THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

# DOCTEUR DE

# L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPECIALITE Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Julie BLANCHI

## Evaluation des biopsies liquides dans les sarcomes des tissus mous : faisabilité et corrélation clinique de la détection de cellules tumorales circulantes et d'ADN tumoral circulant

Sous la direction du professeur Antoine ITALIANO

Soutenue le 4 mai 2022

Membres du jury :

| | | |
|---|---|---|
| M.MASSARD Christophe | PU-PH, Centre Eugène Marquis, Rennes | Président |
| Mme BIANCHINI Laurence | Chercheuse CNRS, Université Côte d'Azur | Rapporteur |
| M. KURTZ Jean-Emmanuel | PU-PH, Université de Strasbourg | Rapporteur |
| M. BIDARD François-Clément | PU-PH, Institut Curie, Paris | Examinateur |
| Mme SOUBEYRAN Isabelle | Dr, Institut Bergonié | Invitée |
| M. MERLIO Jean-Phillipe | PU-PH, Université de Bordeaux | Invité |
| M. ITALIANO Antoine | PU-PH, Université de Bordeaux | Directeur de thèse |

# Titre : Evaluation des biopsies liquides dans les sarcomes des tissus mous : faisabilité et corrélation clinique de la détection de cellules tumorales circulantes et d'ADN tumoral circulant

**Résumé :** Les sarcomes des tissus mous (STM) représentent un groupe de tumeurs hétérogènes regroupant plus de 70 histotypes différents. Environ 40% des STM traités évoluent en situation métastatique. Malgré cette hétérogénéité, la prise en charge des STM métastatiques est la même : le plus souvent palliative (médiane de survie entre 12 et 18 mois) reposant sur une chimiothérapie par doxorubicine et un monitoring de la maladie par imagerie.

Nous avons émis l'hypothèse que les biopsies liquides permettraient de suivre la réponse au traitement et orienteraient vers des thérapies ciblées chez des patients atteints de STM avancé. Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer la faisabilité et la pertinence pronostique du taux de cellules tumorales circulantes (CTC) et d'évaluer l'impact théranostique du séquençage de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) dans cette population de patients.

Afin d'évaluer la faisabilité et l'impact clinique de la détection des CTC, nous avons mis en œuvre une étude prospective (BIP) incluant des patients atteints de STM métastatique et débutant un traitement systémique. Nous avons inclus 76 patients entre juillet 2017 et décembre 2020. Nous avons choisi la technologie ISET basée sur la taille des cellules étant donné l'absence de marqueur membranaire universel compromettant l'utilisation de techniques basées sur la cytométrie. Les CTC étaient recueillies à l'inclusion, au 2ème et 4ème cycles de traitement. Grâce à l'utilisation de critères cytopathologiques, nous avons pu identifier des CTC chez 56 patients (74%). Le taux moyen de CTC était de 22/10 mL et le nombre médian de 11 CTC/10 mL (0-123 CTC/10 mL). Le nombre de CTC à l'inclusion n'était corrélé ni au nombre de sites métastatiques, ni au sous type et grade histologique. Il n'était pas non plus corrélé avec la survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS) quelque soit le seuil choisi (>=1 CTC ou >=médiane). De même, les patients ayant une diminution du taux de CTC >25% entre le 1er cycle et le 2ème cycle de traitement n'avaient pas une meilleure PFS que ceux ayant une stabilité ou une augmentation du taux de CTC.

Dans une seconde étude multicentrique, 98 patients atteints de STM avancé ont été inclus dans 2 études de profil moléculaire (BIP et STING) : l'ADNtc ainsi que les biopsies tissulaires (si présentes) ont été séquencés sur le panel FOUNDATION ONE LIQUID CDx Assay (324 gènes, charge mutationnelle, instabilité microsatellite). Nous avons pu mettre en évidence au minimum une altération actionnable chez 30 patients (31%). Notre RCP moléculaire a permis l'orientation de 21 patients (21%) vers des thérapies ciblées sur ces mutations, 9 (9%) ont été inclus dans des essais cliniques. Nous avons par ailleurs analysé le profil moléculaire de 40 patients ayant

un séquençage ADNtc/biopsie tissulaire. Les biopsies tissulaires de 7 patients n'étaient pas contributives. Nous avons identifié les mêmes altérations actionnables dans l'ADNtc et le tissu pour 5 patients (15%), aucune pour 17 patients (52%), un nombre plus important sur le tissu que sur l'ADNtc chez 10 patients (30%) (majoritairement des variations du nombre de copies (67%)) et plus sur l'ADNtc que sur le tissu pour 1 patient (3%).
Ce travail représente la première étude prospective évaluant la faisabilité et l'impact de la biopsie liquide chez les patients atteints de STM. Nous avons pu montrer dans cette cohorte que contrairement aux résultats d'études menées sur des cancers épithéliaux, le taux de CTC à l'inclusion n'était pas corrélé à une meilleure survie et que la dynamique du taux de CTC n'avait pas non plus de valeur prédictive. Nos résultats démontrent également que le séquençage de l'ADNtc pourrait être utilisé à visée théranostique pour les STM avancés.

**Mots clés :** sarcomes des tissus mous, biopsies liquides, cellules tumorales circulantes, ADN tumoral circulant, impact pronostique, théranostic.

# Title: Liquid biopsies in soft-tissue sarcoma: feasibility of detection of circulating tumor cells and DNA and clinical correlations

**Abstract:** Soft-tissue sarcomas (STS) are a heterogeneous group of rare tumors including more than 70 different substypes. Up to 40% of patients will develop metastatic disease. Patients with advanced STS have palliative purpose: they are generally treated in the same manner with doxorubicin-based chemotherapy. Individual therapy response is monitoring by repeating CT imaging which may represent an important burden for patients with advanced disease.

We hypothesized that liquid biopsies are a tool to monitor therapy response and allow the identification of genomic aberrations with potential to influence and personalize therapy. Objectives of this work were to evaluate the prognostic relevance of circulating tumor cells (CTC) and to examine the results of ctDNA testing to evaluate its theragnostic impact, in patients with advanced STS.

In a first monocentric study, 76 patients with metastatic sarcomas were prospectively enrolled. CTC were collected at onset, at cycle 2 and at cycle 4 with the ISET method (isolation by size of tumor cells). CTC were detected at baseline in 56 patients (74%). The average and median number of CTC were 22 CTC/10 mL (0–123 and were 11 CTC/10 mL (0–123 CTC/10 mL), respectively. The number of CTC at baseline was not significantly correlated with the number of metastatic sites neither with histological subtype or with histological grade. CTC count at baseline whatever the cut-off used (>=1 CTC or >=median value) was not correlated with PFS neither with OS. Furthermore, patients >=1 CTC before the initiation of therapy but who had decreased > 25% in CTC count at the time of C2 did not experience significantly better PFS.

In a second multicentric study, 98 patients with advanced STS have been included in two ongoing institutional molecular profiling studies (BIP, STING) Genomic analysis (ctDNA in all cases and tissue when available) was performed by using the FDA approved Foundation One Liquid CDx Assay (324 genes, tumor mutational burden, microsatellite instability status). 30 (31%) of the total STS cases harbored at least 1 alteration. Overall, the MTB recommended a matched therapy for 21 patients (21%), 9 patients (9%) were treated in a drug-matched clinical trial. 40 patients underwent also NGS of tissue besides ctDNA profiling. Biopsies were no contributive for 7 patients. The number of actionable alterations was similar in 5 (15%), whereas it was higher in tissue than in ctDNA for 10 (30%) patients (the majority of them (67%) being copy number variants) and in liquid than in tissue for 1 (3%) patient.

This study is the first to investigate enumeration of STS CTC in a prospective study.

Contrary to what it is observed in several other epithelial studies, the baseline level of CTC was not associated with overall survival and patients with a significant decrease in CTC levels between inclusion to C2 did not exhibit better PFS to those whose CTC remains elevated, suggesting a lack of intrinsic prognostic value.
It is also the first study to demonstrate the ability to detect a broad array of therapeutically relevant alterations using ctDNA testing at a significant rate (31%) in patients with STS. These data demonstrate that ctDNA profiling has significant clinical potential in STS.

**Keywords :** soft tissue sarcoma, liquid biopsies, circulating tumor cells, circulating tumoral DNA, clinical correlations, theragnostic

**INSERM U1218**

[SARCOTARGET, INSERM U1218, 229 cours de l'Argonne 33076 Bordeaux]

A mon père, le Dr Alain Blanchi

# Remerciements

J’adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements à l’ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Aux membres du jury, Mme Laurence Bianchini, M. le Pr Christophe Massard, M. le Pr François-Clément Bidard et M. le Pr Jean-Emmanuel Kurtz, qui me font l’honneur de juger ce travail.

A mon directeur de thèse, le Pr Antoine Italiano, grâce à qui cette thèse a pu se faire. Merci de m’avoir fait découvrir l’univers passionnant des sarcomes et de m’avoir intégrée dans votre unité.

A Mme le Dr Françoise Durrieu, ma collègue depuis maintenant 5 ans. Merci de m’avoir permis de faire cette thèse pendant mon activité au laboratoire et de m’avoir transmis ton savoir. Merci de ton soutien quotidien.

A Mme Audrey Laroche qui m’a guidée tout au long de cette thèse. Merci d’avoir partagé ton expérience avec moi.

A M. le Dr Benoit Rucheton, mon collègue à mi temps fraichement arrivé au laboratoire. Merci de ton soutien et de ta disponibilité

A l’ensemble des collaborateurs de ce projet pour leur disponibilité et leur partage d’expérience :

A toute l’équipe du laboratoire de biologie médicale et particulièrement à Angélique, Germain, Mathilde, Pascal, Kty, Marie Claude, Victoria, François et Tommy qui m’ont aidée dans mes nombreuses manipulations. Merci de votre aide, de votre rigueur et de votre implication dans votre travail chaque jour mais aussi de votre gentillesse.

A Benjamin Bonhomme avec qui nous avons passé de nombreuses heures de lecture de CTC et qui a toujours su se rendre disponible. Merci pour tous ces échanges constructifs.

A toute l’équipe de la GEC et particulièrement à Larry, Julie et Estelle.

A l’équipe des bio informatiens et particulièrement à Aurélien.

A l’association « Comité Féminin Gironde » et à la fondation Bergonié qui ont participé au financement d’une partie de ce travail.

Aux patients dont les prélèvements ont été utilisés dans cette étude et grâce à qui la recherche est possible.

A mes amis, à ma famille qui, comme à leur habitude, ont été d’un soutien sans faille et sans qui je n’en serais pas là aujourd’hui.

# Table des matières

Remerciements ..... 13
Table des matières ..... 15
Liste des figures ..... 19
Liste des tableaux ..... 21
Abréviations ..... 23
Introduction ..... 25
I. Les sarcomes des tissus mous ..... 27
A. Epidémiologie ..... 27
1. Epidémiologie analytique ..... 27
2. Facteurs extrinsèques ..... 29
B. Épidémiologie descriptive ..... 31
C. Facteurs pronostiques ..... 33
D. Histologie ..... 33
E. Classification des sarcomes des tissus mous ..... 35
F. Prise en charge thérapeutique ..... 39
G. Diagnostic ..... 39
H. Traitement et Suivi ..... 39
II. Prélèvements tissulaires et hétérogénéité tumorale ..... 43
III. Biopsies liquides ..... 47
A. Définition ..... 47
B. Avantages ..... 47
IV. Cellules tumorales circulantes ..... 51
A. Définition ..... 51
B. Potentiel clinique des CTC dans le cancer ..... 53
C. Techniques d'enrichissement et de détection des CTC ..... 53
1. Techniques basées sur les propriétés biophysiques ..... 53
2. Techniques basées sur des paramètres biologiques par immunosélection ..... 55
D. Analyse des CTC ..... 57
E. CTC et sarcomes des tissus mous ..... 57
V. ADNtc ..... 59
A. Définition ..... 59
B. Techniques de détection de l'ADNtc ..... 61
C. ADNtc et les sarcomes des tissus mous ..... 61
VI. Exosomes ..... 63

A. Définition ..... 63
B. Techniques de détection des exosomes ..... 63
C. Exosomes et les sarcomes des tissus mous ..... 63
VII. ARN tumoral circulant ..... 65
A. Définition ..... 65
B. Techniques de détection de l'ARNtc ..... 65
C. ARNtc et sarcomes des tissus mous ..... 67
VIII. Objectifs ..... 69
Résultats expérimentaux ..... 71
Article 1 ..... 73
Article 2 ..... 117
Discussion et perspectives ..... 161
I. A l'avenir, quelles techniques pour les CTC des sarcomes ? ..... 163
A. Techniques pour l'isolement et la numération des CTC ..... 163
B. De la compréhension des CTC lors de l'invasion tumorale ..... 165
C. Vers de nouvelles techniques d'isolement ..... 169
D. Pour une médecine personnalisée ..... 169
II. ADNtc : quelle place dans la prise en charge thérapeutique des sarcomes ? ..... 171
A. ADNtc et thérapie ciblée ..... 171
B. Application de l'ADNtc pour le suivi/monitoring et pour le traitement/récidive après chirurgie ..... 173
III. La charge mutationnelle : un nouveau marqueur pour la prise en charge thérapeutique des sarcomes ? ..... 177
Références bibliographiques ..... 183
Annexe ..... 223

# Liste des figures

Figure 1 : Répartition des sous types de STM (24) ..... 32
Figure 2 : Caractéristiques génomiques des STM (32) ..... 34
Figure 3 : Différentes translocations et altérations moléculaires dans les STM (32) 36
Figure 4 : Réseau NETSARC en 2018 ..... 38
Figure 5 : Cadre conceptuel pour distinguer l'hétérogénéité intratumorale spatiale et temporelle (39) ..... 42
Figure 6 : Différents types d'hétérogénéité intratumorale et sa régulation par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (54) ..... 44
Figure 7 : Hétérogénéite spatio temporelle des biopsies tissulaires (55) ..... 44
Figure 8 : Comparaison de la représentativité de l'hétérogénéité tumorale des biopsies tissulaires versus biopsies liquides (55) ..... 46
Figure 9 : Propriétés génétiques et phénotypiques des cellules à l'origine des métastases à l'échelle de la cellule unique (54) ..... 50
Figure 10 : Intéractions des CTC en transit (79) ..... 50
Figure 11 : Différentes approches technologiques pour l'isolement et la caractérisation des CTC (70) ..... 56
Figure 12 : Altérations génétiques détectables dans l'ADNtc (109) ..... 58
Figure 13 : Méthodes de détection de l'ADN tumoral circulant (123) ..... 60
Figure 14 : Description des exosomes (133) ..... 62
Figure 15 : Processus de l'invasion tumorale dans les tumeurs épithéliales (182) . 164
Figure 16 : EMT/MET dans les carcinomes (en haut) et les processus liés à l'EMT/MET dans certains sous-types de sarcomes (en bas) (183) ..... 164
Figure 17 : Caractéristiques de l'EMT (186) ..... 166
Figure 18 : Voies de signalisation communes régulant l'EMT (186) ..... 166
Figure 19 : Quantification de l'ADNtc avec 2 panels créés à partir de la primitive et de la métastase dans 15 échantillons de plasma obtenu au cours du traitement d'un patient atteint d'un liposarcome myxoïde (216) ..... 176
Figure 20 : Charge mutationnelle dans les sous-types de sarcomes des tissus mous (222) ..... 178

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères RECIST ..... 40
Tableau 2 : Avantages et limites des différents types de biopsies (77) ..... 48
Tableau 3 : Résumé des différentes techniques utilisées pour l'enrichissement et l'isolement des CTC ..... 52
Tableau 4 : Avantages et inconvénients des techniques d'enrichissement des CTC (105) ..... 54
Tableau 5 : Différentes techniques de détection de l'ADNtc (124) ..... 60
Tableau 6 : Etudes des exosomes dans les STM (134) ..... 62
Tableau 7 : Résumé des biopsies liquides et de leur application en médecine clinique (78) ..... 68
Tableau 8 : Principales mutations dans la cohorte de 22 patients atteints de STM avancé en cours d'étude..... 172

# Abréviations

ADNtc : ADN Tumoral Circulant

ADNtotc : ADN total circulant

β-cat : β-catenine

CK : Cytokératines

CNV : Nombre de Variation de Copies

CTC : Cellule Tumorale Circulante

EMT : Transition Epithelio-Mésenchymateuse

FDA : *Food and Drug Administration*

GIST : Tumeurs Stromales Gastro-Intestinales

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MET : Transition Mésenchymato-Epithéliale

MPNST : *Malignant Peripheral Nerve Sheat Tumor*

NGS : Séquençage Nouvelle Génération

NTRK : *Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase*

OS : Survie Globale

PSA : Antigène Prostatique Spécifique

PFS : Survie Sans Progression

SPDG : Somme des Plus Grands Diamètres

STM : Sarcome des Tissus Mous

UPS : Sarcome Pléomorphe Indifférencié

WES : Séquençage de l'Exome

WGS : Séquençage du Génome Entier

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WHO : *World Health Organization*

# Introduction

# I. Les sarcomes des tissus mous

Les sarcomes, du mot grec « *sarkôma* » qui signifie littéralement « excroissance de chair », sont des tumeurs malignes rares (moins de 1% des nouveaux cas de cancer en France) d'origine mésenchymateuse, développées à partir des tissus conjonctifs et de soutien extra-osseux. Ils contrastent avec les carcinomes, autres types de cancers, d'origines épithéliales, plus fréquents et mieux connus.
Les sarcomes représentent un groupe de tumeurs très hétérogènes : il existe trois catégories de sarcomes correspondant à des entités clinico-pathologiques différentes, d'évolutions individuellement spécifiques et dont les traitements sont distincts : les sarcomes osseux (10%), les sarcomes viscéraux développés au sein d'un organe spécifique dont le représentant le plus emblématique est la tumeur stromale gastro-intestinale (GIST) (15%) et les plus fréquents, les sarcomes des tissus mous (STM) (75%).
Les tissus mous sont définis selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par l'ensemble des tissus non épithéliaux extra-squelettiques de l'organisme, à l'exclusion des tissus de soutien des organes et des viscères, du système réticulo-endothélial, des séreuses et de la glie (1). Ils sont ainsi représentés par les muscles lisses et striés, la graisse, les tissus fibreux et les vaisseaux. On y adjoint par convention le système nerveux périphérique, car les tumeurs ayant pour origine le système nerveux périphérique sont similaires aux autres tumeurs des tissus mous. L'origine embryologique des tissus mous est essentiellement représentée par le mésoderme et *a minima* par le neuro-ectoderme.
Les STM représentent donc l'ensemble des tumeurs malignes ayant pour origine les tissus de soutien non osseux.

## A. Epidémiologie

### 1. Epidémiologie analytique

*Prédispositions génétiques*
Il existe plusieurs prédispositions génétiques relatives aux STM :

- le syndrome de Li-Fraumeni : ce syndrome est rare, à mode de transmission autosomique dominant. Il est dû à la mutation du gène suppresseur de tumeur TP53 (2), (3), (4), (5),
- le syndrome du rétinoblastome : ce syndrome est une maladie à transmission autosomique dominante rare caractérisée par une mutation constitutionnelle

du gène suppresseur de tumeur RB1, situé sur le chromosome 13q14. Chez ces patients, il existe un risque élevé de développer des tumeurs primitives secondaires parmi lesquelles les ostéosarcomes se placent en premier (37.0%) devant les mélanomes (7.4%), puis les sarcomes des parties molles (6.9%), les fibrosarcomes (3.3%), les chondrosarcomes (3.3%) et les sarcomes non définis (3.3%) (6),

- la neurofibromatose de type I (ou maladie de Van Recklinghausen) : elle est caractérisée par une mutation du gène suppresseur de tumeur NF1 (7). Les patients atteints de ce syndrome présentent un risque accru de développer des tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques (MPNST) et dans une moindre mesure, des GIST (8),
- la neurofibromatose de type II : elle est caractérisée par la mutation du gène suppresseur de tumeur NF2. Cette maladie est généralement associée à des schwannomes du nerf auditif des deux oreilles ou d'autres nerfs.

D'autres maladies génétiques comme la naevomatose basocellulaire, la sclérose tubéreuse de Bourneville et le syndrome de Werner sont associées à un risque accru de développer un STM. Le lymphœdème chronique peut causer un lymphangiosarcome, aussi appelé syndrome de Stewart et Treves.

### 2. Facteurs extrinsèques

Plusieurs facteurs extrinsèques sont connus pour augmenter le risque de survenue des STM. Parmi eux, on retrouve l'exposition aux rayonnements ionisants et ce même en l'absence de facteurs de risques. Des sarcomes peuvent, dans de très rares cas, être secondaires à une exposition à des rayonnements de radiothérapie pour le traitement de lymphomes (9), (10) ou de cancers tels que le cancer du sein (11). Dans ce cas, le sarcome apparait généralement au niveau de la zone irradiée. L'incidence augmente avec la dose de traitement et diminue avec l'âge. La durée moyenne d'apparition est de 10 ans après la radiothérapie.

Certains agents chimiques sont aussi incriminés : un lien entre l'exposition au chlorure de vinyle ou à l'arsenic et l'angiosarcome hépatique a été établi. Un autre entre l'exposition aux herbicides de type phénoxy ou aux dioxines et les STM en général a aussi été mis évidence. Les personnes exposées professionnellement à ce type d'agents présentent un risque plus élevé de développer un STM. Cependant, le rôle de ces agents reste controversé en raison d'études discordantes (12), (13).

Pour terminer, l'immunodépression liées à certaines infections virales augmente le risque de STM. Par exemple, le virus d'Epstein Barr augmente le risque de léiomyosarcome chez les sujets porteurs du VIH (14).

Le plus souvent les STM surviennent de façon sporadique sans étiologie évidente.

L'étude ETIOSARC en cours de réalisation se propose d'évaluer les étiologies

environnementales des sarcomes en France (15). A terme (2022), elle permettra une meilleure compréhension et détermination des facteurs extrinsèques des STM.

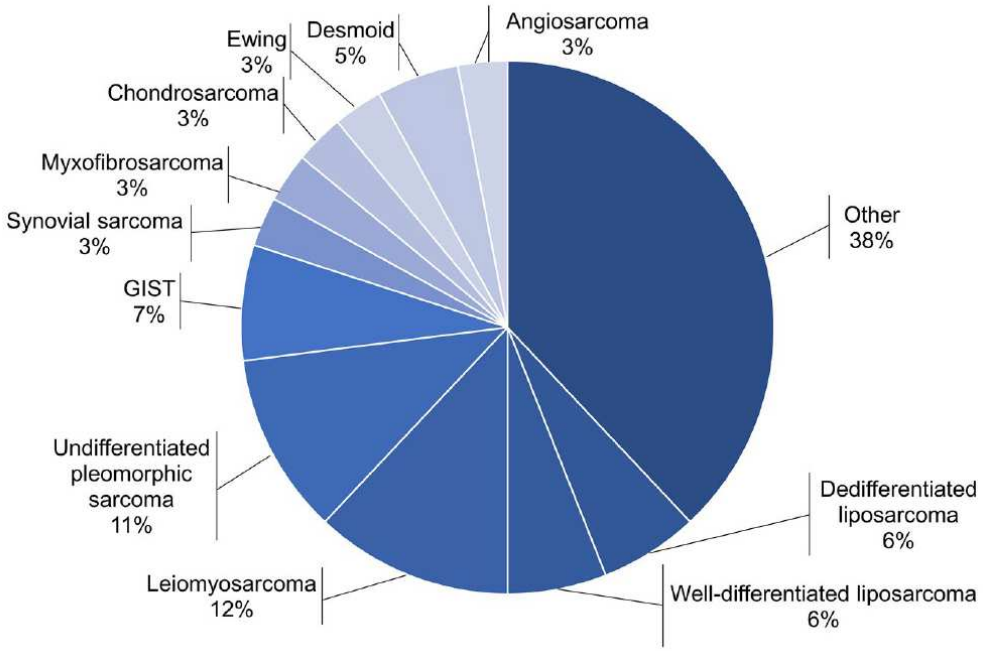
## B. Épidémiologie descriptive

Les STM sont des tumeurs rares (avec 12 750 nouveaux cas estimés en 2019 aux USA (16), 2701 en 2018 en France (17)) et représentent environ 1% des cancers solides chez l'adulte et 15% des cancers chez l'enfant.
En Europe, 4 à 5 nouveaux cas pour 100000 personnes sont diagnostiqués chaque année, sans différence majeure entre pays (18).

En fonction de l'âge, les incidences varient en fonction du type de STM : les rhabdomyosarcomes surviennent presque exclusivement chez les enfants, les synovialosarcomes principalement chez les jeunes adultes, alors que les sarcomes pléomorphes indifférenciés (UPS), les liposarcomes, les léiomyosarcomes et les myxofibrosarcomes dominent chez les personnes âgées.
Chez les adultes, le pic d'incidence se situe entre 50 et 60 ans. Près de 20% des STM sont diagnostiqués chez des patients âgés de plus de 75 ans selon le National institute of Cancer.

Les STM peuvent atteindre tous les organes avec une incidence de 50% pour les membres supérieurs et inférieurs, 45% pour l'abdomen, le thorax et les zones profondes du tronc et 5% pour la tête et le cou.

Ce sont des cancers de pronostic intermédiaire avec une survie nette à 5 ans de 59% pour les cas diagnostiqués entre 2010 et 2015, tout sexe confondu (17).
Concernant la survie globale, tous stades et types histologiques confondus, elle est d'environ 50 à 60% à 5 ans avec un risque de récidive locale à 5 ans de 10 à 25% et un risque de maladie métastatique à 5 ans de 20 à 40% (19), (20).
L'étude française de Bourcier *et al.* (2) menée sur environ 6000 patients a, elle, mis en évidence que le risque de rechute métastatique à 2 ans est d'environ 17% (15 à 25%) et à 5 ans de 10% (5 à 18.5%) tout âge confondu. Le risque de rechute tardive (supérieure à 5 ans) est relativement rare, que ce soit pour la récidive locale (9.3%) ou métastatique (5.8%) (21). Environ 10% des patients sont d'emblée métastatiques, dont 80% au niveau pulmonaire (22).
Pour les STM métastatiques, l'étude METASARC de Savina *et al.* (23) incluant 2165 patients de 3 centres français réalisée entre 1990 et 2013, a montré qu'à l'exception des léïomyosarcomes, la médiane de survie post-traitement était inférieure à 9 mois à partir de la 3$^{ième}$ ligne de traitement.




:

**Figure 1 : Répartition des sous types de STM (24)**

## C. Facteurs pronostiques

Il a été montré que les facteurs pronostiques suivants sont significativement associés à une meilleure survie globale :

- l'âge au diagnostic, avec une diminution de la survie nette à 5 ans de 74% à 30 ans à 47% à 80 ans (17),
- le sexe, avec une survie supérieure chez la femme jeune comparativement à l'homme jeune (à 30 ans : 80 % versus 71% respectivement) mais aux âges plus avancés survie inférieure chez la femme (50% pour les hommes de 80 ans versus 44% pour les femmes) (17),
- le sous-type histologique comme le léïomyosarcome,
- la taille de la tumeur,
- la profondeur,
- le grade,
- la mise en place d'un traitement locorégional,
- l'inclusion dans un essai clinique,
- la combinaison de chimiothérapie en première ligne de traitement.

Un grade élevé au diagnostic est associé, quant à lui, à une diminution de la survie globale.

Dans d'autres types de cancers, d'autres facteurs pronostiques ont été étudiés et ont montré une bonne corrélation avec le pronostic, comme les marqueurs hématologiques de l'inflammation tel que le ratio neutrophiles sur lymphocytes, la protéine C réactive, le ratio plaquettes sur lymphocytes, le ratio lymphocytes sur monocytes (25), (26), (27), (28), (29).

La méta-analyse menée par Li *et al* (30) reprend 23 études évaluant ces marqueurs hématologiques dans les STM et met en évidence qu'ils pourraient être de bons facteurs pronostiques pour les patients atteints de STM de haut grade et pour des STM développés aux extrémités des membres.
L'étude de Brewster *et al.* (31) montre qu'une lymphopénie au diagnostic de STM est associée à une mortalité plus importante.

## D. Histologie

Les STM sont des tumeurs très hétérogènes avec plus de 70 sous types histologiques différents (1) et tout autant de sous types moléculaires. Les sous types les plus fréquents sont (Figure 1) :

- le liposarcome (12%),
- le léïomyosarcome (12%),

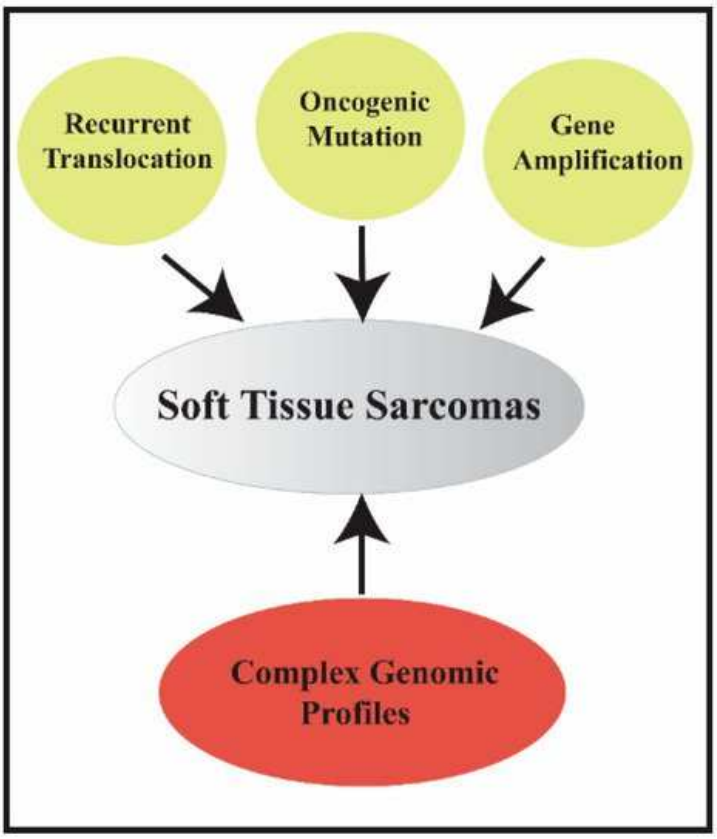



**Figure 2 : Caractéristiques génomiques des STM (32)**

- l’UPS (11%).

Ils sont d’une agressivité variable même au sein d’un même sous type histologique.

## E. Classification des sarcomes des tissus mous

Du fait de leur hétérogénéité et de leur complexité, la classification des sarcomes des tissus mous se base, en plus des informations cliniques générales (âge, la localisation de la tumeur primitive *etc*.) sur les 3 facteurs suivants :

- l’analyse descriptive histologique complète rapportée selon les termes de la dernière classification de l’OMS avec une analyse moléculaire complémentaire si nécessaire (1),
- l’analyse de l’agressivité tumorale évaluée par le grade histologique de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC),
- l’évaluation de l’extension tumorale résumée par le stade TNM de l’American Joint Cancer Committee (AJCC) et de l’Union internationale contre le cancer (UICC).

Les STM présentent aussi des caractéristiques génétiques propres (1), (33). Celles-ci peuvent être classées en deux grands groupes : les sarcomes à « génomique simple » et les sarcomes dits à « génomique complexe » (Figure 2).

Les premiers présentent une altération spécifique *driver* forte, associée à des comportements cliniques caractéristiques. On peut les classer en trois sous-groupes.
Le premier regroupe les STM ayant des translocations spécifiques comme les synovialosarcomes caractérisés dans plus de 80% par la translocation t(X;18)(p11.2;q11.2) produisant un gène de fusion SYT/SSX1 ou SYT/SSX2, ainsi que les liposarcomes myxoïdes, caractérisés de façon pathognomonique par la translocation t(12;16)(q13;p11) produisant le gène de fusion FUS/DDIT3.
Le deuxième regroupe les STM ayant des mutations somatiques spécifiques dans des gènes et des voies de signalisation clés spécifiques, telle que celle de c-KIT dans les GIST.
Le dernier regroupe les STM ayant des anomalies de nombre de copies d’ADN comme l’amplification distincte constante de la région chromosomique 12q13-15 comportant les gènes MDM2 et CDK4 dans les liposarcomes bien différenciés.
Les sarcomes du second groupe à « génomique complexe » se caractérisent par des aberrations chromosomiques de nombre et de structure non récurrentes. Ce groupe est principalement constitué de tumeurs à cellules fusiformes et/ou pléomorphiques, c’est à dire aux noyaux irréguliers, parfois monstrueux, aux nucléoles proéminents, et de formes et de tailles variables. Les principaux représentants de cette classe sont :

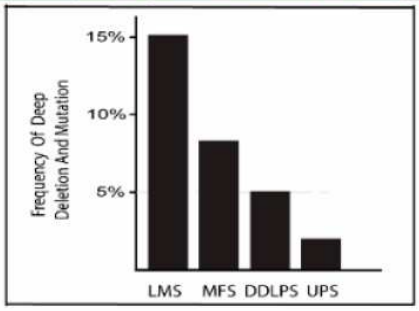
**A**

| Type Of Tumor | Translocation | Fusion Gene |
|---|---|---|
| **Recurrent Somatic Translocations** | | |
| Desmoplastic small round cell tumor | t(11;22)(p13;q12) | *EWSR1-WT1* |
| Alveolar rhabdomyosarcoma | t(2;13)(q35;q14) | *PAX3-FOXO1* |
| | t(1;13)(p36;q14) | *PAX7-FOXO1* |
| Alveolar soft part sarcoma | t(X;17)(p11;q25) | *ASPL-TFE3* |
| Synovial sarcoma | t(X;18)(p11;q11) | *SS18-SSX1* |
| | t(X;18)(p11;q11) | *SS18-SSX2* |
| | t(X;18)(p11;q11) | *SS18-SSX4* |
| Myxoid Liposarcoma | t(12;16)(q13;p11) | *FUS-CHOP* |
| | t(12;22)(q13;q12) | *EWSR1-CHOP* |
| Clear Cell Sarcoma | t(12;22)(q13;q12) | *EWSR1-ATF1* |
| Inflammatory Myofibroblastic Tumor | t(1;2)(q21;p23) | *TMP3-ALK* |
| | t(2;19)(p23;p13) | *TMP4-ALK* |
| | t(2;17)(p23;q23) | *CLTC-ALK* |
| | t(2;2)(p23;q13) | *RANBP2-ALK* |
| Ewing Sarcoma | t(11;22)(q24;q12) | *EWSR1-FLI1* |
| | t(21;22)(q22;q12) | *EWSR1-ERG* |
| | t(7;22)(q22;q12) | *EWSR1-ETV1* |
| | t(17;22)(q12;q12) | *EWSR1-ETV4* |
| | t(2;22)(q33;q12) | *EWSR1-FEV* |
| | t(16;21)(p11;q22) | *FUS-ERG* |
| Ewing Sarcoma-like Small Blue Round Cell Tumor | t(4;19)(q35;q13) | *CIC-DUX4* |
| | t(10;19)(q26.3;q13) | *CIC-DUX4* |
| Infantile Fibrosarcoma | t(X;19)(q13;q13) | *CIC-FOXO4* |
| Unclassified Pleomorphic Sarcoma | t(12;15)(p13;q25) | *ETV6-NTRK3* |
| | inv(X)(p11.4p11.22) | *BCOR-CCNB3* |
| Extraskeletal myxoid chondrosarcoma | EWSR1-NR4A3 | t(9;22)(q22;q12) |
| | TAF2N-NR4A3 | t(9;17)(q22;q11) |
| | TCF12-NR4A3 | t(9;15)(q22;q21) |
| | TFG-NR4A3 | t(9;22)(q22;q15) |

**B**

| Type of Molecular Alteraration | Soft Tissue Tumor | Gene |
|---|---|---|
| **Activating Point Mutations** | GIST | *KIT/PDGFRA, SDHA/B* |
| | Desmoid Tumor | *CTNNB1* |
| | MPNST | *SUZ12, EED* |
| | MLPS | *PIK3CA* |
| | Angiosarcoma | *KDR* |
| | Embryonal RMA | *NRAS, KRAS, HRAS, FGFR4* |
| | Spindle-cell RMA | *MYOD1* |
| | Angiosarcoma | *KDR* |
| **Gene Amplification** | WD/DDLPS | *MDM2 , CDK4* |
| | Post-radiation sarcoma | MYC |
| | LMS | *MYOCD* |
| **Tumor Supressor Inactivation** | LMS, UPS, MFS, Spindle cell lipoma | *RB1* |
| | LMS, UPS, MFS | *PTEN* |
| | LMS, LPS, UPS, SS | *TP53* |
| | Rhabdoid tumor, Epithelioid Sarcoma | *SMARCB1* |
| | SMARCA4-deficient thoracic sarcomas | *SMARCA4* |
| | MPNST, advanced GIST, Dermatofibrosarcoma Protuberans | *CDKN2A* |
| | MPNST,MFH, LPS, RMA | *NF1* |
| | LMS, Angiosarcoma, DDLPS, UPS | *ATRX* |

**C**




(A) Sous groupes de STM avec leur translocations. (**B**) Différentes anomalies moléculaires dans la plupart des sous groupes de STM. (**C**) Taux des altérations de PTEN (mutations et délétions profondes) dans les sous groupes les plus fréquents de sarcomes

**Figure 3 : Différentes translocations et altérations moléculaires dans les STM (32)**

- les léïomyosarcomes, à différenciation musculaire lisse. On les retrouve principalement chez les personnes âgées. Ils ont un mauvais pronostic, avec un risque de rechute métastatique > 50%,
- les myxofibrosarcomes, tumeurs mésenchymateuses fibroblastiques caractérisées par un stroma myxoïde. Les myxofibrosarcomes sont les tumeurs les plus fréquentes chez l'adulte et sont généralement de bas grade, avec un risque élevé de rechute locale mais un risque métastatique plus faible,
- les sarcomes indifférenciés/inclassés. Ce terme, introduit dans la classification WHO de 2013, regroupe une partie des anciens histiocytomes fibreux malins, et regroupe des tumeurs mésenchymateuses non rattachables aux autres catégories établies, et pouvant avoir une prédominance de cellules fusiformes, rondes, épithélioïdes ou encore pléomorphes. Dans ce dernier cas on parle de sarcomes indifférenciés pléomorphes (UPS),
  - les liposarcomes dédifférenciés appartiennent aux sarcomes à génomique complexe de par leurs remaniements génétiques complexes et le caractère pléomorphe et/ou fusiforme des cellules constituant leur partie dédifférenciée, mais ils forment un groupe à part, car ils font aussi partie des sarcomes à « génomique simple ».

A noter qu'aucune altération spécifique n'a été associée à un type histologique (34). Elles apparaissent de manière sporadique. On peut cependant noter plusieurs inactivations majeures que sont celles de TP53 et de RB1, ainsi que celle de PTEN et de ATRX, qui sont observées dans 30% des sarcomes à génomique complexe (35).

La figure 3 (Figure 3) résume les différentes translocations ainsi que les différents types d'altérations moléculaires dans les STM.

Au-delà du cadre strictement nosologique, le diagnostic moléculaire des sarcomes a permis de rassembler des entités microscopiquement distinctes mais présentant des anomalies génétiques identiques, de différencier des tumeurs morphologiquement identiques mais présentant des anomalies moléculaires différentes tout en apportant un espoir thérapeutique majeur en offrant une cible aux thérapies ciblées existantes ou en cours de développement, à l'instar de la révolution engendrée par l'imanitib dans les GIST ou les inhibiteurs de NTRK (*neurotrophic tyrosine receptor kinase*) chez des patients présentant une fusion du gène NTRK.

Ainsi, cette classification est primordiale dès le début pour une prise en charge thérapeutique et un suivi optimum du patient.

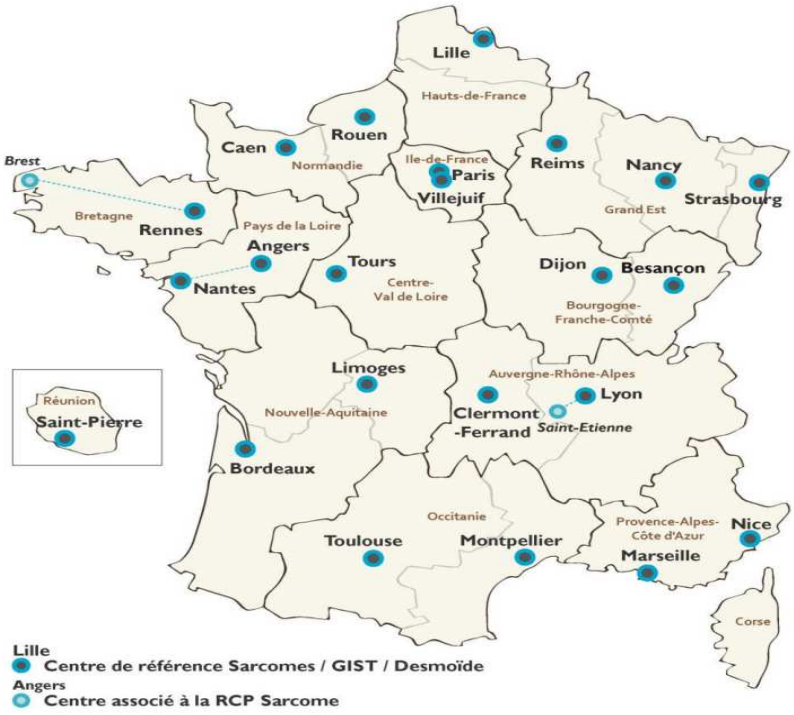



**Figure 4 : Réseau NETSARC en 2018**

## F. Prise en charge thérapeutique

Selon les recommandations de l'ESMO-EURACAN 2018 (36) la prise en charge de tous les STM, dès lors que le diagnostic de sarcome est évoqué, doit se faire obligatoirement de façon multidisciplinaire. Le diagnostic et le suivi doivent se faire dans des centres de références sarcome et/ou faisant partie d'un réseau d'expertise multidisciplinaire. En France, ce sont les réseaux anatomopathologique et clinique « Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes des tissus mous et des viscères » (RRePS) et le « Réseaux de référence Cliniques » (NetSarc), labellisés par l'Institut National du Cancer, qui offrent aujourd'hui les moyens structurés de faire le diagnostic quasi formel d'un STM et de faciliter l'accès à un traitement adapté dans un centre spécialisé (Figure 4).

## G. Diagnostic

Après examen clinique, un bilan initial par imagerie médicale est fondamental pour la démarche diagnostique. Il constitue le début de la prise en charge multidisciplinaire. Les objectifs sont : de reconnaître des tumeurs évidemment bénignes, d'identifier les critères de suspicion de malignité (évoquer le diagnostic de sarcome et l'orienter), de guider les prélèvements biopsiques et de réaliser le bilan d'extension local et à distance.
Toujours selon l'ESMO-EURACAN 2018 (36), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'examen de choix pour le diagnostic des STM des extrémités, du pelvis et du tronc. En pratique, une échographie peut être le premier examen réalisé (plus facile d'accès) mais elle doit obligatoirement être complétée par un scanner ou une IRM.
Après évaluation radiologique, l'approche standard consiste en la réalisation de biopsies réalisées par un chirurgien ou un radiologue après RCP dans un centre de référence.
La biopsie pouvant sous-estimer le grade de la tumeur, une imagerie supplémentaire (incluant un TEP scanner) peut être réalisée si un traitement préopératoire est envisagé. Elle permet en plus de l'anatomopathologie, d'en estimer le grade en évaluant par exemple la nécrose.

## H. Traitement et Suivi

Le traitement repose sur un avis pluridisciplinaire donné lors d'une concertation avec l'ensemble des spécialistes concernés.
Malgré un traitement loco-régional bien conduit, près de 40% des patients vont développer une rechute métastatique qui aboutira au décès dans la majorité des cas. Au stade métastatique, la prise en charge des patients est basée sur une

**Tableau 1 : Critères RECIST**

| RECIST 1.1 (2009) | |
|---|---|
| **Lésions cibles** | Maximum 5 par patient<br>Maximum 2 par organe<br>Taille ≥ 10 mm sauf pour ganglions : Petit axe ≥ 15 mm |
| | |
| **Réponse complète** | Somme des plus grands diamètres (SPGD) des lésions cibles = 0 mm et Ganglions < 10 mm |
| **Réponse partielle** | diminution≥ 30% de la SPDG par rapport au scanner prétraitement |
| **Progression** | SPGD + 20 % (et de ≥ 5 mm) par rapport à la plus petite somme mesurée au cours du suivi |
| **Progression** | Lésions non cibles : si mesurées > 75 % |
| **Nouvelles lésions** | Utilisation de la TEP possible |

chimiothérapie palliative dont l'efficacité reste limitée, la survie globale médiane étant inférieure à 18 mois.

Des études récentes ont montré que l'analyse génétique à haut débit (NGS) des sarcomes peut permettre d'identifier des cibles thérapeutiques actionnables. Par exemple l'étude de Lucchesi *et al.* (37) regroupant le séquençage par NGS de 584 STM a montré la présence d'au moins une altération actionnable chez plus de 40% de ces STM.
Cette étude centrée sur les STM vient confirmer l'étude de Gounder *et al.* (38) plus générale, portant sur 56 histotypes de sarcomes et montrant la présence de cibles thérapeutiques actionnables ayant un traitement spécifique approuvé par la « Food Drug Administration » (FDA) chez environ 10% des patients, qu'environ 40% des patients ont des cibles thérapeutiques actionnables éligibles à des essais thérapeutiques et que des réponses partielles ou complètes ont été obtenues grâce à ce type de traitement. Cette étude souligne aussi que le NGS a permis dans 5% des cas de rectifier le diagnostic initial et d'identifier des résistances à des traitements.

D'autres études sont en cours comme l'étude MULTISARC qui est une étude nationale promue par l'INSERM qui évalue ainsi l'impact du séquençage à haut débit dans la prise en charge des patients atteints de sarcomes avancés, ces derniers pouvant bénéficier dans le cadre de cette étude d'un traitement ciblé adapté au profil moléculaire.

L'évaluation de l'efficacité des traitements systémiques utilisés chez les patients atteints de sarcomes nécessite la réalisation répétée d'examens d'imagerie qui permettent d'évaluer l'évolution de la maladie selon les critères RECIST (Tableau 1).

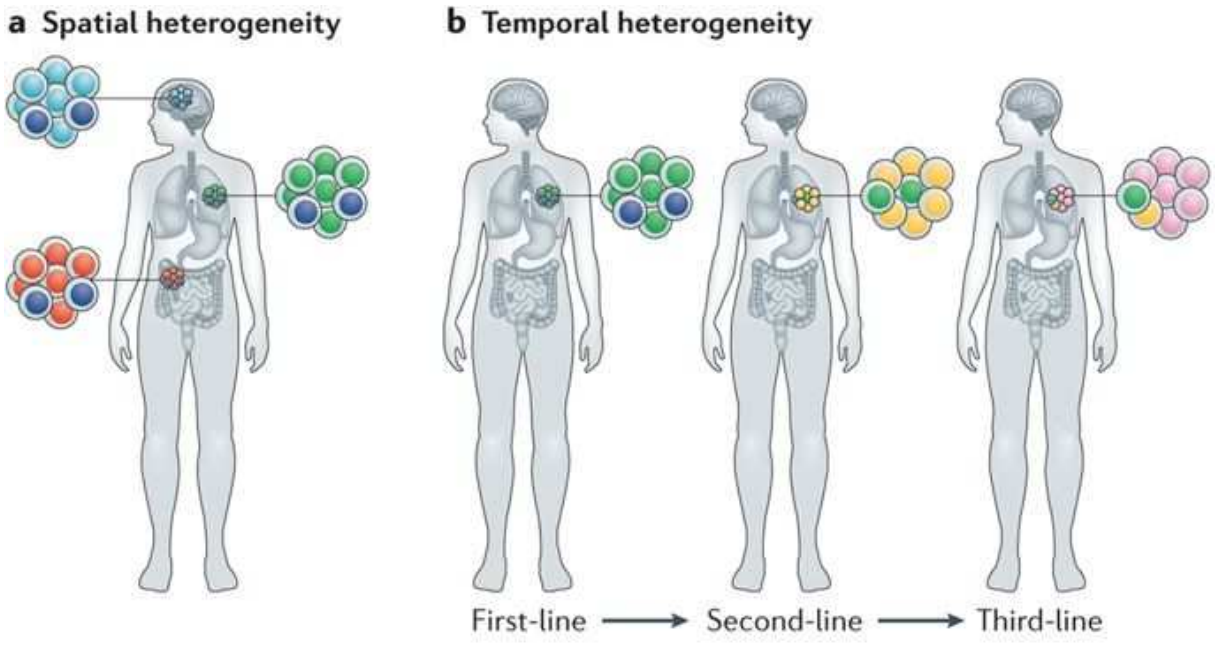



**Figure 5 : Cadre conceptuel pour distinguer l'hétérogénéité intratumorale spatiale et temporelle (39)**

# II. Prélèvements tissulaires et hétérogénéité tumorale

L'utilisation de prélèvements tissulaires à visée théranostique présente certaines limites qui sont communes à tous les cancers. Elles sont principalement de deux types : anatomiques et génomiques. En effet, d'un point de vue anatomique, un accès limité à la tumeur peut augmenter le risque de faux négatifs (40). Le geste chirurgical de la biopsie peut augmenter les risques de complication péri et post opératoire (40). La réalisation de ces biopsies a un coût total élevé (hospitalisation, anesthésie *etc*.) (41). De plus, le prélèvement tissulaire n'est représentatif que du site biopsié ou opéré et ne permet pas forcément de prendre en compte l'hétérogénéité de la tumeur.

Il existe deux types d'hétérogénéité tumorale : une hétérogénéité dite « intertumorale » qui se réfère à l'hétérogénéité entre les patients ayant des tumeurs du même type histologique et une hétérogénéité dite « intratumorale » qui se réfère à l'hétérogénéité entre les cellules tumorales d'un seul patient. Dans cette thèse, seule l'hétérogénéité intratumorale sera développée. L'hétérogénéité intratumorale peut se manifester par une hétérogénéité spatiale, qui décrit la distribution inégale de sous-populations tumorales ayant un statut mutationnel distinct au sein des différents sites tumoraux ou au sein d'un site tumoral d'un même individu, et par une hétérogénéité temporelle, terme appliqué aux variations dynamiques de la diversité génétique de la tumeur au fil du temps et des traitements (42), (39) (Figure 5).

Dans les modèles d'évolution clonale, l'accumulation stochastique de mutations par instabilité génomique entraîne une augmentation de la diversité génétique, la tumeur acquérant des sous-clones avec des génotypes distincts au fil du temps (43). Une telle instabilité résulterait de mutations exogènes (comme l'exposition aux UV ou au tabac) et d'aberrations dans des processus endogènes (comme des erreurs dans la réplication et/ou la réparation de l'ADN ou le stress oxydatif) (44), (45).
La chimiothérapie pourrait également augmenter le spectre mutationnel de la tumeur et créer de l'instabilité génomique (46), (47), (48).
L'hétérogénéité est également générée par la différenciation cellulaire. Dans les modèles de cellules souches cancéreuses, les cancers sont organisés hiérarchiquement avec une population semblable à des cellules souches, soutenant la croissance tumorale par auto-renouvellement et différenciation (49).
Le microenvironnement tumoral génère également une hétérogénéité intratumorale en exerçant différentes pressions sélectives dans des régions distinctes de la tumeur (50), (51), (52), (53).
Ces modèles ne s'excluent pas mutuellement mais agissent ensemble pour créer un système complexe avec de multiples couches d'hétérogénéité établies par les propriétés génétiques, épigénétiques, transcriptomiques, protéomiques et

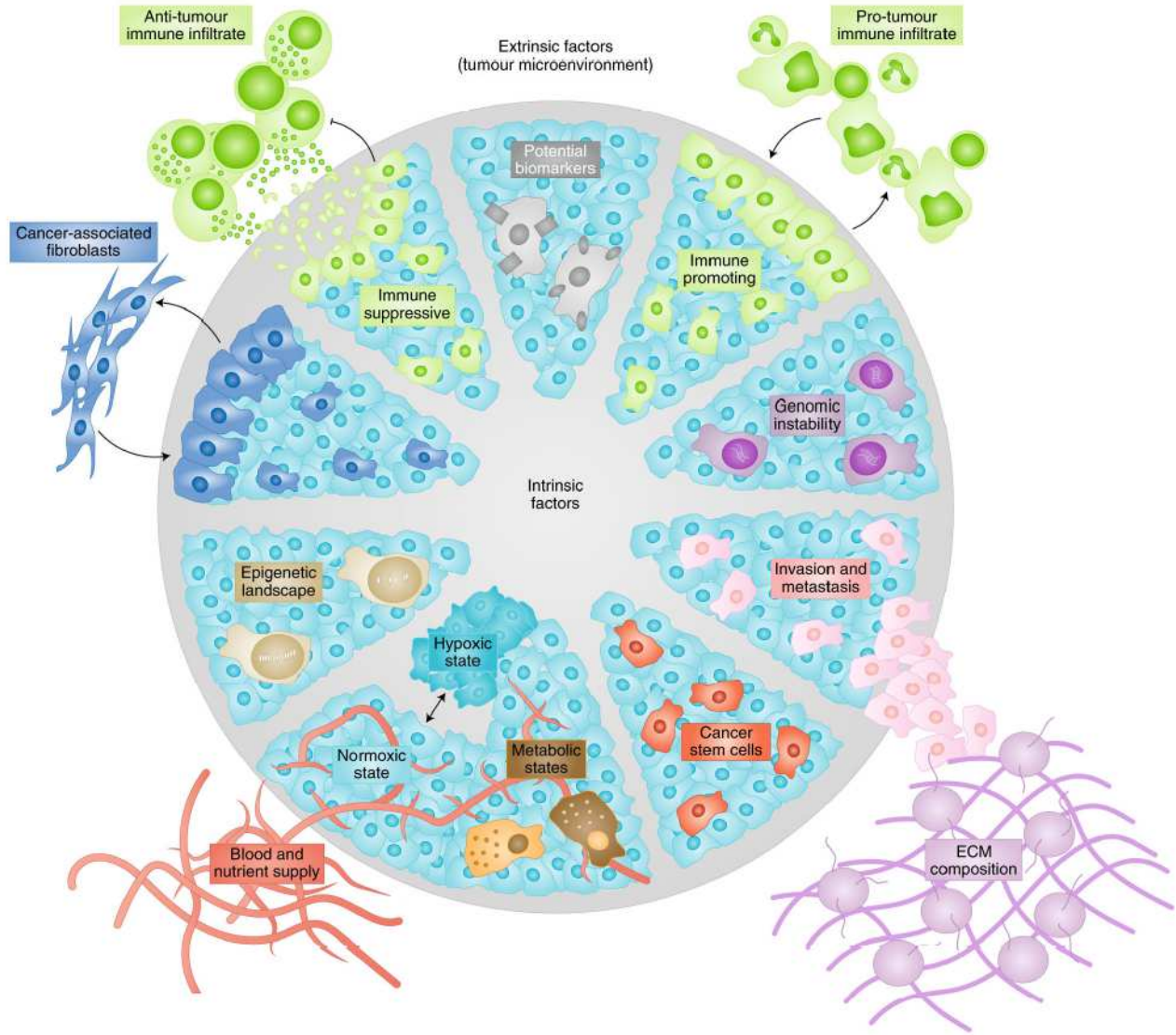



**Figure 6 : Différents types d'hétérogénéité intratumorale et sa régulation par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (54)**

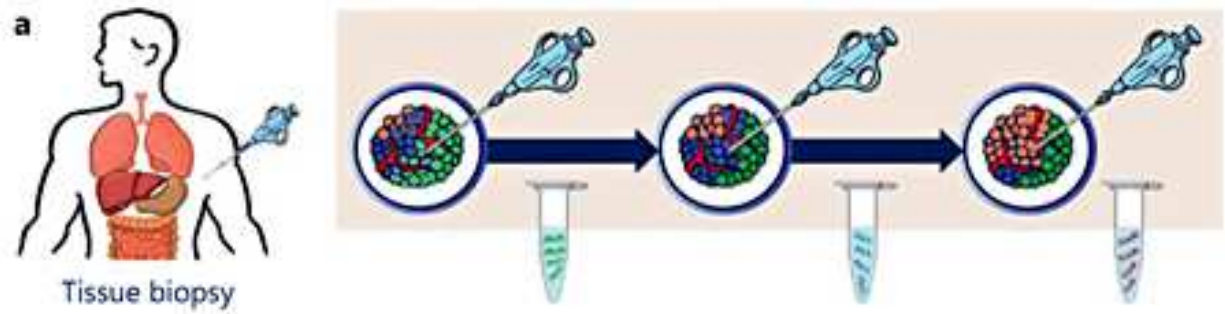



**Figure 7 : Hétérogénéite  spatio temporelle des biopsies tissulaires (55)**

fonctionnelles distinctes des différentes cellules (Figure 6).

On comprend mieux que, lors d'une biopsie tissulaire à visée diagnostique et théranostique, le paysage génétique recueilli ne reflète qu'une partie des clones tumoraux existants et ne permet pas forcément de prendre en compte l'hétérogénéité spatiale de la tumeur (Figure 7). Cette restriction peut donc mener à des échecs thérapeutiques en favorisant l'émergence de sous clones résistants au traitement qui étaient présents en faible quantité dans la tumeur primitive et qui n'avaient pas été détectés par la biopsie tissulaire (54).

De plus, le prélèvement tissulaire a pu être réalisé dans certains cas plusieurs mois voire plusieurs années avant la situation clinique imposant d'avoir une information génétique à visée théranostique. Or, comme nous l'avons vu avec le concept d'hétérogénéité temporelle, le génome tumoral peut évoluer au cours du temps, ainsi l'étude génomique de la biopsie ne reflétera pas le paysage génétique de la situation clinique actuelle et peut donc conduire à une prise en charge non optimale (39).
Face à ce constat, de nouvelles techniques ont donc été développées pour compléter voire suppléer ce « gold standard ». Parmi elles, on trouve les biopsies liquides.

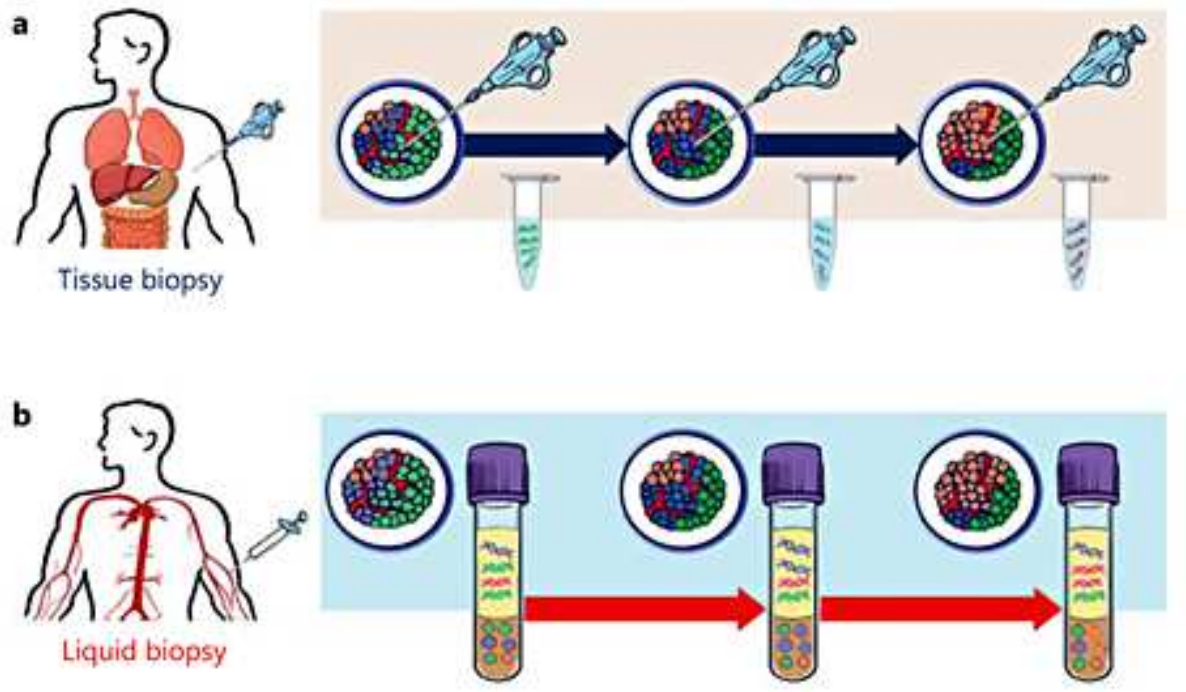



**Figure 8 : Comparaison de la représentativité de l'hétérogénéité tumorale des biopsies tissulaires versus biopsies liquides (55)**

# III. Biopsies liquides

## A. Définition

Selon la définition du dictionnaire du National Cancer Institute (NCI), la biopsie liquide est « *un test effectué sur un échantillon de sang pour la recherche de cellules cancéreuses ou de fragments d'ADN provenant d'une tumeur et circulant dans le sang* ». En oncologie, ce terme est utilisé au sens large pour désigner l'échantillonnage et l'analyse des analytes de divers fluides biologiques, principalement du sang mais aussi d'autres fluides facilement accessibles tels que l'urine, l'ascite ou les épanchements pleuraux (56), (57).
Ces analytes contiennent un pool de cellules et/ou de produits cellulaires dérivés de la tumeur primaire et/ou métastatique. Cela comprend les CTC, l'ADN tumoral circulant (ADNtc), l'ARN tumoral circulant (ARNtc) et les vésicules extra-cellulaires notamment les exosomes contenant du matériel génétique tumoral, les plaquettes éduquées par la tumeur, des métabolites et des protéines (56), (57), (58), (59), (60).

## B. Avantages

Les biopsies liquides ont l'avantage de ne pas être invasives, d'être beaucoup moins traumatiques par rapport aux biopsies classiques, d'être faciles d'accès, répétables et de donner des résultats rapides pour suivre l'évolution en temps réel au cours du traitement du génome tumoral (61).
De plus, elles reflètent bien le contenu génétique des tissus tumoraux. En effet, par exemple, la revue de Rolfo *et al.* (62) retrouve bien une concordance entre le tissu tumoral et le plasma allant de 68 à 97% pour la *primo* détermination du statut EGFR chez des patients ayant un cancer avancé du poumon non à petites cellules.
D'un point de vue scientifique, l'application la plus notable de la biopsie liquide est de comprendre l'hétérogénéité tumorale. En effet, les biopsies liquides sont le reflet de l'ensemble du pool tumoral (primitive, métastase et rechute) (63), (64), (65), (66), (67), (68).
La figure 8 (Figure 8) schématise cette représentativité. Par exemple, l'étude de Paoletti *et al.* (69) séquençant sur un panel de 130 gènes une ou un pool de CTC chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique a montré une concordance de 85% dans au moins une ou plusieurs mutations somatiques récurrentes et altération du nombre de copies de gènes avec les tissus métastatiques, confirmant que les CTC représentent bien l'hétérogénéité tumorale spatio temporelle. La revue de Tellez-Gabriel *et al.* (70) confirme que les CTC sont représentatives de l'hétérogénéité tumorale dans plusieurs cancers. De nombreuses études ont aussi été menées en ce sens sur l'ADNtc (71), (72), (73), (74), (75), (76).
Toujours selon le dictionnaire du NCI, *« une biopsie liquide peut être utilisée pour*

**Tableau 2 : Avantages et limites des différents types de biopsies (77)**

| | Application | Avantages | Limites |
|---|---|---|---|
| **Biopsie tissulaire** | Gold standard histopathologie pour le diagnostic<br><br>Classification et stade du sarcome | Technologie mature, très utilisée en clinique<br><br>Obtention d'un diagnostic cytologique définitif et une classification du sarcome | Perte de l'hétérogénéité moléculaire intratumorale et intermétastatique<br><br>La conservation des échantillons dans des blocs FFPE altère le séquençage du cancer, comme les analyses du génome et de l'exome entier<br><br>Geste chirurgical risqué avec complications post opératoires possibles, risque de faux négatif donnant suite à une mauvaise prise en charge clinique<br><br>Geste inconfortable et invasif pour le patient<br>Nécessité d'opérateurs très qualifiés<br><br>Délais de planning et de bloc opératoire<br><br>Augmentation du coût de la prise en charge |
| **Biopsies liquides** | Screening et détection rapides des patients ayant un sarcome de haut risque<br><br>Diagnostic et classification rapide du sarcome<br><br>Évaluation de l'hétérogénéité tumorale permettant des traitements personnalisés<br><br>Identification de nouvelles mutations génétiques lors d'une thérapie ciblée avec adaptation du traitement<br><br>Monitorage et suivi de la maladie résiduelle après chirurgie et/ou rechute<br><br>Prédiction de la dynamique tumorale et des résultats cliniques<br><br>Évaluation rapide de la réponse thérapeutique | Aborde l'hétérogénéité tumorale spatio temporelle<br><br>Peu invasif, isolement dans de nombreux fluides biologiques<br><br>Coût faible, tests rapides et reproductibles avec une grande sensibilité<br><br>Ratio douleur/ risque minime<br><br>Diagnostic précoce du cancer et surveillance de la progression de la maladie (surveillance en temps réel)<br><br>Détection de mutations ayant des cibles thérapeutiques<br><br>Évaluation de l'hétérogénéité et de la dynamique tumorale<br><br>Suivi facile et continu du patient | Manque de standardisation des protocoles<br><br>Gestion de petite quantité de matériel facilement dégradable nécessitant des méthodes d'analyse extrêmement sensibles et spécifiques<br><br>Contrôles des séries peu développés<br><br>Risque de faux positif et faux négatif conduisant à une mauvaise prise en charge thérapeutique du patient<br><br>Changements micro environnementaux peuvant influencer la libération ou la quantité de matières biologiques<br><br>Nécessité de faire des blancs chez des patients sains pour tenir compte des variations pré-analytiques<br><br>Ratio bruit de fond-patient faible, en particulier dans les maladies à un stade précoce |

*diagnostiquer un cancer à un stade précoce, elle peut également être utilisée pour planifier un traitement ou déterminer si le traitement est efficace ou si le cancer a resurgi. Permettre plusieurs prélèvements sanguins au fil du temps peut aussi aider les médecins à comprendre les changements moléculaires qui se produisent dans une tumeur* ».

Ainsi, les biopsies liquides offrent des perspectives intéressantes pour des applications cliniques, par exemple le diagnostic précoce de cancer, le suivi de la maladie résiduelle pour détecter précocement les rechutes ou encore le suivi de la réponse au traitement pour détecter des résistances et adapter le traitement en conséquence.

Le tableau 2 (Tableau 2) montre les avantages et les inconvénients des biopsies tissulaires et des biopsies liquides dans les sarcomes (77).

Dans ce paragraphe, nous détaillerons uniquement les CTC, l'ADNtc, les exosomes et l'ARNtc (78) ainsi que les techniques mises au point pour les étudier. Puis, nous verrons les différentes études menées sur ce thème dans les STM.

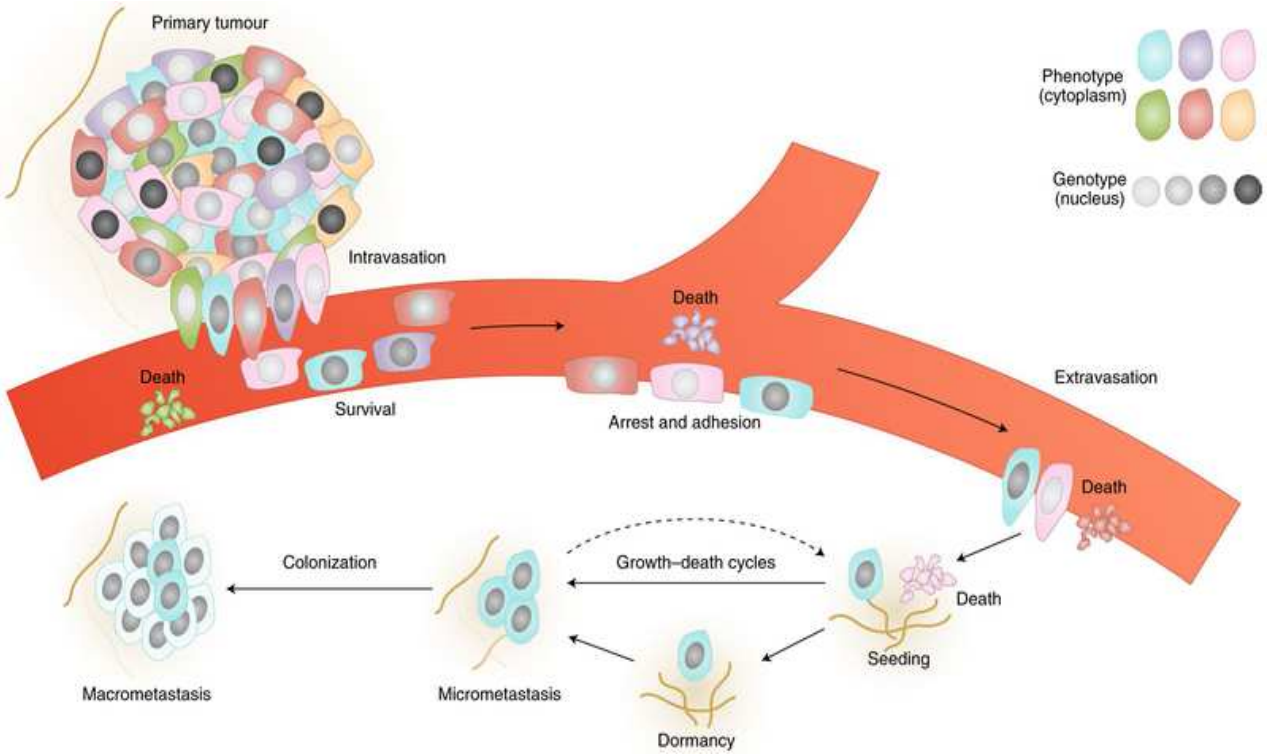



**Figure 9 : Propriétés génétiques et phénotypiques des cellules à l'origine des métastases à l'échelle de la cellule unique (54)**

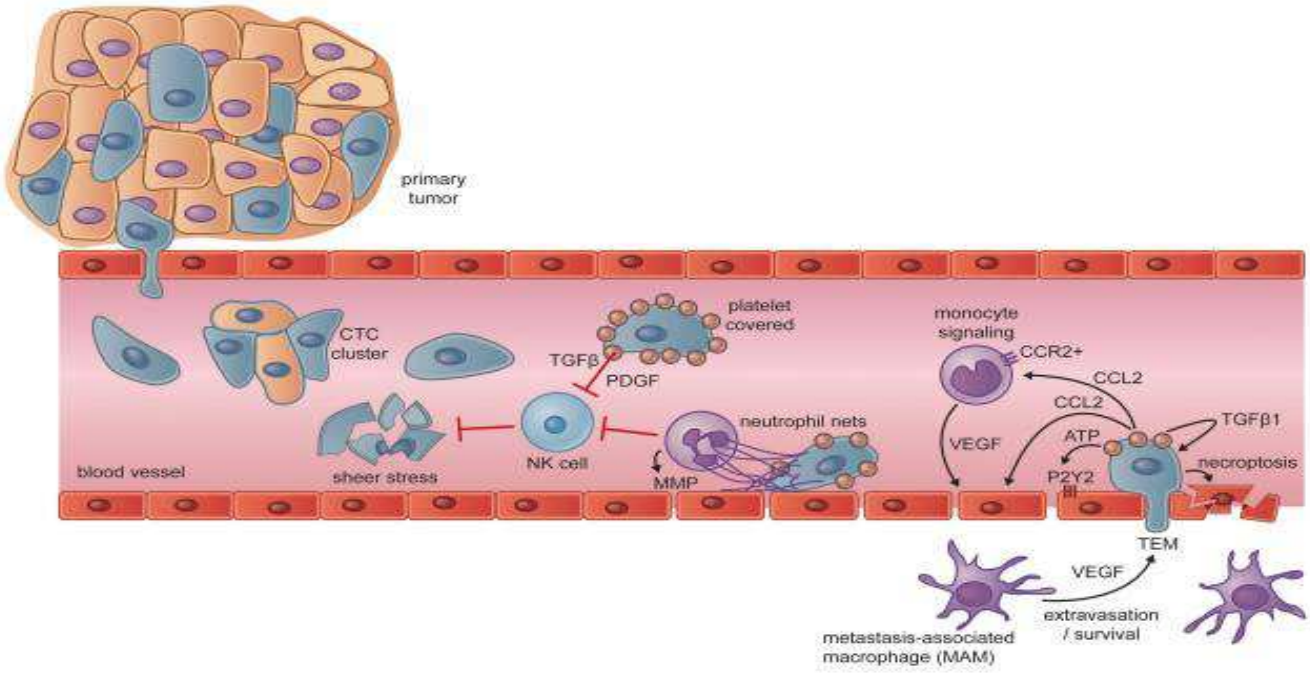



**Figure 10 : Intéractions des CTC en transit (79)**

# IV. Cellules tumorales circulantes

## A. Définition

Les CTC sont des cellules originaires de la tumeur primaire ou des sites métastatiques (80) capables d'envahir les tissus environnants, de passer dans la lymphe ou la circulation sanguine, d'y survivre puis de s'excaver pour coloniser un nouveau site (Figure 9).

Il est admis que la tumeur primaire relargue chaque jour $10^6$ CTC par gramme de tumeur. La majorité d'entre elles meurent et seules 0.01% survivent (81). En effet, une fois arrivées dans la circulation sanguine, elles doivent faire face à de nouvelles contraintes physiques comme des chocs et les forces de stress, et biologiques comme le pH, l'*anoïkis* (forme spécifique d'apoptose, qui est due à un défaut d'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire) et la surveillance par le système immunitaire (82).
Les CTC circulent soit de manière isolée, soit regroupées en *cluster* (83). Les CTC ne disposent que de quelques minutes pour s'excaver des vaisseaux (84). Les *clusters* ont une capacité d'invasion supérieure à celle d'une unique cellule. En effet, il a été montré qu'ils ont une demi-vie dans la circulation sanguine plus faible qu'une cellule (6-10 min vs 25-30 min) ce qui leur permet de moins subir de contraintes et donc de mieux survivre. Ils ont aussi un potentiel métastatique supérieur de 28-50 fois à celui d'une unique cellule (85).
Pour survivre dans cet environnement hostile et s'excaver, les CTC vont être aidées par d'autres cellules comme les plaquettes, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales (79) (Figure 10).

Une fois dans la circulation, les CTC sont recouvertes de plaquettes grâce à l'expression de facteur tissulaire sur leur membrane. Les plaquettes vont faciliter la survie des CTC (86), (87). Dans un premier temps, elles vont former physiquement une couche protectrice sur les CTC en les recouvrant de fibrinogène (88), (89). Dans un second temps, elles vont sécréter des facteurs solubles incluant le TGF-B et le PDGF qui vont inhiber les cellules NK (90) et vont donc permettre aux CTC d'échapper à la reconnaissance et à la lyse par ces cellules (89), (91), (92). Les polynucléaires neutrophiles peuvent avoir un rôle d'immunosuppression des lymphocytes T CD8+ (93), de la clairance intraluminale des CTC par les cellules NK (94) et un effet pro-métastatique par la sécrétion de métalloprotéases matricielles favorisant l'extravasation des CTC (95). Lors de leur passage dans la circulation sanguine, les CTC peuvent par tropisme ou contraintes anatomiques se fixer à la paroi d'un vaisseau d'un nouvel organe. Elles vont alors avoir la possibilité de s'excaver et de coloniser ce dernier. Cette excavation est médiée par les monocytes. En effet, ces derniers peuvent être recrutés par les cellules tumorales en réponse

**Tableau 3 : Résumé des différentes techniques utilisées pour l'enrichissement et l'isolement des CTC**

| | Techniques | Sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|---|
| **Immunoaffinité** | EPISPOT® assay | Protéines sécrétées, clivées ou relarguées | Permet le comptage uniquement des CTC vivantes |
| **Immunoaffinité Enrichissement positif** | CellSearch® | Anticorps anti EpCAM/billes magnétiques | Permet l'enrichissement et le comptage des CTC<br>Autorisé par la FDA<br>Méthode semi automatisée |
| | CellCollector® | Anticorps anti EpCAM sur un stylet en or | Permet la capture et le comptage des CTC<br>Capture *in vivo* |
| **Immunoaffinité Enrichissement positif** | Ephesia® | Anticorps anti EpCAM ou autre/système microfluidique | Permet le comptage et la caractérisation ultérieure des CTC<br>CTC obtenues viables |
| **Propriétés biophysiques** | RosettteSep® (cocktail d'enrichissement CTC) | Cocktail d'anticorps/centrifugation par gradient de densité | Permet d'enrichir les CTC pour les isoler<br>De nombreuses analyses sont ensuite réalisables sur les CTC isolées |
| | ISET® | Taille, filtre | Permet le comptage et la caractérisation moléculaire des CTC |
| | ScreenCell® | Taille, filtre | Permet le comptage et la caractérisation ultérieure des CTC<br>Isolement et préservation des CTC permettant de réaliser des analyses de caractérisation directement sur les supports |
| | ClearCell FX® | Taille, système microfluidique | Permet d'isoler les CTC<br>CTC obtenues viables<br>De nombreuses analyses sont ensuite réalisables sur les CTC isolées |

à la sécrétion de CCL2 et favoriser l'extravasation et le développement de métastases dans les poumons (96), (97).

## B. Potentiel clinique des CTC dans le cancer

Le potentiel clinique des CTC n'a été étudié que depuis ces 20 dernières années. Jusqu'à maintenant, il était difficile de distinguer les CTC des cellules hématopoïétiques sanguines. En effet, elles circulent dans le sang dans des quantités infinitésimales (2 CTC dans 7.5 mL de sang chez les patients atteints d'un ostéosarcome) (98). La valeur pronostique des CTC a été décrite dès 2004 dans le cancer du sein par Cristofanilli *et al.* (99) : les femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique ayant un taux de CTC élevé (≥ 5 CTC/7.5 mL de sang) avaient une progression et une survie globale plus péjoratives. En 2014, Bidard *et al.* (100) ont étayé cette conclusion en étudiant 1944 patients de 17 centres européens. Ils ont rapporté que les patients avec un nombre de CTC de base ≥ 5 CTC/7.5 mL de sang avaient une progression plus défavorable ($p<0.0001$) et une survie globale plus courte ($p<0.0001$) que les patients ayant un nombre de CTC < 5 CTC/7.5 mL. Dans le cancer colorectal métastatique, le système Cell-Search a reçu l'autorisation de la la « Food and Drug Administration » (FDA) pour stratifier en routine les patients en groupes pronostiques « favorables » avec un nombre ≤ 3 CTC/7.5 mL dans le sang et « défavorables » sinon (101), (102), (103).

## C. Techniques d'enrichissement et de détection des CTC

Vu leur faible taux dans le sang, une étape d'enrichissement est nécessaire avant de capturer les CTC (104). Plusieurs techniques ont été développées et sont disponibles sur le marché.
Ces dernières reposent soit sur les propriétés physiques des CTC qui peuvent être leur taille, leur déformabilité, leur densité ou leur charge électrique soit sur les propriétés biologiques de ces cellules avec l'expression ou non de protéines de surface. Nous développons brièvement dans ce paragraphe certaines de ces techniques résumées dans le tableau 3 (Tableau 3).

Pour plus d'information, les tableaux en annexe résument de façon non exhaustive les différents automates disponibles sur le marché (104) (Tableaux en annexe).

### 1. Techniques basées sur les propriétés biophysiques

Ces techniques, se basant sur les propriétés biophysiques des CTC, présentent l'avantage de les enrichir sans discriminer les cellules EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) négatives, ou ayant un phénotype mésenchymateux ou

**Tableau 4 : Avantages et inconvénients des techniques d'enrichissement des CTC (105)**

| Méthode | Avantages | Inconvéniants |
|---|---|---|
| **Densité par gradient de pression** | Coût faible<br>Fiable | Perte de grandes CTC et de cellules agrégées<br>Faible pureté<br>Technique d'enrichissement nécessaire |
| **Microfiltration** | Rapidité de filtration de grands volumes<br>Excellent rendement | Faible pureté<br>Bouchage de la membrane<br>Différente taille de CTC<br>Difficultés de décoller les CTC du filtre |
| **Microfluidique** | Pureté excellente<br>Taux de capture élévé<br>Très bonne viabilité cellulaire<br>Faible perturbation cellulaire | Technique longue<br>Nécessité de prétraitement de l'échantillon pour diminuer les volumes |
| **Dielectrophorèse** | Isolation d'une cellule<br>Excellent rendement | Volume restreint<br>Faible pureté<br>Les propriétés électriques des cellules peuvent être endommagées<br>Beaucoup de paramètres doivent être controlés en même temps |
| **Méthodes basées sur l'immunoaffinité** | Pureté excellente<br>Très bonne viabilité cellulaire<br>Très bonne récupération | Manque de marqueurs spécifiques aux cancers<br>Expression des marqueurs hétérogène dans les cellules<br>Problèmes avec l'affinité et la spécificité des anticorps |

intermédiaire (épithélial et mésenchymateux). Il existe plusieurs types de techniques basés sur :

- *leur taille et/ou leur déformabilité*

Partant du postulat que les CTC ont une taille supérieure à celle des éléments nucléés du sang, plusieurs systèmes de microfiltration en 2 ou 3 dimensions ont été développés.
On peut citer le système ISET (Isolation by Size of Tumor Cells) (106) qui utilise une membrane poreuse comme filtre. Après pré-traitement dans un tampon, les cellules sont filtrées par des pores de 8 µm de diamètre. Les cellules nuclées du sang passent au travers tandis que les CTC sont capturées sur la membrane du filtre.
D'autres techniques utilisant des forces d'inertie et la déformabilité dans des appareils à microfluidiques ont été développées.

- *densité*

Ces techniques se basent sur la densité des CTC : par une centrifugation en gradient de densité, érythrocytes et granulocytes migrent au fond du tube tandis que les CTC et cellules mononucléaires, de densité plus faible, « flottent » dans une interphase accessible à leur collecte.

### 2. Techniques basées sur des paramètres biologiques par immunosélection

Ces techniques sont basées sur l'isolement par immunosélection positive ou négative. Les méthodes d'enrichissement par sélection positive reposent sur une immunoséparation à l'aide de billes magnétiques conjuguées à un anticorps dirigé contre des antigènes spécifiques des cellules tumorales. On peut citer le sytème Cell Search®. En effet, il est le seul approuvé par la FDA américaine pour une utilisation en clinique chez des patients atteints d'un cancer métastatique du sein (2004), colorectal (2007) ou de la prostate (2008). Il s'agit d'une méthode d'énumération des CTC d'origine épithéliale par sélection positive des cellules exprimant l'EpCAM. Des réactifs fluorescents sont ensuite ajoutés pour la détection des CTC. Puis, après un tri dans un champ magnétique, un décompte peut être effectué par lecture automatique au microscope à fluorescence.

Les méthodes d'immunosélection négative reposent pour la plupart sur un système de déplétion des cellules non tumorales, porteuses d'antigènes spécifiques (tels que le marqueur spécifique des leucocytes CD45).

Toutes ces techniques présentent des avantages et des inconvénients, listés dans le tableau 4 (Tableau 4) (105).

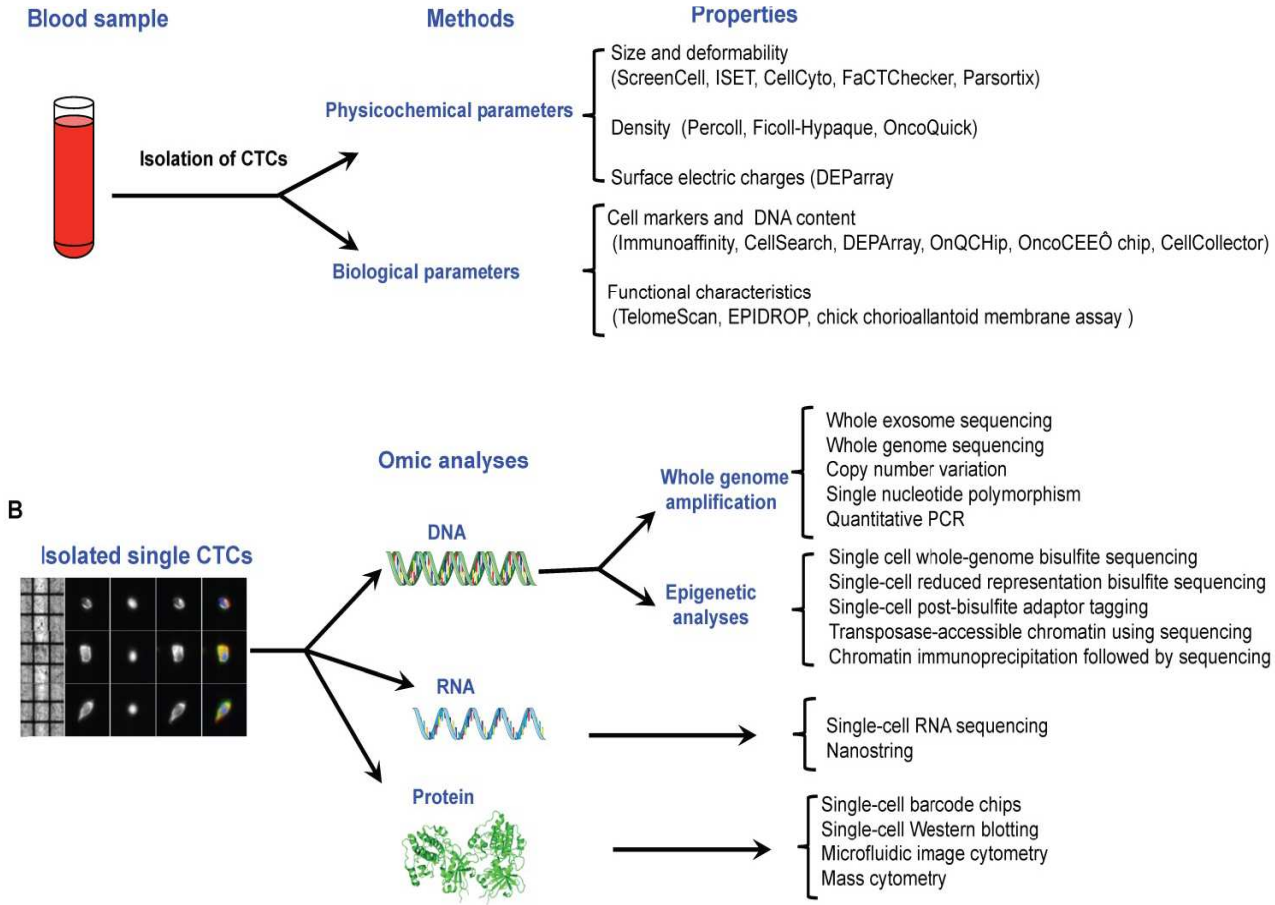



**Figure 11 : Différentes approches technologiques pour l'isolement et la caractérisation des CTC (70)**

## D. Analyse des CTC

Une fois les CTC enrichies et isolées, il est possible d'analyser leur ADN, leur ARN, leurs modifications épigénétiques ainsi que leurs protéomes (Figure 11).
En effet, l'analyse de l'ADN contenu dans les CTC peut se faire sur un pool de cellules mais aussi à l'échelle de la cellule unique. Cette recherche peut se faire sur un panel de gènes ciblés, ou par une approche de séquençage de nouvelle génération comme le séquençage « Whole Exome » (WES) et le séquençage « Whole Genome » (WGS).
Pour le séquençage d'une cellule unique, la quantité d'ADN étant très faible, une étape de pré-amplification du génome (WGA) est souvent nécessaire. Cette dernière génère des biais dans la quantification et la représentativité inégale des séquences générées.
Le séquençage de la cellule unique reste encore un challenge car la couverture du génome reste faible et l'analyse bioinformatique relativement difficile.
Des techniques permettent d'analyser l'ARN des CTC pour étudier l'hétérogénéité de l'expression des gènes de ces dernières. Là aussi, il est possible d'étudier le transcriptome d'une cellule unique mais comme pour l'ADN, des progrès sont à faire car il existe des faux positifs dus à l'amplification non linéaire, une couverture non uniforme, des faux négatifs d'élimination d'allèle dus aux biais d'amplification et au bruit de fond généré.

## E. CTC et sarcomes des tissus mous

Très peu d'études ont été réalisées sur les CTC et les sarcomes des tissus mous. Cela peut s'expliquer par le fait que les sarcomes sont des tumeurs qui, de par leur nature mésenchymateuse, n'expriment pas les antigènes spécifiques communs recherchés dans les techniques d'immunosélection. Nous pouvons noter que des études ont montré la présence d'EpCaM sur certaines CTC de STM (107) mais pas sur tous les types (108).
Des études contradictoires sur l'expression de la vimentine (marqueur spécifique de la dérivation ou de la différenciation mésenchymateuse) par les CTC ne permettent pas de la classer parmi un marqueur commun des STM (110). A l'heure actuelle, ce type de technique n'est donc pas souhaitable pour isoler les CTC des STM.

Pour isoler des CTC de sarcomes tout venant, les techniques d'isolation par la taille semblent être les plus adaptées. Une étude brésilienne (111) menée sur 11 patients atteints de STM métastatique ou en rechute a montré la présence et la faisabilité d'isoler via la technique ISET des CTC avec un taux allant de 2 à 48 CTC pour 8 mL de sang sans nécessité de marqueurs spécifiques. Cette étude souligne aussi le fait

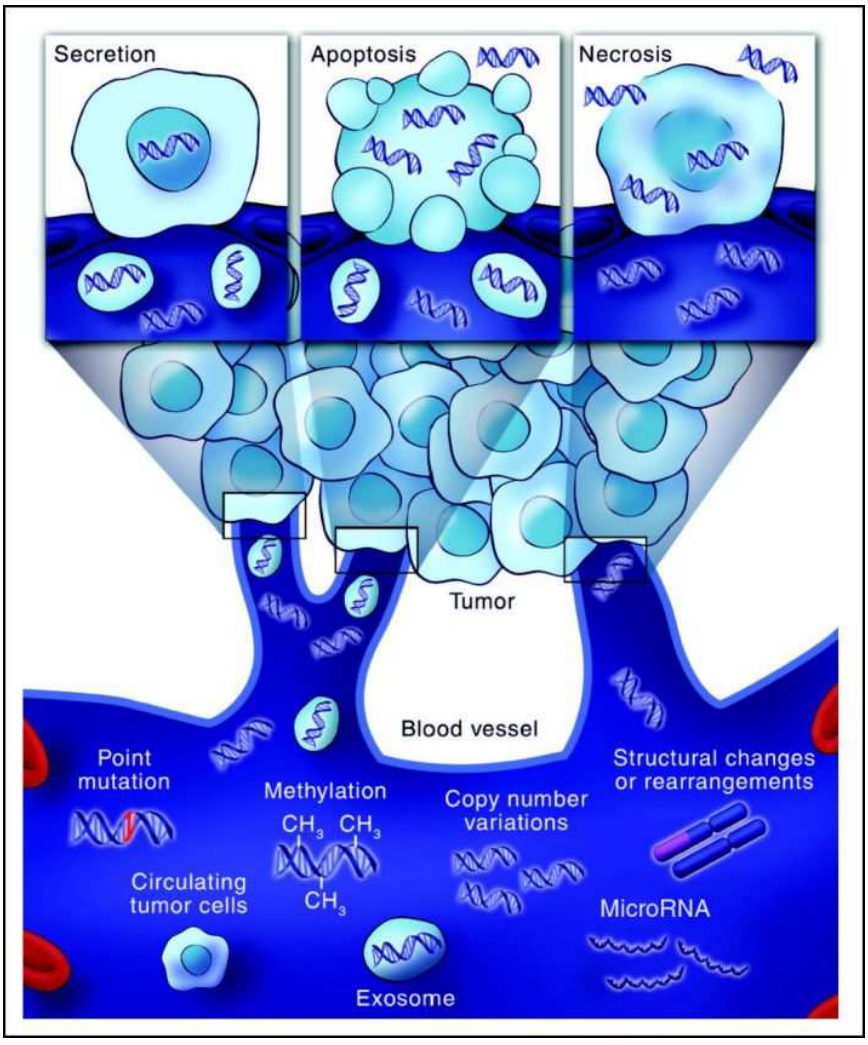



**Figure 12 : Altérations génétiques détectables dans l'ADNtc (109)**

qu’il est aussi difficile de constituer des cohortes importantes de patients pour ce cancer rare.

# V. ADNtc

## A. Définition

L’ADN tumoral circulant (ADNtc) fait référence à l’ADN libre issu de cellules néoplasiques circulant dans le sang d’un patient. Il ne représente qu’une fraction variable et souvent minoritaire de l’ensemble des fragments d’ADN total circulant (ADNtotc) (112). En effet, l’autre fraction, appelé ADN génomique, provient de cellules dites « saines » qui peuvent correspondre aux cellules hématopoïétiques, aux cellules de l’environnement péri-tumoral ou aux cellules en provenance de tissu sain non péri-tumoral. L’ADNtc mesure environ entre 130–150 bp. Il est libéré majoritairement lors de l’apoptose cellulaire (113), (114), (115), (109) (Figure 12).
La quantité d’ADNtc reste très faible dans le sang. En effet, le taux d’ADNtotc chez un sujet sain varie de 0 à 100 ng/mL de sang, avec une moyenne de 30 ng/mL tandis que chez les patients cancéreux, il varie de 0 à 1000 ng/mL de sang avec une moyenne de 180 ng/mL (116). En fonction du stade du cancer, du type, de la masse et du niveau de vascularisation de la tumeur, cette quantité peut représenter 0.01 à 90% de l’ensemble de l’ADNtotc (117), (118).

La quantité d’ADNtc augmente avec la taille de la tumeur : par exemple, une tumeur d’environ 100 g (≈$3 \times 10^{10}$ cellules tumorales) relargue dans la circulation sanguine 3.3% de l’ADNtc (119), (120), (121).

L'un des principaux avantages de l’analyse de l’ADNtc est sa plus grande sensibilité par rapport aux CTC (122). Les niveaux d'ADNtc, bien que faibles, sont toujours plus élevés que le nombre de CTC dans le même échantillon sanguin, et l’ADNtc est souvent présent chez les patients sans CTC détectable (123). De plus, les analyses d’ADNtc ont une spécificité élevée car les mutations somatiques trouvées dans l'ADNtc ne sont pas présentes dans l'ADN normal.

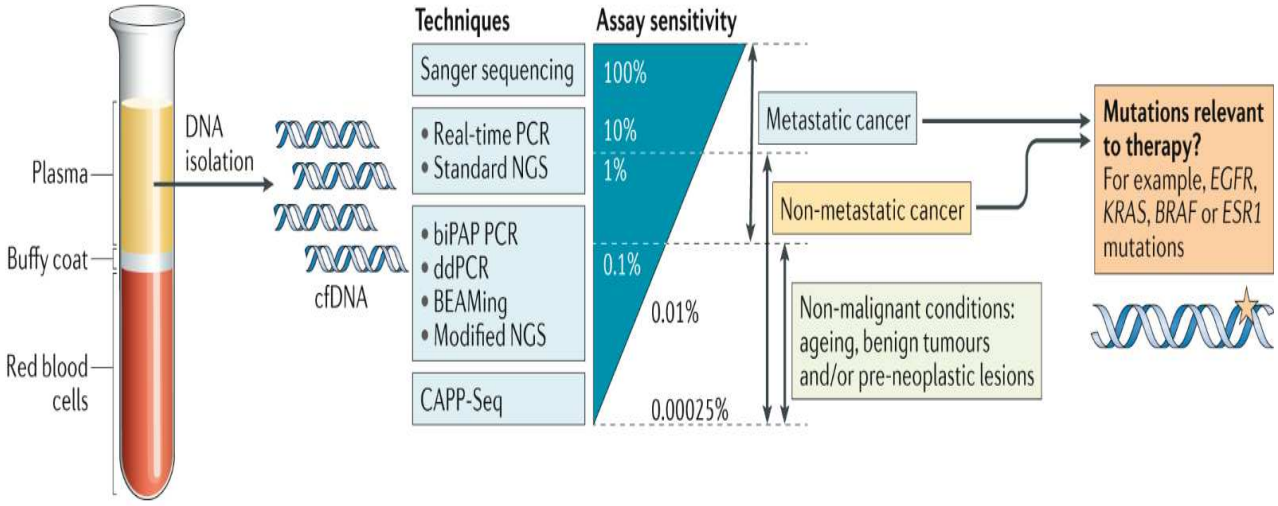



**Figure 13 : Méthodes de détection de l'ADN tumoral circulant (123)**

**Tableau 5 : Différentes techniques de détection de l'ADNtc (124)**

| Methode | Technologie | Plateforme | Objectif | Limites de détections et limitations |
|---|---|---|---|---|
| **Approches ciblées de l'ADNtc** | PCR | dd PCR ET BEAMing | Détection de mutations somatiques | Taux allant de 1% à 0,001%; teste un petit nombre de loci spécifiques et peut manquer des informations substantielles |
| | NGS | Tam-Seq | Détection de mutations somatiques dans un panel de gènes prédéfini permettant une vision plus large et plus complète des régions génomiques | <0.01% – 0.5% – 2%<br>moins complet nécessitant un test personnalisé |
| | | PARE | Détection de réarrangements chromosomiques structuraux somatiques spécifiques | 5% –1 0% |
| **Approches non ciblées de l'ADNtc** | NGS | WGS | Analyse du génome complet et des variations du nombre de copies | |
| | | WES | Analyse de l'exome entier et des variations du nombre de copies | Pas de nécessité de connaître à l'avance des mutations |

## B. Techniques de détection de l'ADNtc

Une première approche pour la détection de l'ADNtc consiste à faire du séquençage ciblé. Cette technique se base sur la détection d'une ou plusieurs mutations connues chez la tumeur primitive (ce qui nécessite d'avoir séquencé au préalable la tumeur).
Plusieurs techniques ont été développées comme la PCR temps réel, la PCR digitale avec la dPCR ou le BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics) (Figure 13).
Les techniques par NGS comme le système Safe-Seqs, le profilage personnalisé du cancer par séquençage (CAPP-seq) peuvent aussi être utilisées pour rechercher des variations du nombre de copies d'un gène, des mutations ponctuelles ou pour identifier un sous clone. Mais cela nécessite une quantité d'ADNtc importante. Ces techniques sont plus sensibles que celles non ciblées dès lors que les quantités d'ADNtc sont inférieures à 0.01%.
Le tableau 5 (Tableau 5) résume les différentes technologies pour l'analyse de l'ADNtc avec leurs avantages et leurs limites (124).

## C. ADNtc et les sarcomes des tissus mous

Il existe quelques études montrant l'intérêt de l'ADNtc dans le diagnostic et le suivi des patients atteints de sarcome des tissus mous.

Les léiomoyosarcomes sont connus pour avoir un nombre important de copies de gènes, un taux intermédiaire d'indels et de polymorphismes d'un seul nucléotide comparés aux autres sarcomes. Deux études portant sur ce type de sarcome ont montré une corrélation significative ente la détection d'ADNtc et l'extension métastatique (125), (126). Ces auteurs notent cependant que cette technique ne peut s'appliquer que sur des patients ayant une forte charge tumorale (avec présence de métastases par exemple) et que des techniques plus sensibles sont nécessaires pour des patients ayant une maladie non progressive ou de petites tumeurs.

Une étude *in vivo* portant sur un liposarcome dédifférencié a montré que l'émergence d'un clone TP53 muté lors de l'étude par NGS de l'ADNtc était corrélée à la résistance au traitement par un inhibiteur de MDM2, suggérant que le suivi et la résistance aux traitements pouvait se faire par l'ADNtc pour ce type de sarcome (127). Les études de Ferreira *et al.* (128) Mihály *et al.* (129), Ogino *et al.* (130), Klega, *et al.* (131) et Braig *et al.* (132) ont montré que la quantification de l'ADNtc pouvait monitorer le suivi de la maladie dans des STM avec une translocation génomique connue.

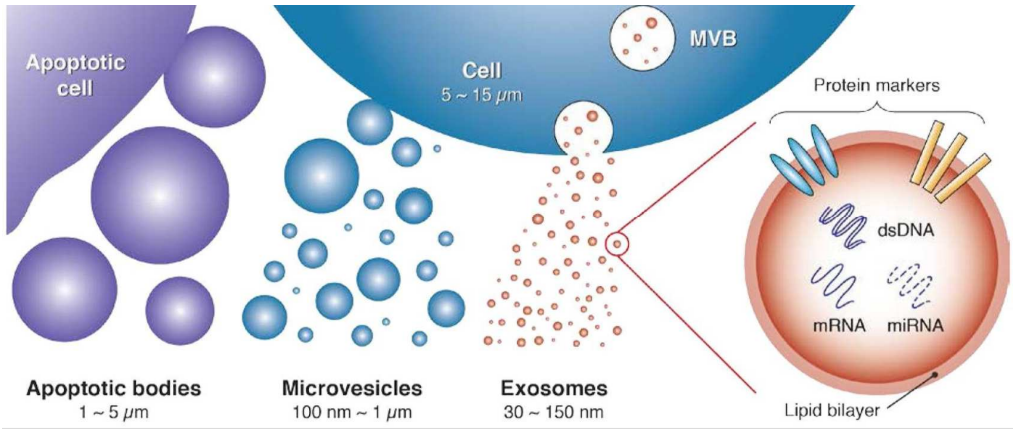



**Figure 14 : Description des exosomes (133)**

**Tableau 6 : Etudes des exosomes dans les STM (134)**

| | Synovialosarcome | Liposarcome | Rhabdomyosarcome | Fibrosarcome |
|---|---|---|---|---|
| **Diagnostic et/ou surveillance** | Transporteurs de miR 92-b-3p | Transporteurs de MiR-25-3p et miR 92a-3p | Transporteurs de miR-1246 et miR-1268, (point commun entre 5 lignées cellulaires de rhabdomyosarcomes) | |
| | | | | |
| **Pronostic** | | | Transporteurs de miRNa distincts en dépendant de la présence ou non du gène de fusion PAX FOXO1 de pronostic défavorable | |
| | | | | |
| **Valeur prédictive** | Transporteur de miR-791associé à la résistance au pazopanib | | | |
| **Traitement** | | | Boosters de l'efficacité de TRAIL mais seulement en combinaison avec le flavopiridol | Booster de l'efficacité de l'immunogénécité tumorale antigénique<br>Potentiels agents immuno adjuvants quand sont enrichis avec HSP70<br>Vecteur du siRNA contre unee recombinase RAD51<br>Boosters de l'efficacité de TRAIL mais seulement en combinaison avec le flavopiridol |

# VI. Exosomes

## A. Définition

Les exosomes font partie de la famille des vésicules extracellulaires. Ce sont des nanoparticules rondes ayant la taille la plus petite (30~150 nm) de cette famille (Figure 14). Elles sont constituées de lipides, de protéines (du cytosquelette ou associées au cytosquelette, d'adhésion, du trafic membranaire, chaperonnes…), d'enzymes impliquées dans la synthèse protéique et du métabolisme cellulaire, d'ARN, de microARN et d'ADN double brin issus de leur cellule d'origine. Ils peuvent être relargués dans les conditions normales et pathologiques par les cellules immunitaires, les cellules souches et les cellules tumorales (135), (136), (137). Ils jouent un rôle important dans la communication intracellulaire et dans les échanges moléculaires (138), (139), (140), (141).
Il a été montré que le contenu des exosomes variait et qu'il était représentatif de leur cellule d'origine (142), (143), (144) et qu'ils étaient facilement accessibles par une prise de sang. Par exemple, le sang humain sain contient environ 1,5 milliard d'exosomes par mL et celui des patients cancéreux plus du double (145).

## B. Techniques de détection des exosomes

Il existe des plateformes microfluidiques qui isolent et analysent les exosomes. Ces plateformes utilisent plusieurs approches d'isolement comme la capture par immunoaffinité, la filtration sur des membranes, la capture sur des nanofiltres, la nanofiltration acoustique et le tri par déplacement latéral déterministe. Elles utilisent aussi différentes techniques d'analyse quantitative des exosomes comme la détection par fluorescence, la détection colorimétrique ou la détection électrochimique (146), (147). Elles permettent d'étudier soit toutes les populations d'exosomes (plateforme EXOChip) (148), soit une sous population donnée (μNMR plateforme développée par Shao *et al.* (149), les protéines (150), l'ARNm et le microARN (iMER plateforme développée par Shao *et al.* (149)) qu'elles transportent.

## C. Exosomes et les sarcomes des tissus mous

Peu d'études ont été menées sur les exosomes dans les sarcomes et plus spécifiquement dans les STM. Le tableau 6 (Tabeau 6) de Massaoutis *et al.* (134) reprend et synthétise ces différentes études.

# VII. ARN tumoral circulant

## A. Définition

L'ARNtc fait référence à l'ARN libre issu de cellules néoplasiques circulant dans le sang d'un patient. Comparé à l'ADN, l'ARN est une molécule relativement instable dont la demi-vie dans le plasma est d'environ 15 secondes (151). Sa stabilité est renforcée par son association avec les protéines (152), les complexes protéolipidiques (153) et les vésicules extracellulaires (154). L'ARNtc fournit des informations quantitatives et qualitatives sur la tumeur. Toutes les classes d'ARN peuvent être utilisées comme biomarqueurs. Cependant, les classes les plus appropriées sont les ARN messagers (ARNm), puis les miARN et les ARN longs non codants (ARNlnc) qui font partie des ARN non codants (ARNnc). En effet, l'ARNm exosomal circulant a été utilisé pour étudier le statut mutationnel de KRAS et BRAF chez les patients atteints de cancer colorectal (155), et l'ARNm exosomal EGFRvIII a un potentiel pour le diagnostic des gliomes de haut grade EGFRvIII positifs (156). De nombreuses fusions de gènes liés au cancer du poumon ont été identifiées dans les ARNm vésiculaires et non vésiculaires et ont une valeur de biomarqueurs (157). Parmi la fraction non vésiculaire des ARNtc, l'ARNm de la télomérase inverse circulante humaine a démontré une plus grande précision diagnostique et pronostique que le PSA pour le cancer de la prostate (158). En ce qui concerne les miARN, ces derniers sont très stables dans le plasma et le sérum (159). Les niveaux plasmatiques de miR-196a et de miR-1246 exosomaux peuvent être utilisés pour le diagnostic précoce des cancers du pancréas (160). Des panels de miARN se sont révélés être des biomarqueurs fiables pour le diagnostic (161) ou le pronostic (162) du cancer du poumon. Plusieurs études ont montré le rôle de l'ARNlnc exosomal en tant que biopsie liquide dans les cancers de la vessie (162), (163), (164), colorectal (165), (166) et dans le carcinome hépatocellulaire (167), (168), (169).

## B. Techniques de détection de l'ARNtc

Le principal défi analytique associé à l'analyse des ARNtc est le choix de la plateforme de détection. Des tests quantitatifs de réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse (RT-qPCR) et des technologies de séquençage d'ARN (RNA-seq) ont été mis au point pour quantifier les ARNtc. Alors que la RT-qPCR est rapide, très sensible et facile à personnaliser, son débit est généralement faible et seul un nombre limité d'ARNtc peut être analysé (170). En revanche, l'ARN-Seq est une technologie à haut débit utilisée pour fournir une vue plus complète de l'ensemble du transcriptome, y compris de la détection des gènes de fusion, du profilage de l'expression des gènes, le séquençage ciblé, les ARN non codants et de

l'analyse unicellulaire (161).

## C. ARNtc et sarcomes des tissus mous

Des études ont été réalisées sur l’ARNtc et les sarcomes. En effet, des variations dans les niveaux de miARN circulant ont été identifiées par RT-qPCR dans un certain nombre de types de sarcomes dont l'ostéosarcome, le sarcome synovial et le rhabdomyosarcome. Il a été montré que ces miARN pourraient permettre de détecter plus précocement que les signes radiologiques, des rechutes ou apparition de métastases (171), (172).

Certains miARN spécifiques dans le sérum (172), (173) ou ARNlnc (174), (175) seraient aussi des biomarqueurs spécifiques permettant d’identifier le type de sarcome dont le patient est atteint.

**Tableau 7 : Résumé des biopsies liquides et de leur application en médecine clinique (78)**

| Analytes | Biopsie solide | Biopsie liquide | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tissus  | CTC  | ADNtc  | Vésicules extra cellulaires dont exosomes  | ARN libre  | miRNA  |
| Origine | | | | | | |
| Cellule viable | Oui | Oui | Non | Oui | Inconnu | Inconnu |
| Cellule apoptotique | Oui | Oui | Oui | Inconnu | Inconnu | Inconnu |
| Composants | | | | | | |
| ADN | Oui | Oui | Oui | Oui | Non | Non |
| ARN | Oui | Oui | Non | Oui | Oui | Oui |
| Protéines | Oui | Oui | Non | Oui | Non | Non |
| Métabolites | Oui | Oui | Non | Inconnu | Non | Non |
| Informations données | | | | | | |
| Mutations | Oui | Oui | Oui | Oui | Possible | Non |
| Variation du nombre de copies d'un gène | Oui | Oui | Oui | Oui | Non | Non |
| Altérations épigénétiques | Oui | Oui | Oui | Oui | Non | Non |
| Gènes de fusion | Oui | Oui | Oui | Oui | Possible | Non |
| Variant d'épissage | Oui | Oui | Non | Oui | Possible | Non |
| Information au niveau de la cellule unique | Oui | Oui | Non | Non | Non | Non |
| Essais fonctionnels | Oui | Oui | Non | Non | Non | Non |
| Applications en oncologie | | | | | | |
| Pronostic | Oui | Oui | Oui | Oui | Inconnu | Possible |
| Identification de marqueurs prédictifs | Oui | Oui | Oui | Possible | Inconnu | Non |
| Classification de sous types moléculaires | Oui | Possible | Possible | Inconnu | Inconnu | Non |
| Suivi de l'évolution clonale dans le temps | Non | Oui | Oui | Inconnu | Non | Non |
| Identification précoce de mécanismes de résistance | Non | Oui | Oui | Possible | Inconnu | Non |
| Suivi de la réponse au traitement | Non | Possible | Oui | Possible | Inconnu | Inconnu |
| Détection précoce de rechute ou maladie résiduelle | Non | Possible | Oui | Possible | Possible | Non |

# VIII. Objectifs

La problématique de ce travail a été d'étudier l'application théranostique des biopsies liquides dans les STM.
Le tableau 7 (Tableau 7) fait une synthèse de l'ensemble des applications possibles pour chacune des biopsies liquides existantes (78).
L'objectif de notre travail de thèse est de déterminer l'impact potentiel de la biopsie liquide pour une médecine de précision chez les patients atteints de sarcome avancé. A ce titre, nous avons décidé (1) d'explorer la faisabilité et l'utilité de la détection de CTC dans le cadre d'une étude monocentrique prospective et (2) de caractériser la faisabilité et la valeur théranostique de l'analyse de l'ADNtc dans le cadre d'une étude multicentrique prospective.

# Résultats expérimentaux

# Article 1

## Impact pronostique des cellules tumorales circulantes chez les patients atteints de sarcome des tissus mous : une étude prospective

L'institut Bergonié est l'un des centres de référence pour les STM. Nous avons voulu évaluer les CTC dans les STM avec l'aide de la technique ISET dans une étude prospective unicentrique.

Méthodes : voir les parties « Methods » et « Supplementary Methods » de l'article joint.

Résultats : voir l'article joint.

Ce travail fait l'objet d'une soumission en première auteure dans le journal « *Journal of Clinical Oncology »* en mars 2022.

**ORIGINAL REPORT *Precision Medicine***

# Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Soft-Tissue Sarcoma:

# A Prospective study

BLANCHI J[1], LAROCHE-CLARY A[1,2], LE LOARER F[3,4], BONHOMME B[3], ITALIANO A[2,4]

1. INSERM U1218, SARCOTARGET team, Bordeaux, France
2. Sarcoma Unit, Institut Bergonié, Bordeaux, France
3. Department of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France
4. Faculty of Medicine, University of Bordeaux, France

**Corresponding author**: Pr Antoine ITALIANO, Institut Bergonié, Bordeaux, France

email : a.italiano@bordeaux.unicancer.fr

**ABSTRACT**

**Purpose**: The detection of circulating tumor cells (CTC) could play an important role in precision medicine for patients with cancer in several fields such as detection of malignancy, monitoring of recurrence, and outcomes prognostication. Data related to CTC in sarcoma are quite limited. This study aims to characterize the prognostic impact of CTC in patients with advanced sarcoma and treated with systemic therapy.

**Methods**: Patients with advanced sarcoma were enrolled on one prospective single center study. CTC were detected by using the ISET method in which CTC are isolated by filtration based on their large size relative to circulating blood leukocytes. The association between baseline and on-treatment CTC count with clinical features and outcome was assessed.

**Results**: Between July 2017 and December 2020, 76 patients were included in the study. CTC were detected at baseline in 56 patients (74%). The average and median number of CTC were 22 CTC/10 mL (0–123 CTC/10 mL) and were 11 CTC/10 mL (0–123 CTC/10 mL), respectively. The number of CTC at baseline was not significantly correlated with the number of metastatic sites neither with histological subtype or with histological grade. CTC count at baseline was not correlated with PFS neither with OS. Patients who had decreased > 25% in CTC count between C1 and C2 did not experience significantly better PFS than patients with no change or increase in CTC counts.

**Conclusions and relevance**: CTC are detectable in most patients with advanced sarcoma. Further studies are needed to confirm the role of CTC monitoring to predict treatment efficacy in patients treated with systemic therapy.

**CONTEXT**

***Key objective***

Investigating the prognostic impact of circulating tumor cells (CTC) monitoring in patients with advanced sarcoma treated with systemic therapy.

***Knowledge generated***

Our results show that CTC are detectable in most patients with advanced sarcoma and that CTC decrease during treatment is not associated with improved progression-free survival.

***Relevance***

Our results indicate that further studies are justified to confirm the role of CTC monitoring to predict treatment efficacy in sarcoma patients treated with systemic therapy.

## INTRODUCTION

Sarcomas represent an heterogenous group of tumors accounting for about 1% of cancer in adults an 15% in children[1]. Surgery is the cornerstone of treatment. However, despite adequate locoregional treatment, up to 40% of patients will develop metastatic disease. In the advanced setting, doxorubicin-based chemotherapy represents the standard of care[2]. Several other agents can be used in patients with anthracyclines-refractory disease including cytotoxic drugs such as trabectedin[3], eribulin[4], gemcitabine combined or not with docetaxel[5], high-dose ifosfamide[6] and tyrosine kinase inhibitors such as pazopanib[7]. However, given the limited efficacy of these agents which is limited with response rate < 10% and progression-free survival being less than 4 months, their use to treat patients with metastatic STS has palliative purpose[8]. It is therefore important to monitor individual therapy response, as about toxicity and disease progression, inefficient therapy should be avoided. Such a monitoring is based of repeated CT imaging which may represent an important burden for patients with advanced disease[9].

Circulating tumor cells (CTC) have been considered as potential promising tool to monitor therapy response in cancer patients. The detection of CTC in the peripheral blood was associated with prognosis in several tumor types including breast[10], colorectal[11], prostate[12] and non-small cell lung cancer[13]. CTC count changes during treatment may be also predictive of response to treatment[11,13].

Data related to sarcoma-derived CTC are very limited[14-29]. Indeed, flow cytometry-based technologies for detection of sarcoma CTC are limited by the lack of a universal marker. In this regard, the ‘isolation by size of tumor cells’ (ISET) diagnostic technique, which relies on the tumour cellular size which is larger than leukocytes

may represent an interesting approach for CTC enrichment and detection in patients with sarcoma[25-26].

The aim of the study is to evaluate the prognostic relevance of CTC in patients with STS treated with systemic therapy in the neoadjuvant and advanced setting,

## PATIENTS AND METHODS

### *Patients*

Patients receiving chemotherapy treatment for metastatic sarcoma were proposed to be enrolled in the institutional molecular profiling program BIP (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02534649). In all cases, the histological diagnosis was established according to the World Health Organization Classification of Tumours[1] by an expert pathologist. Before starting a new line of treatment, patients received a baseline blood draw for CTC, as well as standard imaging studies. Patients were treated at the discretion of their physician. Reassessment of disease status was conducted after two or three cycles of chemotherapy (6-9 weeks, depending on treatment type and schedule) with the same modalities used at baseline. Response to treatment was assessed as per RECIST criteria[30].

### *CTC counts and cytologic analysis*

For the study, 10 mL of peripheral blood was collected in buffered EDTA at treatment onset, at cycle 2 and at cycle 4. The ISET method was carried out as previously described[31]. Blood was filtered through a polycarbonate filter with calibrated 8 µm diameter cylindrical pores. The membrane was then washed with phosphate-buffered saline (PBS), disassembled from the filtration device, and dried at air temperature[31]. The membrane was cut into 2 parts containing 6 spots to be stained and 4 spots to be stored for further studies. The spots were stained using a May-

Grünwald-Giemsa staining method. Stained spots were examined by light microscopy (Nikon ECLIPSE 80i) by an expert pathologist using the following criteria to characterize the malignant features of the cells: presence of cytoplasmic irregularity of the nuclear membrane, size of the nucleus, anisonucleosis, high nuclear/cytoplasmic ratio, and presence of tridimensional sheets of cells.

### *Statistical analysis*

To correlate CTC level profiles during chemotherapy with radiologic or histological response and other variables, an increase or decrease of at least 25% from CTC level at baseline was defined as a significant change, as described previously[32]. Progression-free survival was defined as the time elapsed between chemotherapy onset and progression of disease as defined per RECIST criteria[30]. Overall survival was defined as the time elapsed between chemotherapy onset and death from any cause. Statistical analysis was performed using SPSS statistical package version 19.0 (IBM SPSS Inc., New York, NY, USA).

## RESULTS

### *CTC detection in patients with metastatic soft-tissue sarcomas*

76 patients with metastatic sarcoma were prospectively enrolled in the study between July 2017 and December 2020. Their characteristics are described in Table 1. CTC were detected at baseline in 56 patients (74%). The average and median number of CTC were 22 CTC/10 ml (0–123 CTC/10 ml) and were 11 CTC/10 ml (0–123 CTC/10 ml), respectively. Characterizations of CTC are presented in Figure 1. The number of CTC at baseline was not significantly correlated with the number of metastatic sites neither with histological subtype or with histological grade (Supplementary Table 1).

### *Analysis of PFS and OS according to CTC levels at baseline*

The median follow-up time was 21.9 months. The median progression-free survival was 4.7 months (95% CI 3.7-5.7). At the time of statistical analysis, 43 patients were died and 24 were still alive and 9 were lost. The median overall survival was 14.4 months (95% CI 8.7-20.1). CTC count at baseline whatever the cut-off used (≥1 CTC or ≥ median value) was not correlated with PFS neither with OS (Supplementary Figure 1).

***Analysis of PFS and OS according to change in CTC level from baseline***

To investigate whether a change in CTC predicts early progression and/or death, we compared changes in levels between treatment onset and cycle 2 (3 to 4 weeks after treatment onset). Patients with no detectable CTC at any time point (n=2) and patients with available CTC count at baseline only (n=27) were excluded from this analysis. As shown in Figure 2, no significant difference was observed in terms of PFS or OS between patients who had decreased > 25% in CTC count at the time of C2 experienced and the others.

## DISCUSSION

Blood represents the ideal compartment to develop non-invasive approaches to monitor and predict treatment response in patients with cancer. Several protein markers such as CA15-3 (carbohydrate antigen 15-3) for breast cancer, CA125 (cancer antigen 125) for ovarian cancer, CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9) for pancreatic cancer, CEA (carcinoembryonic antigen) for colon cancer and PSA (prostate-specific antigen) for prostate cancer are currently routinely used by medical oncologists to monitor treatment efficacy. However, none circulating biomarker is available yet for patients with sarcoma.

To our knowledge, we report here the first study investigating enumeration of sarcoma CTC in a prospective study including patients treated with approved therapy. Only few studies aimed to detect CTC detection in patients with sarcoma[14-29] and most of them included a very low number of patients (mean 44, range 1-225) (Table 2). Most of these studies used reverse-transcription (RT)-PCR-based methods to detect CTC[15-21]. However, this approach is reliable only for translocation-related sarcomas such as Ewing' sarcoma which represent less than 30% of all sarcomas[1]. More recently, several studies investigated the capacity of flow cytometry-based technologies for detection of sarcoma CTC[14, 22-23]. However, this approach is limited by the high heterogeneity of sarcoma and the lack of a universal marker. We have used here the 'isolation by size of tumor cells' (ISET) diagnostic technique which is an antibody-independent whole blood filtration method relying on the tumor cellular size which is larger than leukocytes[32]. Chinen et al already demonstrated the relevance of ISET to isolate, identify, and characterize sarcoma CTC in a study including 11 patients with different histological subtypes[26]. One advantage of the ISET method is that it allows the study of CTC morphological features. In a study including 208 patients (3 of them had sarcoma), Hofman et al demonstrated that cytopathologic analysis of CTC detected by ISET is a reliable procedure associated with high specificity and sensitivity in addition to its simplicity, rapidity, and low cost[25]. One limitation of our study is that the molecular features of the CTC isolated with ISET were not investigated. This would have required extensive molecular experiments which were out of the scope of this study. However, evaluation of CTC was performed by experts in the field of sarcoma pathology by using rigorous cytological criteria as previously described[25].

The mean and median numbers of CTC detected at baseline our study (22 and 11, respectively) was like that observed in the study form Chinen et al (21 and 5) who used the same methodology[26]. Contrary to that observed in several other epithelial tumors such as breast, colorectal, prostate or lung cancer[9-13], the baseline level of CTC was not associated with overall survival suggesting a lack of intrinsic prognostic value. Martin Broto et al shown in a study including 35 patients with advanced sarcoma that a decrease in CTC counts after treatment with the experimental drug olaratumab was higher in patients with disease control[29]. This observation was not found in our study.

Only few drugs are active against sarcomas. Given their modest efficacy and their safety profile, their timely and appropriate use is key to achieve successful palliation and improved outcome. Evaluation of clinical benefit is usually based on repeated imaging. However, imaging procedures are expensive, represent an important burden for the patient, and require several cycles of therapy before providing a reliable indication of disease status[9]. Our results suggest that monitoring CTC count during treatment is not useful to predict its efficacy and patient outcome. Further studies are therefore needed to identify innovative methods for therapeutic response monitoring in patients with advanced sarcoma. In this regard, monitoring of circulating tumor DNA (ctDNA) may represent a promising approach. Indeed, monitoring ctDNA has been shown to be useful in evaluating treatment responses and predicting disease progression or relapse in patients with Ewing sarcoma[33] or leiomyosarcoma[34].

## REFERENCES


1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed. Vol. 3).
2. Judson I, Verweij J, Gelderblom H, Hartmann JT, Schöffski P, Blay JY, Kerst JM, Sufliarsky J, Whelan J, Hohenberger P, Krarup-Hansen A, Alcindor T, Marreaud S, Litière S, Hermans C, Fisher C, Hogendoorn PC, dei Tos AP, van der Graaf WT; European Organisation and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014 Apr;15(4):415-23.
3. Demetri GD, von Mehren M, Jones RL, Hensley ML, Schuetze SM, Staddon A, Milhem M, Elias A, Ganjoo K, Tawbi H, Van Tine BA, Spira A, Dean A, Khokhar NZ, Park YC, Knoblauch RE, Parekh TV, Maki RG, Patel SR. Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. J Clin Oncol. 2016 Mar 10;34(8):786-93.
4. Schöffski P, Chawla S, Maki RG, Italiano A, Gelderblom H, Choy E, Grignani G, Camargo V, Bauer S, Rha SY, Blay JY, Hohenberger P, D'Adamo D, Guo M, Chmielowski B, Le Cesne A, Demetri GD, Patel SR. Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. Lancet. 2016 Apr 16;387(10028):1629-37.

5. Maki RG, Wathen JK, Patel SR, Priebat DA, Okuno SH, Samuels B, Fanucchi M, Harmon DC, Schuetze SM, Reinke D, Thall PF, Benjamin RS, Baker LH, Hensley ML. Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas: results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002 [corrected]. J Clin Oncol. 2007 Jul 1;25(19):2755-63.
6. Patel SR, Vadhan-Raj S, Papadopolous N, Plager C, Burgess MA, Hays C, Benjamin RS. High-dose ifosfamide in bone and soft tissue sarcomas: results of phase II and pilot studies-dose-response and schedule dependence. J Clin Oncol. 1997 Jun;15(6):2378-84.
7. van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, Schöffski P, Aglietta M, Staddon AP, Beppu Y, Le Cesne A, Gelderblom H, Judson IR, Araki N, Ouali M, Marreaud S, Hodge R, Dewji MR, Coens C, Demetri GD, Fletcher CD, Dei Tos AP, Hohenberger P; EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group; PALETTE study group. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet. 2012 May 19;379(9829):1879-86.
8. Savina M, Le Cesne A, Blay JY, Ray-Coquard I, Mir O, Toulmonde M, Cousin S, Terrier P, Ranchere-Vince D, Meeus P, Stoeckle E, Honoré C, Sargos P, Sunyach MP, Le Péchoux C, Giraud A, Bellera C, Le Loarer F, Italiano A. Patterns of care and outcomes of patients with METAstatic soft tissue SARComa in a real-life setting: the METASARC observational study. BMC Med. 2017 Apr 10;15(1):78.

9. Kwee TC, Dijkstra H, Knapen DG, de Vries EGE, Yakar D. Which patients are prone to undergo disproportionate recurrent CT imaging and should we worry? Eur J Radiol. 2020 Apr;125:108898.
10. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, *et al.* Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. Clin Cancer Res 2006;12:4218-24.
11. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. J Urol 2009;181:1091-7.
12. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, *et al.* Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008;26:3213-21.
13. Krebs MG, Sloane R, Priest L, *et al.* Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2011;29:1556-63.
14. Dubois SG, Epling CL, Teague J, Matthay KK, Sinclair E. Flow cytometric detection of Ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54(1):13–18.
15. Pfleiderer C, Zoubek A, Gruber B, *et al.* Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR. *Int J Cancer.* 1995;64(2):135–139.
16. Peter M, Magdelenat H, Michon J, *et al.* Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1995;72(1):96–100.

17. Kelly KM, Womer RB, Barr FG. Minimal disease detection in patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *Cancer.* 1996;78(6):1320–1327.
18. Thomson B, Hawkins D, Felgenhauer J, Radich J. RT-PCR evaluation of peripheral blood, bone marrow and peripheral blood stem cells in children and adolescents undergoing VACIME chemotherapy for Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(5):527–533.
19. Avigad S, Cohen IJ, Zilberstein J, *et al.* The predictive potential of molecular detection in the nonmetastatic Ewing family of tumors. *Cancer.* 2004;100(5):1053–1058.
20. Gallego S, Llort A, Roma J, Sabado C, Gros L, de Toledo JS. Detection of bone marrow micrometastasis and microcirculating disease in rhabdomyosarcoma by a real-time RT-PCR assay. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(6):356–362.
21. West DC, Grier HE, Swallow MM, Demetri GD, Granowetter L, Sklar J. Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. J Clin Oncol. 1997;15(2):583–588.
22. Satelli A, Mitra A, Cutrera JJ, Devarie M, Xia X, Ingram DR, Dibra D, Somaiah N, Torres KE, Ravi V, Ludwig JA, Kleinerman ES, Li S. Universal marker and detection tool for human sarcoma circulating tumor cells. Cancer Res. 2014 Mar 15;74(6):1645-50.
23. Vo KT, Edwards JV, Epling CL, Sinclair E, Hawkins DS, Grier HE, Janeway KA, Barnette P, McIlvaine E, Krailo MD, Barkauskas DA, Matthay KK, Womer RB, Gorlick RG, Lessnick SL, Mackall CL, DuBois SG. Impact of Two

Measures of Micrometastatic Disease on Clinical Outcomes in Patients with Newly Diagnosed Ewing Sarcoma: A Report from the Children's Oncology Group. Clin Cancer Res. 2016 Jul 15;22(14):3643-50.

24. Zhang, H.; Gao, P.; Xiao, X.; Heger, M.; Geng, L.; Fan, B.; Yuan, Y.; Huang, C.; Chen, G.; Liu, Y.; *et al.* A Liquid Biopsy-Based Method for the Detection and Quantification of Circulating Tumor Cells in Surgical Osteosarcoma Patients. *Int. J. Oncol.* **2017**, *50*, 1075–1086.
25. Hofman, V.; Bonnetaud, C.; Ilie, M.I.; Vielh, P.; Vignaud, J.M.; Fléjou, J.F.; Lantuejoul, S.; Piaton, E.; Mourad, N.; Butori, C.; *et al.* Preoperative Circulating Tumor Cell Detection Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method for Patients with Lung Cancer Is a New Prognostic Biomarker. Clin. Cancer Res. 2011, 17, 827–835
26. Chinen, L.; Mello, C.; Abdallah, E.; Ocea, L.; Buim, M.; Mingues, N.; Gasparini, J.L., Jr.; Fanelli, M.; Paterlini, P. Isolation, Detection, and Immunomorphological Characterization of Circulating Tumor Cells (CTC) from Patients with Different Types of Sarcoma Using Isolation by Size of Tumor Cells: A Window on Sarcoma-Cell Invasion. OTT 2014, 1609.
27. Balasubramanian, P.; Kinders, R.J.; Kummar, S.; Gupta, V.; Hasegawa, D.; Menachery, A.; Lawrence, S.M.; Wang, L.; Ferry-Galow, K.; Davis, D.; *et al.* Antibody-Independent Capture of Circulating Tumor Cells of Non-Epithelial Origin with the ApoStream® System. PLoS ONE 2017, 12, e0175414.
28. Hasegawa, N.; Takeda Nakamura, I.; Ueno, T.; Kojima, S.; Kawazu, M.; Akaike, K.; Okubo, T.; Takagi, T.; Suehara, Y.; Hayashi, T.; *et al.* Detection of Circulating Sarcoma Tumor Cells Using a Microfluidic Chip-Type Cell Sorter. Sci. Rep. 2019, 9, 1–18.

29. Martín-Broto J, Pousa AL, Brohl AS, Van Tine BA, Powers B, Stacchiotti S, Blay JY, Hu JS, Oakley GJ 3rd, Wang H, Szpurka AM, Levy DE, Mo G, Ceccarelli M, Jones RL. Circulating Tumor Cells and Biomarker Modulation with Olaratumab Monotherapy Followed by Olaratumab plus Doxorubicin: Phase Ib Study in Patients with Soft-Tissue Sarcoma. Mol Cancer Ther. 2021 Jan;20(1):132-141.
30. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009 Jan;45(2):228-47.
31. Hartkopf AD, Wagner P, Wallwiener D, Fehm T, Rothmund R. Changing levels of circulating tumor cells in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. Anticancer Res. 2011 Mar;31(3):979-84.
32. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchot C, Paterlini-Bréchot P. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulatingtumor cells. Am J Pathol. 2000 Jan;156(1):57-63.
33. Klega K, Imamovic-Tuco A, Ha G, *et al*. Detection of somatic structural variants enables quantification and characterization of circulating tumor DNA in children with solid tumors. JCO Precis Oncol. 2018 ; 2018 : 1-13 .
34. Hemming ML, Klega KS, Rhoades J, *et al.* Detection of circulating tumor DNA in patients with leiomyosarcoma with progressive disease. JCO Precis Oncol. 2019; 2019 : 10.1200

***Table 1. Patient characteristics (n=76)***

| | |
|---|---|
| ***Median age, (min-max)*** | 61 (19-88) |
| ***Gender*** | |
| *Men* | 37 (49%) |
| *Women* | 39 (51%) |
| ***Histological subtype*** | |
| *Leiomyosarcoma* | 22 (29%) |
| *Undifferentiated pleomorphic sarcoma* | 17 (22%) |
| *Liposarcoma* | 13 (17%) |
| *Other* | 24 (32%) |
| ***Histological Grade*** | |
| *Grade 1* | 4 (5%) |
| *Grade 2* | 22 (29%) |
| *Grade 3* | 24 (32%) |
| *Unknown or not applicable* | 26 (34%) |
| *Number of Metastatic sites* | |
| *< 2* | 49 (64%) |
| *≥ 2* | 27 (36%) |
| ***Performance Status*** | |
| *≤ 1* | 67 (88%) |
| *≥2* | 9 (12%) |
| ***Treatment regimens*** | |
| *Anthracycline-based regimens* | 23 (31%) |
| *Gemcitabine-based regimens* | 20 (26%) |
| *Trabectedin* | 4 (5%) |
| *Others regimens** | 29 (38%) |

*Pazopanib, high-dose ifosfamide, eribulin, low-dose cyclophosphamide

***Table 2. Number of patients included in studies which aimed to detect CTC in patients with sarcoma***

| *Publication* | **Number of patients included** |
|---|---|
| Dubois SG, et al[14] | 1 |
| Pfleiderer C, et al[15] | 16 |
| Peter M, et al[16] | 36 |
| Kelly KM, et al[17] | 11 |
| Thomson B, et al[18] | 12 |
| Avigad S, et al[19] | 26 |
| Gallego S, et al[20] | 16 |
| West DC, et al[21] | 28 |
| Satelli A, et al[22] | 28 |
| Vo KT, et al[23] | 225 |
| Zhang, H, et al[24] | 23 |
| Hofman, V, et al[25] | 3 |
| Chinen, L, et al[26] | 11 |
| Balasubramanian, P, et al[27] | 15 |
| Hasegawa, N, et al[28] | 1 |
| Martín-Broto J, et al [29] | 51 |

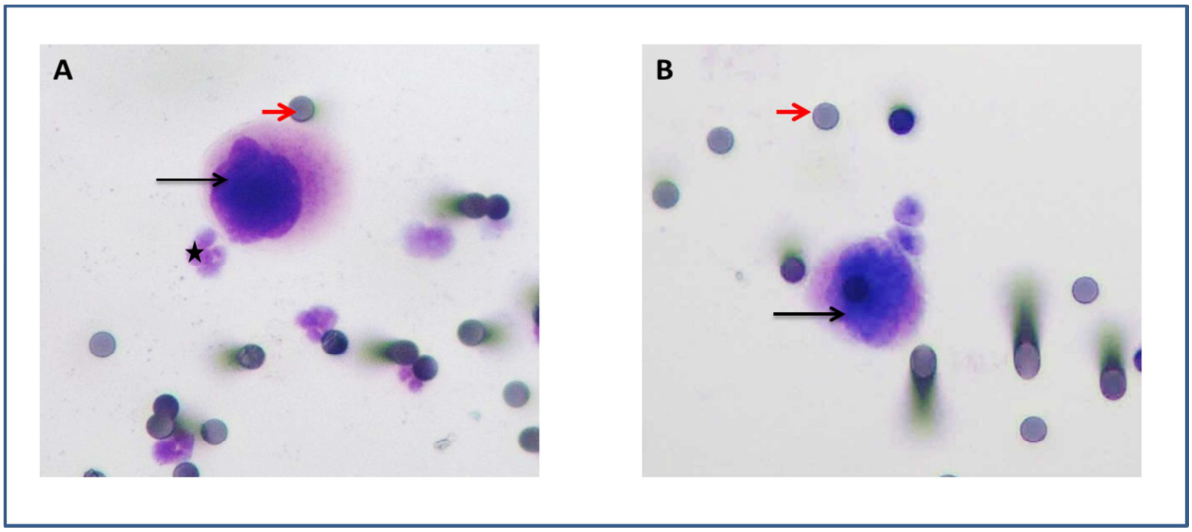



**Figure 1**. Cytomorphologic criteria for circulating sarcoma cells obtained by the isolation by size of epithelial tumor cell method in one patient with advanced alveolar rhabdomyosarcoma (A) and one patient with advanced desmoplastic tumor (B) Black arrows: increased cellular nucleo-cytoplasmic ratio with hyperchromatic, irregular nucleus (size ≥ 12 µm); red arrows: pores of the filter and star: polynuclear neutrophil), MGG staining, magnification × 40

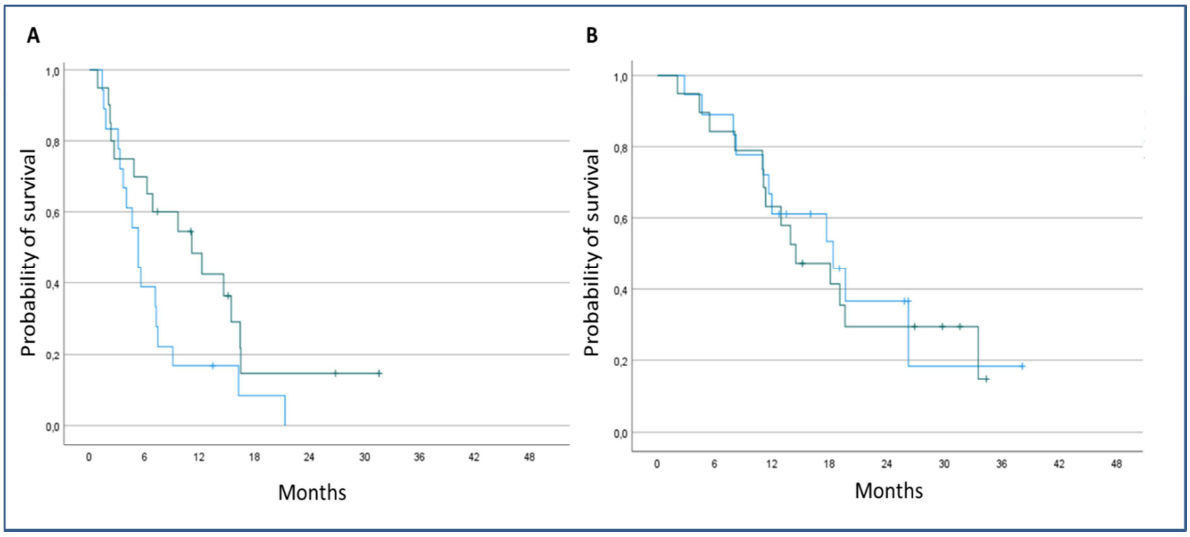
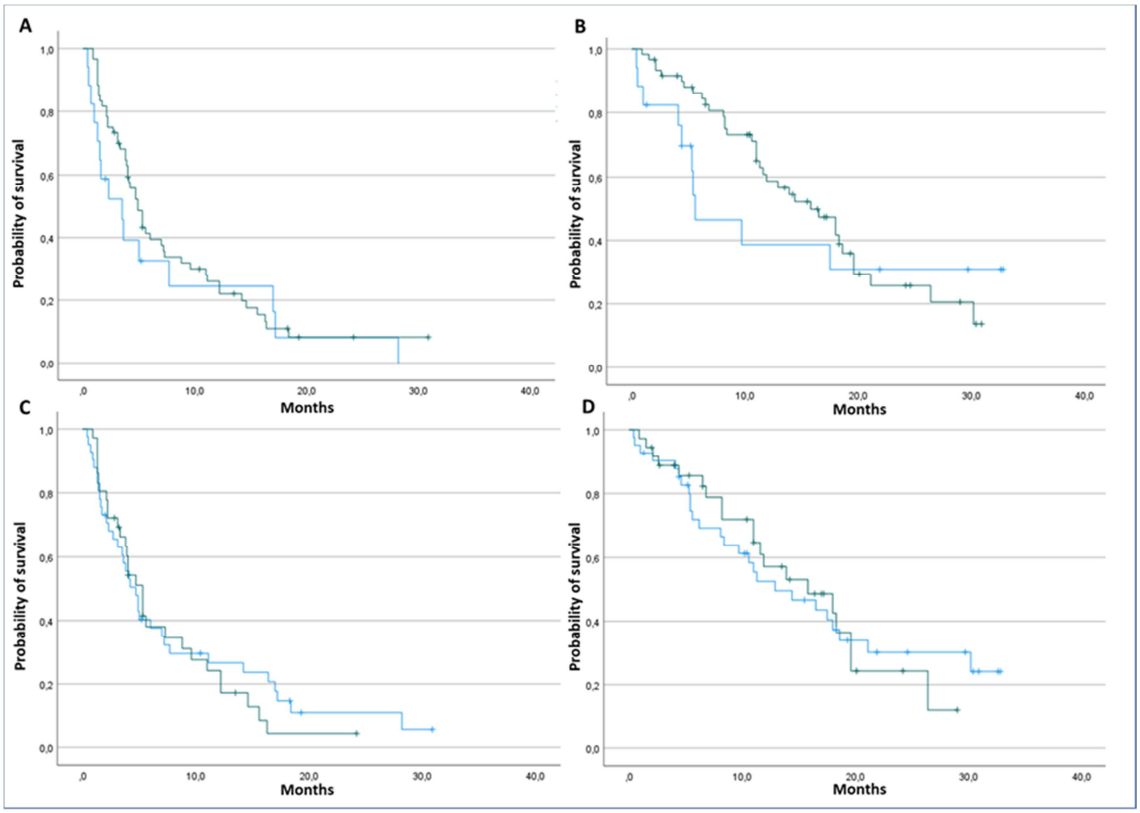



**Figure 2**. Kaplan Meier Curves of Progression-Free (A) and Overall survival (B) according to early CTC count decrease (blue line: decrease > 25% in CTC count at the time of cycle 2 compared to baseline; green line: no change, increase or decrease <25%).

**Supplementary Table 1**. CTC count according to Histological Subtype and Histological Grade

| | | HISTOLOGICAL SUBTYPE | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **Leiomyosarcoma** | **UPS** | **Liposarcoma** | **Others** |
| CTC value | Below the median | 11 | 9 | 5 | 15 |
| | Above the median | 11 | 8 | 8 | 9 |
| | Total | 22 | 17 | 13 | 24 |
| | | HISTOLOGICAL GRADE | | | |
| | | **1** | **2** | **3** | **NA** |
| CTC value | Below the median | 4 | 11 | 12 | 15 |
| | Above the median | 0 | 11 | 12 | 11 |
| | Total | 4 | 22 | 24 | 26 |




**Supplementary Figure 1**. Kaplan Meier Curves of Progression-Free (A-C) and Overall survival (B-D) according to CTC count at baseline. A-B. Kaplan-Meier curves of progression-free (A) and overall survival (B) according to CTC count at baseline (green line: CTC count ≥ 1/10 ml, blue line: CTC count < 1/10 ml). C-D. Kaplan-Meier curves of progression-free (C) and overall survival (D) according to CTC count at baseline (green line: CTC count ≥ median value, blue line: CTC count < median value).

# Article 2

## Etude du profil de l'ADN tumoral circulant chez des patients atteints de sarcome des tissus mous avancés

L'institut Bergonié et le centre Gustave Roussy ont collaboré pour cette étude prospective multicentrique. Nous avons voulu évaluer l'impact théranostique du séquençage de l'ADN tumoral circulant chez des patients atteints de sarcome des tissus mous avancé.

Méthodes : voir les parties « Methods » et « Supplementary Methods » de l'article joint.

Résultats : voir l'article joint.

Cet article a été réalisé en association avec Sofiane Taleb, pharmacien biologiste, de l'Institut Gustave Roussy et est en cours de relecture pour être soumis au journal « *Journal of Oncology Hematology* » en avril 2022.

**LETTER TO THE EDITOR**

# CIRCULATING TUMOR DNA PROFILING OF ADVANCED SOFT-TISSUE SARCOMAS

Julie BLANCHI[1*], Sofiane TALEB[2*], Arnaud BAYLE[2], Benjamin VERRET[3], Maud TOULMONDE[4], Mariella SPALATO[1,4], Paul DUBOS[5], Yech'an LAIZET[5], Melissa ALAME[6], Emmanuel KHALIFA[6], Antoine ITALIANO[1,2,4,7]

5. INSERM U1218, SARCOTARGET team, Bordeaux, France
6. Drug Developpement Department, Gustave Roussy, Villejuif, France
7. Department of Medicine, Gustave Roussy, Villejuif, France
8. Sarcoma Unit, Institut Bergonié, Bordeaux, France
9. Bioinformatic Unit, Institut Bergonié, Bordeaux, France
10. Department of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France
11. Faculty of Medicine, University of Bordeaux, France

*These two authors equally contributed to the work

**Corresponding author**: Pr Antoine ITALIANO, Institut Bergonié, Bordeaux, France

email: a.italiano@bordeaux.unicancer.fr

**ABSTRACT**

Circulating tumor DNA (ctDNA) profiling is increasingly used in the management of patients with advanced solid tumors. We aim to characterize the ctDNA genomic alteration landscape in patients with advanced soft-tissue sarcomas (STS). 98 patients have been included in two prospective precision medicine studies. The samples were tested using an FDA-approved blood-based test to analyze over 300 genes. Actionable targets were observed in 30 patients (31%), including mutations in DNA repair genes and in genes regulating the MAPK pathway. Our study, the largest cohort reported to date to our knowledge, demonstrates the feasibility and utility of ctDNA testing in patients with advanced STS.

**TO THE EDITOR**

Soft-tissue sarcomas (STS) are a heterogeneous group of rare tumors including more than 70 different subtypes and affecting approximately 200 000 individuals worldwide each year.[1] Despite their biological and histologic differences, sarcomas are generally treated in the same manner, with a combination of surgery and radiation therapy. However, despite an adequate loco regional treatment, up to 40% of patients will develop metastatic disease. Chemotherapy is the cornerstone of treatment in the advanced setting with doxorubicin being the first-line standard of care for decades despite many attempts to identify better regimens. Median overall survival (OS) is poor, ranging between 12 and 18 months with only modest improvement within the past 20 years.[2]

Clinical-grade next-generation sequencing (NGS) of tissue- and blood-derived circulating tumor DNA (ctDNA) allows assessment of multiple genomic alterations in patients with cancer. We and others have previously reported that comprehensive genomic profiling through next-generation sequencing (NGS) of tumor tissue allow the identification of genomic aberration with potential to influence and personalize therapy in up to 50% of patients with advanced STS[4,5].

Genomic profiling of ctDNA is increasingly used in the clinic to tailor therapy in cancer patients. Indeed, such liquid biopsy has several advantages: non-invasiveness, reduced turnaround times for faster results, ability to fully capture the landscape of tumor heterogeneity[6].

The purpose of the current study was to examine the results of ctDNA testing from a large cohort of patients with advanced STS included in two prospective precision medicine studies and to characterize the mutational landscape of STS using this

technology. This study, to our knowledge, represents the largest reported series of ctDNA in patients with advanced STS.

From December 2020 to August 2021, 98 patients with advanced STS have been included in two ongoing institutional molecular profiling studies (BIP: NCT02534649, STING: NCT04932525). Their characteristics are described in Table 1. Genomic analysis (ctDNA in all cases and tissue when available) was performed by using the FDA approved Foundation One Liquid CDx Assay (324 genes, tumor mutational burden [TMB], microsatellite instability status)[7]. Each individual genomic report was reviewed and discussed weekly by a multidisciplinary tumor board dedicated to precision medicine, attended by experts in clinical oncology, molecular biology, and clinical genetics. Actionable targets were defined by the MTB according to the existing level of evidence (ESCAT[8]), and molecular-based treatment suggestions were proposed where possible. Alterations were defined as either mutation (including insertion, deletion, truncation, or rearrangement) or amplification/copy number variation. Genes were considered theoretically actionable if the gene product was differentially expressed in tumor versus normal cells and could be targeted by a drug, or if a drug inhibited/modified the oncogenic activity of the gene product. The evidence for actionability might be based on strong clinical data or weaker preclinical data.

93 (95%) of the total STS cases harbored at least 1 alteration (Supplementary Figure 1) and proportions of affected patients in each sarcoma group varied significantly among groups, with the complex genomics sarcomas group being the most altered (49.2%) and translocation-related sarcomas being the least mutated (21.6%). The distribution of the number of alterations was different between complex genomics sarcomas, translocation-related sarcomas, and other sarcomas ($\chi 2$: 0.0321; $P < .05$).

A total of 624 alterations were identified in 189 genes (532 oncogenic mutations including substitutions or short indels plus splice variants, 55 truncation mutations/nonsens mutations, 18 gene amplifications, 4 gene homozygous deletions, and 14 gene rearrangements) (Supplementary Figure 1). The 30 genes most frequently altered were: *TP53, DNMT3A, ATM, TSC1, TET2, CHEK2, KIT, NF1, MLL2, NOTCH1, GNAS, PIK3CA, APC, PTEN, RB1, MSH3, BRCA2, ASXL1, PDGFRA, MAP3K1, TERT, CBL, JAK2, KRAS, MED12, NOTCH3, KDR, ATRX, NTRK1, ABL1*. At least 1 clinically relevant genomic aberration that could potentially guide decisions for targeted treatment was identified in 30 patients (31%): 13 (29%) of 45 cases in the complex genomics sarcoma group, 5 (28%) of 18 in the translocation-related sarcomas group, and 12 (34%) of 35 in the other sarcoma groups (no significantly different; p=0.8380). The most common clinically relevant alterations potentially affecting treatment decisions are described in Figure 1.

Overall, the MTB recommended a matched therapy for 21 patients (21%) (Supplementary Figure 2). The 2 main reasons for not recommending a therapy in patients with an actionable alteration were: no clinical trial available (n=6), recommended matched therapy already received (n=2).

9 patients (9%) were treated in a drug-matched clinical trial. Among them, 3 had clinical benefit. The median follow-up is 2 months [0; 9]. (Supplementary Table 1 and Figure 3).

Six patients were found to have a high TMB (> 16), MTB recommended treatment with an immune checkpoint inhibitor for 4 patients (4%) (Supplementary Figure 4). The reasons for not recommending a therapy were: immune checkpoint inhibitor already received for one patient, presence of another actionable alteration besides

high-TMB for the other patient. 2 patients (2%) were treated in a drug-matched clinical trial.

40 patients underwent also NGS of tissue besides ctDNA profiling. Testing was unsuccessful for 7 patients (17.5%).. No actionable alteration was found in both ctDNA and tissue for 17 patients (52%). The number of actionable alterations was similar in 5 (15%) patients (Supplementary Figure 5). The genes altered were: *HRAS*, *SMARCB1*, *ATM*, *BRAF ATRX* The number of actionable alterations was higher in tissue for 10 (30%) patients (Supplementary Figure 5). These 15 actionable alterations are listed in the Supplementary Table 2: 10 (67%) were copy number variants. The number of actionable alterations was higher in liquid for one (3%) patient (Supplementary Figure 5).

Tissue profiling allowed the identification of an ESCAT I, IIIA and IV alteration not present in ctDNA for 1, 4 and 7 patients, respectively whereas ctDNA profiling allowed the identification of an ESCAT IIIA alteration not present in tissue.

Thus far, data on ctDNA in STS have been very limited. Our study represents the largest reported cohort of patients with STS in this regard. In patients with localized Ewing sarcoma and osteosarcoma, the amount of ctDNA at diagnosis correlates with survival[9]. Monitoring ctDNA has also been shown to be useful in evaluating treatment responses and predicting disease progression or relapse in patients with Ewing sarcoma[10] or leiomyosarcoma[11].

In patients with gastrointestinal stromal tumor, ctDNA findings correlate with tumor biopsies, suggesting that liquid biopsy represent a robust approach for tumor genotyping and treatment tailoring[12]. In our study, we found that 67% of ctDNA findings (presence or not of actionable alterations) correlate with those identifie in

tissue. We found also more alterations in tissue than in ctDNA profiling, the majority of them (67%) being copy number variants. This result is in line with previous studies showing lower sensitivity of ctDNA profiling to identify CNV [13] [14] [15] [16]. It remains 5 patients with a single nucleotid variant not found in ctDNA. Among them, 3 patients had no ctDNA detected. Thus ctDNA seems to be an alternative tool for detection of actionable alterations in STS if detectable and except for copy number variants (losses or amplifications).

We have previously shown that NGS of tissue allow the identification of actionable alteration in up to 41% of patients with advanced STS[4]. We demonstrate here, for the first time to our knowledge, the ability to detect a broad array of therapeutically relevant alterations using ctDNA testing at a significant rate (31%) in patients with STS. Future technological development would allow to increase even more the sensitivity of this approach for copy number alterations

## REFERENCES


1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed. Vol. 3).
2. Judson I, Verweij J, Gelderblom H, Hartmann JT, Schöffski P, Blay JY, Kerst JM, Sufliarsky J, Whelan J, Hohenberger P, Krarup-Hansen A, Alcindor T, Marreaud S, Litière S, Hermans C, Fisher C, Hogendoorn PC, dei Tos AP, van der Graaf WT; European Organisation and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014 Apr;15(4):415-23.
3. Savina M, Le Cesne A, Blay JY, Ray-Coquard I, Mir O, Toulmonde M, Cousin S, Terrier P, Ranchere-Vince D, Meeus P, Stoeckle E, Honoré C, Sargos P, Sunyach MP, Le Péchoux C, Giraud A, Bellera C, Le Loarer F, Italiano A. Patterns of care and outcomes of patients with METAstatic soft tissue SARComa in a real-life setting: the METASARC observational study. BMC Med. 2017 Apr 10;15(1):78.
4. Lucchesi C, Khalifa E, Laizet Y, Soubeyran I, Mathoulin-Pelissier S, Chomienne C, Italiano A. Targetable Alterations in Adult Patients With Soft-Tissue Sarcomas: Insights for Personalized Therapy. JAMA Oncol. 2018 Oct 1;4(10):1398-1404.
5. Gounder M, Mahamed S, Robinson V, Bailey M, Ferraro R, Patel N,et al. Impact of next-generation sequencing (NGS) on diagnostic and therapeutic options in soft-tissue and bone sarcoma. J Clin Oncol 2017, 35, no. 15_suppl 11001-11001.
6. De Mattos-Arruda L, Siravegna G. How to use liquid biopsies to treat patients with cancer. ESMO Open. 2021 Apr;6(2):100060.
7. Woodhouse R, Li M, Hughes J, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One*. 2020;15(9):e0237802. Published 2020 Sep 25. doi:10.1371/journal.pone.0237802

8. J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, Ng CKY, Bedard PL, Tortora G, Douillard JY, Van Allen EM, Schultz N, Swanton C, André F, Pusztai L. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). Ann Oncol. 2018 Sep 1;29(9):1895-1902.
9. Shulman DS, Klega K, Imamovic-Tuco A, et al . Detection of circulating tumour DNA is associated with inferior outcomes in Ewing sarcoma and osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group [published correction appears in Br J Cancer. 2018;120:869] . Br J Cancer. 2018, 119 615 - 621
10. Klega K, Imamovic-Tuco A, Ha G, et al. Detection of Somatic Structural Variants Enables Quantification and Characterization of Circulating Tumor DNA in Children With Solid Tumors. JCO Precis Oncol. 2018;2018:PO.17.00285..
11. Hemming ML, Klega KS, Rhoades J, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Patients With Leiomyosarcoma With Progressive Disease. JCO Precis Oncol. 2019;2019:PO.18.00235.
12. Serrano C, Vivancos A, López-Pousa A, et al. Clinical value of next generation sequencing of plasma cell-free DNA in gastrointestinal stromal tumors. BMC Cancer. 2020;20(1):99. Published 2020 Feb 5. doi:10.1186/s12885-020-6597-x
13. KC Chan, P Jiang, YW Zheng, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing Clin Chem, 59 (2013), pp. 211-224,
14. M Heidary, M Auer, P Ulz, E Heitzer, E Petru, C Gasch, S Riethdorf, O Mauer mann, I Lafer, G Pristauz, et al. The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer Breast Cancer Res, 16 (2014), p. 421.
15. RJ Leary, M Sausen, I Kinde, N Papadopoulos, JD Carpten, D Craig, J O'Sha ughnessy, KW Kinzler, G Parmigiani, B Vogelstein, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing Sci Transl Med, 4 (2012), p. 162ra154.

16. Okuma HS, Yonemori K, Kojima Y, Tanioka M, Sudo K, Noguchi E, et al. Clinical Utility of Circulating Tumor DNA in Advanced Rare Cancers. Front Oncol. 24 nov 2021;11:732525.

## DECLARATIONS

### Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Institutional Review Board of Institut Bergonié. All patients signed informed consent.

### Consent for publication

Not applicable.

### Availability of data and materials

Source data are available on request to the corresponding author.

### Competing interests:

AI: ROCHE (research grant, advisory board)

**Funding:** MSD AVENIR

**Author Contributions:** Conceptualization, A.I..; methodology, J.B., S.T., A.B., M.A, Y.L.,P.D. ; formal analysis, S.V.; investigation, B.V., M.T., M.S., A.I resources, A.I ; writing—original draft preparation, J.B, A.I.; writing—review and editing, J.B., S.T., A.B., A.I.; supervision, A.I.; project administration, A.I. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Acknowledgments:** Not applicable

| **Table 1 Patients characteristics (n=98)** | |
|---|---|
| **Median age (year) [min; max]** | 56 (23; 84) |
| **Gender, n (%)** | |
| Men | 53 (55%) |
| Women | 45 (45%) |
| **Histological subtype, n (%)** | |
| Leiomyosarcoma | 18 (18%) |
| Undifferentiated pleomorphic sarcoma | 6 (6%) |
| Liposarcoma | 8 (8%) |
| Synovial sarcoma | 4 (4%) |
| Other | 62 (64%) |
| **Histological Grade, n (%)** | |
| Grade 1 | 11 (%) |
| Grade 2 | 21 (%) |
| Grade 3 | 42 (39%) |
| Unknown or not applicable | 24 (%) |
| **Performance Status, n (%)** | |
| ≤ 1 | 93 (%) |
| ≥2 | 5 (%) |
| **Number of previous lines of treatment** | |
| 0 | 47 (48%) |
| 1 | 23 (23%) |
| ≥ 2 | 28 (29%) |

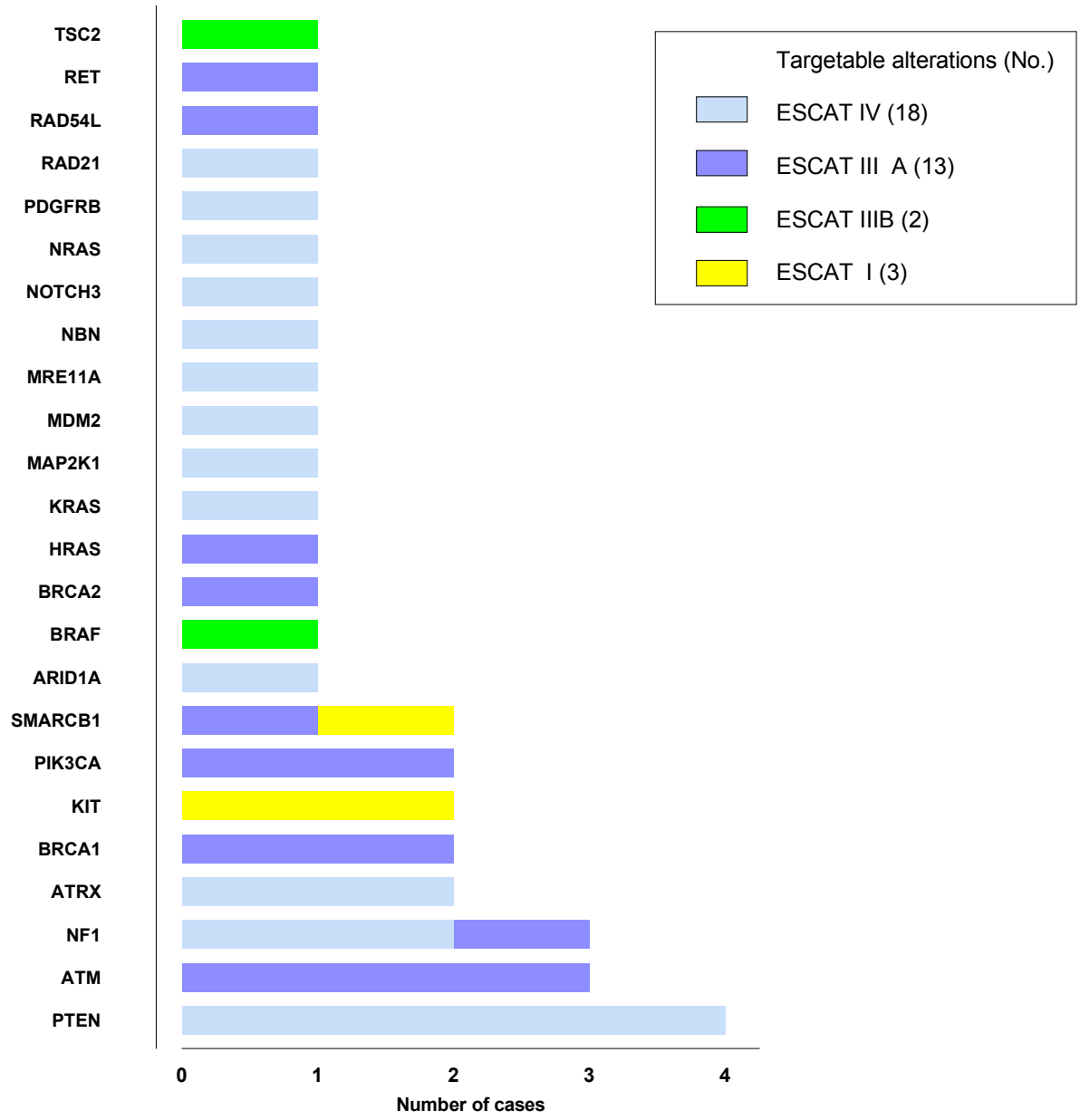



**Figure 1.** Distribution of targetable alterations identified though ctDNA profiling in 98 patients with advanced STS

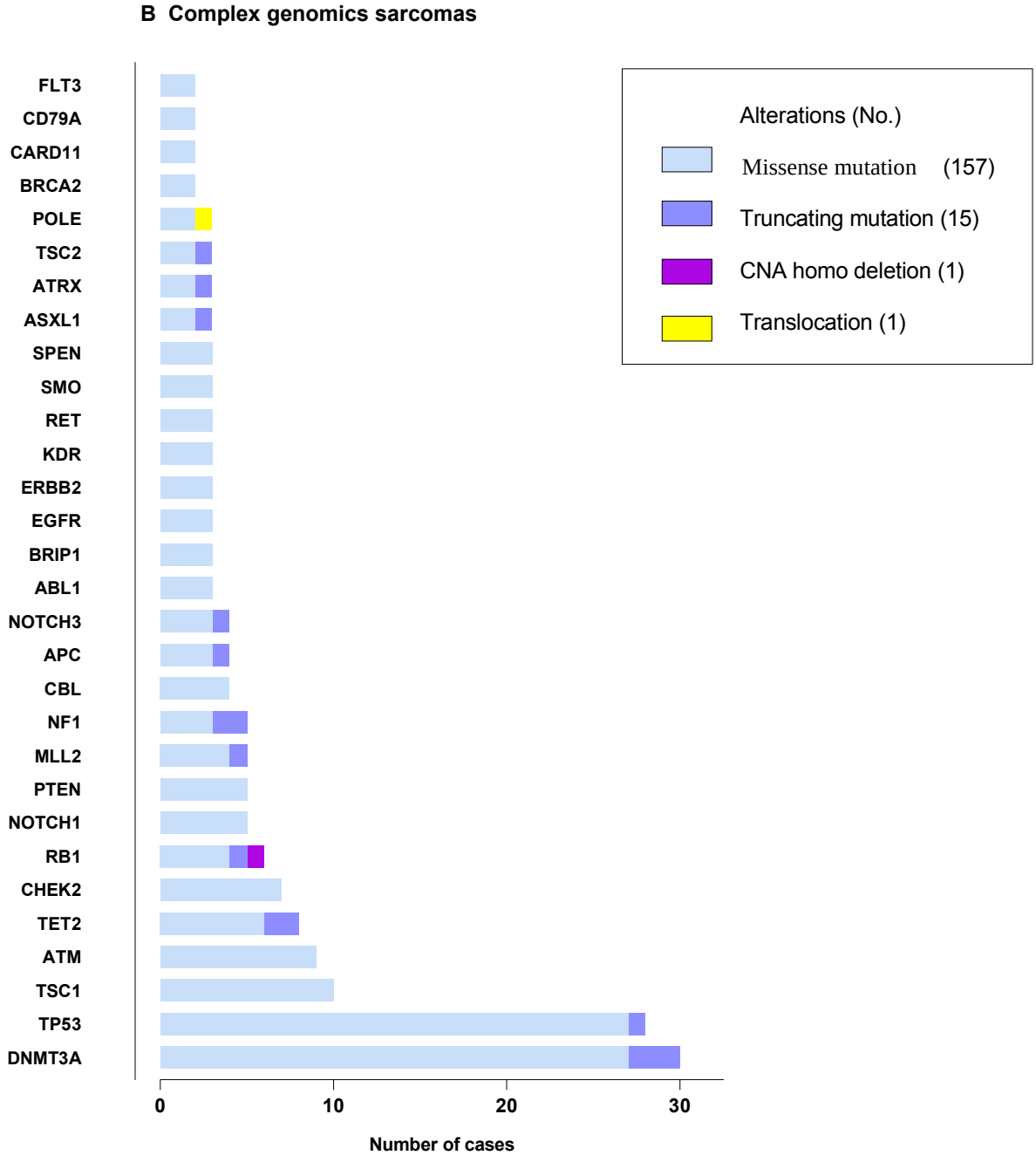
| No patient | Age at diagnosis | Gender | Histology | Targetable alteration | Experimental Drug | B.O.R (R.E.C.I.S.T) | TTP (weeks) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 61 | Male | Solitary fibrous tumor | *PIK3CA* mutation | mTOR inhibitor | SD | 11 |
| 2 | 60 | Male | Epithelioid cell sarcoma | *SMARCB1* mutation | EZH2 inhibitor | PD | 8 |
| 3 | 60 | Male | Leiomyosarcoma | *PTEN* mutation, *TSC2* splice site | mTOR inhibitor | PD | 2 |
| 4 | 59 | Male | Leiomyosarcoma | *PTEN* inibhition | mTOR inhibitor | PR | 7 |
| 5 | 58 | Male | Undifferenciated sarcoma | *NF1* mutations | MEK inhibitor | NA*** | NA |
| 6 | 62 | Male | Liposarcoma | *ATM* mutation | PARP inhibitor | PD | 65 |
| 7 | 69 | Female | Leiomyosarcoma | *ATRX* mutation | PARP inhibitor | NA** | 2.5 |
| 8 | 76 | Female | Liposarcoma | *ATRX* mutation | PARP inhibitor | SD | 19 |
| 9 | 44 | Male | Rhabdomyosarcoma | *RET* mutation | RET inhibitor | NA** | 2 |
| 10* | 74 | Male | Angiosarcoma | bTMB high | PD-1 inhibitor | PD | 9 |
| 11* | 78 | Male | Solitary fibrous tumor | bTMB high | PD1/PD-L1 inhibitor | PD | 5 |

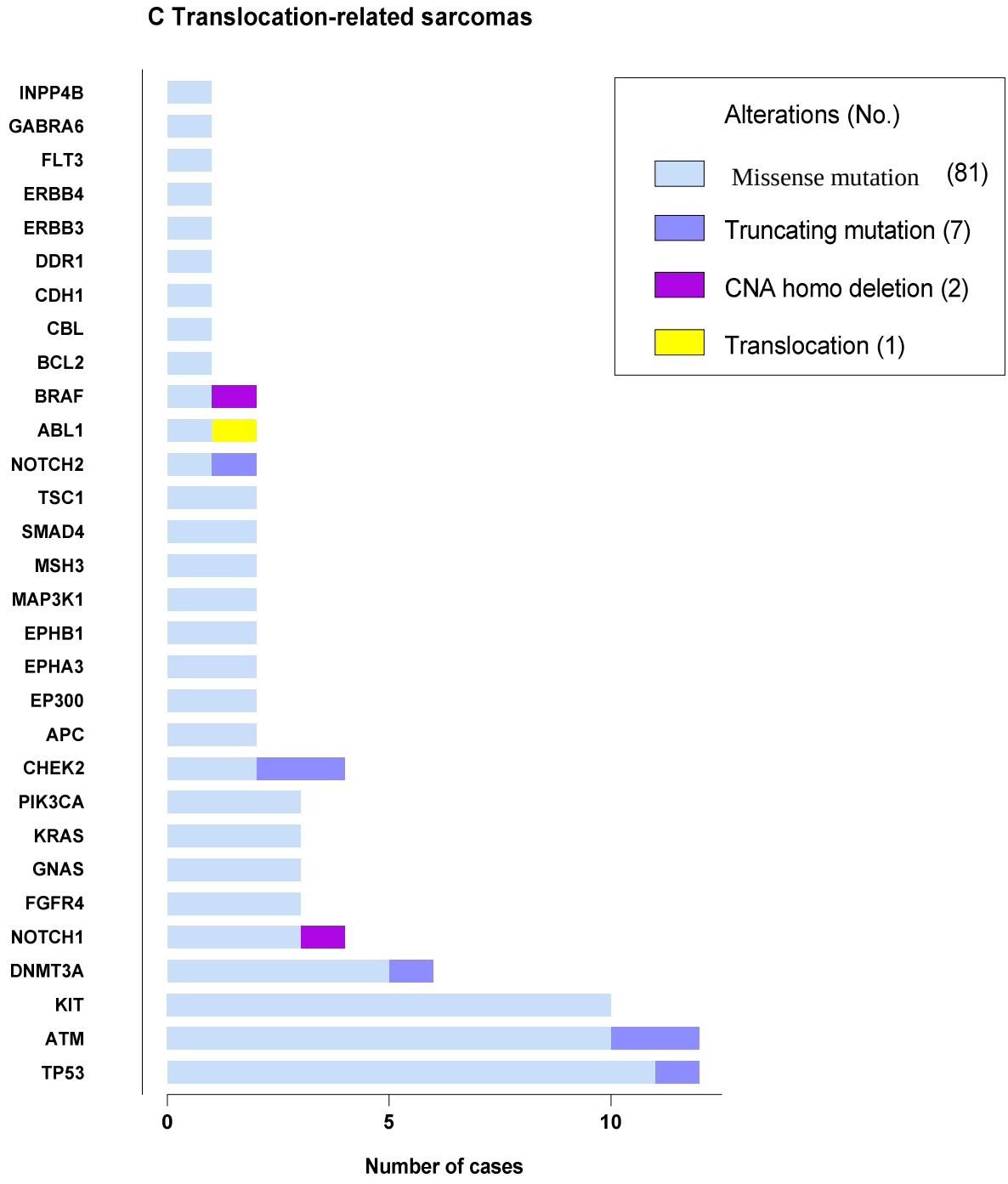
*: bTMB matched therapy; **: death; ***: treatment interruption due to anemia; BOR: best of response; bTMB: blood tumor mutation burden; PD: progressive disease; SD: stable disease; TTP: time to progression

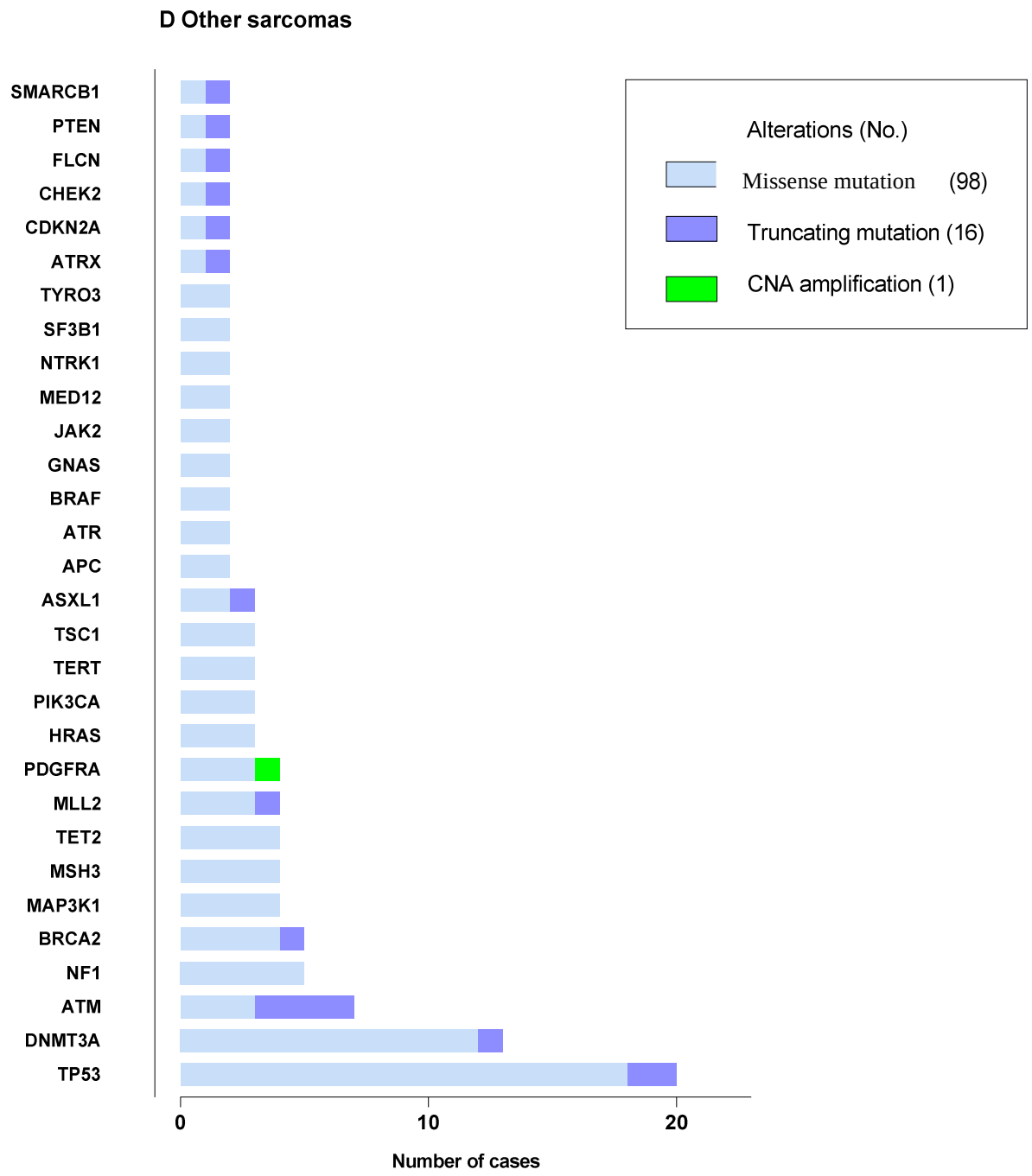
**Supplementary Table 1:** Clinical outcomes of patients with advanced STS treated with therapies matched to ctDNA alterations

| No patient | Targetable alteration | ESCAT Score |
|---|---|---|
| 1 | *IDH1* R132C | IV |
| | *CDKN2A* loss | IV |
| | *CDKN2B* loss | IV |
| 2 | *BRCA1-EFCAB5* truncation | IIIA |
| | *CDKN2A* loss | IV |
| 3 | *RAD51C* R237* | IIIA |
| 4 | *MDM2* amplification | IV |
| | *IDH1* R132C | IV |
| 5 | *CDKN2A* loss | IIIA |
| 6 | *PTEN* loss | IV |
| 7 | *PTEN* loss | IV |
| 8 | *CDK4* amplification | IV |
| 9 | *KIT* amplification | I |
| 10 | *BRCA2* truncation | IIIA |
| | *CDK4* amplification | IV |

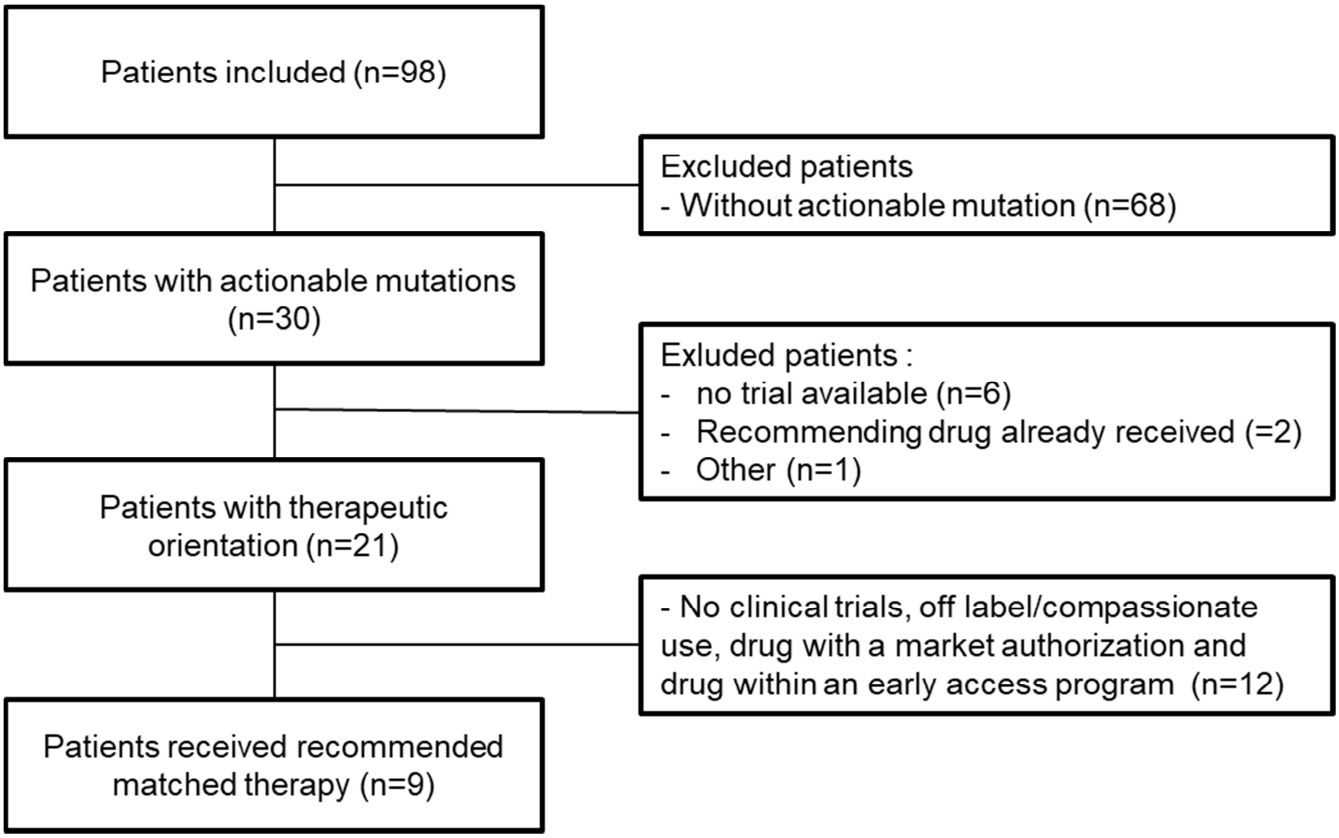
**Supplementary Table 2:** Targetable alterations and ESCAT score of patients with higher number of actionable mutations found in tissue


B Complex genomics sarcomas
FLT3
CD79A
CARD11
BRCA2
POLE
TSC2
ATRX
ASXL1
SPEN
SMO
RET
KDR
ERBB2
EGFR
BRIP1
ABL1
NOTCH3
APC
CBL
NF1
MLL2
PTEN
NOTCH1
RB1
CHEK2
TET2
ATM
TSC1
TP53
DNMT3A
0
10
20
30
Number of cases
Alterations (No.)
Missense mutation (157)
Truncating mutation (15)
CNA homo deletion (1)
Translocation (1)

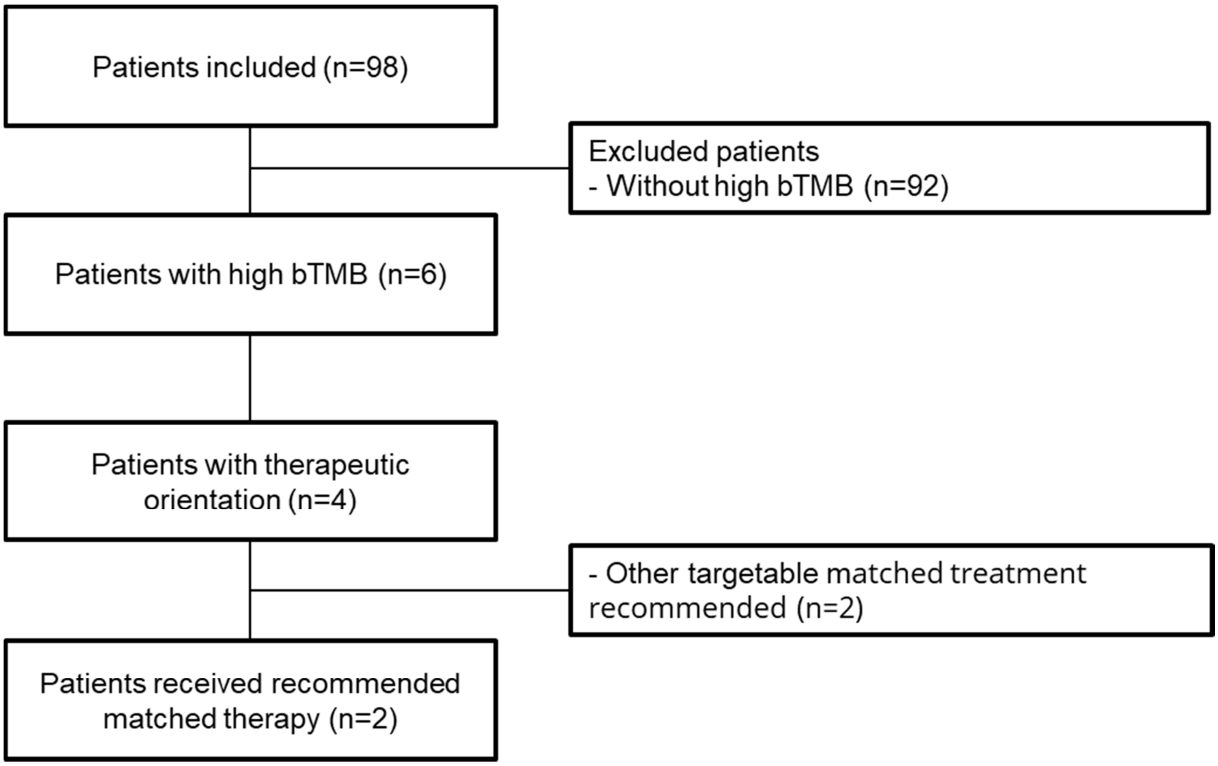

C Translocation-related sarcomas
INPP4B
GABRA6
FLT3
ERBB4
ERBB3
DDR1
CDH1
CBL
BCL2
BRAF
ABL1
NOTCH2
TSC1
SMAD4
MSH3
MAP3K1
EPHB1
EPHA3
EP300
APC
CHEK2
PIK3CA
KRAS
GNAS
FGFR4
NOTCH1
DNMT3A
KIT
ATM
TP53
0
5
10
Number of cases
Alterations (No.)
Missense mutation (81)
Truncating mutation (7)
CNA homo deletion (2)
Translocation (1)



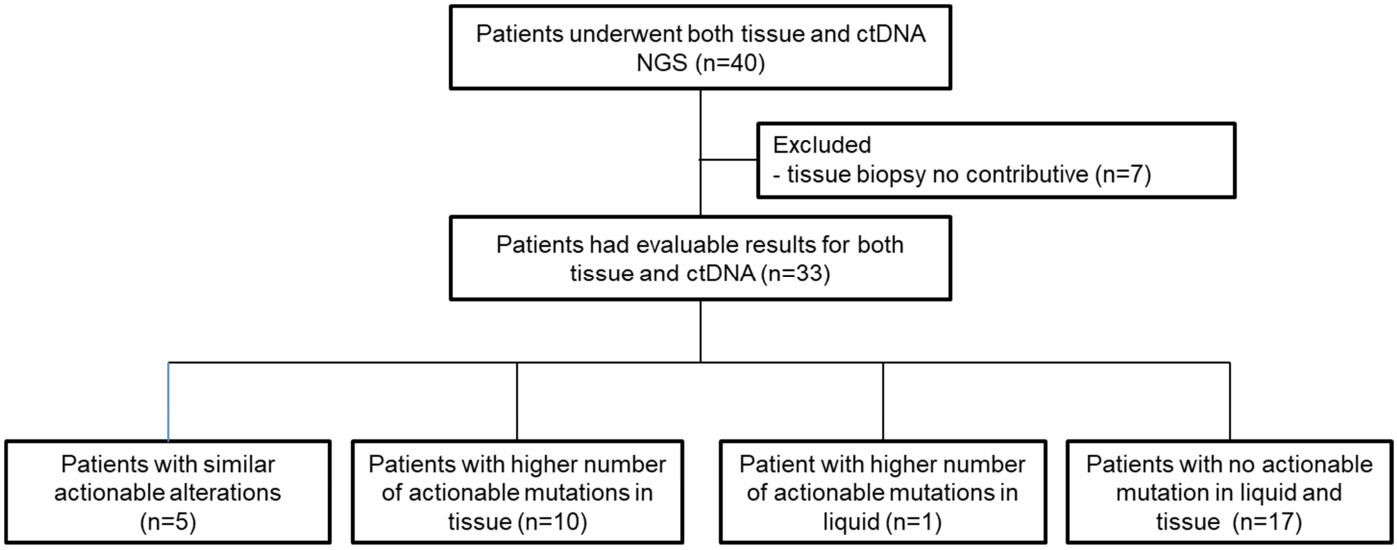

**Supplementary Figure 1:** The most prevalent genomic alterations in 98 ctDNA samples of soft-tissue sarcomas in the entire cohort (A); with complex genomics sarcomas (B); with translocation-related sarcomas (C); and with other sarcomas (D).




**Supplementary Figure 2**. Flowchart design of advanced STS patients with ctDNA




**Supplementary Figure 3.** Study flowchart design of advanced STS patients with high blood TMB (tTMB)




**Supplementary Figure 4**. Comparison of ctDNA and tissue profiling in 40 patients with advanced STS

# Discussion et perspectives

# I. A l'avenir, quelles techniques pour les CTC des sarcomes ?

## A. Techniques pour l'isolement et la numération des CTC

Technique ISET : avantages et limites

L'isolation des CTC des STM reste à l'heure actuelle un challenge. En effet, du fait de la faible incidence et de l'hétérogénéité de ce type de cancer peu d'études portent sur ce sujet. De par la nature mésenchymateuse des cellules tumorales, les techniques par immunoaffinité par enrichissent positif (principalement par l'EPCAM) ne semblent pas appropriées pour ce type de cancer. Seules les techniques basées sur des propriétés biophysiques ou celles basées sur de l'immunoaffinité mais par enrichissement négatif semblent appropriées. Dans cette thèse, nous avons utilisé le système ISET isolant les CTC en fonction de leur taille qui est supérieure à celle des éléments nucléés du sang. C'est également une technique qui a une meilleure sensibilité par rapport au CellSearch® ayant l'aval de la FDA (176).

Nous avons montré que nous arrivions à détecter des CTC grâce à cette technique. Nous les avons identifiées à l'aide de critères cyto-morphologiques selon Hofman *et al.* (177). Nous n'avons pas utilisé de marqueurs négatifs comme le CD45 (permettant de faire la distinction entre CTC, cellules épithéliales, mégacaryocytes et grands monocytes) en accord avec d'autres études (178), (179), (180).
Malgré une lecture en double aveugle avec un biologiste médical et un anatomopathologiste spécialisé dans les STM, nous nous sommes parfois heurtés à des cellules de morphologie difficile à classer. Cette variabilité inter opérateur demeure l'une des limites de cette technique avec la perte potentielle de CTC de taille < 8µm (diamètre des pores du filtre). Dans cette cohorte, nous n'avons pas visualisé de *clusters* de CTC normalement reconnus pour être plus agressifs et semblant être corrélés à un mauvais pronostic (176), (181).

L'un des principaux buts de l'analyse des CTC est d'avancer dans la compréhension du processus métastatique. Cet axe de recherche, prévu initialement dans ce projet de thèse, n'a pas pu être exploré comme prévu en raison de la difficulté à séquencer les CTC isolées par la technique ISET. Après une microdissection de cellules « CTC like » (un nombre défini de cellules d'une lignée de léiomyosarcome bien caractérisée a été dilué dans un sang de témoin) capturées sur le filtre, nous avons tenté de les séquencer sur le panel de gènes Oncomine Comprehensive Assay v3 (161 gènes, 87 « hotspots », 43 « copy number variants », séquençage de l'ensemble des séquences codantes de 48 gènes pour couvrir les mutations et

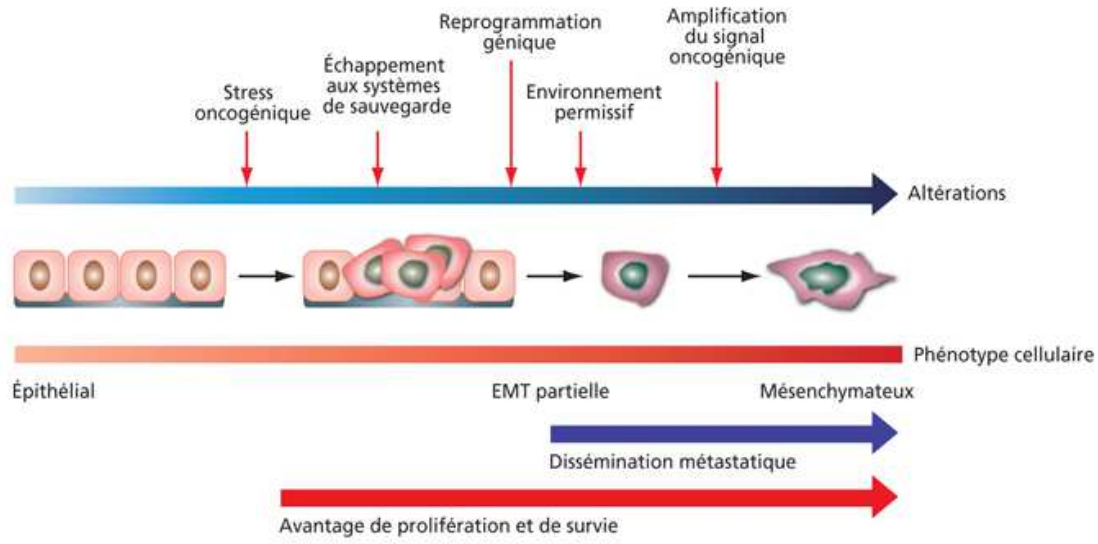



**Figure 15 : Processus de l'invasion tumorale dans les tumeurs épithéliales (182)**

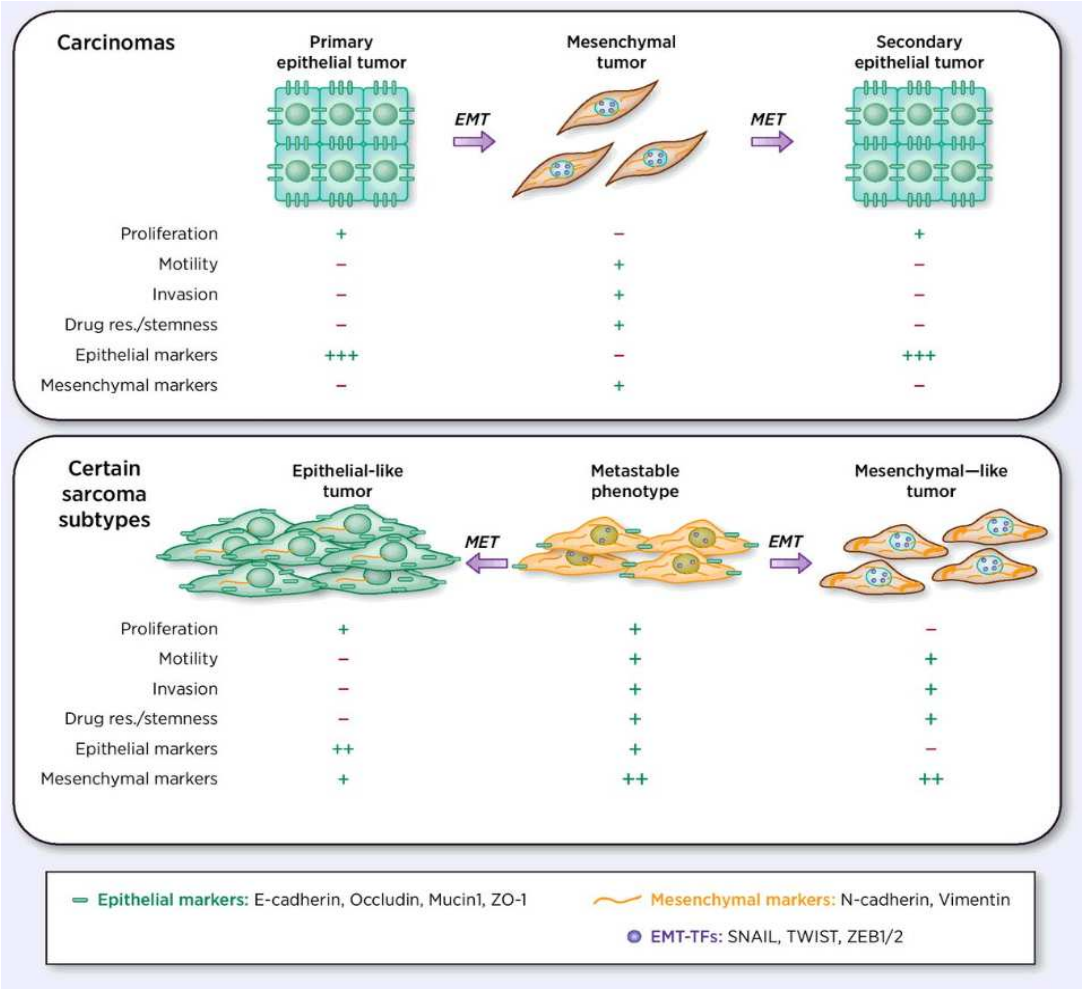



**Figure 16 : EMT/MET dans les carcinomes (en haut) et les processus liés à l'EMT/MET dans certains sous-types de sarcomes (en bas) (183)**

délétions, 51 gènes de fusion) sur un pool de 1, 5 et 10 CTC. Malgré toutes nos précautions et un suivi strict des recommandations fournisseurs, nous ne sommes pas parvenus à obtenir de résultats. Nous avions choisi deux méthodes : une sans et une avec pré-amplification de l'ADN. Nous avions obtenu une librairie satisfaisante avec des fragments de bonne taille mais les résultats du séquençage étaient ininterprétables car il y avait trop de bruit de fond. Ce constat est une autre limite de la technique ISET : il est difficile de séquencer des cellules non vivantes recueillies sur filtre.

## B. De la compréhension des CTC lors de l'invasion tumorale

Les CTC des cancers épithéliaux subissent une transition épithélio mésenchymateuse (EMT) qui permet à des cellules individuelles ou à des groupes de cellules cancéreuses cohésives d'échapper à l'organisation épithéliale rigide, d'acquérir une certaine motilité et de gagner la capacité d'envahir d'autres localisations, ce qui explique pourquoi l'EMT est impliquée dans la progression du cancer, des métastases et de la résistance aux médicaments dans plusieurs carcinomes. Après avoir migré, les cellules ayant subi l'EMT vont pouvoir regagner leur caractère épithélial grâce à une transformation mésenchymo épithéliale (MET).
Il a été démontré que le processus d'invasion du cancer commence très rarement comme un processus unicellulaire, mais qu'il s'agit plutôt d'un événement collectif. Au cours de cette migration cellulaire collective, une sous-population de cellules subit une EMT partielle. L'existence d'états intermédiaires ou d'EMT incomplète a été décrite par l'étude de Klymkowsky *et al.* (184). Ils permettent de modifier la morphologie des cellules vers un phénotype fusiforme et réorganisant le cytosquelette cellulaire et les contacts cellule à cellule, tout en maintenant l'expression de certains marqueurs épithéliaux, par exemple l'E-cadhérine, qui est nécessaire pour assurer la cohésion pendant la migration et permet la résistance au stress mécanique que les cellules subissent pendant la migration (Figure 15).

On pourrait penser que les sarcomes de par leur nature mésenchymateuse ne subissent pas l'EMT et la MET. Sannino *et al.* (183) ont suggéré que dans certains types de sarcomes, les CTC resteraient dans un « état métastable », c'est-à-dire leur permettant d'acquérir des caractéristiques phénotypiques mésenchymateuses ou épithéliales sous certaines conditions (Figure 16).

Ce concept a été identifié dans les cellules souches du trophoblaste (185) et peut être associé à un comportement plus agressif des cellules cancéreuses. Ainsi, une telle hétérogénéité moléculaire intratumorale dans les sarcomes pourrait donc conduire à un comportement plus agressif car la tumeur entière profiterait des caractéristiques biologiques de ces cellules liées à l'EMT et au MET. Ce concept est étayé par le degré variable de différenciation épithéliale/mésenchymateuse observé

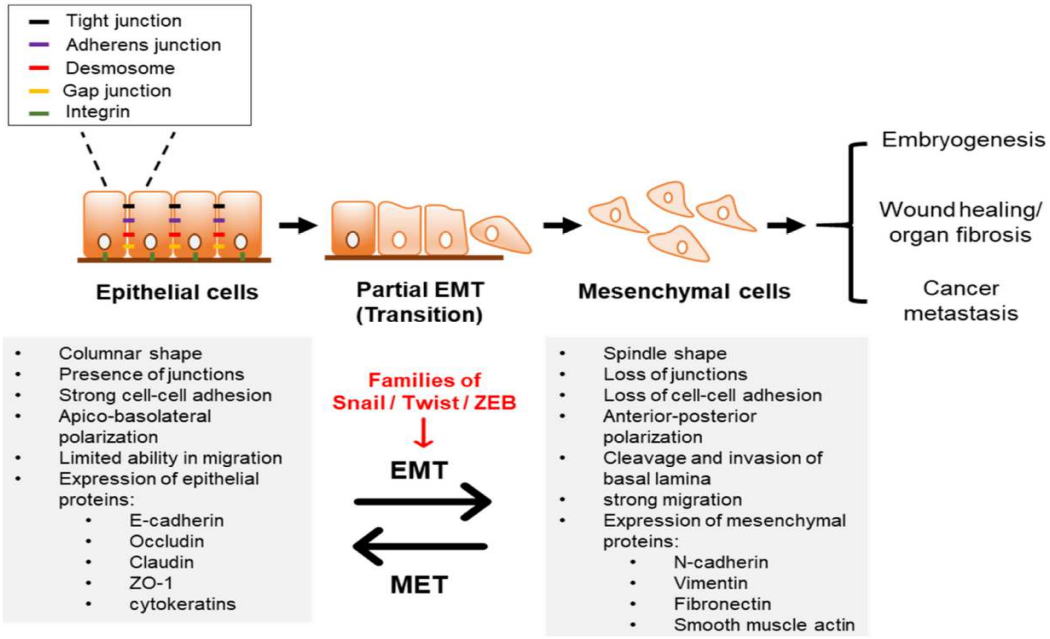



**Figure 17 : Caractéristiques de l'EMT (186)**

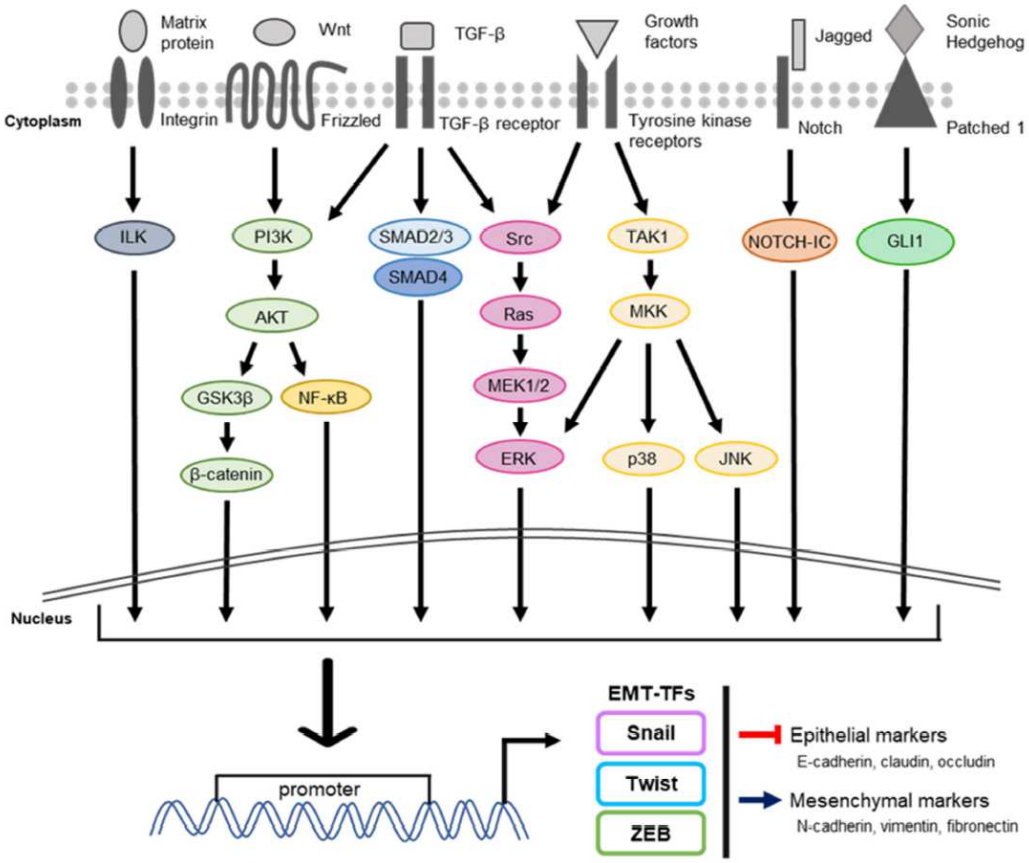



**Figure 18 : Voies de signalisation communes régulant l'EMT (186)**

dans divers histotypes de sarcomes, qui peuvent être soit plus épithéliaux (sarcomes d'Ewing, sarcomes synoviaux et sarcomes épithélioïdes), soit plus mésenchymateux (ostéosarcomes, chondrosarcomes), ainsi que par l'existence de sous-types de sarcomes présentant les deux phénotypes extrêmes dans une même tumeur. Par exemple, les synovialosarcomas biphasiques, qui sont composés de cellules fusiformes et épithélioïdes, expriment le marqueur épithélial E-cadhérine dans leurs cellules épithélioïdes, alors que les synovialosarcomes fibreux monophasiques n'ont pas de composante épithélioïde et expriment fortement les facteurs de transcription de l'EMT : SNAIL, SLUG et TWIST1, ainsi que l'inducteur de l'EMT : TGFβ (187), (188). Ces changements phénotypiques sont entièrement réversibles, comme l'ont démontré les expériences de knockdown de TWIST1, qui ont réduit la migration et l'invasion des lignées cellulaires de sarcome synovial. Un autre exemple est fourni par le sarcome épithélioïde, qui présente de manière caractéristique des marqueurs à la fois mésenchymateux et épithéliaux. En effet, pratiquement tous ces cancers sont positifs pour la cytokératine et l'antigène de membrane épithéliale, mais la plupart des cas coexpriment le marqueur mésenchymateux qu'est la vimentine (189). Dans les carcinomes, l'EMT et la MET sont dirigés par une variété de facteur de transcription d'EMT, tels que SNAIL, SLUG, TWIST1, et ZEB1/2, qui induisent des changements significatifs dans l'interaction cellule à cellule, l'adhésion cellule-matrice et le cytosquelette (Figure 17). Sannino *et al.* (183) suggèrent que l'activation des voies TGFβ, WNT, AKT/PI3K/mTOR et MEK/ERK (190), (191) peut conduire à un phénotype plus agressif de type mésenchymateux et qu'à l'inverse, l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs, tels que PTEN (192) ou GSK3β (193) peut favoriser la différenciation épithéliale (Figure 18).

Ainsi, les marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine, la β-caténine les cytokératines et les marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, la N-cadhérine et la fibronectine, qui sont des effecteurs en aval de ces voies, peuvent être utilisés pour déterminer le degré auquel une cellule donnée a subi les processus EMT, MET ou EMT/MET. Ces observations sont retrouvées dans l'étude réalisée par Balasubramanian *et al.* (194) utilisant le dispositif ApoStream™ qui a montré la faisabilité d'isoler des CTC de STM et a mis en évidence l'hétérogénéité des profils phénotypiques des CTC isolées : $CD45^{-}/(CK/\beta\text{-cat})^{+/-}/VIM^{+/-}$.

Pour conclure, du fait de cette plasticité et de l'hétérogénéité de l'expression des marqueurs de l'EMT/MET au sein même des CTC des STM, l'utilisation de marqueurs épithéliaux et/ou mésenchymateux pour la capture et l'isolement des CTC dans les STM ne parait pas être la technique la plus appropriée.

## C. Vers de nouvelles techniques d'isolement

Chibon *et al.* (195) ont mis au point une signature transcriptionnelle de 67 gènes liés à la mitose et à l'intégrité chromosomique (CINSARC) et ont montré son impact pronostique en termes de prédiction du risque de rechute métastatique. Une anomalie chromosomique fréquente présente dans les cancers est l'aneuploïdie (196). L'aneuploïdie est définie comme un contenu chromosomique anormal et est associée à des profils d'expression génique modifiés, à un potentiel métastatique accru, à une résistance aux traitements et à un mauvais pronostic global (197), (198). A la lumière de ces données, il pourrait être intéressant d'isoler les CTC des STM en se basant sur des techniques simples permettant d'évaluer l'intégrité chromosomique comme par exemple l'hybridation in situ en fluorescence (FISH).
L'étude de Zhang *et al.* (98) menée sur une cohorte de 23 patients atteints d'ostéosarcome a mis en évidence la présence de CTC grâce à leur aneuploïdie détectée en FISH (utilisation de sondes marquées pour le centromère du chromosome 8). Les CTC étaient définies comme des cellules aneuploïdes (nombre de centromères du chromosome 8 différent de 2), CK18- et CD45-. Ils ont pu montrer grâce à cette technique que les patients en situation métastatique ou de rechute avaient un taux plus élevé de CTC que des patients au stade localisé et que les patients ayant un taux de CTC ≥ 2 CTC/7,5 mL de sang avaient une PFS significativement plus courte que les patients ayant un taux de CTC < 2 CTC/7,5 mL de sang. Une étude pilote de 2020 menée sur 4 patients atteints de STM métastatique par Napolitano *el al*. (199) a montré la présence de CTC aneuploïdes avec une médiane de 4 CTC/7 mL de sang alors qu'aucune n'était retrouvée dans le groupe témoin. Une analyse *in silico* a été réalisée à partir des données de la cohorte « The Cancer Genome Atlas » de patients atteint de STM, et a confirmé le rôle pronostique de l'aneuploïdie dans les sarcomes, avec une PFS et une OS significativement plus faibles dans le groupe présentant une aneuploïdie élevée, indépendamment de l'histologie de la tumeur. L'évaluation longitudinale du nombre et de la ploïdie des CTC pourrait donc représenter un nouvel outil pour évaluer le pronostic et la réponse au traitement des patients atteints de STM.

## D. Pour une médecine personnalisée

Au cours des dernières années, des équipes de recherche ont établi des cultures de CTC, des lignées de CTC (200), (201), (202) et des xénogreffes de CTC (203), (204), (205) comme modèles pour les tests fonctionnels (206), (207), (208). Ce volet qui devait être abordé dans cette thèse n'a malheureusement pas abouti. Nous avons tenté d'isoler des cellules vivantes de lignée de STM « CTC like » non adhérées sur le filtre selon le protocole fourni par le fournisseur. Malgré plusieurs essais, nous n'avons jamais réussi à établir des cultures de ces cellules. Ces modèles *in vitro* et *in vivo* peuvent être utilisés pour tester la sensibilité aux médicaments.

Girotti *et al.* ont réussi (209) à cultiver des xénogreffes dérivées de cellules tumorales circulantes (CDX) chez des patients atteints de mélanome. Ils ont montré qu'elles avaient un tropisme métastatique similaire chez la souris et chez le patient, et que les cellules avaient traversé la barrière hémato-encéphalique chez les deux hôtes. Ils ont également montré que les CDX avaient le même profil génomique que les tumeurs primaires. Les auteurs ont montré que l'utilisation de ces CDX pouvait être très utile pour guider la thérapeutique chez les patients atteints de mélanomes.
Pour contribuer à la médecine personnalisée, l'efficacité de l'établissement de cultures et de xénogreffes de CTC doit être améliorée. Jusqu'à présent, des centaines de CTC sont nécessaires pour établir une lignée cellulaire ou une xénogreffe, ce qui limite cette approche à quelques patients atteints d'une maladie avancée.

# II. ADNtc : quelle place dans la prise en charge thérapeutique des sarcomes ?

## A. ADNtc et thérapie ciblée

Dans notre deuxième article, nous avons étudié l'ADNtc et l'impact de son séquençage sur la médecine personnalisée.

Dans notre étude, le taux d'altération actionnable était de 31% (30/98). Sur les 21 patients orientés en RCP, 9 ont pu recevoir une thérapie ciblée. L'étude de Okuma *et al.* (210) portant sur des cancers rares et incluant 39 STM retrouve quant à elle 31% de mutations actionnables (12/39) chez des patients atteints de STM par la technique Guardant360® (Guardant Health, Inc, Redwood City, CA). Seulement 5 des 36 patients ayant un niveau d'évidence 1A-3A de l'actionnabilité de la mutation ont pu recevoir une thérapie ciblée, les raisons de non inclusion étant les mêmes que dans notre étude (l'accès aux essais étant certainement le facteur le plus limitant, ce qui n'était pas le cas dans notre étude).

Nous avons montré que pour 33 couples ADNtc/tissu séquencés, seuls 5 présentaient les mêmes mutations actionnables et que chez 10 patients, plus de mutations étaient retrouvées dans le tissu que sur l'ADNtc.

Nous menons à l'heure actuelle une étude comparant le séquençage de la tumeur primitive, de la métastase, de la rechute (si présente) et de l'ADNtc chez des patients atteints de STM avancé en utilisant le panel Oncomine comprehensive V3. Nous

**Tableau 8 : Principales mutations dans la cohorte de 22 patients atteints de STM avancé en cours d'étude**

| Patient | Primitive | Métastase | Rechute | ADNtc |
|---|---|---|---|---|
| **1** | TP53 p.R273H<br>RB1 p.Y749X | ***** | ***** | TP53 p.R273H<br>RB1 p.Y749X |
| **2** | TP53 p.A159V | ***** | ***** | POLE p.R1092G |
| **3** | Absence de mutation | Absence de mutation | Absence de mutation | ESR1 p.A207V<br>CREBBP p.C1294Y |
| **4** | TP53 p.C176W<br>NF1 p.F1884L | ***** | ***** | NF1 p.F1884L |
| **5** | POLE p.E1091G | Absence de mutation | ***** | Absence de mutation |
| **6** | Absence de mutation | NOTCH3 p.N1207D<br>POLE p.Q2217R | ***** | NF1 p.W696<br>NTRK3 p.E318K<br>NOTCH3 p.N1207D<br>POLE p.Q2217R |
| **7** | Absence de mutation | Absence de mutation | ***** | TSC1 p.L974fs |
| **8** | NRAS p.Q61K | NRAS p.Q61K<br>CTNNB1 p.S45F | ***** | FANCA p.R800X<br>SMARCA4 p.S1155C<br>PMS2 p.G72E |
| **9** | TP53 p.R273H<br>CREBBP p.L2339F | TP53 p.R273H | TP53 p.R273H | NOTCH1 p.V413M |
| **10** | Absence de mutation | NF1 p.R711C | ***** | NF1 p.R711C |
| **11** | NF1 p.A1226G<br>NF1 p.L1187V | NF1 p.A1226G<br>NF1 p.L1187V | NF1 p.A1226G<br>NF1 p.L1187V | Absence de mutation |

avons inclus 45 patients. A l'heure actuelle, l'ensemble des biopsies de 22 patients a pu être séquencé. Nous retrouvons un nombre peu élevé de mutations, fusions et amplifications connues comme pathogènes ou étant délétères (Tableau 8).
Une seule fusion de AGK(2) – BRAF(8) a été rétrouvée sur tissu pour un patient.
Aucune altération n'a été retrouvée pour 5 patients quel que soit la nature du prélèvement. Pour un patient, les mêmes mutations ont été retrouvées dans la tumeur primitive et l'ADNtc. Pour 6 patients, au moins une mutation n'a pas été retrouvée dans l'ADNtc alors qu'elle était au moins retrouvée dans la tumeur primitive et/ou la rechute locale et/ou la métastase. Pour 6 patients, au moins une mutation présente dans l'ADNtc n'a pas été retrouvée dans les prélèvements tissulaires. Il semblerait à la vue de ces résultats préliminaires que le profil de l'ADNtc ne reflèterait pas plus la tumeur primitive que la métastase ou la rechute sur ce panel restreint. Il n'a été retrouvé aucune amplification dans l'ADNtc bien que présente dans au moins un tissu (MDM2, CDK4, CCND2, CCND1, FGF19, IGFR1) chez 7 patients, suggérant la moins bonne sensibilité de l'ADNtc pour la détection de variations de copies.
L'étude d'Okuma *et al.* (210) a montré que sur 22 couples ADNtc/tissus (l'histologie des couples étant non précisée), 11 patients (50%) ont présenté une certaine forme de concordance entre les résultats du NGS plasmatique et ceux du NGS tissulaire. Parmi les mutations comparables, 29% (11/38) étaient détectées à la fois dans l'ADNtc et tissulaire. Cependant, 53% de toutes les mutations « comparables » ont été rapportées uniquement par le NGS plasmatique contrairement à ce que nous avons trouvé.
La corrélation entre ADNtc et tissu pour les amplifications géniques était médiocre la majorité d'entre elles (71%) étant observée uniquement dans les prélèvements tissulaires ce que nous retrouvons bien dans notre étude.

Ainsi, l'ADNtc ne semblerait pas en mesure de remplacer l'analyse sur tissu dans la détection de mutations cliniquement pertinentes dans les STM.
Jung et Kirchner (211) ainsi que Esagian *et al.* (212) ont fait le même constat sur le cancer du poumon non à petites cellules. La méta-analyse de Bos *et al.* (213) portant elle sur l'ADNtotc a montré que la sensibilité du WES de l'ADNtotc était de 50% en utilisant le tissu tumoral comme référence. La concordance globale entre l'ADNtotc et le tissu tumoral apparié était de 31% tout type de tumeur confondu.

## B. Application de l'ADNtc pour le suivi/monitoring et pour le traitement/récidive après chirurgie

De nombreuses études portant sur les cancers épithéliaux ont montré que l'ADNtc pouvait être utilisé pour le monitoring du traitement, le suivi et la récidive post chirurgie (214).

L’étude de Johansson *et al.* (215) a monitoré l’ADNtc pré et post chirurgie chez 32 patients atteints de GIST. L'ADNtc a été détecté au moins une fois chez 9 des 32 patients, la fréquence des allèles mutants variant de 0,04% à 93%. Les patients à haut risque étaient plus souvent positifs pour l'ADNtc que les autres groupes ($p< 0,05$). Les patients dont l'ADNtc était détectable présentaient également des taux de prolifération des cellules tumorales plus élevés ($p<0,01$) et des tumeurs de plus grande taille ($p<0,01$). Tous les patients dont l'ADNtc était positif pendant l'opération sont devenus négatifs post opération. Enfin, ils ont détecté des mutations de résistance multiples chez 2 patients ayant progressé sous traitement. Leurs données montrent que l’ADNtc peut être utilisé pour le suivi/monitoring après chirurgie.

Hemming *et al.* (126) ont étudié l’ADNtc dans une cohorte de patients atteints de léiomyosarcome. Ils ont identifié de l'ADNtc chez 11 (69%) des 16 patients dont la maladie avait progressé et dont la taille de la tumeur était supérieure à 5 cm. L’ADNtc n’était pas détectable chez 16 patients présentant une maladie stable ou une faible charge tumorale au moment de la prise de sang. Une fraction plus élevée d'ADNtc par rapport à l’ADNtotc était associée à une augmentation de la taille de la tumeur et à la progression de la maladie. Pour un patient, le taux d'ADNtc a diminué après résection de la maladie progressive et, pour un autre patient, le taux d’ADNtc est devenu détectable lors de la rechute.

Dans une étude préalable, Braig *et al.* (132) ont montré qu’en raison de la nature unique de chaque translocation et du peu de mutations « hotspot », la quantification de l'ADNtc était techniquement exigeante et ne convenait pas aux diagnostics de routine pour les STM. Partant de ce constat, Eisenhardt *et al.* (216) ont créé un panel spécial pour les liposarcomes myxoïdes (36 541 paires de bases couvrant les introns de DDIT3, FUS et EWS où se produisent les translocations t(12;16) et t(12;22), la région du promoteur TERT et de mutations « hotspot » dans les exons de 7 gènes). Ils ont pu montrer que les niveaux d'ADNtc diminuaient après la résection de la tumeur et augmentaient lorsque la maladie métastatique était détectée. Ils ont observé un déclin de l'ADNtc à l’initiation de la radiothérapie/chimiothérapie. Cependant, en parallèle de l'augmentation de la charge tumorale, les concentrations ont augmenté à nouveau après plusieurs mois.
L'impact de l'hétérogénéité intratumorale sur la quantification de l'ADNtc a aussi été évalué chez un patient qui présentait initialement une maladie multifocale des jambes après des résections antérieures. Au cours de son traitement, il a eu quatre récidives locales avant qu'une petite métastase pulmonaire (0,3 $cm^3$) ne soit identifiée et réséquée. Le séquençage de l'exome a été réalisé à partir de la tumeur initiale de la jambe et de la métastase pulmonaire. Les panels ont ciblé 22 et 17 régions génomiques respectivement, et 6 mutations étaient identiques dans les deux panels. L'ADNtc dans 15 échantillons de plasma a été quantifié avec les deux panels. Pendant la maladie localisée, l'ADNtc fluctue en fonction de la quantité de la masse tumorale viable. Le panel de la lésion primaire a donné de meilleurs résultats

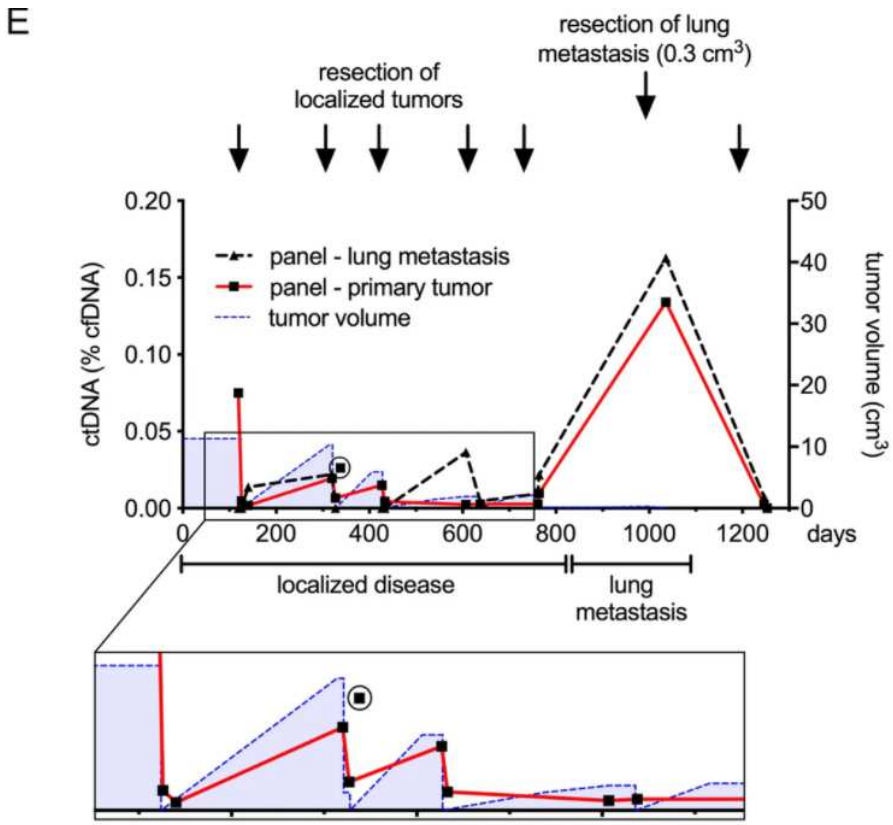


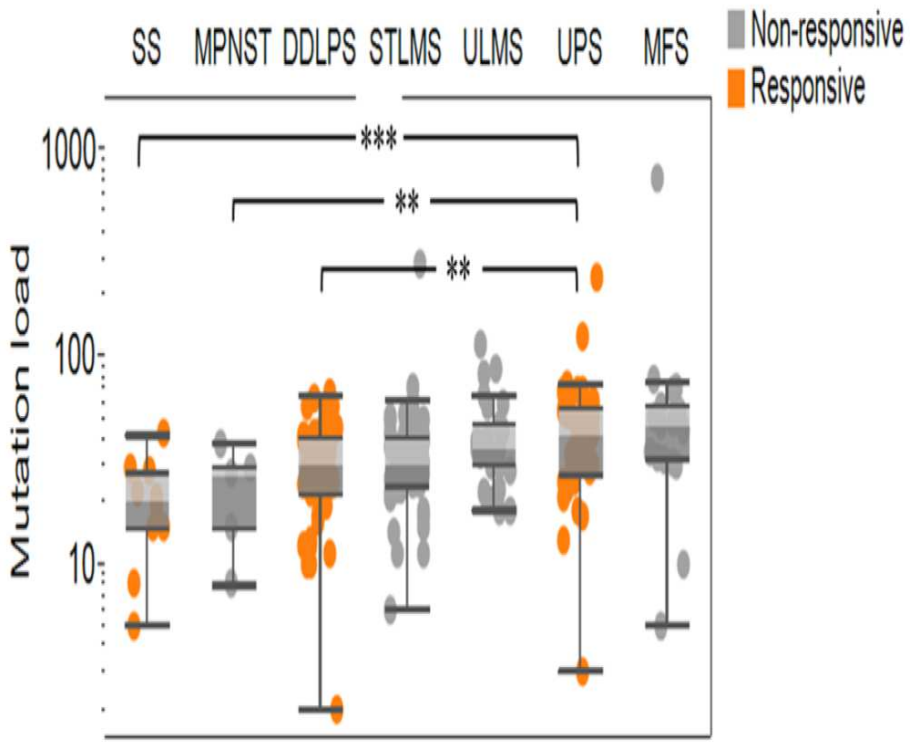

**Figure 19 : Quantification de l'ADNtc avec 2 panels créés à partir de la primitive et de la métastase dans 15 échantillons de plasma obtenu au cours du traitement d'un patient atteint d'un liposarcome myxoïde (216)**

lorsque la maladie était encore localisée. Cependant, la petite métastase pulmonaire a entraîné une augmentation marquée des concentrations d'ADNtc, qui ont à nouveau diminué après la résection. Les deux panels ont eu des performances similaires pendant la phase métastatique de la maladie (Figure 19). Les concentrations d'ADNtc comparativement élevées des métastases pulmonaires dans les liposarcomes myxoïdes pourraient permettre de détecter une récidive plus tôt par biopsie liquide qu'avec les approches basées sur l'imagerie.

Cette étude a donc montré que la quantification de l'ADNtc sur la base du profilage génomique du cancer pourrait aider à prédire la récidive tumorale et à surveiller l'hétérogénéité tumorale et la réponse au traitement dans les maladies métastatiques. Ce qui est très intéressant est que ce test peut facilement être adapté à d'autres tumeurs à translocation, par exemple les sarcomes synoviaux. Cependant, cette technique ne permettrait d'étudier qu'une sous population de STM.

# III. La charge mutationnelle : un nouveau marqueur pour la prise en charge thérapeutique des sarcomes ?

Le panel FOUNDATION ONE utilisé dans notre étude permet d'évaluer la charge mutationnelle. Nous avons observé que 6 patients avaient un TMB élevé (> 16%) et que 2 patients avaient pu être orientés sur cette charge mutationnelle. La charge mutationnelle est calculable dans tous types de cancer épithéliaux comme mésenchymateux et mérite donc d'être étudiée.
La charge mutationnelle d'une tumeur peut permettre de prédire l'efficacité d'un traitement par des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Par exemple, Snyder *et al.* (217) ont montré que le traitement par ipilimumab, un anticorps anti-CTLA-4, était significativement plus efficace chez les patients atteints de mélanomes porteurs de plus de 100 mutations par génome codant, par rapport aux patients dont la tumeur contenait <100 mutations. Dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules, les patients traités par un anticorps anti-PD-1 et ayant une charge élevée de mutations non synonymes avaient une meilleure réponse clinique que ceux ayant une faible charge sous le même traitement. Ces résultats confirment qu'une charge mutationnelle plus élevée se traduit probablement par une probabilité accrue que les néoantigènes soient reconnus par le système immunitaire En accord avec ces résultats, l'association entre la réponse au traitement par ipilimumab, la charge




Les sous-types analysés comprennent le synovialosarcome (SS), la tumeur maligne de la gaine du nerf périphérique (MPNST), le liposarcome dédifférencié (DDLPS), le léiomyosarcome des tissus mous (STLMS), le léiomyosarcome utérin (ULMS), le sarcome pléomorphe indifférencié (UPS) et le myxofibrosarcome (MFS). Les sous-types sont classés par charge mutationnelle médiane. La couleur orange indique les sous-types qui ont répondu à l'immunothérapie dans SARC028. ** indique p<0,01, *** indique p<0,001.

**Figure 20 : Charge mutationnelle dans les sous-types de sarcomes des tissus mous (222)**

mutationnelle globale et la charge néoantigène a été démontrée chez des patients atteints de mélanome (217). Les STM ont une charge mutationnelle plus faible que les autres types de cancers (218). Le séquençage de l'exome de léiomyosarcomes utérins a révélé une moyenne de 373 mutations somatiques par échantillon, alors qu'il a été démontré que la charge mutationnelle dans le chondrosarcome variait de 1 à 115 mutations somatiques (219), (220). Dans 12 spécimens de liposarcomes de différents sous-types, un total de 377 mutations somatiques potentielles a été détecté, dont 91% ont été validées par séquençage Sanger (221). Les sarcomes épithélioïdes ont un taux de mutations ponctuelles somatiques codantes similaire à celui du carcinome ovarien, ce qui indique un taux de mutation pertinent dans ce type de sarcome. Ces données pourrait être bénéfiques pour le traitement avec des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (223)**,** (224). Dans une autre étude, le séquençage de l'exome de cas de rhabdomyosarcome a révélé un nombre moyen de mutations de 24 mutations par échantillon dans une tumeur primaire, tandis que les tumeurs métastatiques présentaient 43,3 mutations par échantillon et les tumeurs récidivantes 42 mutations par échantillon, mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives (225).
Bien que certaines études de séquençage de nouvelle génération aient rapporté la charge mutationnelle de certains sarcomes, il est encore très difficile de comparer directement la charge mutationnelle de différents types de sarcomes sur la base de ces études (les taux de mutations n'étant pas effectués sur les mêmes pipelines d'analyse).

L'étude de Roszik *et al.* (222) retrouve une charge mutationnelle globalement faible chez les STM. Celle-ci semble peu prédictive de la réponse à l'immunothérapie (226) et suggère que d'autres facteurs, notamment concernant le microenvironnement tumoral, ont un rôle plus important dans la sensibilité à ce type de traitement (227) (étude CONDOR menée par le professeur Antoine Italiano) (Figure 20).

Ces études portent sur la charge mutationnelle retrouvée dans les tissus. Le TMB sanguin semble correspondre au TMB tissulaire, et il a déjà été validé en pratique clinique pour certains types de cancer comme le cancer de la prostate (228) ou le cancer du poumon non à petites cellules (229). Ce postulat reste controversé (230). Des études complémentaires sont à envisager pour connaitre ce qu'il en est dans les STM.

En conclusion ce travail nous a permis d'évaluer et d'étudier l'impact des biopsies liquides que sont les CTC et l'ADNtc dans la prise en charge des sarcomes des tissus mous.
Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe de tumeurs rares, hétérogènes, d'origine mésenchymateuse. Nous avons pu montrer qu'il était possible de détecter des CTC et de l'ADNtc sur des cohortes importantes de patients atteints de STM avancé. Pour les CTC, il apparait qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de technique optimale pour leur enrichissement et leur isolement ce qui demeure un frein à la corrélation de leur taux avec le suivi de la maladie, contrairement à ce qui a été possible de faire dans les cancers épithéliaux. Ce travail nous a aussi permis de mieux appréhender le processus métastatique des STM et nous a permis de comprendre pourquoi les techniques basées sur les marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux ne sont pas adaptées à ce type de cancer. Quant au séquençage des CTC et à leur culture à visée théranostique, nous en sommes encore aux balbutiements et, malgré les nombreux défis techniques, des études complémentaires sont à mener.

Pour l'ADNtc, nous avons montré qu'il était détectable mais surtout qu'il avait un rôle à visée thérapeutique : il peut informer sur la présence de mutations actionnables à des thérapies ciblées. Ces mutations étaient retrouvées pour la plupart dans la biopsie tissulaire, mais certaines n'étaient pas détectées ce qui pourrait limiter le champ thérapeutique. L'ADNtc reflète donc cette hétérogénéité tumorale.

Ce travail a aussi mis en évidence qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur commun aux STM. La prise en charge optimale serait donc personnalisée : basée sur l'histotype de la tumeur permettant de créer des panels spécifiques mais aussi sur l'analyse des biopsies tissulaires.

Il apparait que les biopsies liquides seraient un outil complémentaire à l'étude de la biopsie tissulaire et que leur combinaison permettrait une prise en charge plus optimale du patient tant sur le suivi que sur la prise en charge thérapeutique.

De nombreuses études restent à mener pour tenter d'optimiser la prise en charge des patients atteints de STM. Par ce travail, nous espérons avoir pu apporter une meilleure compréhension du processus métastatique et du rôle de la biopsie liquide dans les STM.

# Références bibliographiques

1. Soft Tissue and Bone Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 3. IARC Press. Vol. 3. Lyon; 2020.

2. Bourcier K, Dinart D, Le Cesne A, Honoré C, Meeus P, Blay J-Y, et al. Outcome of Patients with Soft-Tissue Sarcomas: An Age-Specific Conditional Survival Analysis. The Oncologist. juill 2019;24(7):e559‑64.

3. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. Cancer Res. 15 sept 1988;48(18):5358‑62.

4. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and Other Neoplasms. Science. 30 nov 1990;250(4985):1233‑8.

5. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, et al. Prevalence and Diversity of Constitutional Mutations in the p53 Gene among 21 Li-Fraumeni Families. Cancer Res. 1 mars 1994;54(5):1298.

6. Moll AC, Imhof SM, Bouter LM, Tan KEWP. Second primary tumors in patients with retinoblastoma a review of the literature. Ophthalmic Genet. janv 1997;18(1):27‑34.

7. Sørensen SA, Mulvihill JJ, Nielsen A. Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. N Engl J Med. 17 avr 1986;314(16):1010‑5.

8. Zöller ME, Rembeck B, Odén A, Samuelsson M, Angervall L. Malignant and benign tumors in patients with neurofibromatosis type 1 in a defined Swedish population. Cancer. 1 juin 1997;79(11):2125‑31.

9. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. Nat Rev Cancer. sept 2003;3(9):685‑94.

10. Bjerkehagen B, Småstuen MC, Hall KS, Skjeldal S, Bruland ØS, Smeland S, et al. Incidence and mortality of second sarcomas - a population-based study. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. oct 2013;49(15):3292‑302.

11. Kirova YM, Vilcoq JR, Asselain B, Sastre-Garau X, Fourquet A. Radiation-induced sarcomas after radiotherapy for breast carcinoma: a large-scale single-institution review. Cancer. 15 août 2005;104(4):856‑63.

12. Zahm SH, Fraumeni JF. The epidemiology of soft tissue sarcoma. Semin Oncol. oct 1997;24(5):504‑14.

13. Tuomisto, Kiviranta, Tukiainen. Soft-tissue sarcoma and dioxin: A case-control study. Int J Cancer. 2004;108(6):893‑900.

14. McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, et al. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. N Engl J Med. 5 janv 1995;332(1):12‑8.

15. Lacourt A, Amadéo B, Gramond C, Marrer E, Plouvier S, Baldi I, et al. ETIOSARC study : environmental aetiology of sarcomas from a French prospective multicentric population-based case-control study-study protocol. BMJ Open. 18 juin 2019;9(6):e030013.

16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. janv 2019;69(1):7‑34.

17. Amadéo, Désandes, Delafosse. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 - Sarcome des tissus mous. 2021.

18. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirlaque MD, et al. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. févr 2013;49(3):684‑95.

19. Mathoulin-Pélissier S, Chevreau C, Bellera C, Bauvin E, Savès M, Grosclaude P, et al. Adherence to consensus-based diagnosis and treatment guidelines in adult soft-tissue sarcoma patients: a French prospective population-based study. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. janv 2014;25(1):225‑31.

20. Biau DJ, Ferguson PC, Chung P, Griffin AM, Catton CN, O'Sullivan B, et al. Local recurrence of localized soft tissue sarcoma: a new look at old predictors. Cancer. 1 déc 2012;118(23):5867‑77.

21. Toulmonde M, Le Cesne A, Mendiboure J, Blay J-Y, Piperno-Neumann S, Chevreau C, et al. Long-term recurrence of soft tissue sarcomas: prognostic factors and implications for prolonged follow-up. Cancer. 1 oct 2014;120(19):3003‑6.

22. Cutts S, Andrea F, Piana R, Haywood R. The management of soft tissue sarcomas. Surg J R Coll Surg Edinb Irel. févr 2012;10(1):25‑32.

23. Savina M, Le Cesne A, Blay JY, Ray-Coquard I, Mir O, Toulmonde M, et al. Modalités de traitement et survie des patients atteints de sarcome des tissus mous métastatiques : l'étude METASARC. Rev DÉpidémiologie Santé Publique. mai 2017;65:S50‑1.

24. Gamboa AC, Gronchi A, Cardona K. Soft-tissue sarcoma in adults: An update on the current state of histiotype-specific management in an era of personalized medicine. CA Cancer J Clin. mai 2020;70(3):200‑29.

25. Polterauer S, Grimm C, Tempfer C, Sliutz G, Speiser P, Reinthaller A, et al. C-reactive protein is a prognostic parameter in patients with cervical cancer. Gynecol Oncol. oct 2007;107(1):114‑7.

26. Zhou L, Cai X, Liu Q, Jian Z-Y, Li H, Wang K-J. Prognostic Role of C-Reactive Protein In Urological Cancers: A Meta-Analysis. Sci Rep. oct 2015;5(1):12733.

27. Nishijima TF, Muss HB, Shachar SS, Tamura K, Takamatsu Y. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. Cancer Treat Rev. déc 2015;41(10):971‑8.

28. McMillan DC. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: A decade of experience in patients with cancer. Cancer Treat Rev. août 2013;39(5):534‑40.

29. Wang X, Ni X, Tang G. Prognostic Role of Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Patients With Bladder Cancer: A Meta-Analysis. Front Oncol. 14 août 2019;9:757.

30. Li L-Q, Bai Z-H, Zhang L-H, Zhang Y, Lu X-C, Zhang Y, et al. Meta-Analysis of Hematological Biomarkers as Reliable Indicators of Soft Tissue Sarcoma Prognosis. Front Oncol. 30 janv 2020;10:30.

31. Brewster R, Purington N, Henry S, Wood D, Ganjoo K, Bui N. Evaluation of Absolute Lymphocyte Count at Diagnosis and Mortality Among Patients With Localized Bone or Soft Tissue Sarcoma. JAMA Netw Open. 5 mars 2021;4(3):e210845.

32. Stefano S, Giovanni S. The PTEN Tumor Suppressor Gene in Soft Tissue Sarcoma. Cancers. 14 août 2019;11(8):E1169.

33. Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. Nat Rev Cancer. 14 juill 2011;11(8):541‑57.

34. Gibault L, Pérot G, Chibon F, Bonnin S, Lagarde P, Terrier P, et al. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. J Pathol. janv 2011;223(1):64‑71.

35. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: elizabeth.demicco@sinaihealthsystem.ca, Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. Cell. 2 nov 2017;171(4):950-965.e28.

36. Gronchi A, Miah AB, Dei Tos AP, Abecassis N, Bajpai J, Bauer S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN-GENTURIS Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up☆. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. nov 2021;32(11):1348‑65.

37. Lucchesi C, Khalifa E, Laizet Y, Soubeyran I, Mathoulin-Pelissier S, Chomienne C, et al. Targetable Alterations in Adult Patients With Soft-Tissue Sarcomas: Insights for Personalized Therapy. JAMA Oncol. 1 oct 2018;4(10):1398.

38. Gounder MM, Ali SM, Robinson V, Bailey M, Ferraro R, Patel NM, et al. Impact of next-generation sequencing (NGS) on diagnostic and therapeutic options in soft-tissue and bone sarcoma. J Clin Oncol. 20 mai 2017;35(15_suppl):11001‑11001.

39. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol. févr 2018;15(2):81‑94.

40. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Cagle PT, Capelozzi VL, et al. Liquid Biopsy in Lung Cancer: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. Arch Pathol Lab Med. août 2016;140(8):825‑9.

41. Ilié M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? Transl Lung Cancer Res. août 2016;5(4):420‑3.

42. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? Nat Rev Cancer. mai 2012;12(5):323‑34.

43. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. Cancer Cell. 12 janv 2015;27(1):15‑26.

44. Cleaver JE, Crowley E. UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. Front Biosci J Virtual Libr. 1 avr 2002;7:d1024-1043.

45. Roberts SA, Gordenin DA. Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. Nat Rev Cancer. déc 2014;14(12):786‑800.

46. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. 23 oct 2008;455(7216):1061‑8.

47. Murugaesu N, Wilson GA, Birkbak NJ, Watkins T, McGranahan N, Kumar S, et al. Tracking the genomic evolution of esophageal adenocarcinoma through neoadjuvant chemotherapy. Cancer Discov. août 2015;5(8):821‑31.

48. Findlay JM, Castro-Giner F, Makino S, Rayner E, Kartsonaki C, Cross W, et al. Differential clonal evolution in oesophageal cancers in response to neo-adjuvant chemotherapy. Nat Commun. 5 avr 2016;7:11111.

49. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. Cell Stem Cell. 6 mars 2014;14(3):275‑91.

50. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med. nov 2013;19(11):1423‑37.

51. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Della Puppa A, Frasson C, et al. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. Stem Cells Dayt Ohio. mai 2010;28(5):851‑62.

52. Widmer DS, Hoek KS, Cheng PF, Eichhoff OM, Biedermann T, Raaijmakers MIG, et al. Hypoxia Contributes to Melanoma Heterogeneity by Triggering

HIF1α-Dependent Phenotype Switching. J Invest Dermatol. oct 2013;133(10):2436‑43.

53. Black JC, Atabakhsh E, Kim J, Biette KM, Van Rechem C, Ladd B, et al. Hypoxia drives transient site-specific copy gain and drug-resistant gene expression. Genes Dev. 15 mai 2015;29(10):1018‑31.

54. Lawson DA, Kessenbrock K, Davis RT, Pervolarakis N, Werb Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. Nat Cell Biol. déc 2018;20(12):1349‑60.

55. Venesio T, Siravegna G, Bardelli A, Sapino A. Liquid Biopsies for Monitoring Temporal Genomic Heterogeneity in Breast and Colon Cancers. Pathobiology. 2018;85(1‑2):146‑54.

56. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol. sept 2017;14(9):531‑48.

57. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer. avr 2017;17(4):223‑38.

58. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. Clin Chem. janv 2015;61(1):112‑23.

59. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. Cancer Discov. mai 2016;6(5):479‑91.

60. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). Cancer Cell. févr 2017;31(2):172‑9.

61. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy - Current Status and Where We Need to Progress. Comput Struct Biotechnol J. 2018;16:190‑5.

62. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, Baas P, Barlesi F, Bivona TG, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. sept 2018;13(9):1248‑68.

63. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 oct 2016;34(28):3375‑82.

64. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. Nat Commun. 10 juin 2016;7:11815.

65. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature. déc 2007;450(7173):1235‑9.

66. San Lucas FA, Allenson K, Bernard V, Castillo J, Kim DU, Ellis K, et al. Minimally invasive genomic and transcriptomic profiling of visceral cancers by next-generation sequencing of circulating exosomes. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. avr 2016;27(4):635‑41.

67. Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, Riely GJ, Jänne PA, Koch WH, et al. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 mars 2016;22(5):1103‑10.

68. Mathai RA, Vidya RVS, Reddy BS, Thomas L, Udupa K, Kolesar J, et al. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. J Clin Med. 18 mars 2019;8(3):E373.

69. Paoletti C, Cani AK, Larios JM, Hovelson DH, Aung K, Darga EP, et al. Comprehensive Mutation and Copy Number Profiling in Archived Circulating Breast Cancer Tumor Cells Documents Heterogeneous Resistance Mechanisms. Cancer Res. 15 févr 2018;78(4):1110‑22.

70. Tellez-Gabriel M, Heymann M-F, Heymann D. Circulating Tumor Cells as a Tool for Assessing Tumor Heterogeneity. Theranostics. 2019;9(16):4580‑94.

71. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martínez-Ricarte F, Torrejon D, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. Nat Commun. 10 nov 2015;6:8839.

72. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. sept 2014;25(9):1729‑35.

73. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. Sci Transl Med [Internet]. 30 mai 2012 [cité 20 janv 2022];4(136). Disponible sur: https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003726

74. Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. Nat Commun. 4 nov 2015;6:8760.

75. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature. mai 2013;497(7447):108‑12.

76. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. Nature. 28 juin 2012;486(7404):537‑40.

77. Li X, Seebacher NA, Hornicek FJ, Xiao T, Duan Z. Application of liquid biopsy in bone and soft tissue sarcomas: Present and future. Cancer Lett. déc 2018;439:66‑77.

78. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. Nat Rev Genet. févr 2019;20(2):71‑88.

79. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. Cell. 9 févr 2017;168(4):670‑91.

80. Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. Lab Chip. 2014;14(1):57‑62.

81. Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. Am J Cancer Res. 2011;1(6):740‑51.

82. Huang Q, Hu X, He W, Zhao Y, Hao S, Wu Q, et al. Fluid shear stress and tumor metastasis. Am J Cancer Res. 2018;8(5):763‑77.

83. Fabisiewicz A, Grzybowska E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. Med Oncol Northwood Lond Engl. janv 2017;34(1):12.

84. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 déc 2004;10(24):8152‑62.

85. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. Cell. 28 août 2014;158(5):1110‑22.

86. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. Blood. 30 juill 2015;126(5):582‑8.

87. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. Nat Rev Cancer. févr 2011;11(2):123‑34.

88. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. Blood. 1 juill 2007;110(1):133‑41.

89. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. Blood. 1 janv 2005;105(1):178‑85.

90. Labelle M, Hynes RO. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. Cancer Discov. déc 2012;2(12):1091‑9.

91. Kopp H-G, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. Cancer Res. 1 oct 2009;69(19):7775‑83.

92. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of Tumor Cells by Natural Killer Cells in Mice Is Impeded by Platelets. Cancer Res. 15 mars 1999;59(6):1295.

93. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C-S, et al. IL-17-producing γδ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. Nature. 18 juin 2015;522(7556):345‑8.

94. Spiegel A, Brooks MW, Houshyar S, Reinhardt F, Ardolino M, Fessler E, et al. Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells. Cancer Discov. juin 2016;6(6):630‑49.

95. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. Proc Natl Acad Sci. 29 juill 2014;111(30):E3053‑61.

96. Qian B-Z, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature. juill 2011;475(7355):222‑5.

97. Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A, et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. Cancer Cell. 10 juill 2012;22(1):91‑105.

98. Zhang H, Gao P, Xiao X, Heger M, Geng L, Fan B, et al. A liquid biopsy-based method for the detection and quantification of circulating tumor cells in surgical osteosarcoma patients. Int J Oncol. avr 2017;50(4):1075‑86.

99. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med. 19 août 2004;351(8):781‑91.

100. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. Lancet Oncol. avr 2014;15(4):406‑14.

101. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. juill 2009;20(7):1223‑9.

102. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJM, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. mai 2010;21(5):1006‑12.

103. Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, Rivera F, Valladares M, Massuti B, et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. The Oncologist. 2012;17(7):947‑55.

104. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. Nat Rev Cancer. sept 2014;14(9):623‑31.

105. Gabriel MT, Calleja LR, Chalopin A, Ory B, Heymann D. Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. Clin Chem. avr 2016;62(4):571‑81.

106. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. Cancer Lett. août 2007;253(2):180‑204.

107. Ward K, Amaya C, Verma K, Tran D, Diaz D, Torabi A, et al. Epithelial cell adhesion molecule is expressed in a subset of sarcomas and correlates to the degree of cytological atypia in leiomyosarcomas. Mol Clin Oncol. janv 2015;3(1):31‑6.

108. Satelli A, Mitra A, Brownlee Z, Xia X, Bellister S, Overman MJ, et al. Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 févr 2015;21(4):899‑906.

109. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. J Clin Oncol. 20 févr 2014;32(6):579‑86.

110. Nicolazzo C, Gradilone A. Significance of circulating tumor cells in soft tissue sarcoma. Anal Cell Pathol Amst. 2015;2015:697395.

111. Chinen L, Mello C, Abdallah E, Ocea L, Buim M, Mingues N, et al. 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. sept 2014;1609.

112. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol. août 2013;10(8):472‑84.

113. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, et al. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. Cancer Res. 2 févr 2001;61(4):1659.

114. Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, Cheng SH, Wong J, Wong VW-S, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 17 mars 2015;112(11):E1317-1325.

115. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. Kwiatkowski DJ, éditeur. PLOS Genet. 18 juill 2016;12(7):e1006162.

116. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer. juin 2011;11(6):426‑37.

117. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 19 févr 2014;6(224):224ra24.

118. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med. sept 2008;14(9):985‑90.

119. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. Nat Med. mai 2014;20(5):548‑54.

120. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 nov 2005;102(45):16368‑73.

121. Barlebo Ahlborn L, Østrup O. Toward liquid biopsies in cancer treatment: application of circulating tumor DNA. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. mai 2019;127(5):329‑36.

122. Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? Virchows Arch Int J Pathol. déc 2016;469(6):601‑9.

123. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. Nat Rev Clin Oncol. juill 2019;16(7):409‑24.

124. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. Ther Adv Med Oncol. 2018;10:1758835918794630.

125. Przybyl J, Chabon JJ, Spans L, Ganjoo KN, Vennam S, Newman AM, et al. Combination Approach for Detecting Different Types of Alterations in Circulating Tumor DNA in Leiomyosarcoma. Clin Cancer Res. 1 juin 2018;24(11):2688‑99.

126. Hemming ML, Klega KS, Rhoades J, Ha G, Acker KE, Andersen JL, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Patients With Leiomyosarcoma With Progressive Disease. JCO Precis Oncol. 2019;2019.

127. Jung J, Lee JS, Dickson MA, Schwartz GK, Le Cesne A, Varga A, et al. TP53 mutations emerge with HDM2 inhibitor SAR405838 treatment in de-differentiated liposarcoma. Nat Commun. 31 août 2016;7:12609.

128. Ferreira EN, Barros BDF, de Souza JE, Almeida RV, Torrezan GT, Garcia S, et al. A genomic case study of desmoplastic small round cell tumor: comprehensive analysis reveals insights into potential therapeutic targets and development of a monitoring tool for a rare and aggressive disease. Hum Genomics. 18 nov 2016;10(1):36.

129. Mihály D, Nagy N, Papp G, Pápai Z, Sápi Z. Release of circulating tumor cells and cell-free nucleic acids is an infrequent event in synovial sarcoma: liquid biopsy analysis of 15 patients diagnosed with synovial sarcoma. Diagn Pathol. 17 oct 2018;13(1):81.

130. Ogino S, Konishi H, Ichikawa D, Hamada J, Shoda K, Arita T, et al. Detection of fusion gene in cell-free DNA of a gastric synovial sarcoma. World J Gastroenterol. 28 févr 2018;24(8):949‑56.

131. Klega K, Imamovic-Tuco A, Ha G, Clapp AN, Meyer S, Ward A, et al. Detection of Somatic Structural Variants Enables Quantification and Characterization of Circulating Tumor DNA in Children With Solid Tumors. JCO Precis Oncol. 2018;2018.

132. Braig D, Becherer C, Bickert C, Braig M, Claus R, Eisenhardt AE, et al. Genotyping of circulating cell-free DNA enables noninvasive tumor detection in myxoid liposarcomas. Int J Cancer. 15 août 2019;145(4):1148‑61.

133. Contreras-Naranjo JC, Wu H-J, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. Lab Chip. 25 oct 2017;17(21):3558‑77.

134. Masaoutis C, Korkolopoulou P, Theocharis S. Exosomes in sarcomas: Tiny messengers with broad implications in diagnosis, surveillance, prognosis and treatment. Cancer Lett. 1 mai 2019;449:172‑7.

135. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol. août 2002;2(8):569‑79.

136. Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugière S, Tomaskovic-Crook E, et al. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. Gut. déc 2003;52(12):1690‑7.

137. Ventimiglia LN, Alonso MA. Biogenesis and Function of T Cell-Derived Exosomes. Front Cell Dev Biol. 2016;4:84.

138. Hosseini-Beheshti E, Pham S, Adomat H, Li N, Tomlinson Guns ES. Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes. Mol Cell Proteomics MCP. oct 2012;11(10):863‑85.

139. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. mai 2013;12(5):347‑57.

140. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 18 févr 2013;200(4):373‑83.

141. Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers. Proteomics. mars 2014;14(4‑5):412‑25.

142. Johnstone RM. Exosomes biological significance: A concise review. Blood Cells Mol Dis. avr 2006;36(2):315‑21.

143. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. J Proteomics. 10 sept 2010;73(10):1907‑20.

144. Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringnér M, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 avr 2013;110(18):7312‑7.

145. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. Nature. 9 juill 2015;523(7559):177‑82.

146. He M, Zeng Y. Microfluidic Exosome Analysis toward Liquid Biopsy for Cancer. J Lab Autom. août 2016;21(4):599‑608.

147. Li G, Tang W, Yang F. Cancer Liquid Biopsy Using Integrated Microfluidic Exosome Analysis Platforms. Biotechnol J. mai 2020;15(5):e1900225.

148. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagrath S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. Lab Chip. 7 juin 2014;14(11):1891‑900.

149. Shao H, Chung J, Lee K, Balaj L, Min C, Carter BS, et al. Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. Nat Commun. nov 2015;6(1):6999.

150. Lu C, Verbridge SS, éditeurs. Microfluidic Methods for Molecular Biology [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 20 janv 2022]. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-30019-1

151. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. Clin Chem. oct 2002;48(10):1647‑53.

152. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 mars 2011;108(12):5003‑8.

153. Wieczorek AJ, Sitaramam V, Machleidt W, Rhyner K, Perruchoud AP, Block LH. Diagnostic and Prognostic Value of RNA-Proteolipid in Sera of Patients with Malignant Disorders following Therapy: First Clinical Evaluation of a Novel Tumor Marker. Cancer Res. 1 déc 1987;47(23):6407.

154. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. Biochim Biophys Acta. janv 2007;1775(1):181‑232.

155. Hao Y-X, Li Y-M, Ye M, Guo Y-Y, Li Q-W, Peng X-M, et al. KRAS and BRAF mutations in serum exosomes from patients with colorectal cancer in a Chinese population. Oncol Lett. mai 2017;13(5):3608‑16.

156. Manda SV, Kataria Y, Tatireddy BR, Ramakrishnan B, Ratnam BG, Lath R, et al. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. J Neurosurg. avr 2018;128(4):1091‑101.

157. Aguado C, Giménez-Capitán A, Karachaliou N, Pérez-Rosado A, Viteri S, Morales-Espinosa D, et al. Fusion gene and splice variant analyses in liquid biopsies of lung cancer patients. Transl Lung Cancer Res. oct 2016;5(5):525‑31.

158. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaria J, Aliño SF, Dasí F. Cell-free circulating plasma hTERT mRNA is a useful marker for prostate cancer diagnosis and is associated with poor prognosis tumor characteristics. PloS One. 2012;7(8):e43470.

159. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Res. oct 2008;18(10):997‑1006.

160. Xu Y-F, Hannafon BN, Zhao YD, Postier RG, Ding W-Q. Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer. Oncotarget. 29 sept 2017;8(44):77028‑40.

161. Jin X, Chen Y, Chen H, Fei S, Chen D, Cai X, et al. Evaluation of Tumor-Derived Exosomal miRNA as Potential Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 sept 2017;23(17):5311‑9.

162. Liu Q, Yu Z, Yuan S, Xie W, Li C, Hu Z, et al. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. Oncotarget. 21 févr 2017;8(8):13048‑58.

163. Zhong G, Wang K, Li J, Xiao S, Wei W, Liu J. Determination of Serum Exosomal H19 as a Noninvasive Biomarker for Breast Cancer Diagnosis. OncoTargets Ther. 2020;13:2563‑71.

164. Zheng R, Du M, Wang X, Xu W, Liang J, Wang W, et al. Exosome-transmitted long non-coding RNA PTENP1 suppresses bladder cancer progression. Mol Cancer. 3 oct 2018;17(1):143.

165. Qi P, Dong L, Lin W, Zhou X, Du X. Abstract B42: A two-lncRNA signature in serous exosomes serves as a new biomarker for colorectal cancer diagnosis. In: Biomarkers and Extracellular RNAs [Internet]. American Association for Cancer Research; 2016 [cité 20 janv 2022]. p. B42‑B42. Disponible sur: http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.NONRNA15-B42

166. Hu D, Zhan Y, Zhu K, Bai M, Han J, Si Y, et al. Plasma Exosomal Long Non-Coding RNAs Serve as Biomarkers for Early Detection of Colorectal Cancer. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2018;51(6):2704‑15.

167. Sun L, Su Y, Liu X, Xu M, Chen X, Zhu Y, et al. Serum and exosome long non coding RNAs as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. J Cancer. 2018;9(15):2631‑9.

168. Xu H, Chen Y, Dong X, Wang X. Serum Exosomal Long Noncoding RNAs ENSG00000258332.1 and LINC00635 for the Diagnosis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. juin 2018;27(6):710‑6.

169. Zhang C, Yang X, Qi Q, Gao Y, Wei Q, Han S. lncRNA-HEIH in serum and exosomes as a potential biomarker in the HCV-related hepatocellular carcinoma. Cancer Biomark Sect Dis Markers. 14 févr 2018;21(3):651‑9.

170. Fernandez-Mercado M, Manterola L, Larrea E, Goicoechea I, Arestin M, Armesto M, et al. The circulating transcriptome as a source of non-invasive cancer biomarkers: concepts and controversies of non-coding and coding RNA in body fluids. J Cell Mol Med. oct 2015;19(10):2307‑23.

171. Allen-Rhoades W, Kurenbekova L, Satterfield L, Parikh N, Fuja D, Shuck RL, et al. Cross-species identification of a plasma microRNA signature for detection, therapeutic monitoring, and prognosis in osteosarcoma. Cancer Med. juill 2015;4(7):977‑88.

172. Yuan J, Chen L, Chen X, Sun W, Zhou X. Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for chemosensitivity and prognosis in human osteosarcoma. J Int Med Res. 2012;40(6):2090‑7.

173. Wang S-N, Luo S, Liu C, Piao Z, Gou W, Wang Y, et al. miR-491 Inhibits Osteosarcoma Lung Metastasis and Chemoresistance by Targeting αB-crystallin. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 6 sept 2017;25(9):2140‑9.

174. Wen J-J, Ma Y-D, Yang G-S, Wang G-M. Analysis of circulating long non-coding RNA UCA1 as potential biomarkers for diagnosis and prognosis of osteosarcoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. févr 2017;21(3):498‑503.

175. Ma B, Li M, Zhang L, Huang M, Lei J-B, Fu G-H, et al. Upregulation of long non-coding RNA TUG1 correlates with poor prognosis and disease status in

osteosarcoma. Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med. avr 2016;37(4):4445‑55.

176. 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. 1 oct 2011;129(7):1651‑60.

177. Hofman VJ, Ilie MI, Bonnetaud C, Selva E, Long E, Molina T, et al. Cytopathologic Detection of Circulating Tumor Cells Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method: Promises and Pitfalls. Am J Clin Pathol. janv 2011;135(1):146‑56.

178. Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. Br J Cancer. sept 2011;105(6):847‑53.

179. Marquette C-H, Boutros J, Benzaquen J, Ferreira M, Pastre J, Pison C, et al. Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening: a prospective cohort study. Lancet Respir Med. juill 2020;8(7):709‑16.

180. Garrido Castillo L, Mejean A, Vielh P, Anract J, Decina A, Nalpas B, et al. Predictive Value of Circulating Tumor Cells Detected by ISET® in Patients with Non-Metastatic Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy. Life. 22 janv 2022;12(2):165.

181. Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 10 févr 2012;30(5):525‑32.

182. Ansieau, Jacqueroud. La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigenèse. Innovations & Thérapeutiques en Oncologie. 2016;295‑304.

183. Sannino G, Marchetto A, Kirchner T, Grünewald TGP. Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Mesenchymal Tumors: A Paradox in Sarcomas? Cancer Res. 1 sept 2017;77(17):4556‑61.

184. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-Mesenchymal Transition. Am J Pathol. mai 2009;174(5):1588‑93.

185. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. Cell Cycle. sept 2011;10(17):2865‑73.

186. Kang E, Seo J, Yoon H, Cho S. The Post-Translational Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition-Inducing Transcription Factors in Cancer Metastasis. Int J Mol Sci. 30 mars 2021;22(7):3591.

187. Qi Y, Wang C-C, He Y-L, Zou H, Liu C-X, Pang L-J, et al. The correlation between morphology and the expression of TGF-β signaling pathway proteins and epithelial-mesenchymal transition-related proteins in synovial sarcomas. Int J Clin Exp Pathol. 2013;6(12):2787‑99.

188. Lee K-W, Lee NK, Ham S, Roh T-Y, Kim S-H. Twist1 is essential in maintaining mesenchymal state and tumor-initiating properties in synovial sarcoma. Cancer Lett. févr 2014;343(1):62‑73.

189. Chbani L, Guillou L, Terrier P, Decouvelaere AV, Grégoire F, Terrier-Lacombe MJ, et al. Epithelioid Sarcoma. Am J Clin Pathol. 1 févr 2009;131(2):222‑7.

190. Srivastava RK, Kaylani SZ, Edrees N, Li C, Talwelkar SS, Xu J, et al. GLI inhibitor GANT-61 diminishes embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma growth by inhibiting Shh/AKT-mTOR axis. Oncotarget. 15 déc 2014;5(23):12151‑65.

191. Yang P, Wang G, Huo H, Li Q, Zhao Y, Liu Y. SDF-1/CXCR4 signaling up-regulates survivin to regulate human sacral chondrosarcoma cell cycle and epithelial–mesenchymal transition via ERK and PI3K/AKT pathway. Med Oncol. janv 2015;32(1):377.

192. Chen J, Yan D, Wu W, Zhu J, Ye W, Shu Q. MicroRNA-130a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma by targeting PTEN. Oncol Rep. juin 2016;35(6):3285‑92.

193. Lv Y, Dai H, Yan G, Meng G, Zhang X, Guo Q. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3β/β-catenin/Snail signaling pathway. Cancer Lett. avr 2016;373(2):164‑73.

194. Balasubramanian P, Kinders RJ, Kummar S, Gupta V, Hasegawa D, Menachery A, et al. Antibody-independent capture of circulating tumor cells of non-epithelial origin with the ApoStream® system. Najbauer J, éditeur. PLOS ONE. 12 avr 2017;12(4):e0175414.

195. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Pérot G, Brouste V, Tirode F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. Nat Med. juill 2010;16(7):781‑7.

196. Giam M, Rancati G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. Cell Div. déc 2015;10(1):3.

197. Dürrbaum M, Storchová Z. Effects of aneuploidy on gene expression: implications for cancer. FEBS J. mars 2016;283(5):791‑802.

198. Alvegard TA, Berg NO, Baldetorp B, Fernö M, Killander D, Ranstam J, et al. Cellular DNA content and prognosis of high-grade soft tissue sarcoma: the Scandinavian Sarcoma Group experience. J Clin Oncol. mars 1990;8(3):538‑47.

199. Napolitano A, Minelli A, Santini D, Tonini G, Vincenzi B. Identification of Aneuploid Circulating Tumor Cells in Soft-Tissue Sarcoma Patients: A Pilot Study. Oncology. 2020;98(12):893‑6.

200. Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, et al. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. Science. 11 juill 2014;345(6193):216‑20.

201. 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. 1 mars 2015;75(5):892‑901.

202. Koch C, Kuske A, Joosse SA, Yigit G, Sflomos G, Thaler S, et al. Characterization of circulating breast cancer cells with tumorigenic and metastatic capacity. EMBO Mol Med [Internet]. 7 sept 2020 [cité 11 mars 2022];12(9). Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emmm.201911908

203. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. Nat Biotechnol. juin 2013;31(6):539‑44.

204. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. Nat Med. août 2014;20(8):897‑903.

205. Faugeroux V, Pailler E, Oulhen M, Deas O, Brulle-Soumare L, Hervieu C, et al. Genetic characterization of a unique neuroendocrine transdifferentiation prostate circulating tumor cell-derived eXplant model. Nat Commun. déc 2020;11(1):1884.

206. Pantel K, Alix-Panabières C. Functional Studies on Viable Circulating Tumor Cells. Clin Chem. 1 févr 2016;62(2):328‑34.

207. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy in cancer patients: advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay. Expert Rev Mol Diagn. 2 nov 2015;15(11):1411‑7.

208. Cortés-Hernández LE, Eslami-S Z, Alix-Panabières C. Circulating tumor cell as the functional aspect of liquid biopsy to understand the metastatic cascade in solid cancer. Mol Aspects Med. avr 2020;72:100816.

209. Girotti MR, Gremel G, Lee R, Galvani E, Rothwell D, Viros A, et al. Application of Sequencing, Liquid Biopsies, and Patient-Derived Xenografts for Personalized Medicine in Melanoma. Cancer Discov. mars 2016;6(3):286‑99.

210. Okuma HS, Yonemori K, Kojima Y, Tanioka M, Sudo K, Noguchi E, et al. Clinical Utility of Circulating Tumor DNA in Advanced Rare Cancers. Front Oncol. 24 nov 2021;11:732525.

211. Jung A, Kirchner T. Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis. Dtsch Ärztebl Int [Internet]. 9 mars 2018 [cité 10 mars 2022]; Disponible sur: https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2018.0169

212. Esagian SM, Grigoriadou GI, Nikas IP, Boikou V, Sadow PM, Won J-K, et al. Comparison of liquid-based to tissue-based biopsy analysis by targeted next generation sequencing in advanced non-small cell lung cancer: a comprehensive systematic review. J Cancer Res Clin Oncol. août 2020;146(8):2051‑66.

213. Bos MK, Angus L, Nasserinejad K, Jager A, Jansen MPHM, Martens JWM, et al. Whole exome sequencing of cell-free DNA – A systematic review and Bayesian individual patient data meta-analysis. Cancer Treat Rev. févr 2020;83:101951.

214. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. Cancer Discov. avr 2021;11(4):858‑73.

215. Johansson G, Berndsen M, Lindskog S, Österlund T, Fagman H, Muth A, et al. Monitoring Circulating Tumor DNA During Surgical Treatment in Patients with Gastrointestinal Stromal Tumors. Mol Cancer Ther. déc 2021;20(12):2568‑76.

216. Eisenhardt AE, Schmid A, Esser J, Brugger Z, Lausch U, Kiefer J, et al. Targeted next-generation sequencing of circulating free DNA enables non-invasive tumor detection in myxoid liposarcomas. Mol Cancer. déc 2022;21(1):50.

217. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. N Engl J Med. 4 déc 2014;371(23):2189‑99.

218. Kim K, Kim HS, Kim JY, Jung H, Sun J-M, Ahn JS, et al. Predicting clinical benefit of immunotherapy by antigenic or functional mutations affecting tumour immunogenicity. Nat Commun. déc 2020;11(1):951.

219. Tarpey PS, Behjati S, Cooke SL, Van Loo P, Wedge DC, Pillay N, et al. Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. Nat Genet. août 2013;45(8):923‑6.

220. Mäkinen N, Aavikko M, Heikkinen T, Taipale M, Taipale J, Koivisto-Korander R, et al. Exome Sequencing of Uterine Leiomyosarcomas Identifies Frequent Mutations in TP53, ATRX, and MED12. Morton CC, éditeur. PLOS Genet. 18 févr 2016;12(2):e1005850.

221. Kanojia D, Nagata Y, Garg M, Lee DH, Sato A, Yoshida K, et al. Genomic landscape of liposarcoma. Oncotarget. 15 déc 2015;6(40):42429‑44.

222. Roszik J, Mustachio LM, Livingston JA, Groisberg R, Carmagnani Pestana R, Subbiah V, et al. Landscape of Immune-Related Markers and Potential Therapeutic Targets in Soft Tissue Sarcoma. Cancers. 19 oct 2021;13(20):5249.

223. Jamshidi F, Bashashati A, Shumansky K, Dickson B, Gokgoz N, Wunder JS, et al. The genomic landscape of epithelioid sarcoma cell lines and tumours: Genomic landscape of epithelioid sarcoma. J Pathol. janv 2016;238(1):63‑73.

224. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature. mars 2007;446(7132):153‑8.

225. Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. Nat Commun. nov 2015;6(1):7557.

226. Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, Van Tine BA, Schuetze SM, Hu J, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. nov 2017;18(11):1493‑501.

227. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TW-W, Sun C-M, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. Nature. 23 janv 2020;577(7791):556‑60.

228. Qiu P, Poehlein CH, Marton MJ, Laterza OF, Levitan D. Measuring Tumor Mutational Burden (TMB) in Plasma from mCRPC Patients Using Two Commercial NGS Assays. Sci Rep. déc 2019;9(1):114.

229. Wang Z, Duan J, Cai S, Han M, Dong H, Zhao J, et al. Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients With Non–Small Cell Lung Cancer With Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. JAMA Oncol. 1 mai 2019;5(5):696.

230. Fridland S, Choi J, Nam M, Schellenberg SJ, Kim E, Lee G, et al. Assessing tumor heterogeneity: integrating tissue and circulating tumor DNA (ctDNA) analysis in the era of immuno-oncology - blood TMB is not the same as tissue TMB. J Immunother Cancer. août 2021;9(8):e002551.

# Annexe

Tableaux montrant les différentes technologies d'enrichissement et d'isolement des CTC disponibles sur le marché.

**Tableau 1 Biophysique - Microfiltration à deux et trois dimensions : Séparation cellulaire basée sur la taille à l'aide de pores ou de géométries tridimensionnelles**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **ISET®** | Taille, déformabilité | Filtres ayant des pores 8-µm, 10–12 puits pouvant filtrer 1 mL de sang, visualisation de *cluster* |
| **ScreenCell®** | | Surface hydrophile, pores de 7.5/6.5-µm |
| **CellSieve™** | | Elaboré à partir d'une photorésine transparente, flexible, non fluorescente, pores de 7-µm |
| **Flexible Micro Spring Array (FMSA)** | | Elaboré à partir de parylene C, capture de cellules viables, visualisation de *cluster* |
| **FaCTChecker** | | Elaboré à partir de parylene C, capture de cellules viables entre les couches de membranes |
| **Parsortix** | | Cellules viables relachées grâce à un flux |
| **Resettable Cell Trap** | | Microvalves controlées pneumatiquement |
| **Cluster Chip** | | Colonnes triangulaires conçues pour les *clusters* de CTC |

**Tableau 2 : Biophysique – Les cellules de focalisation inertielle sont séparées passivement par taille grâce à l'application de forces d'inertie dans des dispositifs microfluidiques**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **Vortex** | Taille | Pas de lyse des globules rouges, capture de cellules viables, facile à fabriquer, visualisation de *cluster* |
| **ClearCell® FX** | | Lyse des globules rouges, 1–1.5 mL/min, capture de cellules viables, facile à fabriquer, visualisation de *cluster* |
| **ApoStream®** | Signature électrique | DEP-FFF, flux continu, capture de cellules viables>10 mL/h |
| **DEPArray™** | | Nécessite un pré enrichissement, permet la récupération et la manipulation de cellules viable et unique à travers les cages DEP |

**Tableau 3 : Biophysique - Centrifugation en gradient de densité : Echantillon placé sur un milieu de séparation et centrifugé pour séparer les différentes populations cellulaires en fonction de leurs densités relatives**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **Ficoll Paque®** | Densité | Coût peu élévé, facile d'utilisation |
| **OncoQuick** | Densité, Taille | Membrane poreuse au-dessus du milieu de séparation pour une séparation supplémentaire par filtration |
| **RosetteSep™ CTCEnrichment Cocktail** | Densité, Cocktail d'anticorps | Le marquage par les anticorps modifie la densité cellulaire |
| **Accucyte Enrichment and CyteSealer™** | Densité | Le fractionnement séquentiel de densité enrichit les cellules cibles. Des modules additionnels CyteFinder™ and CytePicker™ sont nécessaires pour un haut débit d'image et la récuperation d'une cellule unique |

**Tableau 4 : Essais fonctionnels : Enrichissement en CTC viables basé sur la bioactivité des cellules, comme la sécrétion de protéines ou l'adhésion cellulaire**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **EPISPOT** | Sécrétion de protéines | Discrimination entre CTC viables et apoptotiques basée sur la sécrétion de protéines |
| **Vita-Assay™** | Matrice d'ahdésion cellulaire (CAM) | Enrichissement de CTC viables basé sur une adhésion particulière à la CAM, visualisation de *cluster* |
| **TelomeScan** | Sécrétion de protéines | Adénovirus sélectif pour la réplication spécifique de la télomérase |

**Tableau 5 : Biophysique - Acoustophorèse : Séparation des cellules en fonction de leur mobilité acoustophorétique en les exposant aux ondes acoustiques**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **Acoustophorèse Chip** | Taille | Pré alignement et séparation acoustique |

**Tableau 6 : Développement d'imagerie directe pour améliorer l'efficacité de l'imagerie ou pour remplacer l'enrichissement par l'imagerie fluorescente à grande vitesse**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **Microfluidic CellConcentrator (MCC)** | Aucun | Pompe passive concentrant par 5x l'échantillon |
| **ImageStream®** | CK, CD45, DRAQ5 | Hybride entre cytometrie de flux et microspopie par fluorescence, 5000 cellules/sec |
| **EPIC** | CK, CD45, DAPI | Microscopie digitalisée automatique, visualisation de *cluster* |
| **FASTCell™** | CK, CD45, DAPI | Gamme de fibre optique permettant de visualiser de larges champs, 25M cells/min, résolution faible |
| **CytoTrack** | CK, CD45, DAPI | Visualisation de *cluster*, 100 M cellules/min |
| **cytométrie en flux photoacoustique** | Spectre d' absorption | Technique non invasive de grands volumes de sang |

**Tableau 7 : Immunoaffinité – Enrichissement positif par des anticorps ciblant des antigènes spécifiques de tumeurs couplés à des particules magnétiques ou déposés à la surface du dispositif pour capturer les CTC**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **CellSearch®** | EpCAM | Validé par la FDA |
| **AdnaTest** | Cocktail d'anticorps | Plusieurs marqueurs de cancer determines par RT PCR sur des CTC capturées |
| **MACS** | EpCAM | Enrichissement pos/neg, |
| **MagSweeper** | EpCAM | Pureté, débit de 9 mL/h |
| **GEDI** | PSMA/HER 2, taille | Séparation sur la taille minimisant les contaminations |
| **CTC Chip** | EpCAM | Contact avec les anticorps optimisé par des microspots, 1–2 mL/h |
| **OncoCEE** | Cocktail d'anticorps | Marquage par des anticorps |
| **Herringbone Chip** | EpCAM | Mélange par micro tourbillons, visualisation de *cluster*, 4.8 mL/h |
| **GEM** | EpCAM | Mélange par micro tourbillons, 3.6 mL/h |
| **Graphene Oxide Chip** | EpCAM | Géométrie plane, 1–3 mL/h |
| **Modular SinusoidalMicrosystem (commercialized by BioFluidica)** | EpCAM | Trois modules: sélection, impédance et imagerie, visualisation de *cluster*, >86% purité, >7.5 mL/h |
| **Ephesia** | EpCAM | Assemblement de µm billes magnétiques dans des colonnes, >3 mL/h |
| **Magnetic Sifter** | EpCAM | flux vertical, 10 mL/h |
| **LiquidBiopsy** | Cocktail d'anticorps | Automatisé, le flux de gaine minimise les liaisons non spécifiques, flux continu, 5 mL/h |
| **Isoflux™** | EpCAM | Flux continu automatisé |
| **CTC-iChip** | EpCAM, taille | Enrichissement pos/neg, séparation par la taille, 8 mL/h |
| **GILUPI CellCollector™** | EpCAM | Peut traiter de grands volumes de sang |

**Tableau 8 : Immunoaffinité –Enrichissement négatif : les anticorps ciblant les antigènes associés aux leucocytes sont couplés à des particules magnétiques ou la surface de l'appareil élimine les cellules indésirables**

| Technologie | Critère de sélection | Principales caractéristiques |
|---|---|---|
| **EasySep™ HumanCD45 Depletion Kit** | CD45 | Simple et facile d'utilisation |
| **QMS** | | Flux continu, haut débit |
| **MACS** | | |
| **CTC iChip** | CD45, CD66b, Size | |