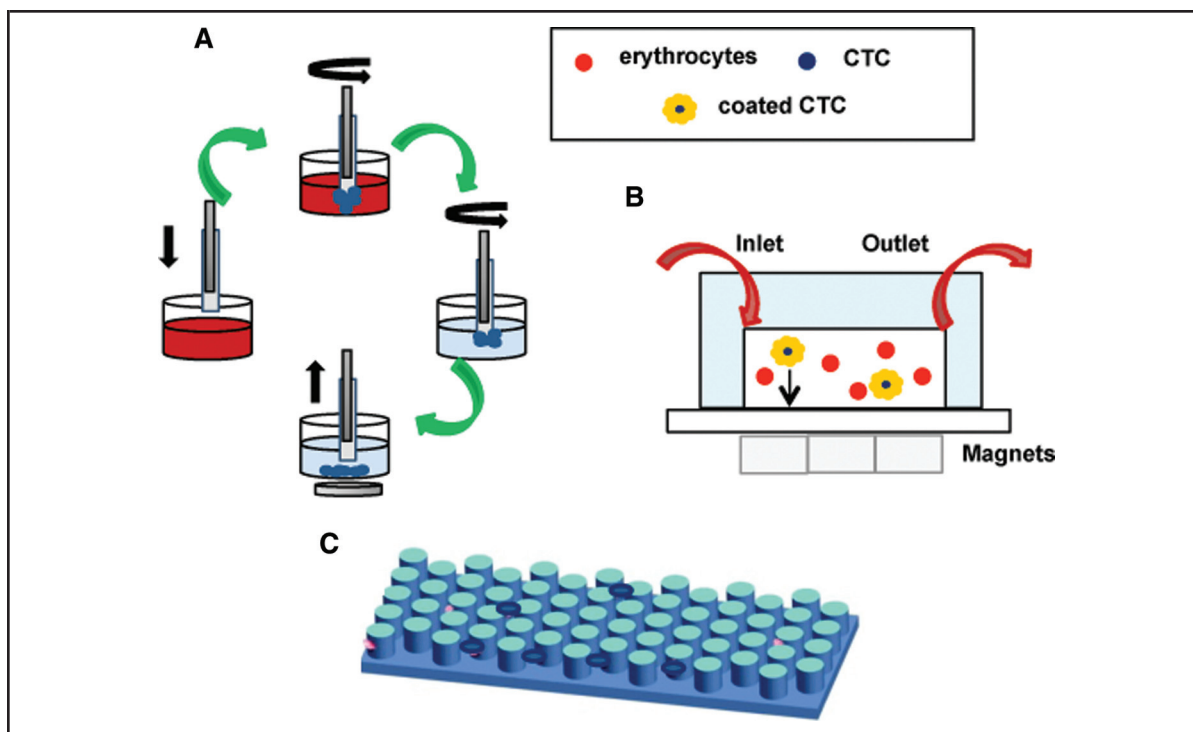


Fig. 5. Antibody-based CTC isolation approaches.

(A), MagSweeper [Fig. adapted with permission from (61)]. Magnetic beads were coated with an antibody targeting surface markers and mixed into blood samples to bind cancer cells, which are captured with the magnetic rod. After several washings, the cells are extracted using a magnetic source. (B), Microchip-based immunomagnetic assay. The sample is pumped in continuously through the microchannel, causing noncaptured blood cells to exit the chip, whereas CTCs are retained due to the magnetic force. (C), Diagram representation of OnCCChip™ (On-Q-ity) and CEE (Biocept) devices. These cell enrichment technologies exploit the placement of posts and flow rates through mathematical modeling to enhance isolation and capture of CTCs within a microfluidic channel.

have shown significant variations (10%–90%) (59–60). This variation can be explained because the magnetic gradient generated by the separation structure can only attract labeled cells within a limited distance. The MagSweeper® system is a proposed (Fig. 5A) solution (61) that uses a robotic arm equipped with a magnetic rod that binds labeled cells. This was initially demonstrated for the recovery of EpCAM-positive cells but can be adapted for other CTC markers. Recovery rates of 60% using this device have been reported (54).

Microscale separation devices have also been developed. Isolation efficiency in an immunomagnetic microfluidic chip is mainly governed by an equilibrium between hydrodynamic and magnetic forces acting on the labeled cells (62). Hoshino et al. described an immunomagnetic capture system for CTCs based on a microchannel on top of a stack of permanent magnets (Fig. 5B). As the sample flows into the microchannel, the magnetic gradient attracts the labeled cells. Recovery rates around 86% have been attained with this system (63).

Finally, CTCs can be recovered using adhesion-based methods that exploit the ability of CTCs to bind to a surface whose biochemical and topographical properties have been modified without the need to label the cells. In static adhesion-based assays, the sample is first incubated on the capture surface. Nonadherent, supposedly nontarget cells are washed off, leaving the CTCs attached to the surface. On the basis of this approach, the cell adhesion matrix has been used to detect and isolate the most invasive CTCs from patients with metastatic and local carcinomas of different origins (64, 65). Microfluidic adhesion-based devices consist of microchannels coated with an antibody against CTCs. Their design determines both the efficiency of the cell binding and the recovery rate by influencing the flow rate (66, 67). Among these devices, the OnQChip™ (On-Q-ity) and the CEE™ chip (Biocept Laboratories) are 2 commercialized microfluidic devices that have incorporated 3D structures (microposts) to increase the effective surface, thus promoting cell adhesion (Fig. 5C). The first com-

bins antibody affinity and size selection for the capture of CTCs and the second is based in immunoaffinity. In this field, Hughes et al. have developed, for instance, a microfluidic system based on the binding of E-selectin, a molecule present in the endothelium on to which CTCs adhere before their extravasation (68). This approach has attained high flow rates compared to the other adhesion-based methods (4.8 mL/h) and approximately 50% capture efficiency. Interestingly, this device demonstrated higher efficiency than the CellSearch system on the basis of the number of CTCs isolated (68).

Concluding Remarks

We have highlighted the non-EpCAM-based methods for CTC enrichment/isolation. The major advantage of these techniques is that they can enrich for CTCs that do not have EpCAM expression. However, many challenges associated with current methodologies must be faced, such as the need to improve purity and recovery rates, throughput, cell viability after recovery, and enrichment rates.

It would be beneficial to identify properties exclusive to CTCs, which may take the form of a single “master” marker or a combination of antibodies able to recognize all the CTCs present in the sample. Moreover, it would be desirable if those properties or markers were able to distinguish between metastatic and nonmetastatic CTCs. Unfortunately, current knowledge does not make it possible to clearly identify and classify CTCs. This information most important for clinical use, determining the prognosis of the disease, making treatment decisions, and assessing the effectiveness of the treatment applied.

Despite the numerous methods for isolating CTCs described in the literature, some are still at the proof-of-concept stage with evidence only in cultured cells. The main drawback is that cell lines do not effectively reflect CTCs in a natural biological fluid, especially in terms of heterogeneity (69). It would be interesting to develop new cell lines that exhibit the genomic and transcriptional heterogeneity of cancer cell lines. Recently, Cayre-fourcq et al. (70) and Yu et al. (71) reported the isolation of CTCs and their growth in culture for the establishment of a cell line to examine tumor heterogeneity. Another important point is the necessary sample volume required for CTC isolation. In most cases, the inability to process whole blood is due to high cell concentration or the necessity for reducing sample volume because of the device’s limited capacity. A frequently proposed solution is the dilution of samples; however, dilution is not ideal because it reduces the probability of CTC capture and the prolonged enrichment time compromises cell viability. In addition, the biological characteristics of the cells can be altered by the composition of the dilution buffer.

With the use of immunologically based enrichment methods, the wide range of phenotypes presented by CTCs make it necessary to use specific cocktails for cell surface epithelial and mesenchymal markers that do not cross-react with other blood cells (72). Yokobori et al. described plastin 3 as a good alternative for avoiding the use of large cocktails of antibodies, because this marker is not downregulated in CTCs during their EMT and is not expressed in blood cells (73). Although positive selection is very specific and a high purity can be obtained, the presence of some uncharacterized CTCs in each individual blood sample should be taken into consideration. This can be avoided by negative selection, in which the blood sample is depleted of leukocytes by use of antibodies against CD45 and other leukocyte antigens (not expressed on carcinomas or other solid tumors). However, cytokeratin⁺ and CD45⁺ subcell populations have been described and may be related to various artifacts such as cell doublets or nonspecific antibody bindings (74) or circulating cancer-associated macrophage-like cells (75). The role of EMT in tumor cell dissemination stimulates the development of technologies based on the depletion of normal CD45⁺ hematopoietic cells to limit loss of CTCs with high phenotypic plasticity. However, it should be noted that not all CD45⁻ cells in the blood are tumor cells (e.g., circulating endothelial cells) (11).

In the last decade, the strong interest in CTCs has accelerated the development of numerous isolation technologies based on EpCAM-independent methods. Technologies based on physical approaches (density gradient centrifugation, microfiltration, microfluidics, DEP) or biological properties of CTCs (e.g., membranous markers) have been demonstrated. However, further improvements in preenrichment steps will enhance methods for the capture and characterization of these cells.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors’ Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: This paper was written as a part of research project which received funding from the Seventh Framework Program [(FP7/2007-2013) under grant agreement no. 264817—BONE-NET and this work was supported by the Fondation de France (Engt no. 16390)].

Expert Testimony: None declared.

Patents: None declared.

References

- van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, den Toonder JM. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res* 2011;71:5955–60.
- Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6:449–58.
- McGee SF, Lanigan F, Gilligan E, Groner B. Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression. *EMBO Rep* 2006;7:1084–8.
- Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;9:302–12.
- Lloyd JM, McIver CM, Stephenson SA, Hewett PJ, Rieger N, Hardingham JE. Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:417–23.
- Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:58–68.
- Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* [Epub ahead of print 2015 Jun 8].
- Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999;5:1950–60.
- Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am J Cancer Res* 2011;1:740–51.
- Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:931–9.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014;14:623–31.
- Alix-Panabieres C, Pierga JY. Circulating tumor cells: liquid biopsy. *Bull Cancer* 2014;101:17–23.
- Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 2012;38:68–75.
- Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B, Butler RN, Mi JX, Sage RE, Dobrovic A. Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 1993;53:3455–8.
- Liljefors M, Nilsson B, Fagerberg J, Ragnhammar P, Mellstedt H, Frödin JE. Clinical effects of a chimeric anti-EpCAM monoclonal antibody in combination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2005;26:1581–9.
- Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, Valero V, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int J Cancer* 2011;130:1590–7.
- Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer* 2011;129:1651–60.
- Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012;58:936–40.
- Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, et al. Detection of EpCAM-negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood. *J Oncol* 2011;2011:252361.
- Bobek V, Gurlich R, Eliasova P, Kolostova K. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: enrichment and cultivation. *World J Gastroenterol* 2014;20:17163–70.
- Low WS, Wan Abas WA. Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties. *Biomed Res Int* 2015;2015:239362.
- Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics* 2007;4:741–56.
- Pösel C, Möller K, Fröhlich W, Schulz I, Boltz J, Wagner DC. Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. *PLoS One* 2012;7:e50293.
- Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:3879–84.
- Chang Y, Hsieh PH, Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J* 2009;32:264–75.
- Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* 2003;162:149–55.
- Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 2002;49:150–8.
- Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull* 2010;94:49–64.
- Danova M, Torchio M, Mazzini G. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Diagn* 2011;11:473–85.
- Zabaglo L, Ormerod MG, Parton M, Ring A, Smith IE, Dowsett M. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells. *Cytometry A* 2003;55:102–8.
- Shiau JS, Tang CHI, Lin TY, Wang DM. A model for resistance growth during protein microfiltration. *Sep Sci Technol* 2003;38:917–32.
- Zheng S, Lin HK, Lu B, Williams A, Datar R, Cote RJ, Tai YC. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. *Biomed Microdevices* 2011;13:203–13.
- Lu B, Xu T, Goldkorn A, Tai YC. Polyethylene membrane slot filter for the capture, analysis and culture of viable circulating tumor cells. Proceedings of the 23rd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS '10), Hong Kong, China. Jan 25–28 2010;935–8.
- Lin HK, Zheng S, Williams AJ, Balic M, Groshen S, Scher HI. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 2010;16:5011–8.
- Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 2011;31:427–41.
- Freidin MB, Tay A, Freydina DV, Chudasama D, Nicholson AG, Rice A, et al. An assessment of diagnostic performance of a filter-based antibody-independent peripheral blood circulating tumour cell capture paired with cytomorphologic criteria for the diagnosis of cancer. *Lung Cancer* 2014;85:182–5.
- Mohamed H, McCurdy LD, Szarowski DH, Duva S, Turner JN, Caggana M. Development of a rare cell fractionation device: application for cancer detection. *IEEE Trans Nanobioscience* 2004;3:251–6.
- Tan SJ, Yobas L, Lee GY, Ong CN, Lim CT. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomed Microdevices* 2009;11:883–92.
- Xu L, Mao X, Imrali A, Syed F, Mutsavangwa K, Berney D, et al. Optimization and evaluation of a novel size based circulating tumor cell isolation system. *PLoS One* 2015;10:e0138032.
- Wu A, Bhagat AA, Leong MC, Lim CT. ClearCell FX: a microfluidic system for label-free circulating tumor cell enrichment. *J Clin Oncol* 2014;32(15 Suppl):e22023.
- Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc* 2014;9:694–710.
- Pohl HA. Some effects of nonuniform fields on dielectrics. *J Appl Phys* 1958;29:1182–8.
- Pethig R. Review article-dielectrophoresis: status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics* 2010;4:022811.
- Gonzalez CF, Remcho VT. Harnessing dielectric forces for separations of cells, fine particles and macromolecules. *J Chromatogr A* 2005;1079:59–68.
- Becker FF, Wang XB, Huang Y, Pethig R, Vykoukal J, Gascoyne P. Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:860–4.
- Moon HS, Kwon K, Kim SI, Han H, Sohn J, Lee S, Jung HI. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP). *Lab Chip* 2011;11:1118–25.
- Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova VO, Hasegawa DK, Pethig R, Davis DW. ApoStreamTM, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics* 2012;6:24133.
- Bolognesi C, Doffini A, Busson G, Lanzelotto, Signorini G, Sero V et al. Image-based microchip sorting of pure, immunophenotypically defined subpopulation of tumor cells from tiny formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples reveals their distinct genetic features. *Cancer Res* 2015;75:1552.
- Vykoukal J, Vykoukal DM, Freyberg S, Alt EU, Gascoyne PR. Enrichment of putative stem cells from adipose tissue using dielectrophoretic field-flow fractionation. *Lab Chip* 2008;8:1386–93.
- Moldenhauer G, Momburg F, Möller P, Schwartz R, Hämmerling GJ. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* 1987;56:714–21.
- Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the

- sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R69.
52. Pamme N. On-chip bioanalysis with magnetic particles. *Curr Opin Chem Biol* 2012;16:436–43.
 53. Talasz AH, Powell AA, Huber DE, Berbee JG, Roh KH, Yu W, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3970–5.
 54. Ghazani AA, McDermott S, Pectasides M, Sebas M, Mino-Kenudson M, Lee H, et al. Comparison of select cancer biomarkers in human circulating and bulk tumor cells using magnetic nanoparticles and a miniaturized micro-NMR system. *Nanomedicine* 2013;9: 1009–17.
 55. Haun JB, Devaraj NK, Hilderbrand SA, Lee H, Weissleder R. Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection. *Nat Nanotechnol* 2010;5:660–5.
 56. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4589–94.
 57. Schneider T, Moore LR, Jing Y, Haam S, Williams PS, Fleischman AJ, et al. Continuous flow magnetic cell fractionation based on antigen expression level. *J Biochem Biophys Methods* 2006;68:1–21.
 58. Zborowski M, Chalmers JJ. Rare cell separation and analysis by magnetic sorting. *Anal Chem* 2011;83: 8050–6.
 59. O'Hara SM, Moreno JG, Zweitzig DR, Gross S, Gomella LG, Terstappen LW. Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Chem* 2004;50:826–35.
 60. Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, Hofstetter A, Oberneder R. Isolation of circulating cancer cells from whole blood by immunomagnetic cell enrichment and unenriched immunocytochemistry in vitro. *J Urol* 2003;169:701–5.
 61. Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One* 2012;7:e33788.
 62. Pamme N. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip* 2006;6:24–38.
 63. Hoshino K, Huang YY, Lane N, Huebschman M, Uhr JW, Frenkel EP, Zhang X. Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab Chip* 2011;11:3449–57.
 64. Lu J, Fan T, Zhao Q, Zeng W, Zaslavsky E, Chen JJ, et al. Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *Int J Cancer* 2010;126:669–83.
 65. Fan T, Zhao Q, Chen JJ, Chen WT, Pearl ML. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;112:185–91.
 66. Zheng X, Cheung LS, Schroeder JA, Jiang L, Zohar Y. A high-performance microsystem for isolating circulating tumor cells. *Lab Chip* 2011;11:3269–76.
 67. Adams AA, Okagbare PI, Feng J, Hupert ML, Patterson D, Göttert J, et al. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J Am Chem Soc* 2008;130:8633–41.
 68. Hughes AD, Mattison J, Western LT, Powderly JD, Greene BT, King MR. Microtube device for selectin-mediated capture of viable circulating tumor cells from blood. *Clin Chem* 2012;58:846–53.
 69. Auman JT, McLeod HL. Colorectal cancer cell lines lack the molecular heterogeneity of clinical colorectal tumors. *Clin Colorectal Cancer* 2010;9:40–7.
 70. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 2015;75:892–901.
 71. Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014;345:216–20.
 72. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 339:580–4.
 73. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, et al. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res* 2013;73:2059–69.
 74. Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, Garcia-Villa A, Deighan C, Wu Y, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2014;16:R23.
 75. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:3514–9.



Research Paper

Isolation of circulating tumor cells in a preclinical model of osteosarcoma: Effect of chemotherapy



Antoine Chalopin^{a,b,1}, Marta Tellez-Gabriel^{c,1}, Hannah K. Brown^d, François Vallette^e,
Marie-Françoise Heymann^{d,e}, François Guoin^{a,b,c,d}, Dominique Heymann^{c,d,e,*}

^a INSERM, U1238, Université de Nantes, Faculty of Medicine, rue Gaston Veil, Nantes, France

^b Nantes University Hospital, CHU, Alexis Ricordeau, France

^c Université de Nantes, Faculty of Medicine, Nantes, France

^d INSERM, European Associated Laboratory "Sarcoma Research Unit", Department of Oncology and metabolism, Medical School, University of Sheffield, United Kingdom

^e Institut de Cancérologie de l'Ouest, CRCINA, LabCT, INSERM, U1232, Université de Nantes, Université d'Angers, 44805 cedex, Saint Herblain, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Osteosarcoma
Circulating tumor cells
Metastatic process
Biomarker
Recurrent disease

ABSTRACT

Osteosarcoma is a rare primary bone tumor, which mainly affects children and adolescents and has a poor prognosis, especially for patients with metastatic disease. A poor therapeutic response to the conventional chemotherapy is observed with the development of lung metastases, highlighting the need for improving the current regimens and the identification of early markers of the recurrent and metastatic disease. Circulating Tumour Cells (CTCs) play a key role in the metastatic process and could be powerful biomarkers of the progressive disease. The present study aimed to isolate CTCs by using a pre-clinical model of human osteosarcoma and to monitor their kinetic of release and their modulation by ifosfamide. CTCs were detectable into the bloodstream before any palpable primary tumors. Ifosfamide increased CTCs count and in contrast decreased the number of lung tumor nodules. On established tumors, ifosfamide slowed down the tumour growth and did not modulate CTC count that could be explained by a release of cancer cells from the primary tumour with reduced properties for inducing lung metastases. This report highlights the biological interest of CTCs in osteosarcoma.

1. Introduction

Osteosarcoma is the most common primary malignant tumour of bone in children and young adults. This neoplasm has its origin in mesenchymal cells committed to the osteoblast differentiation programme [1–3]. Malignant cells are able to destabilize the accurate osteoblastic/osteoclastic activity balance of bone formation and resorption that in turn facilitates the tumour cell proliferation and formation of tumoral osteoid tissue. Conventional therapy for osteosarcoma patients combines neoadjuvant chemotherapy followed by surgical removal of all detectable disease (including metastases), and post-operative chemotherapy [1,4,5]. Current regimens of chemotherapy are based on four drugs: i) high-dose methotrexate (HDMTX) with leucovorin rescue; ii) doxorubicin (adriamycin); iii) cisplatin, and iv) ifosfamide [15]. Unfortunately, a low response rate to chemotherapy is frequently observed leading to the development of metastases preferentially located in the lungs and finally to the patient death.

The cell dissemination process is a very complex mechanism that

involves various components of the tumour microenvironment (e.g. blood vessels, immune cells) [7–9]. Cancer cells that have escaped from the primary tumour and are able to invade the bloodstream to become Circulating Tumour Cells (CTCs), that will be capable to intravasate, survive in the circulation, migrate into the interstitial space and finally establish the tumour growth at a new location [10–12]. Only a small number of cells will successfully complete all the steps, thus it is important to identify and well characterize which CTCs are able to complete the metastatic process [12].

Numerous studies have underlined the biological value of CTCs that can be used as biomarkers in the follow up of epithelial malignancies such breast and prostate cancers [13]. CTCs, which are collected, isolated and characterized from a non-invasive liquid biopsy, reflect the primary or/and metastatic disease for which a targeted therapy may be given [13,14]. Even if membrane vimentin or bone isoenzyme of alkaline phosphatase appear to be expressed by a majority of bone sarcomas and could be used for isolating sarcoma CTCs [15–17], there is no universal marker for the CTC detection in tumours of mesenchymal

* Corresponding author at: Institut de Cancérologie de l'Ouest, INSERM, LabCT, Blvd Jacques Monod, 44805 Saint-Herblain cedex, France
E-mail addresses: dominique.heyman@univ-nantes.fr, dominique.heyman@sheffield.ac.uk (D. Heymann).

¹ AC and MTG have contributed equally to this work.

origin. Consequently, various methods independent of any cell markers have been proposed and are based on size or density discrimination [18–20]. In light of the few reports available in the literature [15–17] and the lack of specific marker for isolating sarcoma CTCs, by using a preclinical model of osteosarcoma, the aims of the present study were to: i) isolate CTCs; ii) enumerate CTCs during the tumour growth and iii) determine the effect of ifosfamide treatment on CTC release.

2. Material and methods

2.1. Cell culture

HOS-MNNG human osteosarcoma cell line purchased from the American Type Culture Collection was modified for overexpressing the green fluorescence protein (GFP) [21]. GFP-MNNG/HOS cells were cultured in DMEM (Lonza, Belgium) supplemented with 10% FBS in a humidified 5% CO₂/air atmosphere at 37 °C.

2.2. In vivo experiments

For both experiments 6-week-old female athymic nude mice were purchased from Elevages Janvier (France) and Harlan Laboratory (UK) and procedures involving animal handling and care were approved by the Animal Care and Ethics Committee of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.06, authorization number: 1280.01) and the Home office in UK [PPL: 70/8967, Establishment license no.: 50/2509]. Mice were acclimatized for at least one week prior to experimental manipulation. Mice were anesthetized by inhalation of Isoflurane/air (1.5%, 1 Lmin⁻¹) before i.m. inoculation of 1.5×10^6 GFP-MNNG/HOS cells resuspended with phosphate-buffered saline (PBS). Osteosarcoma cells were injected in close proximity to the tibia, rapidly leading to tumour growth in the soft tissue with secondary contiguous bone invasion and development of lung metastases [22]. The tumor volumes were monitored twice a week and calculated by measuring two perpendicular diameters using calipers, according to the following formula: $V = 0.523 \times L \times (S)^2$, in which L and S are, respectively, the largest and the smallest perpendicular diameters. Tumor volumes were monitored until a maximum of 2500 mm³. Blood samples were collected in EDTA tubes by intracardiac puncture in anesthetised animals and mice were euthanized by cervical dislocation. Ifosfamide (HoloXan, Baxter) was prepared extemporaneously, diluting with PBS and administered intraperitoneally at doses of 15 mg/kg or 30 mg/kg per day on cycles of 3 consecutive days. Control mice were injected in the same conditions with an equivalent volume of PBS. The doses used were defined on the most commonly-used dose in the literature [23–26], on the frequency applicable in clinical practice, and on the recommendations proposed by Reagan-Shaw et al. [27]. Lung metastatic nodules were macroscopically and manually scored in each animal at the time of necropsy as previously shown [22].

2.3. Blood processing: enrichment step of blood samples and isolation of circulating tumour cells

Collection of CTCs from blood combined a pre-enrichment step and an isolation phase. Pre-enrichment was carried out as follow: i) red cell depletion carried out by incubation of blood samples with cell lysis buffer for 10 min at room temperature; ii) cell wash with PBS three times consecutively; iii) leukocytes depletion using double positive selection with CD45- and Tert19-microbeads (Milteny Biotec, Germany) following the manufacturer's protocol. CTCs were the isolated either by fluorescence activated cell sorting (FACS ARIAM, Becton Dickinson) or by the DEPArray™ platform (Menarini, Silicon Biosystems, Italy) to obtain pure single cells [28] (Fig. 1).

2.4. RNA extraction and gene expression analysis

Total RNA was extracted using the NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. Kg, Germany). RNA was reverse transcribed using the Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, France) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed with a CFX96 real-time PCR detector system (Bio-Rad, France) with SYBR Select master Mix reagents (Life Technologies, France). Primer sequences are detailed in supplementary data 1.

2.5. Proliferation assay

Proliferation was determined by using a WST-1 colorimetric test based on the cleavage of the tetrazolium salt WST-1 by mitochondrial dehydrogenase in viable cell and according the manufacturer's recommendation (Takara, Japan). Two thousands cells per well were seeded into 96 multi-well plates and after 24 h, 48 h and 72 h, cell proliferation was assessed by optical density measurement at 470 nm with Victor 2 1420 (Multilabel Counter, Perkin Elmer).

2.6. Migration and invasion assays

To evaluate migration ability of GFP-MNNG/HOS cells and isolated CTCs, cells were seeded in growth media without serum on the upper side of a Transwell chamber (Falcon) on a porous transparent polyethylene terephthalate membrane (8 µm pore size). The lower chamber of the transwell was filled with growth medium containing 10% FBS. After 24 hours of incubation, cells on the upper side of the filters were mechanically removed and cells migrated to the lower side were fixed (with glutaraldehyde 10%) and stained (with violet crystal 0.1%). Five random fields were taken under light microscope and analysed for each chamber and cells were counted with the ImageJ software (NIH, USA). The same procedure was used for invasion assays seeding cells on the upper side of Matrigel® (Corning, France)-coated transwells (50 ng Matrigel/well).

2.7. Statistical analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). SEM from replicate experiments was calculated as noted in the legends and is shown as error bars. All error bars show SEM for at least triplicate measurement from independent experiments. The mean ± SEM was calculated for all groups and compared by non-parametric Mann–Withney Wilcoxon test. SPSS statistics software (IBM) was used for all statistical analysis. Differences were considered significant at the 95% confidence level ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. CTCs are detectable before the tumour mass in a murine model of osteosarcoma

To validate the methods used and to avoid any bias linked to the mode of cancer cell injection in mice, 2×10^7 GFP-MNNG/HOS cells resuspended in PBS or Matrigel® were inoculated intramuscularly in paraosseous site. After blood collection, the presence of CTCs was analysed by flow cytometry after 24 h and 48 h post inoculation. In all conditions used, no CTCs were observed into the blood demonstrating that CTCs further detected were not associated to a technical artefact such as a leak of cancer cells into the bloodstream immediately after cell inoculation (data not shown).

We carried out a kinetic analysis of CTC release into the bloodstream. Thirty mice previously injected with 1.5×10^6 GFP-MNNG/HOS cells, were randomly divided into 3 groups and sacrificed at days 10, 30 and 45 respectively after cell injection (Fig. 2A). For each group,

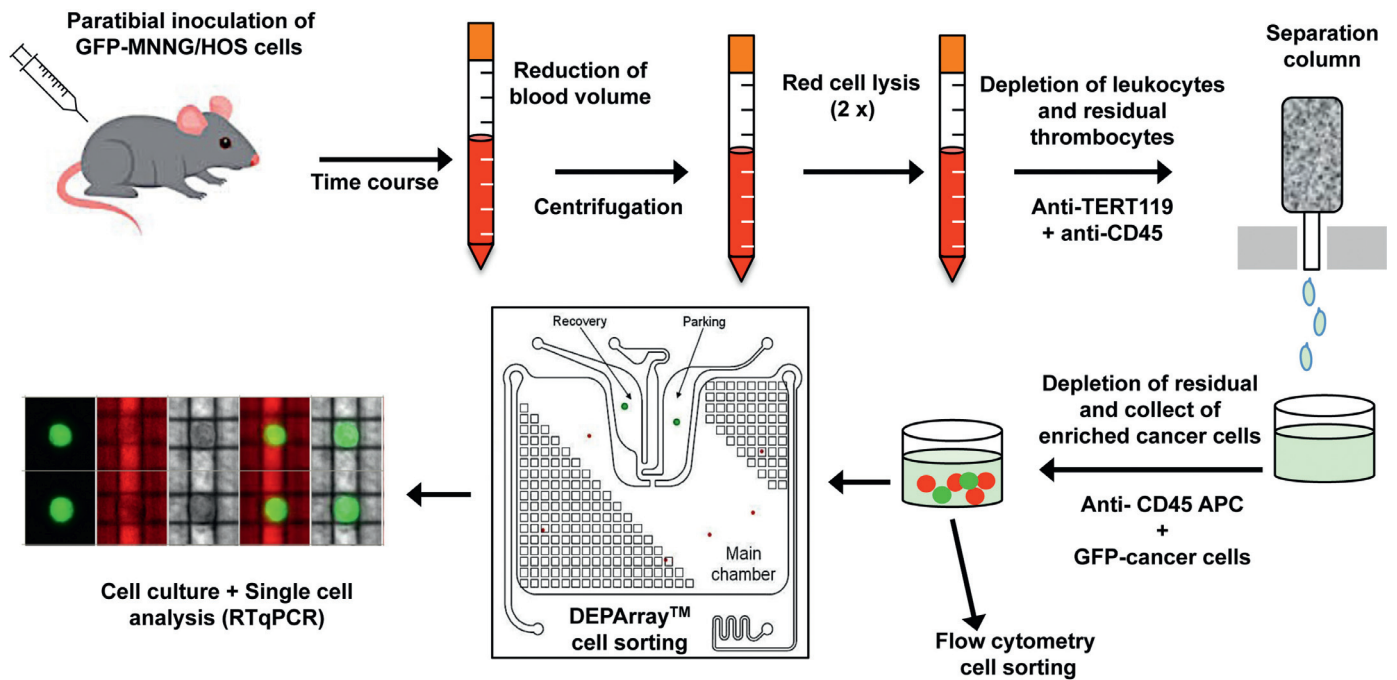


Fig. 1. CTC capture and characterization workflow. CTCs were isolate from a xenograft murine model of human osteosarcoma cells. Human GFP-MMNG/HOS osteosarcoma cells were inoculated in close contact to the tibia of immunodeficient mice. The kinetic study of CTCs detection into the bloodstream was then carried out. A first pre-enrichment step was performed including successively: i) a reduction of blood volume by centrifugation; ii) two lyses of erythrocytes; iii) an immunomagnetic depletion of leukocytes and residual thrombocytes. In a second step, enriched samples were processed for isolating CTCs by flow cytometry or dielectrophoresis technology (DEPArray™). Isolated cells were enumerated, cultured and singles cells were analysed by RTqPCR.

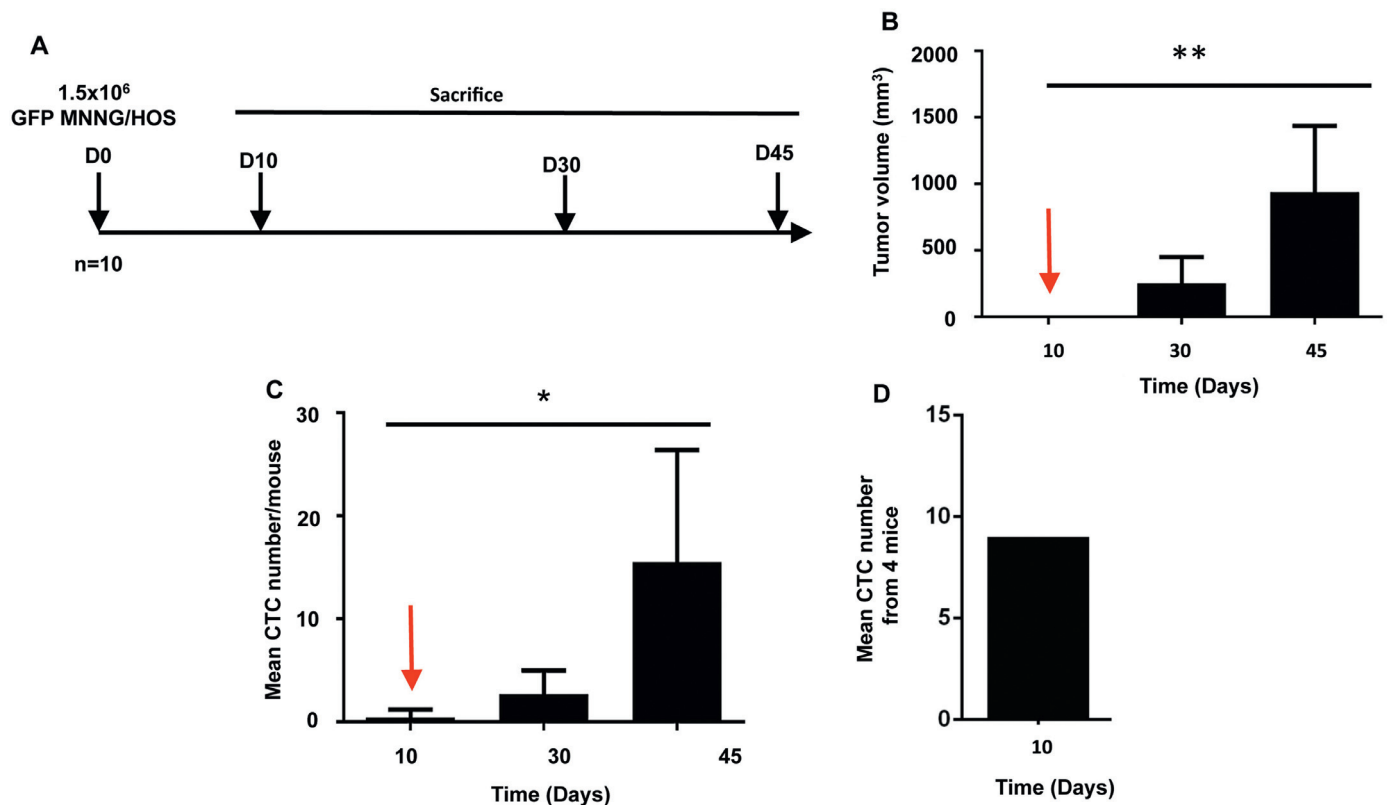


Fig. 2. Monitoring of CTC release into the bloodstream. (A) Summary of the experimental protocole. Human GFP-MMNG/HOS osteosarcoma cells were inoculated in paratibial site of nude mice. Tumor growth monitored (B) twice a week and the CTC dynamic (C,D) in blood were monitored at day 10, 30 and 45 after tumor cell inoculation. CTCs were enumerated by flow cytometry (C) or by DEPArray™ (D). CTCs are precociously detectable in mice before any palpable tumor mass and can be considered an early event associated to the tumor development. D10: day 10; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 5$ /condition.

6 samples were individually processed by flow cytometry cell sorting for CTC isolation and 4 blood samples were pooled for isolating individual CTCs with the DEPArray™. As expected, cells inoculated resulted in the formation of palpable tumours growing in a time dependent manner (Fig. 2B). In parallel of the tumour growth, the number of CTCs has been increasing in a time dependent manner and CTCs were detectable from day 10 post-cell injection, before any palpable tumour mass and lung metastases (Fig. 2C). The early detection of CTCs was confirmed by the two methods used: flow cytometry (Fig. 2C) and DEPArray™ (Fig. 2D).

3.2. Ifosfamide treatment results in a decrease of the primary tumour volume and an increase of CTCs

Ifosfamide is one of the conventional drugs used in osteosarcoma. We assessed the effects of ifosfamide and more precisely the number of CTCs, tumour volume and number of metastasis when the drug was administered at early stages of the disease in the murine model (i.e. 10 days after tumor challenge). Fifteen mice, previously injected with GFP-MNNG/HOS cells were divided into 3 groups: group 1, five days after cell inoculation mice received 1 cycle of ifosfamide at a dose of 15 mg/kg (1 cycle = drug administration three consecutive days); group 2, five days after cell inoculation mice received 1 cycle of ifosfamide at a dose of 30 mg/kg; group 3 (control group): mice received equivalent volume of PBS (Fig. 3A). Mice were sacrificed at day 25 and blood samples were collected and individually processed to isolate CTCs by cell sorting. As shown in Fig. 3, there were no statistical significant differences in tumour volumes (Fig. 3B). However, the number of CTCs was higher in treated groups compared to the control group ($p < 0.01$), and

surprisingly, the number of metastases has significantly decreased during the same period of time ($p < 0.05$) (Fig. 3C).

Then, we studied the effect of the administration of multiple ifosfamide doses. Thirty-two mice injected with GFP-MNNG/HOS cells, randomized before treatment in two groups A and B. When the tumor mass was palpable (D24), the mice of group A ($n = 8$ /subgroup) received 1 cycle of ifosfamide at 30 mg/Kg or PBS solution as the control subgroup. In group B, mice were treated with 2 cycles of ifosfamide at 30 mg/kg, at one week interval or PBS as the control group (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, one cycle of ifosfamide reduced significantly the tumor growth (mean tumor volume at D33: 498.3 mm³ for treated mice compared to 1220.5 mm³ for control; $p < 0.001$) but did not reduced significantly the number of CTCs (Fig. 4B). As expected, in treatment B, treated mice showed a significant decrease in tumor volumes (mean tumor volumes at D45: 663.9 mm³ in treated mice compared to 1454.9 mm³ in control mice; $p < 0.01$). However two cycles ifosfamide had no impact on CTC number compared to the vehicle group (Fig. 4C). All together, these results revealed the differential effect of ifosfamide on the release of tumor cells according the stage of tumor development.

3.3. Molecular characterization of isolated CTCs at early stages

Isolated CTCs exhibited properties of adherence then reflecting indirectly their viability. Single isolated CTCs were cultured and their biological properties and phenotype were compared with the parental cell line. Two cell lines (CTC1, CTC2) were then developed (Fig. 5). Proliferation, migration, invasion assays did not show any significant difference between CTC1, CTC2 and the parental cell line (data not shown). The expression of several markers related to metastatic process

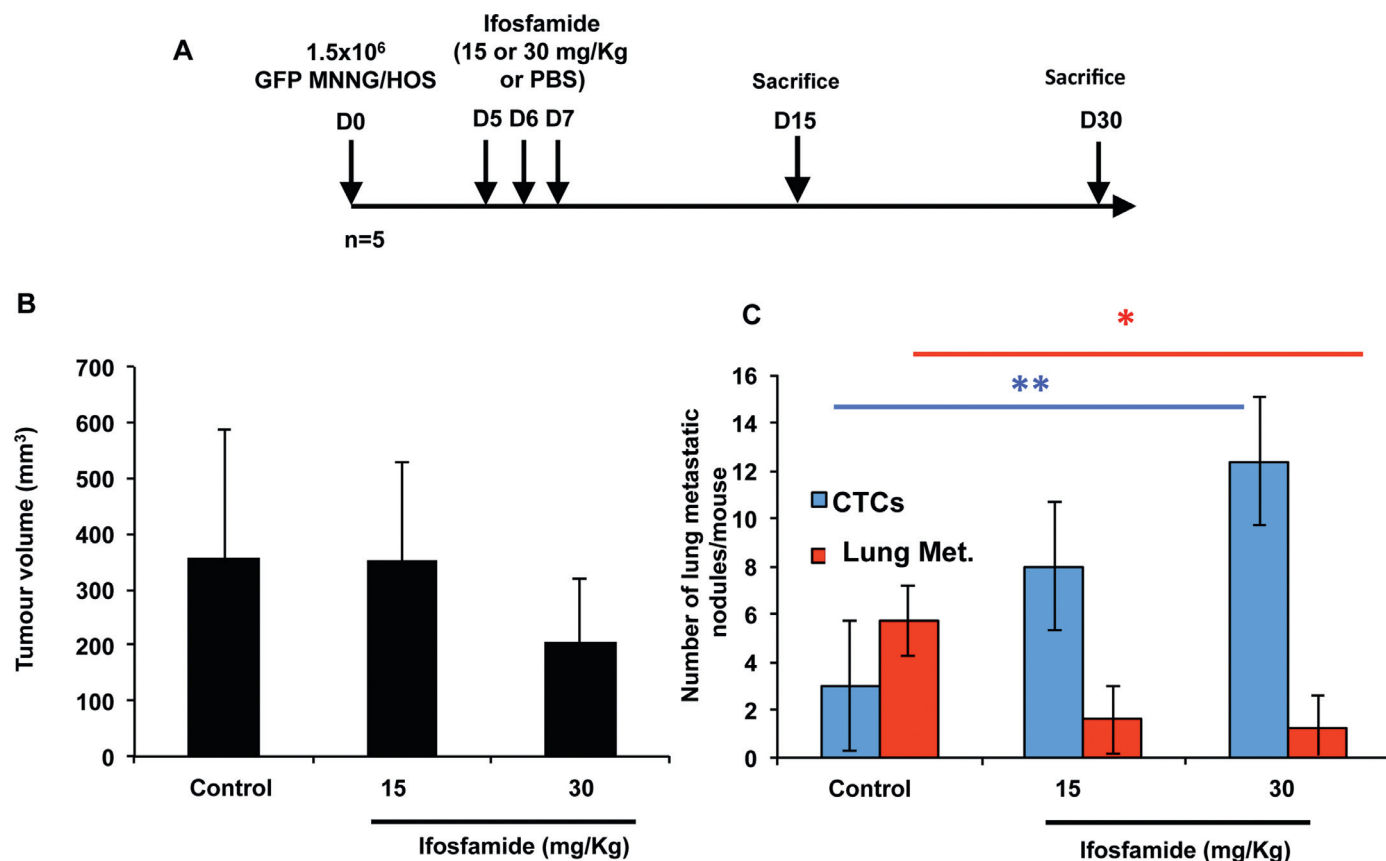


Fig. 3. Opposite effect of one cycle of ifosfamide on the number of lung metastases and CTCs at early stage of osteosarcoma development. (A) Summary of the experimental protocol. Human GFP-MNNG/HOS osteosarcoma cells were inoculated in paratibial site of nude mice. Three days post-inoculation of osteosarcoma cells, mice were treated with ifosfamide at doses of 15 mg/kg or 30 mg/kg i.p. per day, 3 days consecutively. Control mice were injected in the same conditions with an equivalent volume of PBS. Tumor volume (B), number of lung metastases/mouse (Lung Met.) (C) and CTCs (C) were enumerated 15 and 30 days after inoculation of cancer cells.

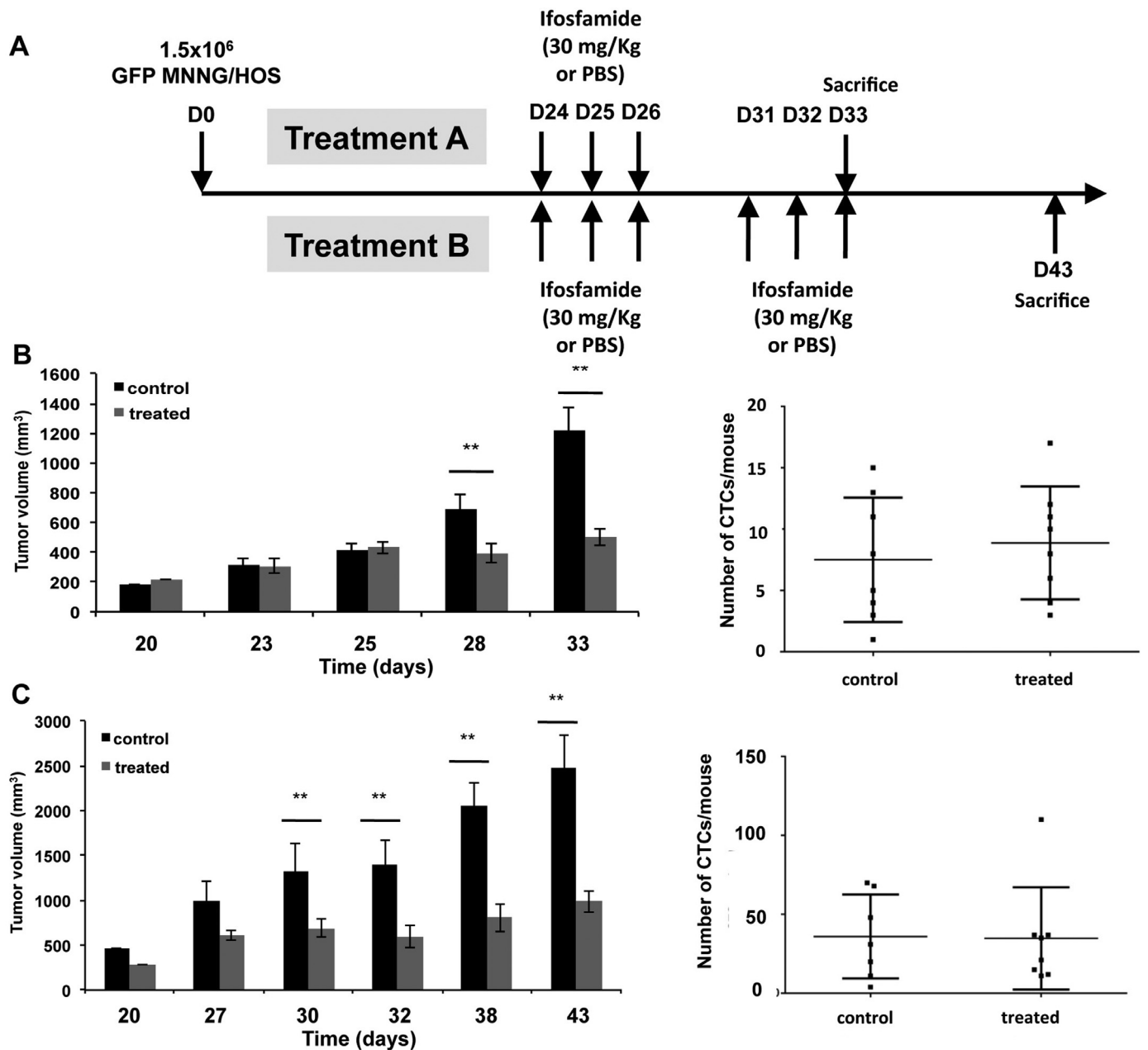


Fig. 4. At late stage of osteosarcoma development, one cycle or two cycles of ifosfamide slow down the tumor volume without any impact on CTC release into the bloodstream. (A) Summary of the experimental protocols. Human GFP-MMNG/HOS osteosarcoma cells were inoculated in paratibial site of nude mice. Three weeks post-inoculation of osteosarcoma cells, mice were treated with one (B) or two cycles (C) of 30 mg/kg/day i.p. ifosfamide administered 3 days consecutively. Control mice were injected in the same conditions with an equivalent volume of PBS. Tumor volume and CTCs were measured at the end-point. D0: day 0. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. $n = 8$ /group.

(CD99, ADAM8, ENDRA and LTK) was compared between the two clones and the parental cell line. As shown in Fig. 5, ADAM8, LTK and ENDRA were differentially expressed in the three cell lines and in contrast to CD99.

4. Discussion

Osteosarcoma is the most common bone sarcoma in adolescents. Unfortunately, a poor therapeutic response to the conventional chemotherapy is frequently observed leading to the development of metastatic foci and highlighting the need to improve the current regimens and to identify early biomarkers of the recurrent and/or metastatic disease. The present study analysed the biological value of CTCs into the bloodstream in a preclinical model of osteosarcoma. CTCs were

detectable at early stage of the disease before any tumor mass. At early stage of osteosarcoma development, one cycle of ifosfamide (15 or 30 mg/Kg) had any significant effect on the primary tumor growth. However, a high impact on the metastatic process was observed and was characterized by a decreased number of lung metastases, and surprisingly, by an increase in the total number of viable CTCs. At later stage, one or two cycles of ifosfamide had a significant beneficial effect on the growth of primary tumors and no impact on the release of CTCs into the bloodstream.

The biological relevance of CTCs has been already established in epithelial cancers. Indeed, numerous studies demonstrated that metastatic patients with detectable CTCs have a worse prognosis compared to patients with undetectable CTCs [12,14]. The works focusing on the detection and capture of CTCs in osteosarcoma have been hampered

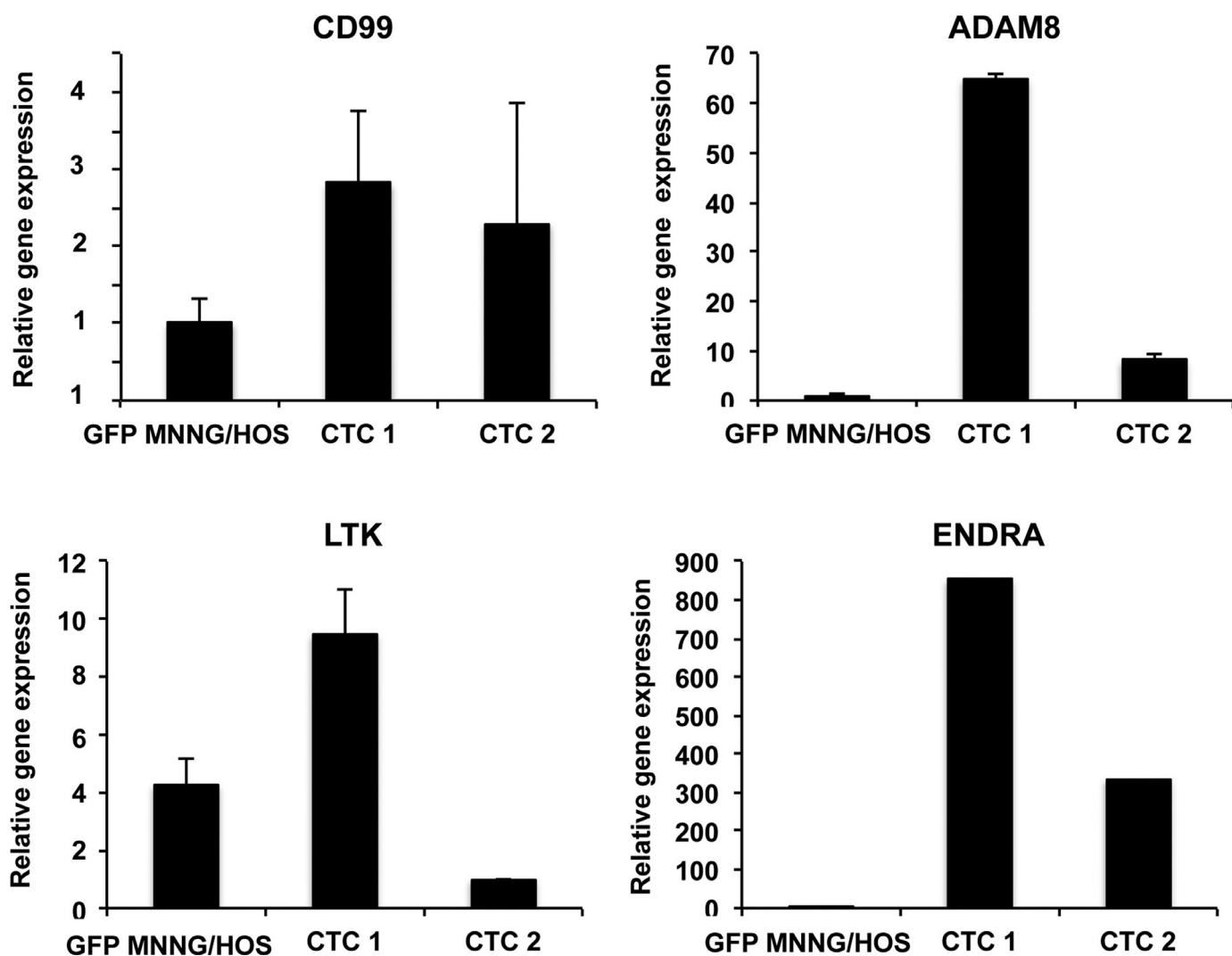


Fig. 5. Gene expression of CTCs compared to the parental cell line. Isolated CTCs were cultured and used for developing new cell lines. Gene expression profile for CD99, LTK, ENDRA and ADAM8 was analysed by RT-qPCR compared to Hprt1 used as house keeping gene. Relative expression of different genes was obtained with DDcT method.

due to the absence of specific markers expressed by mesenchymal cancer cells [15,18–20]. However, progressively more and more cues have strengthened the biological interest of CTCs in osteosarcoma. Thus, Satelli et al. observed a higher number of CTCs in metastatic patients compared to patients with localized disease. Using a method based on isolation by size of tumor cells (ISET), Chinen et al. [29] detected CTCs in sarcoma patients. More recently, Li et al. [30] confirmed the detection of CTCs in cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells and two studies analysing CTCs by FISH in small cohorts of osteosarcoma patients revealed a potential positive association between CTC count, disease progression and poor prognosis [31,32]. The present report is the first study investigating the regulation of CTC release after chemotherapy. CTCs were detectable in blood circulation at early stages of the disease (i.e. 10 days after cancer cell inoculation). This finding is in agreement with previous studies in breast [33] and prostate cancer [34]. Overall, these data suggest that CTCs could be used as a non-invasive method to study the early biological events of osteosarcoma development and to monitor the recurrence of the disease in patients.

Ifosfamide belongs to the four major alkylating agents used in the treatment of osteosarcoma including also methotrexate, cisplatin and doxorubicin [35]. In the present report, we observed an opposite effect of ifosfamide on the CTC and lung metastasis formation at early stage of

the tumor development. Indeed, ifosfamide decreased the number of lung nodules whereas CTC count increased on the period of time and may be considered as a new biological tool for monitoring therapeutic response. On established tumors, ifosfamide whatever the dose regimen, had a therapeutic benefit as demonstrated by a slow down of tumor progression after drug administration. The differential effects of ifosfamide on tumor volume between early and late stages of tumor development could be explained by the vasculature network formed in established tumors leading to a higher bioavailability of ifosfamide close to the tumor tissues. After inoculation, cancer cells establish cell contact with their microenvironment and progressively proliferate and elaborate an osteoid matrix [5,7,8]. The fragile interface between cancer cells and their environment at early stage could explain the significant release of CTCs after ifosfamide treatment not observed on later stages. CTC count was higher in large tumors than at the early stage of the disease and was not modulated by ifosfamide revealing a potential “equilibrium” or “saturating” state in the metastatic process in osteosarcoma. However, CTCs detectable after ifosfamide treatment appear unable to induce the formation of lung metastases. This increase could be explained by a release of phenotypically altered cancer cells from the primary tumour induced by chemotherapy and with reduced properties for inducing lung metastases. CTC extravasation is a complex mechanism mixing physical properties of cancer cells (e.g. lower

deformability) and biological aspects such as genetic properties and specific addressing molecules that lead to the reciprocal recognition of lymphatic/blood vessel walls of distant organs by CTCs. Therefore, CTC heterogeneity and phenotypic specificities drive their extravasation into the metastatic site and the formation of metastatic nodules [6,36].

CTCs play a key role in the metastatic process and could be powerful biomarkers of the progressive disease or/and therapeutic response [37]. The present work analysed for the first time the effects of a conventional chemotherapeutic agent in a pre-clinical model of osteosarcoma. Overall, our study strengthens the potential interest to enumerate and characterize CTCs in osteosarcoma. Osteosarcoma are highly prone to induce lung metastases, which more frequently occur within 3 years following the diagnosis and which have a major impact on the overall survival rate. Based on the present results, CTCs appear detectable before any tumor mass and may be considered as an early event of the metastatic dissemination and/or may reflect the recurrent disease. To assess the biological value of CTCs in osteosarcoma recurrence, murine models could be used. The enumeration of CTCs in a murine model based on patient-derived sarcoma xenografts or murine-tumor allograft surgically implanted into hindlimbs, subsequently amputated followed by an observational period of time for development of metastasis could be an option [38–40]. The number of CTCs may reflect the therapeutic response suggesting a strong clinical interest in the follow up of osteosarcoma patients. The lack of ifosfamide-treated CTCs to implant in the lung should be assessed by inoculating treated CTCs in non-treated immunodeficient mice and determining their ability to establish lung metastases. Of course, the “clinical applications” of the present work should be taken in consideration with caution, in particular, since ifosfamide shows a paradoxical effect in patients with a therapeutic response on established soft-tissue/para-osteal tumours but not on sub-clinical disease. The present study should be considered as a proof-of-concept for isolating CTCs in osteosarcoma in absence of universal biomarkers. The next step of the study will be to determine the biological and clinical value of CTC in osteosarcoma and the isolation/enumeration/characterization of CTCs in a large series of patients (e.g. metastatic versus non-metastatic disease; kinetic of CTC release during chemotherapy) will be then required.

Acknowledgment

The works was performed at Inserm (University of Nantes) and at the University of Sheffield (INSERM). We thank the Cytometry Facility Cytocell for expert technical assistance (SFR Bonamy, University of Nantes, FR).

Funding

This study was written as a part of a research project which was funded by the Bone Cancer Research Trust (UK, research project number 144681) and the Seventh Framework Programme (FP7) under grant agreement no. 264817 – BONE-NET.

Conflict of interest

Authors have no conflict of interest.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jbo.2018.07.002.

References

- [1] H.K. Brown, K. Schiavonne, F. Gouin, M.F. Heymann, D. Heymann, Biology of bone sarcomas and new therapeutic developments, *Calcif. Tissue Int.* 102 (2018) 174–195.
- [2] A.B. Mohseny, K. Szuhai, S. Romeo, A.P. Buddingh, I. Briare-de Bruijn, D. de Jong, M. van Pel, A.M. Cleton-Jansen, P.C. Hogendoorn, Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2, *J. Pathol.* 219 (2009) 294–305.
- [3] A.J. Mutsaers, C.R. Walkley, Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* 62 (2014) 56–63.
- [4] A.I. Ségaly, M. Tellez-Gabriel, M.F. Heymann, D. Heymann, Receptor tyrosine kinases: characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers, *J. Bone Oncol.* 4 (2015) 1–12.
- [5] M.F. Heymann, H.K. Brown, D. Heymann, Drugs in early clinical development for the treatment of osteosarcoma, *Expert Opin. Investig. Drugs* 25 (2016) 1265–1280.
- [6] A. Luetke, P.A. Meyers, I. Lewis, H. Juergens, Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 523–532.
- [7] A. Alfranca, L. Martinez-Cruzado, J. Tornin, A. Abarrategi, T. Amaral, E. de Alava, P. Menendez, J. Garcia-Castro, R. Rodriguez, Bone microenvironment signals in osteosarcoma development, *Cell Mol. Life Sci.* 72 (2015) 3097–3113.
- [8] M.F. Heymann, F. Lezot, D. Heymann, The contribution of immune infiltrates and the local microenvironment in the pathogenesis of osteosarcoma, *Cellular Immunol.* (2018) In Press.
- [9] Q. Liu, H. Zhang, X. Jiang, C. Qian, Z. Liu, D. Luo, Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to seed and soil hypothesis, *Mol. Cancer* 16 (2017) 176.
- [10] S.P. Chiang, R.M. Cabrera, J.E. Segall, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 311 (2016) C1–C14.
- [11] X.X. Jie, X.Y. Zhang, C.J. Xu, Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: mechanisms and clinical applications, *Oncotarget* 8 (2017) 81558–81571.
- [12] K. Pantel, M.R. Speicher, The biology of circulating tumor cells, *Oncogene* 35 (2016) 1216–1224.
- [13] C. Alix-Panabières, K. Pantel, *Cancer Discov.* 6 (2016) 479–491.
- [14] K. Pantel, C. Alix-Panabières, Liquid biopsy: potential and challenges, *Mol. Oncol.* 10 (2016) 371–373.
- [15] A. Satelli, A. Mitra, J.J. Cutrera, M. Devarie, X. Xia, D.R. Ingram, D. Dibra, N. Somaiah, K.E. Torres, V. Ravi, J.A. Ludwig, E.S. Kleinerman, S. Li, Universal marker and detection tool for human sarcoma circulating tumor cells, *Cancer Res* 74 (2014) 1645–1650.
- [16] Ø.S. Bruland, H. Høifødt, G. Saeter, S. Smeland, O. Fodstad, Hematogenous micrometastases in osteosarcoma patients, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 4666–4673.
- [17] Ø.S. Bruland, H. Høifødt, K.S. Hall, S. Smeland, Ø. Fodstad, Bone marrow micrometastases studied by an immunomagnetic isolation procedure in extremity localized non-metastatic osteosarcoma patients, *Cancer Treat. Res.* 152 (2009) 509–515.
- [18] L. Chang, G. Asatrian, S.M. Dry, A.W. James, Circulating tumor cells in sarcomas: a brief review, *Med. Oncol.* 32 (2015) 430.
- [19] M. Tellez-Gabriel, H.K. Brown, R. Young, M.F. Heymann, D. Heymann, The challenges of detecting circulating tumor cells in sarcoma, *Front. Oncol.* 6 (2016) 202.
- [20] M.T. Gabriel, L.R. Calleja, A. Chalopin, B. Ory, D. Heymann, Circulating tumor cells: a review of non-EpCAM-based approaches for cell enrichment and isolation, *Clin. Chem.* 62 (2016) 571–581.
- [21] L. Rodriguez Calleja, C. Jacques, F. Lamoureux, M. Baud'huin, M. Tellez Gabriel, T. Quillard, D. Sahay, P. Perrot, J. Amiaud, C. Charrier, R. Brion, F. Lecanda, F. Verrecchia, D. Heymann, L.W. Ellissen, B. Ory, ΔNp63α silences a miRNA program to aberrantly initiate a wound-healing program that promotes TGFβ-induced metastasis, *Cancer Res.* 76 (2016) 3236–3251.
- [22] A.I. Ségaly, A. Mohamadi, B. Dizier, A. Lokajczyk, R. Brion, R. Lanel, J. Amiaud, C. Charrier, C. Boisson-Vidal, D. Heymann, Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment, *Int. J. Cancer* 137 (2015) 73–85.
- [23] K. Sommer, S.O. Peters, I.H. Robins, M. Raap, G.J. Wiedemann, S. Rimmert, P. Sieg, C. Bittner, T. Feyerabend, A preclinical model for experimental chemotherapy of human head and neck cancer, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 1145–1149.
- [24] G.A. Odri, S. Dumoucel, G. Picarda, S. Battaglia, F. Lamoureux, N. Corradini, J. Rousseau, F. Tirode, K. Laud, O. Delattre, F. Gouin, D. Heymann, F. Redini, Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients, *Cancer Res.* 70 (2010) 7610–7619.
- [25] L. Hanly, R. Figueredo, M.J. Rieder, J. Koropatnick, G. Koren, The effects of N-acetylcysteine on ifosfamide efficacy in a mouse xenograft model, *Anticancer Res.* 32 (2012) 3791–3798.
- [26] B. Gobin, M.B. Baudhuin, F. Lamoureux, B. Ory, C. Charrier, R. Lanel, S. Battaglia, F. Redini, F. Lezot, F. Blanchard, D. Heymann, BYL719, a new α-specific PI3K inhibitor: single administration and in combination with conventional chemotherapy for the treatment of osteosarcoma, *Int. J. Cancer* 136 (2015) 784–796.
- [27] S. Regan-Shaw, M. Nihal, N. Ahmad, Dose translation from animal to human studies revisited, *FASEB J.* 22 (2007) 659–661.
- [28] M. Tellez-Gabriel, C. Charrier, B. Brounais-Le Royer, M. Mullard, H.K. Brown, F. Verrecchia, D. Heymann, Analysis of gap junctional intercellular communications using a dielectrophoresis-based microchip, *Eur. J. Cell Biol.* 96 (2017) 110–118.
- [29] L.T. Chinen, C.A. Mello, E.A. Abdallah, L.M. Ocea, M.E. Buim, N.M. Breve, J.L. Junior Gasparini, M.F. Fanelli, P. Paterlini-Bréchet, Isolation, detection, and immunomorphological characterization of circulating tumor cells (CTCs) from patients with different types of sarcoma using isolation by size of tumor cells: a window on sarcoma-cell invasion, *OncoTargets Ther.* 7 (2014) 1609–1617.
- [30] H. Li, Q.H. Meng, H. Noh, I.S. Bath, N. Somaiah, K.E. Torres, X. Xia, R. Wang, S. Li, Detection of circulating tumor cells from cryopreserved human sarcoma peripheral blood mononuclear cells, *Cancer Lett* 406 (2017) 216–223.
- [31] H. Zhang, P. Gao, X. Xiao, M. Heger, L. Geng, B. Fan, Y. Yuan, C. Huang, G. Chen, Y.

- Liu, Y. Hu, X. Yu, S. Wu, L. Wang, Z.A. Wang, A liquid biopsy-based method for the detection and quantification of circulating tumor cells in surgical osteosarcoma patients, *Int. J. Oncol.* In Press.
- [32] H.Q. Zhang, M.H. Li, Z. Wang, P.H. Lan, Y.J. Lu, G.J. Chen, L. Wang, Detection and clinical significance of circulating tumor cells in osteosarcoma using immunofluorescence combined with in situ hybridization, *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 339 (2017) 485–489.
- [33] M. Yu, S. Stott, M. Toner, S. Maheswaran, D.A. Haber, Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization, *J. Cell Biol.* 192 (2011) 373–382.
- [34] S.L. Stott, R.J. Lee, S. Nagrath, M. Yu, D.T. Miyamoto, L. Ulkus, E.J. Inserra, M. Ulman, S. Springer, Z. Nakamura, A.L. Moore, D.I. Tsukrov, M.E. Kempner, D.M. Dahl, C.L. Wu, A.J. Iafrate, M.R. Smith, R.G. Tompkins, L.V. Sequist, M. Toner, D.A. Haber, S. Maheswaran, Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer, *Sci. Transl. Med.* 2 (2010) 25ra3.
- [35] H. Jürgens, J. Treuner, K. Winkler, U. Göbel, Ifosfamide in pediatric malignancies, *Semin. Oncol.* 16 (1989) 46–50.
- [36] D.S. Micalizzi, S. Maheswaran, D.A. Haber, A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology, *Genes Dev.* 31 (2017) 1827–1840.
- [37] L. Zhou, D.T. Dicker, E. Matthew, W.S. El-Deiry, R.K. Alpaugh, Circulating tumor cells: silent predictors of metastasis, *F1000Res.* 6 (2017) 1445.
- [38] S.D. Goldstein, M. Hayashi, C.M. Albert, K.W. Jackson, D.M. Loeb, An orthotopic xenograft model with survival hindlimb amputation allows investigation of the effect of tumor microenvironment on sarcoma metastasis, *Clin. Exp. Metastasis* 32 (2015) 703–715.
- [39] M.E. Aanstoos, D.P. Regan, R.J. Rose, L.S. Chubb, N.P. Ehrhart, Do mesenchymal stromal cells influence microscopic residual or metastatic osteosarcoma in a murine model? *Clin. Orthop. Relat. Res.* 474 (2016) 707–715.
- [40] C. Maloney, M.C. Edelman, M.P. Kallis, S.Z. Soffer, M. Symons, B.M. Steinberg, Intratibial injection causes direct pulmonary seeding of osteosarcoma cells and is not a spontaneous model of metastasis: a mouse osteosarcoma model, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 476 (2018) 1514–1522.

Titre : Caractérisation des cellules tumorales circulantes de sarcomes osseux :
Identification de nouveaux marqueurs de la pathologie récidivante

Mots clés : Ostéosarcome, cellule tumorale circulante, maladie récurrente, biomarqueur

Résumé : L'ostéosarcome est une tumeur osseuse primaire rare, qui touche principalement les enfants et les adolescents. C'est une maladie de mauvais pronostic, en particulier pour les patients atteints d'une maladie métastatique. Une mauvaise réponse thérapeutique aux traitements conventionnels comme la chimiothérapie est observée avec le développement de métastases pulmonaires, soulignant la nécessité d'améliorer les schémas thérapeutiques actuels et l'identification de marqueurs précoces de la maladie récurrente et métastatique.

Les cellules tumorales circulantes (CTC) jouent un rôle clé dans le processus métastatique et pourraient être de puissants biomarqueurs de la maladie évolutive.

La présente étude visait à isoler les CTCs en utilisant un modèle préclinique d'ostéosarcome humain et de suivre leur cinétique de libération et leur modulation par l'ifosfamide. Les CTCs étaient détectables dans la circulation sanguine avant toute tumeur primaire palpable. L'ifosfamide a augmenté le nombre de CTC et, au contraire, a diminué le nombre de nodules tumoraux pulmonaires. Sur les tumeurs établies, l'ifosfamide a ralenti la croissance tumorale et n'a pas modulé le nombre de CTC qui pourrait s'expliquer par une libération de cellules cancéreuses de la tumeur primaire avec une réduction des propriétés d'induction de métastases pulmonaires.

Cette étude met en évidence l'intérêt biologique des CTCs dans l'ostéosarcome comme marqueur précoce de la maladie récidivante.

Title : Characterization of circulating tumor cells of bone sarcomas:
Identification of new markers of recurrent pathology

Keywords : osteosarcoma, circulating tumor cells, recurrent disease, biomarker

Abstract : Osteosarcoma is a rare primary bone tumor, which mainly affects children and adolescents and has a poor prognosis, especially for patients with metastatic disease. A poor therapeutic response to the conventional chemotherapy is observed with the development of lung metastases, highlighting the need for improving the current regimens and the identification of early markers of the recurrent and metastatic disease.

Circulating Tumour Cells (CTCs) play a key role in the metastatic process and could be powerful biomarkers of the progressive disease.

The present study aimed to isolate CTCs by using a pre-clinical model of human osteosarcoma and to monitor their kinetic of release and their modulation by ifosfamide. CTCs were detectable into the bloodstream before any palpable primary tumors. Ifosfamide increased CTCs count and in contrast decreased the number of lung tumor nodules. On established tumors, ifosfamide slowed down the tumour growth and did not modulate CTC count that could be explained by a release of cancer cells from the primary tumour with reduced properties for inducing lung metastases. This report highlights the biological interest of CTCs in osteosarcoma.