



**HAL**  
open science

# Impact de la biopsie liquide dans le mélanome uvéal primitif et métastatique

Arnaud Martel

► **To cite this version:**

Arnaud Martel. Impact de la biopsie liquide dans le mélanome uvéal primitif et métastatique. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2023. Français. NNT : 2023COAZ6050 . tel-04524698

**HAL Id: tel-04524698**

**<https://theses.hal.science/tel-04524698>**

Submitted on 28 Mar 2024

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT

## Impact de la biopsie liquide dans le mélanome uvéal primitif et métastatique

**Arnaud MARTEL**

Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN)

Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale (LPCE)

**Présentée en vue de l'obtention du grade de  
docteur en Sciences de la Vie et de la Santé  
d'Université Côte d'Azur**

**Dirigée par** : Paul Hofman / Sandra Lassalle

**Soutenue le** : 22 décembre 2023

**Devant le jury, composé de :**

Stéphanie BAILLIF, PU-PH, Université Côte d'Azur

Pierre-Yves ROBERT, PU-PH, Université de Limoges

Laurent KODJIKIAN, PU-PH, Université Claude

Bernard Lyon 1

Frédéric MOURIAUX, PU-PH, Université de Rennes

Sandra LASSALLE, MCU-PH, Université Côte d'Azur

Paul HOFMAN, PU-PH, Université Côte d'Azur



**Impact de la biopsie liquide dans le mélanome uvéal primitif et  
métastatique**

**Impact of liquid biopsy in primary and metastatic uveal melanoma**

**Jury**

**Présidente du Jury**

Stéphanie Baillif, PU-PH, Université Nice Côte d'Azur

**Rapporteurs**

Pierre-Yves Robert, PU-PH, Université de Limoges

Laurent Kodjikian, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1

**Directeur**

Paul Hofman, PU-PH, Université Côte d'Azur

**Co-directrice**

Sandra Lassalle, MCU-PH, Université Côte d'Azur

**Invité**

Frédéric Mouriaux, PU-PH, Université de Rennes

## **Résumé : Impact de la biopsie liquide dans le mélanome uvéal primitif et métastatique**

Le mélanome uvéal (MU) est le cancer intraoculaire primitif le plus fréquent chez l'adulte. Malgré une prise en charge médico-chirurgicale adaptée permettant un contrôle local de la tumeur dans plus de 90% des cas, on estime qu'environ 50% des patients présenteront des métastases, principalement hépatiques, dans les 10 années suivant le diagnostic. La dissémination métastatique du MU s'effectue uniquement par voie hématogène. Détecter le plus précocement possible la présence de cellules tumorales dans le sang circulant permettrait une prise en charge très précoce des patients, avant la survenue des métastases hépatiques. Depuis quelques années, la biopsie liquide (BL) s'est imposée comme un moyen non invasif, reproductible et prometteur d'obtenir un diagnostic, un pronostic et un suivi théranostique de patients atteints de tumeurs solides. La BL concerne le sang ainsi que tout liquide humain, et permet entre autres d'identifier plusieurs paramètres tumoraux comme les cellules tumorales circulantes (CTCs) ou l'ADN tumoral circulant.

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer la place de la BL, et notamment des CTCs, dans le MU primitif et métastatique.

Dans un premier article, nous avons réalisé une revue de la littérature sur les biopsies liquides afin : (i) de faire un état des lieux des connaissances sur la BL dans le MU, (ii) d'identifier les différents marqueurs évaluables dans le MU, (iii) de recenser les différentes techniques d'identification des marqueurs tumoraux, et (iv) de relever les limites techniques actuelles. Nous avons conclu que monitorer les CTC était actuellement le paramètre le plus pertinent dans la mesure où elles sont le reflet vivant de la dissémination spatio-temporelle des cellules tumorales. Nous avons également observé des discordances entre les résultats des différentes études, dues à une grande diversité des techniques pré analytiques et des cohortes analysées.

Afin de déterminer la technique la plus adaptée à l'identification des CTC dans le MU, nous avons dans un deuxième article comparé in vitro 4 dispositifs de capture des CTC en utilisant une lignée de MU métastatique (OMM 2.3). Les cellules étaient filtrées à la fois en utilisant du milieu cellulaire (RPMI) et du sang veineux provenant de volontaires sains. Nous avons successivement comparé le Vortex VTX-1 (Biosciences, Pleasanton, CA, USA, système micro fluidique), le ClearCell FX (ClearBridge, Biolidics, Singapore, système micro fluidique), l'ISET (Rarecells, Paris, France, système de filtration par taille) et le Cellseach (Menarini Silicon Biosystems, Florence, Italie, système immun magnétique). Les taux de capture, étaient de 39,2%, 22,2%, 8,9% et 1,1% pour l'ISET, le Vortex VTX-1, le ClearCell FX et le Cellseach, respectivement. Nous avons également comparé ces dispositifs en termes de reproductibilité, de facilité d'utilisation, de rapidité, d'ergonomie, et de capacité à réaliser des analyses cytogénétiques post analytiques. Ces expérimentations nous ont permis d'identifier le dispositif de capture des CTC ainsi que le protocole analytique les plus adaptés. Nous avons mis au point une technique rapide, fiable et reproductible de capture des CTC en utilisant le système de filtration micro fluidique Vortex VTX-1 suivi de l'immunocytochimie par Melan A.

Suite aux conclusions de ce travail in vitro, nous avons maintenant débuté l'application clinique chez nos patients présentant un MU primitif ou métastatique en utilisant le système de filtration micro fluidique Vortex VTX-1. Enfin, nous avons publié un 3e article détaillant la mise en place d'une biobanque dédiée à l'onco-ophtalmologie au CHU de Nice. Une biobanque dédiée, sécurisée et accréditée est essentielle pour collecter des échantillons de haute qualité afin de promouvoir la recherche translationnelle et multicentrique en oncologie oculaire.

**Mots-clés :** mélanome uvéal, biopsie liquide, cellules tumorales circulantes, vortex, biobanque

## **Abstract : impact of liquid biopsy in primary and metastatic uveal melanoma**

Uveal melanoma (UM) is the most common primary intraocular malignancy in adults. Despite appropriate medical and surgical management allowing local control of the tumor in more than 90% of cases, it is estimated that about 50% of patients will present metastases, mainly hepatic, within 10 years of diagnosis. Metastatic spread occurs only hematogenously. Detecting the presence of tumor cells in circulating blood as early as possible would allow very early management of patients before the occurrence of liver metastases. In recent years, liquid biopsy (LB) has emerged as a non-invasive, reproducible and promising way to obtain a diagnosis, prognosis and theranostic follow-up of patients with solid malignancies. LB concerns blood as well as any human fluid and allows identifying several tumor parameters such as circulating tumor cells (CTCs) or circulating tumor DNA.

The aim of this thesis work was to evaluate the place of LB, and in particular CTCs, in primary and metastatic UM.

In a first article, we conducted a review of the literature on liquid biopsies in order to: (i) assess the current status of LB in the UM field, (ii) to identify the different markers evaluable in the MU, (iii) to assess the different techniques for identifying these tumor markers, and (iv) to report the current technical limitations. We concluded that monitoring CTCs is currently the most relevant parameter as they are a living expression of the spatio-temporal dissemination of tumor cells. We also observed discrepancies between the different studies results, due to a wide variety of pre-analytical techniques and cohorts analyzed.

In order to determine the most suitable technique for the identification of CTCs in MU, we have in a second article compared in vitro 4 CTC capture devices using a metastatic UM line (OMM 2.3). The cells were filtered using both cellular medium (RPMI) and venous blood from healthy volunteers. We successively compared the Vortex VTX-1 (Biosciences, Pleasanton, CA, USA, microfluidic system), the ClearCell FX (ClearBridge, Biolidics, Singapore, microfluidic system), the ISET (Rarecells, Paris, France, size filtration system) and the Cellseach (Menarini Silicon Biosystems, Florence, Italy, immunomagnetism system). Recovery rates were 39.2%, 22.2%, 8.9% and 1.1% for the ISET, Vortex VTX-1, ClearCell FX and Cellseach, respectively. We also compared these devices in terms of reproducibility, ease of use, speed, ergonomics, and ability to perform post-analytical cytogenetic analyses. These experiments allowed us to identify the most suitable CTC capture device and analytical protocol. We have developed a fast, reliable and reproducible CTC capture technique using the Vortex VTX-1 microfluidic filtration system followed by Melan A immunocytochemistry.

Following the conclusions of this in vitro work, we have now started clinical application in our patients with primary or metastatic MU using the Vortex VTX-1 microfluidic filtration system.

Finally, we published a third article on the establishment of a dedicated biobank to ophthalmic malignancies at the University Hospital of Nice. A secure and accredited dedicated biobank is essential to collect high-quality samples to promote translational and multicenter research in ocular oncology.

**Key-words:** uveal melanoma, liquid biopsy, circulating tumour cells, vortex, biobank

## REMERCIEMENTS

### Aux membres du jury :

- A Madame *la Professeure BAILLIF*, présidente du jury. Je vous remercie pour votre confiance et votre soutien, que ce soit dans le service au quotidien ou dans le cadre de mon Master 2 et ma thèse de sciences. Soyez assurée de mon profond respect et de ma gratitude.

- A Monsieur *le Professeur ROBERT*, rapporteur de thèse. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse et vous remercie pour votre soutien répété notamment sur le plan Universitaire. Vous êtes un exemple et j'espère que ce travail saura répondre à vos attentes.

- A Monsieur *le Professeur KODJIKIAN*, rapporteur de thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse qui, je l'espère, vous donnera entière satisfaction. Soyez assuré de mon profond respect.

- A Monsieur *le Professeur MOURIAUX*, assesseur de thèse. Je vous remercie pour votre soutien depuis le début de cette thèse de sciences et pour votre confiance maintes fois répétée notamment sur le plan Universitaire. C'est un réel plaisir de collaborer à vos côtés.

- A Monsieur *le Professeur HOFMAN*, directeur de thèse. Je vous remercie d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse, somme toute assez éloigné du poumon. Votre expertise en biopsie liquide nous aura permis de conduire ce travail de thèse à son terme et je vous en remercie sincèrement.

- A Madame *le Docteur LASSALLE*, co-directrice de thèse. Je te remercie Sandra pour ton aide et ton soutien sans faille dans ce travail de thèse. Sans toi, ce dernier n'aurait pu aboutir. Je te remercie pour ton temps, nos discussions, nos relectures et nos échanges qui m'ont permis de mieux appréhender (et apprécier !) le monde complexe des biopsies liquides.

### A tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail de thèse :

- A *Corine BERTOLOTTO*. Je te remercie de m'avoir accueilli dans ton équipe au C3M dans le cadre de mon MASTER 2, étape indispensable avant cette soutenance. Même si le Western Blot n'est pas vraiment mon ami, j'ai pu découvrir la rigueur de la recherche fondamentale à tes côtés. Je te remercie d'avoir participé à tous mes comités de suivi de thèse et pour ta disponibilité sans faille. Félicitations pour ton investissement majeur pour le Master 2 cancérologie.

- A *Lara BELLINI* qui m'a remarquablement encadré lors de ma venue au C3M lors de mon MASTER 2 et qui a su faire de patience avec un néophyte comme moi.

- A *Baharia MOGRABI*. Je te remercie de m'avoir si bien accueilli dans ton laboratoire pour ce travail de thèse. Ta positivité presque jusqu'au boutiste, ton entrain et ta passion

contagieuse pour ton métier font de toi une de mes plus rencontres durant ma thèse de sciences.

- A **Barnabe ROMEO** : je te remercie pour ton aide inestimable pour ce travail de thèse. Tu as été la pierre angulaire de ce travail, notamment à ses débuts (je m'en souviens encore !) et c'est avec toi que nous avons mis au point notre méthode de comptage qui a été la base de ce travail de thèse. Je te remercie pour ta grande gentillesse et ta disponibilité. Je te souhaite le meilleur dans ta vie professionnelle et personnelle.

- A **Salome LALVEE et Katia ZAHAF** : la « *team immuno* ». Je vous remercie pour votre grand professionnalisme grâce auquel nous avons pu terminer ce travail de thèse. Merci Salome pour ton aide initiale avec le Vortex et ta patience avec moi dans le découpage des ISET.

- A **Myriam SALAH et Virginie TANGA** : la « *team cellsearch* ». Bien que la remise en fonctionnement du Cellsearch n'ait pas été le succès du siècle, nous avons passé de bons moments à essayer de résoudre tous les messages d'erreurs les uns après les autres. Je vous remercie pour votre aide, toujours dans la joie et la bonne humeur.

- A **Julien FAYADA et Olivier BORDONNE** : merci pour votre grande gentillesse. Merci Olivier pour ta patience avec les consentements...Je suis ravi d'avoir fait votre connaissance.

- A **Christelle BONNETAUD et Kevin WASHETINE** : la « *team biobanque* ». Je vous remercie pour votre disponibilité et toutes les données que vous m'avez communiquées. C'est un plaisir de travailler avec vous.

- A l'ensemble du personnel de l'IRCAN qui a pu m'aider et me guider au cours de ma thèse.

- A **Lauris GASTAUD** : je te remercie pour ta simplicité, ta gentillesse et ton intelligence qui nous ont permis de construire ensemble notre protocole d'étude. Travailler à tes côtés aura été un énorme privilège. Je t'apprécie autant que tes patients t'apprécient (et ils sont tous dithyrambiques). Je te souhaite le meilleur.

- A **Madame Christine LOVERA** : l'argent étant le nerf de la guerre, cette thèse n'aurait pu voir le jour sans votre grande réactivité et votre soutien pour l'obtention de notre bourse commune. Merci pour votre disponibilité.

### **Aux membres du DOON :**

- A **Sacha NAHON-ESTEVE** : « *cher ami* », nous te remercions tous pour le travail acharné que tu as réalisé pour le DOON, grâce à tes qualités de « *geek* » bien sûr, mais aussi et surtout grâce à ta motivation et ta passion pour l'onco-ophtalmologie. Tu es, indirectement, une des personnes qui a le plus contribué à ce travail de thèse. Eh oui ! Au-delà des quelques gouttes de sang données pour la science et de ces innombrables indications d'énucléation, tu m'as permis, grâce à ton investissement exceptionnel dans le service, de me libérer du temps pour le laboratoire en toute quiétude, sachant que les choses seraient parfaitement gérées dans le



service. Je te souhaite bon courage pour ta propre thèse et dans ta vie personnelle bien sûr. Je termine en précisant que le site internet du DOON est le suivant : [www.cancerdesyeux.fr](http://www.cancerdesyeux.fr)

- Au **Docteur Jean Pierre Caujolle** : je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance et essaierons de poursuivre votre œuvre dans les années à venir.

- A **Célia MASCHI** : je te remercie pour ton soutien et te félicite pour la prise en charge de tes patients, tant sur le plan médical qu'humain.

- A nos amies radiothérapeutes, **Déborah Aloi** et **Anais Groulier** pour leur grand professionnalisme. C'est un plaisir de travailler avec vous au quotidien.

#### **A l'ensemble du service d'Ophtalmologie :**

Je remercie l'ensemble du service d'ophtalmologie, avec ses infirmières, infirmiers de blocs, ARCs, anesthésistes, orthoptistes, secrétaires, aides-soignants mais bien sur les internes et les chefs-assistants qui constituent la pierre angulaire de du service. Merci à mes donneurs de sang « sains ». Une mention spéciale à **Cécilia PARMARO** qui m'a énormément aidé (et qui continue de le faire) dans l'organisation au quotidien et pour la gestion du DIU. C'est grâce à toi que j'arrive à m'y retrouver et à fluidifier des semaines parfois chargées. Félicitations pour ton grand professionnalisme reconnu de tous.

#### **A ma famille :**

Car rien de tout cela n'aurait été possible sans eux. A Julie et Elsa qui sont mes bonheurs du quotidien, vous êtes ce qui m'est de plus précieux. A mes parents pour leur éducation et leur soutien inconditionnel. A Audrey, Julien, Antoine et Henri. A l'ensemble de ma belle-famille. Et bien sûr à mon Sirius pour me maintenir en forme.

#### **Aux amis :**

A nos amis de l'hôpital, hors hôpital, de la piscine, et d'ailleurs. Merci pour votre soutien et votre amitié précieuse.

**Aux patients** : pour leur confiance et leur reconnaissance au quotidien qui nous permet de continuer.

## Liste des figures

- **Figure 1** : volumineux MU compliqué de décollement de rétine exsudatif.
- **Figure 2** : échographie oculaire en mode B d'un mélanome choroidien. Avec l'aimable autorisation du Dr NAHON-ESTEVE (membre du DOON, [www.cancerdesyeux.fr](http://www.cancerdesyeux.fr)). DR : décollement de rétine.
- **Figure 3** : OCT d'un mélanome choroidien avec mise en évidence d'un décollement séreux rétinien (flèche jaune). Avec l'aimable autorisation du Dr NAHON-ESTEVE (membre du DOON, [www.cancerdesyeux.fr](http://www.cancerdesyeux.fr)).
- **Figure 4** : angiographie rétinienne au vert d'indocyanine (ICG) d'un mélanome choroidien montrant sa vascularisation intrinsèque (double vascularisation, flèche jaune). Avec l'aimable autorisation du Dr NAHON-ESTEVE (membre du DOON, [www.cancerdesyeux.fr](http://www.cancerdesyeux.fr)).
- **Figure 5** : diversité génétique des mélanomes péri-oculaires avec profil mutationnel.
- **Figure 6** : les différentes composantes de la biopsie liquide à visée tumorale.
- **Figure 7** : intérêt de la biopsie liquide dans le MU.
- **Figure 8** : photographie montrant la réalisation d'une PCA. Après incision cornéenne périphérique, une canule est insérée et permet d'aspirer l'humeur aqueuse située entre la cornée et l'iris.
- **Figure 9** : A : CTC obtenue avec : (A) Vortex VTX-1 ; (B) ClearCell FX ; (C) ISET.
- **Figure 10** : figure résumant l'intérêt des biopsies liquides pour une meilleure compréhension physiopathologique du processus de dissémination métastatique dans le MU.

## Liste des tableaux

- **Tableau 1** : facteurs associés à un risque accru de dissémination métastatique du MU.  
GEP : Gene Expression Profile.
- **Tableau 2** : les différentes phases dans l'étude des CTCs.
- **Tableau 3** : taux de capture sur milieu cellulaire et sang veineux obtenu avec chaque plateforme de CTCs. iCN : initial Cell Number ; fCN : final Cell Number; RPMI : Roswell Park Memorial Institute ; SD : Standard Deviation.
- **Tableau 4** : avantages et inconvénients de chaque plateforme dans notre expérience en vue d'une application en pratique clinique quotidienne.
- **Tableau 5** : caractéristiques des 48 patients inclus.
- **Tableau 6** : principaux résultats dans le groupe de patients CTC positive versus CTC négative.
- **Tableau 7** : résultats statistiques sur le nombre de CTC et/ou CTM comptabilisés avec les données cliniques paracliniques des 48 patients. CTM = Circulating Tumor Microthrombus.
- **Tableau 8** : comparaison des études sur la détection des CTCs dans le MU. NC = Non Communiqué.

## Liste des abréviations

- BAP-1 : BRCA1 associated protein-1
- BL : Biopsie Liquide
- C3M : Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire
- CDX : Cell Derived Xenograft
- CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
- COMS : Collaborative Ocular Melanoma Study
- CPP : Comité de Protection des Personnes
- Ct-DNA : ADN tumoral circulant
- CTC : Cellule Tumorale Circulante
- CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
- CTM : Circulating Tumour Microemboli
- Ct-RNA : ARN tumoral circulant
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
- DGOS : Direction Générale de l'Offre de Soins
- DOON : Département d'Onco-Ophtalmologie Niçois
- EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
- FBS : Fetal bovine serum
- FDA : Food and Drug Administration
- GEP : Gene Expression Profiling
- GIRCI : Groupements Interrégionaux pour la Recherche Clinique et l'Innovation
- GP : Glycoprotéine
- HA : Humeur Aqueuse
- HMW-MAA : High Molecular Weight- Melanoma Associated Antigen
- IRCAN : Institute of Research Cancer and Aging
- ISET : Isolation by Size of Tumor cells

- LPCE : Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale
- MAP : Mitogen activated protein
- MEK : Mitogen-activated protein kinase
- MERRI : Mission Enseignement Recherche Reference et Innovation
- MTA : Material Transfer Agreement
- MU : Mélanome Uvéal
- NOMA : Nice Ocular Melanoma
- OCT : Optical Coherence Tomography
- PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
- PBS : Phosphate-Buffered Saline
- PCA : Ponction de Chambre Antérieure
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PD-1 : Programmed Death-1
- PDX : Patient Derived Xenograft
- RNA : acide ribonucleique
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
- SD : Standard Deviation
- TEP : Tumor Educated Platelet
- TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
- TNM : Tumor Nodes Metastasis
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

# **TABLE DES MATIERES**

## **1. Partie I : Généralités**

<b>1.1. Le mélanome uvéal.....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Epidémiologie.....	2
1.1.2. Diagnostic.....	3
1.1.3. Genèse tumorale.....	8
1.1.4. Evolution et pronostic.....	10
1.1.5. Traitement.....	12
1.1.6. Challenges.....	14
<b>1.2. Les biopsies liquides.....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Les différentes biopsies liquides.....	15
1.2.1.1. Les cellules tumorales circulantes (CTCs).....	16
1.2.1.2. L'ADN tumoral circulant (ct-DNA) et l'ARN tumoral circulant (ct-RNA).....	19
1.2.1.3. Les micro-ARN tumoraux non codants (mi-RNA) circulants (cmiRNA).....	20
1.2.1.4. Les exosomes tumoraux.....	21
1.2.1.5. Les Tumor Educated Platelets (TEP).....	21
1.2.2. Rationnel des biopsies liquides dans le mélanome uvéal.....	22
1.2.2.1. L'humeur aqueuse.....	23
1.2.2.2. Le sang veineux.....	25

## **2. Partie II : Objectifs de la thèse.....27**

## **3. Partie III : Résultats.....29**

3.1. Biopsie liquide et mélanome uvéal : état des lieux.....	29
3.1.1. Résumé de l'article.....	29
3.1.1.1. CTCs et MU.....	29
3.1.1.2. Ct-DNA et MU.....	31
3.1.1.3. Autres composantes des biopsies liquides.....	32
3.1.1.4. Conclusions et perspectives.....	33
3.1.2. Article N°1.....	35
3.2. Comparaison de 4 plateformes de biopsie liquide dans le mélanome uvéal.....	79
3.2.1. Résumé de l'article.....	79
3.2.1.1. Introduction.....	79
3.2.1.2. Matériel et Méthode.....	80
3.2.1.3. Résultats et discussion.....	84
3.2.2. Article N°2.....	93
3.3. Importance du biobanking en cancérologie oculaire : l'exemple de la biobanque « NOMA ».....	139
3.3.1. Résumé de l'article.....	140
3.3.2. Article N°3.....	146

<b>4. Partie IV : Discussion et perspectives.....</b>	<b>186</b>
4.1. Rappel des principaux résultats.....	186
4.2. Application chez l'homme : résultats préliminaires de l'étude clinique en cours.....	186
4.3. Perspectives.....	195
4.3.1. Perspectives à court terme.....	195
4.3.2. Perspectives à moyen-long terme.....	196
<b>5. Partie V : Conclusion.....</b>	<b>200</b>
<b>6. Partie VI : Références.....</b>	<b>202</b>
<b>7. Partie VII : Annexes.....</b>	<b>209</b>

**Impact de la biopsie liquide dans le mélanome uvéal  
primitif et métastatique**



# **Partie I- Généralités**

## **1.1. Le mélanome uvéal (MU)**

Anatomiquement, l'uvée comprend l'iris, les corps ciliaires et la choroïde. Le MU naît de la choroïde dans 90% des cas, des corps ciliaires dans 6% des cas et de l'iris dans 4% des cas (Singh et al., 2011).

### **1.1.1. Epidémiologie du MU**

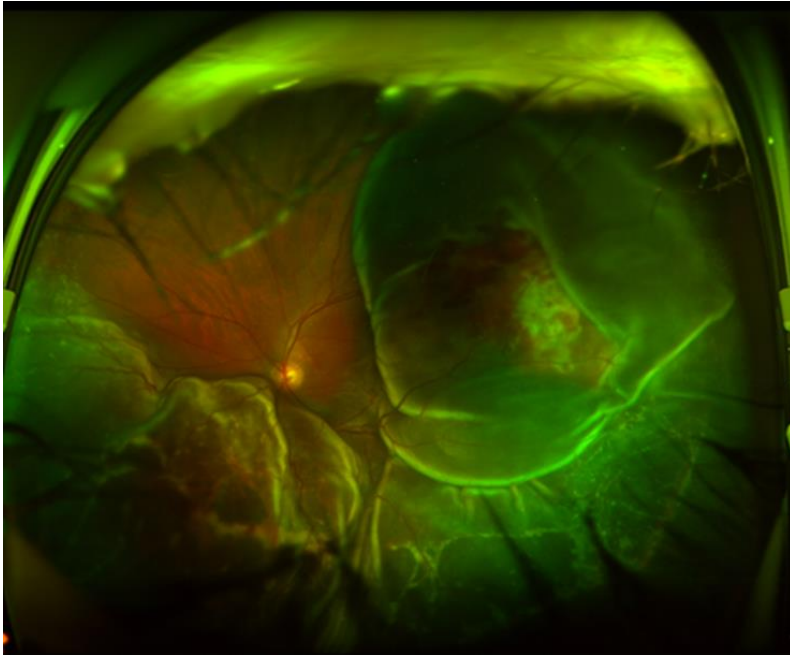
Le MU est la tumeur intraoculaire primitive la plus fréquente chez l'adulte. Sa prévalence est estimée à 6 cas / millions d'habitants (Jager et al., 2020). En France, entre 400 et 450 cas sont diagnostiqués annuellement ce qui en fait un cancer rare. En comparaison, environ 1500 cas sont annuellement diagnostiqués aux Etats-Unis (Chattopadhyay et al., 2016). Les dernières études épidémiologiques ne retrouvent pas d'augmentation significative de l'incidence du MU au cours des dernières décennies (Aronow et al., 2018; Singh et al., 2011). Certaines variations géographiques sont retrouvées avec par exemple une incidence plus importante en Europe du Nord (8 cas / millions d'habitants) comparativement à l'Europe du Sud (environ 3 cas / millions d'habitants)(Aronow et al., 2018). Le MU est plus rarement rencontré parmi les populations hispaniques et africaines (Branisteanu et al., 2021). Le sexe ratio est de 1. L'âge moyen de découverte se situe selon les études entre 58 et 62 ans (Branisteanu et al., 2021). Les facteurs de risque du MU sont notamment le syndrome BAP-1, le syndrome du naevus dysplasique cutané, la mélanocytose oculo-palpébrale (naevus d'Ota), le xeroderma pigmentosum et un phototype clair (dont les iris clairs)(Branisteanu et al., 2021). La présence d'un naevus choroïdien au fond d'œil, bien que fréquent puisque rencontré dans 8% de la

population générale, constitue un facteur de risque avec un risque cumulé de transformation de MU de 0,2% à 1% (Chattopadhyay et al., 2016).

### **1.1.2. Diagnostic**

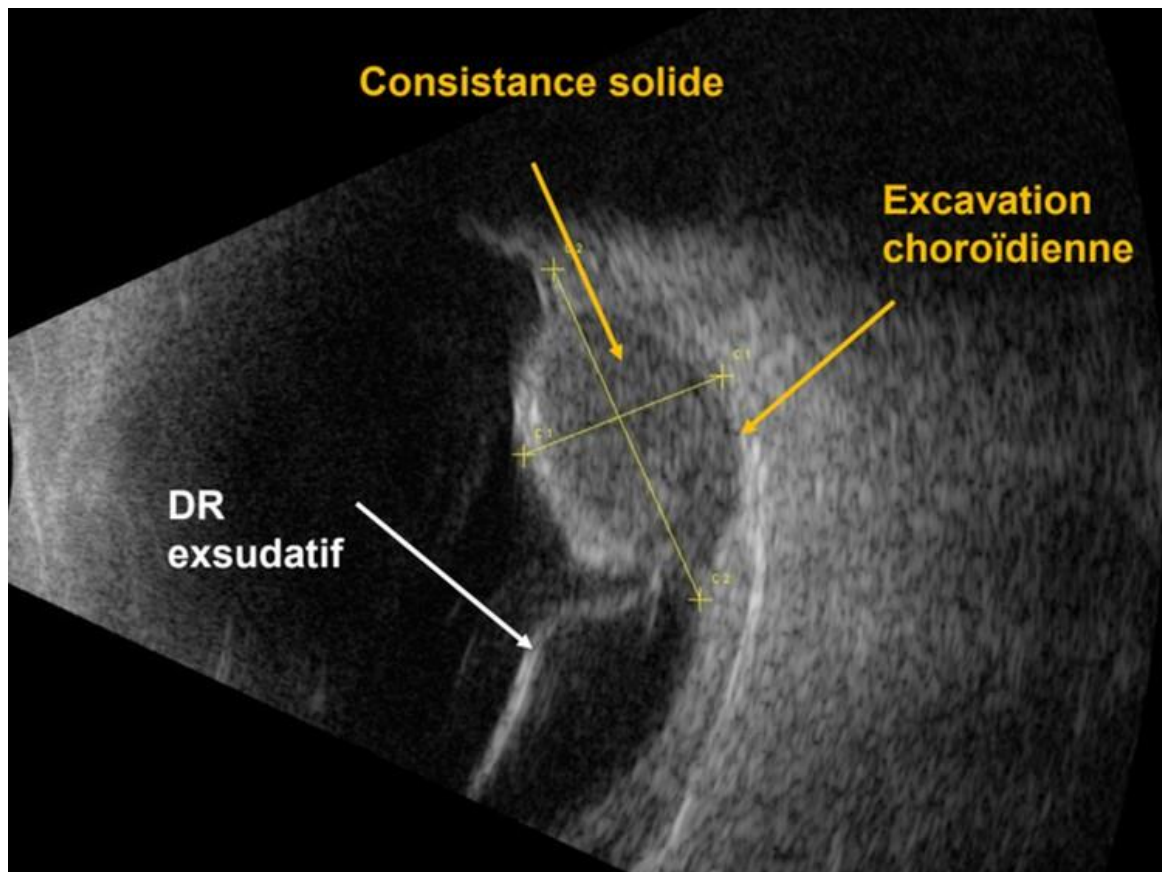
Le diagnostic est généralement posé au stade de primitif oculaire, exceptionnellement au stade métastatique (moins de 4% des cas)(Smit et al., 2020). Les symptômes dépendent de la localisation du MU. Les MU localisés au niveau de la choroïde peuvent être longtemps asymptomatiques et découverts de manière tout à fait fortuite au cours d'un examen du fond d'œil. Les principaux symptômes sont la baisse d'acuité visuelle, les métamorphopsies, les photopsies ou encore les amputations du champ visuel. Les MU siégeant au niveau des corps ciliaires se compliquent plus volontiers de cataracte, de douleurs en rapport avec un glaucome par fermeture de l'angle ou pigmentaire voire d'une extension extra-oculaire visible. Enfin, les MU d'origine irienne peuvent être dépistés par le patient lui-même ou son entourage (modification de la couleur des yeux) ou au cours d'un examen ophtalmologique standard.

Le diagnostic est réalisé, au mieux, dans un centre de référence ou de compétence en onco-ophtalmologie. Le fond d'œil retrouve une masse choroïdienne, souvent pigmentée bien que des lésions achromes soient présentes dans 10% des cas (**Figure 1**).



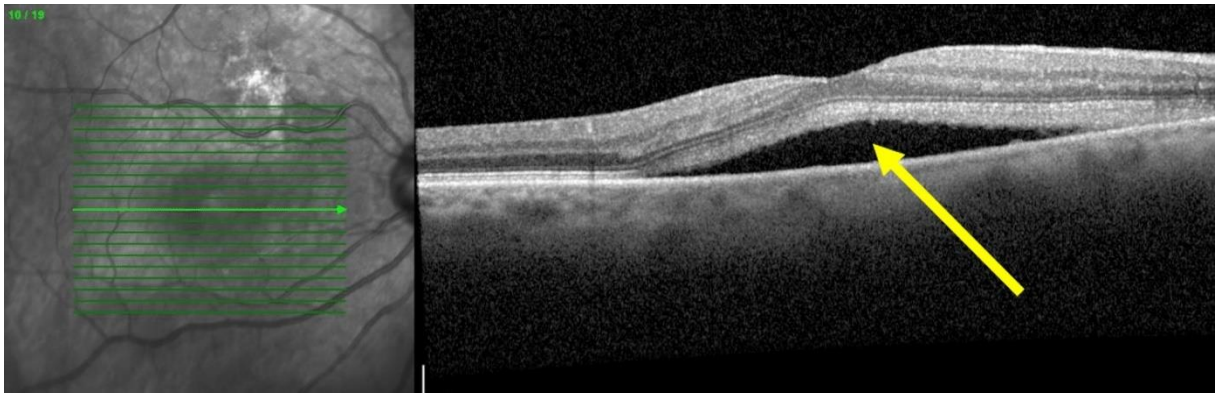
**Figure 1** : volumineux MU compliqué de décollement de rétine exsudatif.

L'échographie en mode A met en évidence une décroissance de l'échogénicité assez typique. L'échographie en mode B identifie une lésion classiquement hypo ou iso-échogène ainsi qu'une excavation choroïdienne évocatrice. L'échographie, quand réalisée par un praticien entraîné, constitue l'examen de référence (**Figure 2**). L'échographie est également indispensable pour l'évaluation de la réponse tumorale post traitement après protonthérapie.

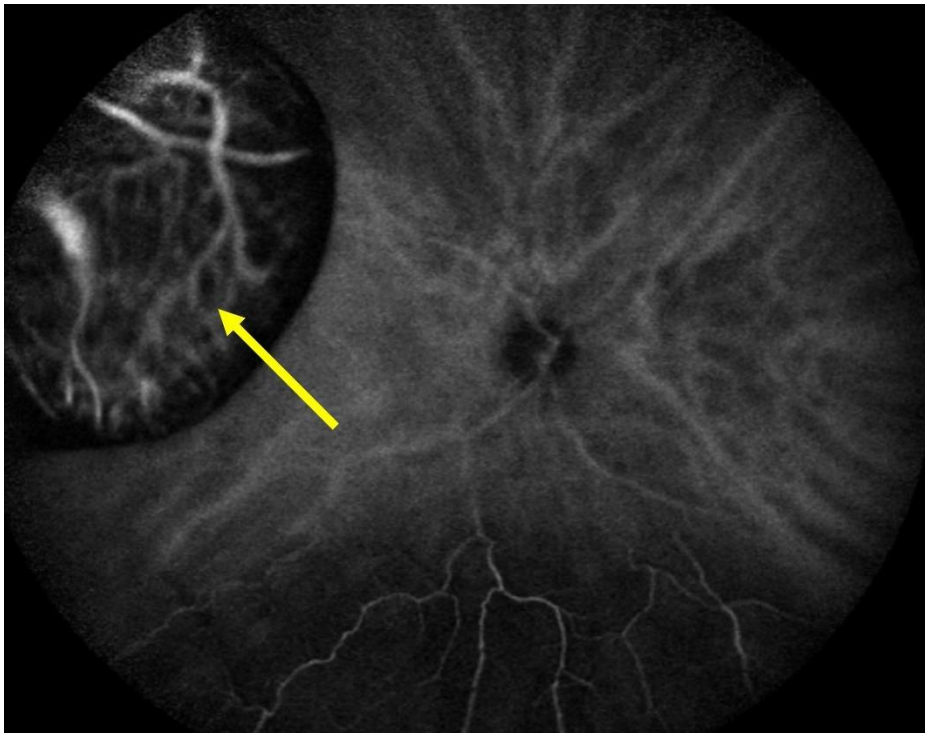


**Figure 2** : échographie oculaire en mode B d'un mélanome choroidien. Avec l'aimable autorisation du Dr NAHON-ESTEVE (membre du DOON, [www.cancerdesyeux.fr](http://www.cancerdesyeux.fr)). DR : décollement de rétine.

L'OCT confirme la nature choroïdienne de la lésion et permet de mieux identifier le liquide sous rétinien (**Figure 3**). L'angiographie à la fluorescéine, l'angiographie au vert d'indocyanine et plus récemment l'OCT-angiographie retrouvent une double vascularisation témoignant du processus de néovascularisation autonome tumorale (**Figure 4**). L'IRM orbitaire n'est généralement pas utile, sauf en cas de doute sur une extension au niveau du nerf optique.



**Figure 3 :** OCT d'un mélanome choroidien avec mise en évidence d'un décollement séreux rétinien (flèche jaune). Avec l'aimable autorisation du Dr NAHON-ESTEVE (membre du DOON, [www.cancerdesyeux.fr](http://www.cancerdesyeux.fr)).



**Figure 4 :** angiographie rétinienne au vert d'indocyanine (ICG) d'un mélanome choroidien montrant sa vascularisation intrinsèque (double vascularisation, flèche jaune). Avec l'aimable autorisation du Dr NAHON-ESTEVE (membre du DOON, [www.cancerdesyeux.fr](http://www.cancerdesyeux.fr)).

Différencier un naevus bénin d'un MU de petite taille est compliqué. Plusieurs critères composites (cliniques + imagerie) ont été développés pour aider l'ophtalmologiste. Les critères de « TFSOM » édités par Shields et al. au début des années 2000 permettent de guider le praticien (Shields et al., 2004) :

- T =thickness > 2 mm en échographie en mode B,
- F = fluid (décollement séreux rétinien) à l'OCT,
- S = symptoms (baisse d'acuité visuelle < 4/10<sup>e</sup>)
- O = orange pigment
- M = Melanoma hollow à l'échographie oculaire

L'évolutivité des lésions sur 2 examens différents (augmentation de diamètre et d'épaisseur) est un critère de malignité majeur à prendre en compte. Une augmentation de taille de plus de 1,8 mm / an est particulièrement suspect.

D'autres critères ont plus récemment été édités en 2021 avec une excellente sensibilité (>99%) : critères « MOLES » (Al Harby et al., 2021) :

- M : Mushroom shape (aspect champignon)
- O : Orange pigment
- L : Large tumor size
- E : Enlarging tumor
- S : Subretinal fluid

Contrairement à un grand nombre de cancers, le diagnostic de MU est uniquement posé sur les données de l'examen clinique et de l'imagerie. Aucune biopsie tissulaire n'est nécessaire avant de traiter les patients pour plusieurs raisons :

(i) une étude du groupe COMS (Collaborative Ocular Melanoma Study) a montré que la pertinence du diagnostic clinique et paraclinique était de 99% sur pièce d'énucléation ("Accuracy of diagnosis of choroidal melanomas in the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 1," 1990). Et pourtant, cette étude avait été conduite en 1990, avant les progrès technologiques en matière d'imagerie ophtalmologique. Cela laisse penser que le diagnostic est extrêmement fiable quand effectué par des onco-ophtalmologues entraînés ;

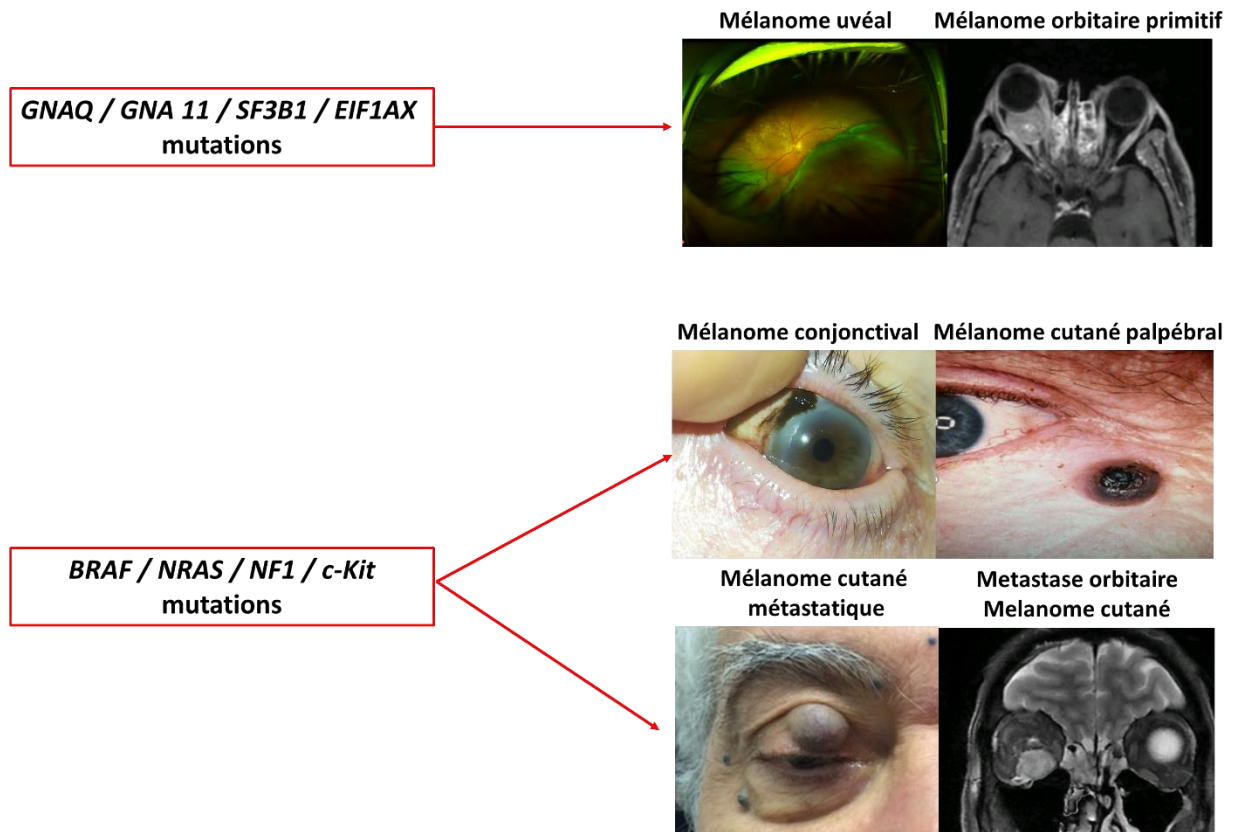
(ii) les biopsies tissulaires, qu'elles soient réalisées par voie trans-sclérale ou trans-vitréennes, sont associées à un risque de dissémination extra-oculaire, à des complications intra-oculaires comme l'hémorragie intra-vitréenne ou le décollement de rétine et à un taux élevé de biopsie non contributive (biopsie blanche)(Frizziero et al., 2019).

Le contexte, l'examen clinique et les examens complémentaires d'imagerie permettent en général d'éliminer les diagnostics différentiels comme les métastases choroïdiennes, les hématomes, les hémangiomes, les tumeurs vasoprolifératives périphériques ou encore la maladie de Coats.

### **1.1.3. Genèse tumorale**

Ces dernières années ont été marquées par de nombreux progrès dans la compréhension de la tumorigénèse du MU (Pandiani et al., 2017). La région péri oculaire est une région unique puisque de très nombreux mélanomes peuvent s'y développer. Citons par exemple le MU, le mélanome conjonctival, le mélanome cutané palpébral, le mélanome orbitaire primitif et la métastase orbitaire de mélanome cutané (**Figure 5**). Bien que tous ces mélanomes soient « géographiquement » et « anatomiquement » très proches les uns des

autres (à quelques centimètres voire millimètres près), ils partagent des mutations génétiques parfois radicalement différentes (Rodrigues et al., 2019).



**Figure 5 :** diversité génétique des mélanomes péri-oculaires avec profil mutationnel.

Il est désormais bien établi que la génétique du MU est radicalement différente de celles du mélanome cutané ou du mélanome conjonctival (Rodrigues et al., 2019). En effet, les mutations « *drivers* » BRAF, NRAS, KRAS, c-Kit et NF1 retrouvées dans les mélanomes cutanés et conjonctivaux sont classiquement absents du MU (Brouwer et al., 2022; Pandiani et al., 2017). Cela explique pourquoi le MU ne répond pas aux traitements par thérapie ciblée anti BRAF ou anti MEK utilisées dans le mélanome cutané métastatique (Pandiani et al., 2017).



Considéré comme peu mutagène, probablement en raison de la barrière hémato-oculaire, le MU présente cependant certaines mutations assez typiques, certaines également retrouvées dans les nævi choroïdiens. Il existe plusieurs mutations activatrices et inactivatrices à l'origine de l'oncogenèse puis de l'agressivité du MU. Des mutations activatrices de certains proto-oncogènes au niveau des protéines G de surface GNAQ-GNA11 sont retrouvées dans plus de 80% des MU (Chattopadhyay et al., 2016). Ces mutations sont mutuellement exclusives entre elles et surviennent précocement dans le processus tumoral (Onken et al., 2008). Plus rarement, d'autres mutations de la voie Gα11/Q (mutations PLCB4-CYSTLR2) peuvent survenir. Dans tous les cas, l'activation des protéines de surfaces GNA permet l'activation de plusieurs voies de signalisation intra cellulaires comme la voie des MAP kinases et la voie de signalisation Hippo (Pandiani et al., 2017). Plus tard dans la tumorigénèse, d'autres mutations vont survenir et détermineront l'agressivité du MU et sa propension à disséminer. Les mutations SF3B1 et EIF1AX sont retrouvées dans 20% des MU environ et seraient associées à un meilleur pronostic (Smit et al., 2020). La perte d'expression de l'anti-oncogène BAP-1 situé sur le chromosome 3 et impliqué dans la voie des ubiquitines a été corrélée négativement au pronostic avec risque accru de dissémination métastatique (Smit et al., 2020).

#### **1.1.4. Evolution et pronostic**

La dissémination métastatique du MU s'effectue uniquement par voie hématogène (Chattopadhyay et al., 2016). Pour des raisons encore incomplètement élucidées, le foie constitue le principal site métastatique avec près de 90% des cas de métastases. La présence de métastases synchrones au moment du diagnostic est exceptionnelle (moins de 4% des cas)(Smit et al., 2020). Malgré une meilleure compréhension moléculaire et génétique du MU, on estime qu'environ 50% des patients présentant un MU développeront des métastases dans

les 10 ans suivant le diagnostic (Singh et al., 2011). Ce chiffre demeure inchangé depuis plus d'un demi-siècle, ce qui explique la complexité et la gravité du MU. La plupart des métastases surviennent durant les 5 premières années de suivi. Plusieurs facteurs ont été associés à un risque accru métastatique et sont résumés dans le **Tableau 1** (Lamas et al., 2021).

Actuellement, les données génétiques et chromosomiques constituent les facteurs pronostiques les plus fiables et les plus reproductibles. La classification chromosomique de Trolet est basée sur les altérations chromosomiques identifiées sur pièce tumorale (Trolet et al., 2009). La perte du chromosome 3 et la trisomie du chromosome 8 (gain 8q) ont été associées à un haut risque métastatique (Cassoux et al., 2014). A contrario, un gain isolé du chromosome 6p est de bon pronostic (Trolet et al., 2009). Un profilage génétique (GEP : Gene Expression Profiling) basé sur le screening d'un panel de 12 gènes a également été développé et permet de distinguer les patients ayant un risque métastatique faible (MU de classe 1) de ceux ayant un risque métastatique élevé (MU de classe 2) (Onken et al., 2012). Ce test est commercialisé aux Etats-Unis sous le nom de DecisionDx-UM® (Castle Biosciences, Friendswood, TX). De manière intéressante, les MU de classe 1 sont plus souvent associées aux mutations SF3B1 et EIF1AX de bon pronostic, alors que les MU de classe 2 sont plus volontiers associées aux mutations inactivatrices de BAP 1 (Smit et al., 2020).

Cependant, l'évaluation de ces facteurs chromosomiques et génétiques ne peut s'effectuer que sur du tissu tumoral, principalement après une énucléation. Par conséquent, ces données ne sont que rarement disponibles notamment pour les patients traités de manière conservatrice (i.e. sans énucléation).

En fonction du risque métastatique, une surveillance du risque métastatique est mise en place dès le diagnostic et repose sur la prescription d'une IRM ou échographie hépatique tous les 3 à 6 mois pendant au moins 10 ans.

<b>Clinique</b>	<b>Histologie</b>	<b>Chromosomique</b>	<b>Génétique</b>
Age élevé	Cellules épithélioïdes ou mixtes	Perte complète du Chromosome 3	MU de Classe 2 (GEP)
Sexe masculin	Atteinte des corps ciliaires	Gain 8q	Mutation BAP-1
Grande taille tumorale (épaisseur > 8 mm), stades T3 et T4 (TNM)	Perte de l'expression immunohistochimique de BAP-1		
	Extension extra sclérale		
	Envahissement des veines vortiqueuses		
	Emboles vasculaires		
	Engainement nerveux		
	Présence de macrophages ou lymphocytes associés à la tumeur		
	Nécrose tumorale		

**Tableau 1** : facteurs associés à un risque accru de dissémination métastatique du MU. GEP :

Gene Expression Profile.

### **1.1.5. Traitement**

Le traitement oculaire du MU dépend principalement de la taille tumorale et du pronostic visuel. Les tumeurs de petite taille et de taille intermédiaire (épaisseur < 12 mm, diamètre < 20 mm) sont traitées de manière conservatrice par radiothérapie ou brachythérapie (radiothérapie de contact). En France, le principal traitement est la protonthérapie. La

protonthérapie permet de distribuer un faisceau de protons de manière extrêmement ciblée selon un pic de Bragg et est associée à un taux de contrôle tumoral sur le plan local > 90% à 5 ans (Caujolle et al., 2013). Certaines tumeurs de grande taille, avec conservation visuelle possible, peuvent également bénéficier d'un traitement conservateur avec des bons résultats sur le plan tumoral (Bensoussan et al., 2016), même si des injections intra vitréennes répétées d'anti VEGF s'avéreront nécessaires pour prévenir au mieux le syndrome de lyse tumorale (Bensoussan et al., 2016).

En cas de MU de grande taille ou en cas de dissémination tumorale intraoculaire, une prise en charge non conservatrice par énucléation est recommandée. Dans certains cas, une énucléation secondaire, c'est-à-dire réalisée après réalisation d'un premier traitement conservateur, peut être indiquée en cas de récurrence tumorale post radique, de perforation oculaire post radique ou de complications douloureuses (glaucome néo vasculaire par syndrome de lyse)(Singh et al., 2011).

La prise en charge des métastases hépatiques ou systémiques n'est pas consensuelle et dépend de l'expérience de chaque centre. Les résultats sont particulièrement décevants, avec un décès survenant de manière quasi systématique dans les 2 ans suivant le diagnostic de métastase, quel que soit le traitement réalisé (Rantala et al., 2022). On distingue les traitements hépatiques ciblés (chimio-embolisation hépatique, hépatectomie partielle) des traitements systémiques (Reichstein et al., 2022). Les immunothérapies dites « *conventionnelles* » anti PD-1 et anti CTLA-4 utilisées notamment dans le mélanome cutané métastatique restent particulièrement décevantes dans le MU. Le tebentafusp, une immunothérapie bispécifique (TCR-anti-CD3) ciblant la glycoprotéine de surface Gp 100 a récemment suscité de l'espoir en montrant une amélioration statistiquement significative de la survie globale comparativement aux patients traités par immunothérapie anti PD-1 / anti

CTLA-4 (Nathan et al., 2021). Cependant, plusieurs limites peuvent être soulignées : (i) le tebentafusp ne peut être administré qu'aux patients positifs au HLA-A\*02:01, (ii) la survie globale à 1 an, bien qu'améliorée, reste décevante (73% versus 59%), (iii) enfin, les résultats à moyen terme (3-5 ans) ne sont pas encore disponibles.

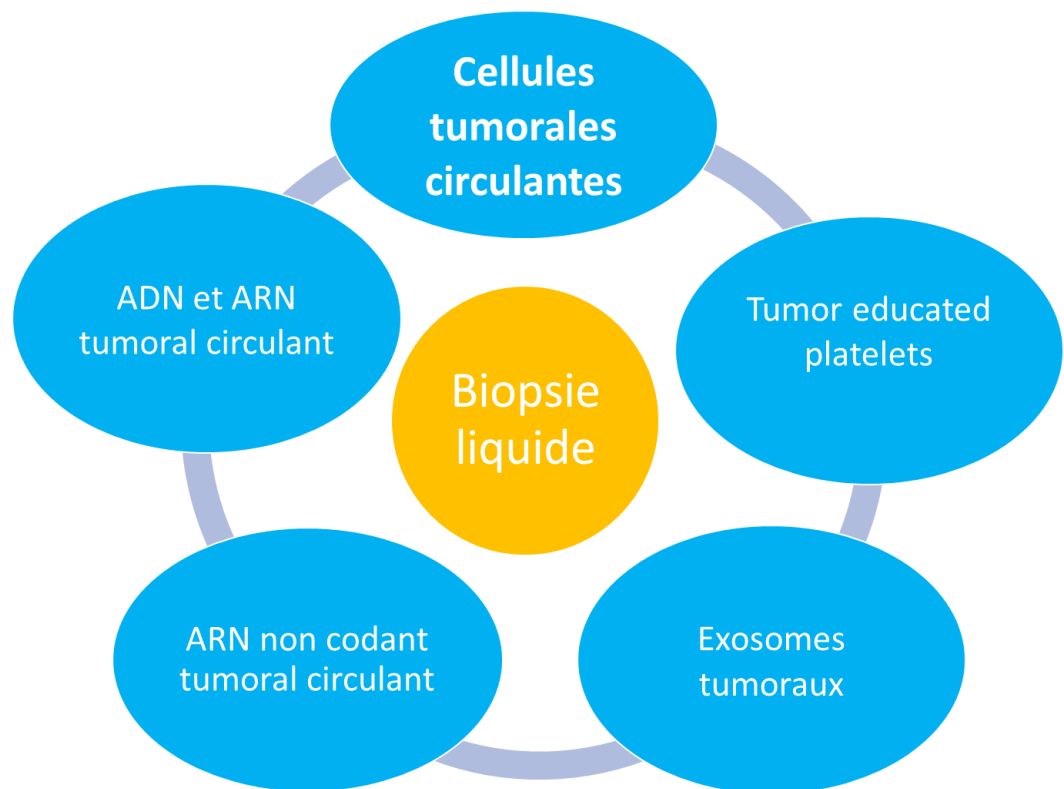
#### **1.1.6. Challenges**

Les deux principaux défis dans le MU sont sa détection la plus précoce possible et le traitement de sa dissémination métastatique. A l'heure actuelle, compte tenu de la difficulté à développer un traitement efficace au stade métastatique, la voie thérapeutique la plus prometteuse est probablement de débiter un traitement avant la survenue de la métastase chez les patients les plus à risque. Ce traitement pourrait permettre d'éradiquer d'éventuelles cellules tumorales circulantes (CTC). Plusieurs études ont entrepris la prescription de traitements adjuvants chez des patients à haut risque métastatique (Chattopadhyay et al., 2016). Une étude publiée en 2018 avait pour la première fois retrouvé une amélioration de la survie globale chez des patients présentant un MU à haut risque métastatique (perte du chromosome 3 + gain 8q ou profile génomique de Classe 2 ou taille T3/T4 selon la classification TNM) traités par sunitinib (inhibiteur de la tyrosine kinase) de manière adjuvante au traitement oculaire (Valsecchi et al., 2018). Bien que ces résultats ne se soient pas confirmés à plus long terme, un traitement adjuvant au moment du traitement du primitif oculaire apparaît justifié. L'utilisation du tebentafusp chez des patients à la fois éligibles et à haut risque métastatique pourrait être prochainement étudié.

## 1.2. Les biopsies liquides (BL)

### 1.2.1. Les différentes biopsies liquides (BL)

Les BL consistent à prélever un liquide biologique, le plus souvent du sang veineux par simple prise de sang, afin de faire le diagnostic, le pronostic voire le suivi thérapeutique d'un cancer. A partir du liquide prélevé, plusieurs paramètres peuvent être monitorés : les Cellules Tumorales Circulantes (CTCs), l'ADN tumoral circulant (ctDNA), l'ARN tumoral circulant (ctRNA), l'ARN tumoral non codant (nc-ARN), les exosomes et les Tumor Educated Platelets (TEP)(Poulet et al., 2019)(Figure 6).



**Figure 6** : les différentes composantes de la biopsie liquide à visée tumorale.

### 1.2.1.1. Les cellules tumorales circulantes (CTCs)

Les CTCs représentent des cellules tumorales vivantes capturées dans un liquide donné. Elles auraient été identifiées pour la première fois en 1869 par Ashworth mais ont réellement été recherchées dans les années 1990. Les CTCs représentent une fraction de la tumeur primitive ayant acquis des caractéristiques pro-métastatiques et en transit dans la circulation sanguine. Les CTCs seraient le reflet le plus direct des mutations cytogénétiques de la cellule tumorale en cours de transit métastatique (Lin et al., 2021). Plusieurs modifications permettent à la cellule tumorale de métastaser, notamment la transition épithélio-mesenchymateuse (TEM). Une fois dans la circulation sanguine, une grande partie des CTCs serait détruite en raison des turbulences hémodynamiques de la circulation sanguine et du système immunitaire. Seul un faible nombre de CTCs survivra, notamment grâce à de multiples interactions avec les éléments figurés du sang comme les PNN ou les plaquettes (Heeke et al., 2019) et gagneront leur site métastatique ou rentreront en état de dormance tumorale (stade de quiescence)(Asnaghi et al., 2015).

Les CTCs ont principalement été étudiées comme facteur pronostic dans de multiples cancers solides comme le cancer pulmonaire, prostatique, le cancer du sein ou encore le cancer colo-rectal (Poulet et al., 2019). Capturer une CTC, l'isoler puis la révéler à partir d'une simple prise de sang est un processus complexe, parfois fastidieux et non standardisé (Ju et al., 2022). Schématiquement, 3 phases doivent être distinguées (**Tableau 2**) :

- *La phase pré-analytique* : elle consiste à capturer la CTC et à l'isoler des éléments figurés du sang. Plusieurs méthodes sont possibles et consistent soit en un isolement des CTCs grâce à un marquage spécifique (système immunomagnétique consistant à enrichir sélectivement les CTCs en les capturant grâce à un système de micro-billes aimantables), soit un isolement des CTCs grâce à leur propriétés physiques (système

microfluidique consistant à isoler les CTCs en se basant sur leurs propriétés élastiques et mécaniques) soit en une détection directe sur filtre. Actuellement, seul le système d'isolation immunomagnétique CellSearch (Menarini Silicon Biosystems, Florence, Italie) a reçu l'agrément de la FDA (Food and Drug Administration) dans le pronostic des cancers prostatiques, colorectaux et mammaires et représente, de facto, le gold standard (Ferreira et al., 2016).

- La phase analytique : elle consiste à révéler la CTC isolée. Plusieurs techniques d'énumération sont possibles. L'isolement immunomagnétique est actuellement la technique la plus utilisée dans le MU, grâce à l'utilisation d'un ou plusieurs anticorps spécifiques du mélanome. Les marqueurs généralement recherchés sont MCAM, MSCP, gp100.
- La phase post-analytique : elle consiste à réaliser des analyses complémentaires sur les CTCs isolées telles que de la cytogénétique, de la protéomique, du transcriptomique, voire de la culture cellulaire ouvrant ainsi la voie à des modèles de xenogreffe chez l'animal (CDX / Cell Line-Derived) (Suvilesh et al., 2022).



Phase	Phase pré-analytique	Phase analytique	Phase post-analytique
Exemples	Méthode d'Immunoaffinité avec des stratégies d'enrichissement positives ou négatives (technologie immunomagnétique, microfluidique...)	Immunofluorescence Immunocytochimie Cytométrie en flux	Génomique Transcriptomique Proteomique
	Méthode biophysique basée sur: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Taille</li> <li>○ Deformabilité</li> <li>○ Densité</li> <li>○ Microfluidique</li> <li>○ Electrophorese</li> </ul>	Spectrométrie Impédance électrique	Culture cellulaire Xenogreffe (CDX)

**Tableau 2** : les différentes phases dans l'étude des CTCs.

Les CTCs ont l'avantage de représenter une fraction vivante de la tumeur et de mieux refléter les anomalies moléculaires à l'origine de la dissémination métastatique. Elles reflètent aussi l'hétérogénéité tumorale, et l'évolution spatio-temporelle de clones tumoraux pour aider à prédire les clones cellulaires résistants. Enfin, elles offrent des possibilités post-analytiques uniques notamment la mise en culture cellulaire voire la xénogreffe (CDX). Cela explique pourquoi les CTCs représentent le paramètre le plus fidèle et prometteur des BL (Poulet et al., 2019). Les principaux inconvénients des CTCs sont actuellement le manque de standardisation préanalytique et analytique concernant leur capture et leur identification ainsi que la complexité méthodologique rendant leur utilisation en pratique clinique quotidienne difficile (Ferreira et al., 2016).

### **1.2.1.2. L'ADN tumoral circulant (ct-DNA) et l'ARN tumoral circulant (ct-RNA)**

Les ctDNA sont de petits fragments d'ADN tumoral retrouvés dans le sang suite à l'apoptose ou la nécrose des cellules tumorales, ou activement sécrétées par les cellules tumorales, reflétant ainsi les altérations génétiques de la tumeur à un moment donné chez un patient. (Rostami et al. 2020). Des études ont montré que les mutations identifiées dans le ctDNA reflètent celles de la tumeur primaire (Calapre et al. 2019 ; Kidess et al. 2015). Dans le MU, plus de 95 % des patients présentent des mutations récurrentes mutuellement exclusives affectant GNA11 (Q209, R183), GNAQ (Q209, R183), PLC $\beta$ 4 (D630) ou CYSLTR2 (L129) (Robertson et al., 2017). Bien que ces mutations n'aient pas de valeur pronostique, elles permettent de détecter le ct-DNA chez la plupart des patients, en utilisant une approche ciblée (Beasley et al., 2018). Dans le MU, le ctDNA est détectable chez les patients présentant des métastases (Beasley et al. 2018 ; Bidard et al. 2014), mais également chez les patients avec une tumeur non métastatique (Beasley et al., 2023). Contrairement aux CTCs, détecter et amplifier le ct-DNA relève de méthodologies plus standardisées. Les principales limites de la détection du ct-DNA sont le risque de fausse positivité lors de l'amplification par PCR, l'impossibilité de savoir si l'ADN identifié provient d'une CTC ou d'une cellule tumorale primitive apoptotique, et enfin l'impossibilité de procéder à des culture cellulaire ou greffe (Poulet et al., 2019). Les résultats du taux de détection du ct-DNA dans le MU sont pour l'instant variables selon les études (selon méthodologies utilisées, cohortes de patients). L'utilité des ct-DNA dans le MU est également actuellement controversé selon les

études, mais il apparaît que le ct-DNA aurait une valeur pronostique sur la survie meilleure que les CTC (Bidard et al., 2014).

Le ctRNA offre la possibilité de détecter l'expression transcriptionnelle des gènes mais l'ARN circulant n'est pas stable dans le sang, souvent très peu abondant et de mauvaise qualité. Dans le MU, il a été utilisé comme marqueur indirect des CTCs. Actuellement les études s'orientent plutôt vers la recherche de techniques optimisées pour exploiter le ctRNA que sur l'impact diagnostique ou pronostique de ce marqueur (Solé et al., 2019).

### **1.2.1.3. Les micro-ARN tumoraux non codants (mi-RNA) circulants (cmiRNA)**

Les mi-RNA correspondent à une fraction de l'ARN ne codant aucune protéine mais permettant de favoriser ou de réprimer l'expression génétique. En fonction de leur taille, on distingue les micro-ARN (mi-RNA) qui mesurent moins de 22 nucléotides et les longs ARN non codants (plus de 200 nucléotides). A ce jour, plus de 1500 mi-RNA ont été identifiés chez l'homme et joueraient un rôle pivot dans l'oncogenèse en régulant positivement ou négativement certains proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs (Poulet et al., 2019). Les miRNA peuvent être sécrétés dans les fluides extracellulaires et acheminés vers les cellules cibles par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires, notamment les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques, dans diverses conditions physiologiques et pathologiques, ce qui leur permet de fonctionner comme des messagers chimiques. Les mi-RNA circulants peuvent être isolés dans de nombreux fluides biologiques (plasma, sang total...) (Seyhan, 2023). Dans le MU, la mise en évidence de cmiRNA est actuellement mal

standardisé sur le plan méthodologique, et les résultats obtenus sont actuellement difficilement comparables et reproductibles (Beasley et al., 2022).

#### **1.2.1.4. Les exosomes tumoraux**

Les exosomes sont de minuscules (de l'ordre du nanomètre) vésicules extracellulaires relâchées dans la circulation par une multitude de cellules, dont les cellules cancéreuses. Les exosomes contiennent de l'ADN, de l'ARN, des miARN et des protéines (Möller and Lobb, 2020). Les exosomes permettraient de protéger les acides nucléiques de la dégradation et du système immunitaire durant leur trajet dans la circulation sanguine notamment.

Les exosomes joueraient un rôle dans l'oncogenèse en régulant le micro-environnement tumoral (Poulet et al., 2019). Ils joueraient également un rôle pivot dans la dormance tumorale, la réactivation tumorale et sa dissémination métastatique dans certains organes cibles (Martel et al., 2020a). Il existe actuellement peu de preuves de l'utilité clinique des exosomes dans le MU et de futures études seront nécessaires.

#### **1.2.1.5. Les tumour educated-platelets (TEP)**

Les plaquettes constituent les deuxièmes cellules les plus représentées dans la circulation sanguine. Plusieurs études observationnelles de grande taille ont constaté que la dissémination métastatique serait réduite chez les patients traités par anti-agrégants plaquettaires (In 't Veld and Wurdinger, 2019). Dès lors, le rôle des plaquettes dans la dissémination métastatique a été évoquée. Les TEP correspondent à une fraction des plaquettes sanguines dévolues à la réactivation des cellules tumorales en dormance (Poulet et al., 2019). Certains auteurs ont démontré qu'une partie des CTCs de MU effectuaient leur

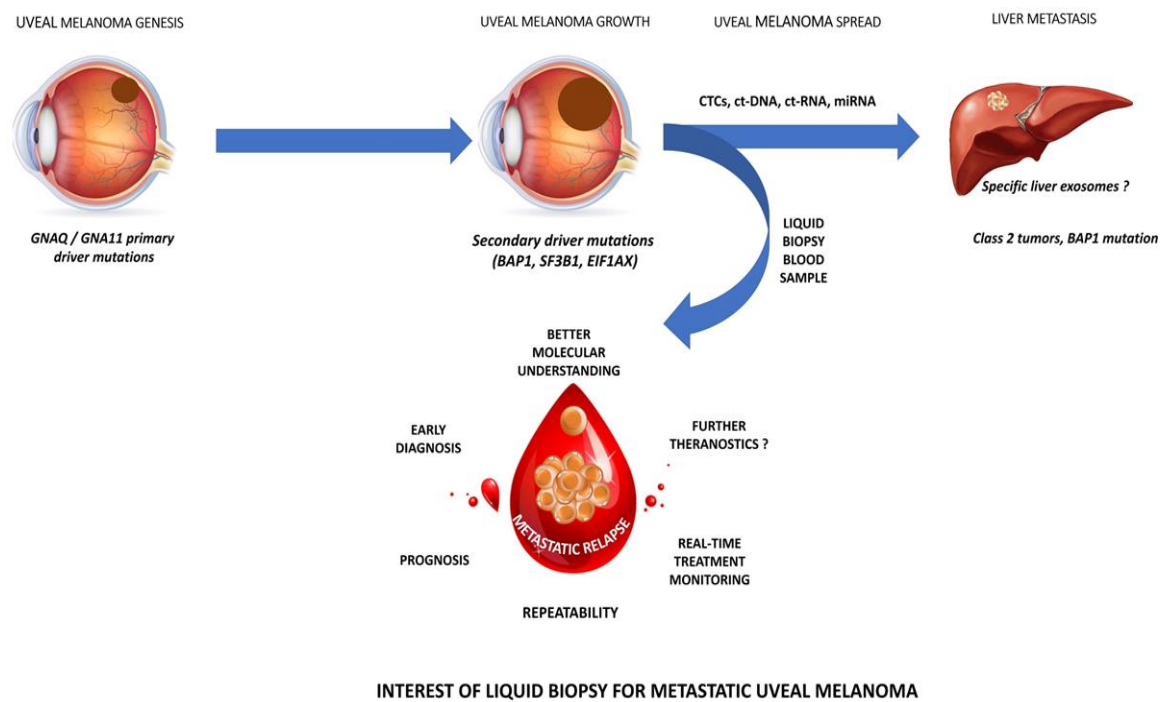
« hibernation », c'est-à-dire leur dormance tumorale, dans la moelle osseuse (Eide et al., 2009). Elles seraient alors en interaction étroite avec certains éléments figurés du sang, dont les plaquettes, produites justement au niveau de la moelle osseuse.

### **1.2.2. Rationnel des biopsies liquides dans le mélanome uvéal**

Les BL apparaissent particulièrement intéressantes dans le MU pour plusieurs raisons

**(Figure 7) :**

- (i) Le MU métastase uniquement par voie hématogène et est donc accessible à une simple prise de sang.
- (ii) Aucune biopsie tissulaire n'est réalisée en routine dans le MU. La biopsie tissulaire est peu rentable en raison de la faible quantité de tissu prélevé, fait courir le risque d'une dissémination extra-oculaire, et est associé à un taux important de complications intra-oculaires (Frizziero et al., 2019). Une BL permettrait de confirmer le diagnostic et surtout obtenir des données cytogénétiques habituellement manquantes en pratique quotidienne ce qui permettrait une meilleure stratification du risque métastatique.
- (iii) La BL est une technique simple et peu invasive.
- (iv) La BL pourrait permettre un diagnostic plus précoce des MU de petite taille dont un doute persiste avec un naevus choroïdien bénin (Grisanti et al., 2023).
- (v) La BL peut être répétée dans le temps : au moment du diagnostic, du suivi voire de la dissémination métastatique. Cette répétition des prélèvements dans le sang pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de dormance tumorale, de réactivation tumorale et de dissémination, notamment hépatique.

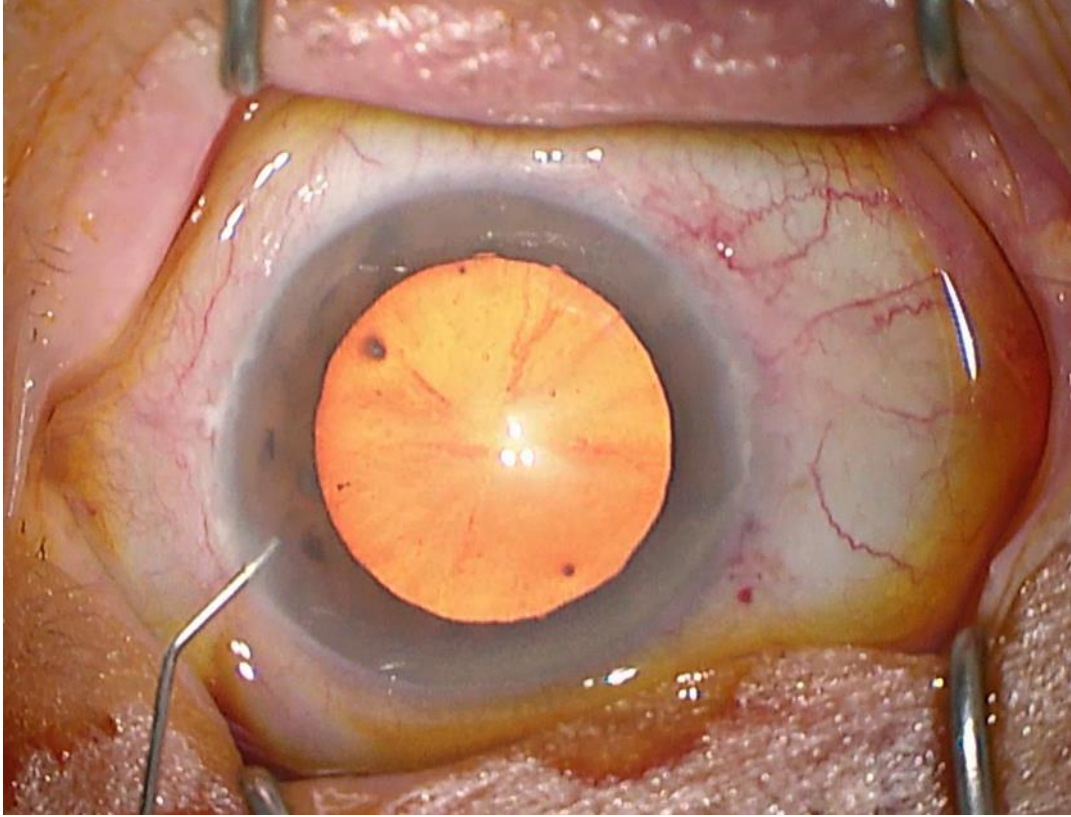


**Figure 7** : intérêt de la biopsie liquide dans le MU.

Dans le MU, 2 milieux liquidiens apparaissent particulièrement intéressants et complémentaires à étudier : l’humeur aqueuse (HA) et le sang veineux.

### 1.2.2.1. L’humeur aqueuse (HA)

L’HA est produite par les corps ciliaires, remplit la chambre antérieure de l’œil puis s’évacue par le trabéculum et le réseau veineux supra choroïdien. La ponction de chambre antérieure (PCA) est un geste simple réalisé dans une salle dédiée en consultation permettant de collecter de manière peu invasive l’HA et de réaliser plusieurs analyses (bactériologiques, virales, cytokiniques mais également tumorale) (**Figure 8**).



**Figure 8 :** photographie montrant la réalisation d'une PCA. Après incision cornéenne périphérique, une canule est insérée et permet d'aspirer l'humeur aqueuse située entre la cornée et l'iris.

A l'instar du MU, le rétinoblastome de l'enfant est une tumeur intraoculaire dont le diagnostic est uniquement clinique, sans nécessité de réalisation d'une biopsie tissulaire. Dans le rétinoblastome de l'enfant, plusieurs équipes ont démontré la présence de ct-DNA dans l'HA. Le monitoring du Ct-DNA intraoculaire permet de réaliser le diagnostic, mais surtout le suivi évolutif sous traitement par la répétition des PCA (Raval et al., 2022). Contrairement au MU, le rétinoblastome de l'enfant ne dissémine que rarement par voie hématogène. Cela explique

pourquoi la sensibilité de la PCA est supérieure à celle de la prise de sang veineuse dans le rétinoblastome (Berry et al., 2020). En se basant sur les travaux réalisés dans le rétinoblastome, plusieurs équipes ont également montré l'intérêt de la recherche de ct-DNA dans l'HA de patients présentant un MU (Im et al., 2022). Ces études ont permis l'identification de ct-DNA intraoculaire, en particulier après radiothérapie (probable relargage tumoral post apoptotique) mais ont également permis l'identification de mutations initiatrices (mutations GNAQ-GNA11) et pronostiques (mutation BAP-1)(Im et al., 2022). A terme, la principale indication de la PCA serait probablement une aide diagnostique en cas de lésion pigmentée intraoculaire dont il est difficile d'affirmer cliniquement et par imagerie multimodale s'il s'agit d'un naevus atypique ou d'un MU de petite taille. Cependant, il est important de souligner que les mutations initiatrices GNAQ-GNA11 sont également retrouvées dans les naevi choroïdiens. A ce jour, aucune étude n'a comparé le ct-DNA collecté dans l'HA dans des lésions choroïdiennes pigmentées bénignes versus malignes.

#### **1.2.2.2. Biopsie veineuse**

Si l'HA constitue une BL plutôt à visée diagnostique, la BL veineuse est quant à elle plutôt réalisée à visée pronostique. Le principal défi dans le MU étant la dissémination métastatique hématogène, le sang veineux apparaît comme le compartiment de choix à monitorer. Bien qu'une étude ait démontré une meilleure sensibilité dans la détection des CTCs du sang artériel en comparaison au sang veineux dans le MU (Terai et al., 2015), une des caractéristiques des BL doit rester leur caractère faiblement invasif, raison pour laquelle la quasi-totalité des études portent sur une prise de sang veineuse. Plusieurs études ont étudié l'intérêt de la BL dans le MU. La recherche des CTCs et du ct-DNA chez les patients présentant un MU est présentée dans l'article N°1 (voir Partie III-Résultats).

De l'ensemble de ces études, nous pouvons retenir les points suivants :



- (i) Les CTCs et le ct-DNA sont détectés chez les patients présentant un MU primitif et métastatique mais pas chez les patients contrôles (patients sains ou présentant des lésions choroïdiennes pigmentées bénignes / naevus). La spécificité de la BL semble donc bonne.
- (ii) Le taux de CTCs et de ct-DNA est généralement plus importante chez les patients présentant un MU métastatique comparativement à ceux présentant un MU uniquement localisé à l'œil.
- (iii) Selon les études, le ct-DNA semble mieux corrélé que les CTCs à certains marqueurs histo-pronostiques
- (iv) Concernant la détection des CTCs dans le MU, il n'y aucun consensus concernant le système de capture idéal (immunomagnétisme, microfluidique, par taille) ni sur la méthode d'identification la plus adaptée (immunofluorescence, immunocytochimie...). Dans certaines études, la détection des CTCs apparait assez expérimentale et non transférable à la pratique clinique quotidienne.

## **PARTIE II - OBJECTIFS DE LA THESE**

Les objectifs de ce travail de thèse étaient les suivants :

1. Tout d'abord, nous avons réalisé une revue de la littérature sur les BL dans le MU. L'objectif était de synthétiser les connaissances actuelles sur le sujet, de cerner les limites actuelles, de déterminer quel compartiment des BL était le plus prometteur (CTC, ct-DNA...) et de mettre en place un protocole de recherche dont la principale caractéristique serait sa réalisation en pratique clinique quotidienne (Martel et al., 2020b).
2. Nous avons ensuite cherché à déterminer la meilleure méthodologie pour isoler puis identifier les CTCs de MU. Pour cela, nous avons comparé 4 systèmes d'isolement des CTCs in vitro en utilisant une lignée de MU métastatique à la fois dans du milieu de conservation cellulaire et dans du sang veineux de volontaires sains. Nous avons comparé le rendement de chaque plateforme mais également pris en compte plusieurs caractéristiques intrinsèques comme la durée de traitement par plateforme, la reproductibilité, la facilité d'utilisation et l'application potentielle en pratique clinique quotidienne (Martel et al., 2023b).
3. Une fois la meilleure technique identifiée, nous avons appliqué notre méthodologie à nos patients présentant un MU primitif et métastatique. Avant de débiter cette étude prospective, plusieurs conditions devaient être mises en place. Une convention entre le CHU de Nice et le Centre Antoine Lacassagne avec respect de l'anonymat des patients en accord avec la réglementation en vigueur a été signée. L'étude a été déclarée et approuvée par les autorités sanitaires Françaises. Un financement a été

obtenu auprès du GIRCI (Groupements Interrégionaux pour la Recherche Clinique et l'Innovation) méditerranée et de la Fondation des Aveugles de Guerre. Par ailleurs, l'utilisation de prélèvements sanguins à visée de recherche nécessite à la fois le consentement des patients, mais également une biobanque dédiée et certifiée pour cette activité. Depuis plusieurs années, une collection dédiée à l'ophtalmologie a été mise en place au sein de la biobanque du LPCE. Au cours de mon travail de thèse, et conscient qu'un travail de recherche translationnelle réalisé à partir d'échantillons biologiques d'origine humaine reposait grandement sur la qualité de ces échantillons, nous avons également réalisé un travail de synthèse sur l'ensemble des prélèvements d'onco-ophtalmologie stockés dans notre biobanque, visible sur le site <https://biobank-cotedazur.fr> (Martel et al., 2023a)

4. Enfin, nous avons rédigé un protocole de recherche des CTCs chez nos patients présentant un MU primitif et métastatique. L'inclusion a duré 2 ans, de septembre 2021 à septembre 2023. L'objectif était d'inclure 50 patients présentant un MU et 5 patients constituaient un groupe contrôle sain. Des résultats préliminaires de cette étude seront présentés dans la discussion de ce travail de thèse.

## **PARTIE III- RESULTATS**

### **3.1. Biopsies liquides en onco-ophtalmologie : état des lieux.**

Nous avons réalisé une revue de la littérature sur les BL en onco-ophtalmologie (Martel et al., 2020b). Cet article avait pour but de synthétiser les données actuelles relatives à la BL dans le MU, d'étudier les différentes méthodologies employées et leurs limites et de déterminer, in fine, la méthodologie la plus adaptée en vue d'une application clinique en pratique quotidienne chez nos patients présentant un MU primitif et métastatique. Un résumé synthétique de l'article est présenté ci-dessous.

#### **3.1.1. Résumé de l'article**

##### **3.1.1.1. CTCs et MU**

- Plusieurs auteurs ont étudié les CTCs dans le MU. La plupart des prélèvements étaient veineux (entre 4ml et 10 ml de sang). Le processing des tubes de sang était rapide, généralement dans les 4 heures compte tenu de la fragilité des CTCs. Dans certains cas, la recherche des CTCs pouvait être réalisée dans les 72 heures suivant le prélèvement en utilisant des tubes de sang avec milieu protecteur (tubes CellSave pour l'utilisation du CellSearch). Cette analyse « *différée* » est intéressante dans le cadre de potentielles études multicentriques (Bidard et al., 2014). Les deux plateformes les plus utilisées étaient la plateforme immunomagnétique CellSearch (Menarini Silicon Biosystems, Florence, Italie) et la plateforme ISET (Rarecells, Paris, France) basée sur la taille des CTCs. La définition d'une CTC est quasi unanime dans toutes les études. Il s'agit d'une cellule isolée ou en cluster (CTM = circulating tumour microemboli = agrégats d'au

moins 3 CTCs), de taille  $> 16 \mu\text{m}$ , de forme ronde ou ovale, avec un ratio nucléocytoplasmique  $> 50\%$  et positif à la méthode de révélation utilisée (immunofluorescence, immunocytologie, immunomagnétisme...). Dans certains cas, des marqueurs négatifs (CD34, CD45) sont également nécessaires et permettent d'éliminer certains éléments figurés du sang (leucocytes, macrophages, cellules endothéliales)(Andree et al., 2016).

- Les principaux marqueurs positifs utilisés étaient Melan A (également appelé MART-1), HMW-MAA (également appelé MCSP), GP-100.
- La sensibilité des CTCs dans le MU apparaît variable d'une étude à l'autre. Cela peut être expliqué par des méthodologies de capture et d'identification différentes, par des populations d'étude différentes (inclusion de MU primitif ou métastatique ou les deux) et par un nombre de prélèvement variable d'une étude à l'autre (d'un seul prélèvement à un instant « *t* » versus multiples prélèvements au cours du suivi). Les taux de détection étaient compris entre 1,6% et 93,6% (Eide et al., 2009; Tura et al., 2014). Le nombre médian de CTCs retrouvées se situait entre 1 et 8, ce qui est plus faible que dans beaucoup d'autres tumeurs solides (Martel et al., 2020b).
- La détection sanguine des CTCs pourrait également aider au diagnostic des MU de petite taille. Dans une étude récente publiée en 2023, une équipe Allemande a identifié des CTCs chez environ 50% des patients présentant un MU de petite taille avec épaisseur  $< 2,5 \text{ mm}$  et diamètre  $< 10 \text{ mm}$  (Grisanti et al., 2023).
- La spécificité des CTCs dans le MU est excellente. Ulmer et al. ont identifié des CTCs chez 19 / 52 patients (19%) mais chez aucun des 20 contrôles (Ulmer et al., 2008). Donc la détection des CTCs pourrait permettre de distinguer un MU d'un naevus choroidien bénin. Mazzini et al, en utilisant la technologie ISET, ont détecté des CTCs chez 55%

des patients présentant un MU contre 0% chez les patients présentant un naevus (Mazzini et al., 2014).

- Il n'y a pas de consensus concernant un éventuel lien entre la détection des CTCs et la présence de facteurs histo-pronostiques défavorables. Certaines études retrouvaient une relation entre CTCs et grande taille tumorale, MU de Classe 2 et dissémination métastatique alors que d'autres études n'observaient pas de lien histo-pronostique (Martel et al., 2020b).
- Peu d'études ont réalisé des analyses complémentaires à partir des CTC isolées. Seule l'équipe de Tura et al. a recherché la présence de la monosomie 3 reconnue comme étant de pronostic péjoratif sur les CTCs isolées (Grisanti et al., 2023; Tura et al., 2014).

### **3.1.1.2. Ct-DNA et ct-RNA dans le MU**

- Dans un premier temps, la RT-PCR a été utilisée pour détecter l'ARNm spécifiques des cellules circulantes de MU. Ces études ont ciblé la tyrosinase, MART1 et gp100. En général, le ctRNA a été associée à un pronostic péjoratif. Cependant, bien que la RT-PCR soit une technique relativement simple pour déduire indirectement l'existence de CTC, elle ne fournit pas d'informations phénotypiques ou génotypiques sur les CTC et ne permet pas de différencier les CTC de l'ARN circulant.
- Le ct-DNA dans le MU a été moins étudié que les CTCs. L'ADN était extrait à partir de 6ml à 50 ml de sang veineux. Les principales cibles moléculaires amplifiées étaient les mutations activatrices GNAQ, GNA11, PLC $\beta$ 4 et CYSLTR2.
- La positivité du ct-DNA était de 1,1% à 97% et dépendait principalement de la population d'étude et de la répétition ou pas des prélèvements sanguins dans le temps (Martel et al., 2020b). Le taux de ct-DNA ou ct-RNA était corrélé à la sévérité de la maladie avec des taux plus importants détectés en cas de dissémination métastatique

(Bidard et al., 2014). Une étude récente a montré que le taux pré opératoire de ct-DNA était corrélé à la récurrence locale et la survie globale chez des patients opérés de métastase hépatique de MU (Mariani et al., 2023). La même étude a également constaté un relargage sanguin du ct-DNA 48h après traitement chirurgical de la métastase hépatique (Mariani et al., 2023), ce qui n'avait pas été le cas dans l'étude de Charitoudis et al. qui ne retrouvait aucune augmentation du taux de ct-DNA après traitement chirurgical oculaire (Charitoudis et al., 2016).

- Contrairement aux CTCs, le ct-DNA n'est pas spécifique car parfois détecté dans certains naevi choroidiens (Bustamante et al., 2021).
- Une seule étude, celle de Bidard et al. publiée en 2014, comparait CTCs et ct-DNA dans le MU (Bidard et al., 2014). Les CTCs (isolées par le système CellSearch) et le ct-DNA (cibles moléculaires GNAQ-GNA11) étaient corrélés à la dissémination métastatique, à la progression sans décès et à la survie globale dans l'analyse univariée. Mais dans l'analyse multivariée, seul le ct-DNA corrélé à la survie et à la mélanome hépatique. Cette étude tend à affirmer la supériorité du ct-DNA en termes de pronostic global.

### **3.1.1.3. Autres composantes des biopsies liquides**

- Seule la détection des mi-RNA a véritablement été étudiée dans la littérature. Stark et al. ont identifié un panel de 6 mi-RNA particulièrement prévalents dans le MU (mi-RNA 16, 145, 146a, 204, 211, 363-3p). D'autres études ont confirmé la détection du mi-RNA 146a dans le MU métastatique, en faisant un potentiel biomarqueur. La principale limite des mi-RNA réside dans le grand nombre d'études identifiant de nombreux mi-RNA « *prometteurs* » sans qu'une étude parvienne à confirmer les résultats de la précédente. Cela est probablement expliqué par le grand nombre de mi-

RNA à explorer (plus de 1500). Une autre limite est l'absence d'explication réelle de l'action des mi-RNA sur le métabolisme du MU. Certaines études ont montré que le mi-RNA-34a, réduit dans le MU, est impliqué dans l'inhibition l'oncogène c-MET (Martel et al., 2020b). Toutes ces raisons expliquent, qu'à l'heure actuelle, le dosage des mi-RNA n'est ni réalisé ni recommandé en pratique clinique quotidienne.

- Peu d'études se sont intéressées aux exosomes dans le MU. L'étude de Ragusa et al. (Ragusa et al., 2015) a montré une augmentation du mi-RNA 146 a (précédemment identifié dans les études sur les mi-RNA sériques) contenu dans des exosomes intravitréennes chez des patients présentant un MU.
- A ce jour, aucune étude n'a investigué les TEP dans le MU. Leur rôle est pour l'instant spéculatif.

#### **3.1.1.4. Conclusions et perspectives**

- A partir de cette revue, il apparaît que la BL pourrait permettre une meilleure compréhension globale de l'oncogenèse mais surtout de la dissémination métastatique du MU à plusieurs moments clés :
  - La détection des CTCs, du ct-DNA voire de certains mi-RNA en intra-oculaire par simple PCA ou par prélèvement veineux pourrait permettre un diagnostic ultra précoce des MU de petite taille en cas de doute diagnostique avec un naevus choroïdien bénin.
  - Lors du traitement du primitif oculaire, la détection sanguine des CTCs et du ct-DNA pourrait permettre d'établir le risque métastatique du patient. En cas de haut risque métastatique, une inclusion dans un essai thérapeutique impliquant un traitement systémique adjuvant pourrait s'avérer intéressant.



- A l'issue de cette revue, nous avons déterminé que la détection des CTCs dans le sang veineux était la technique de BL la plus prometteuse. Cependant, cette revue ne nous a pas permis de déterminer une méthode de référence pour l'isolation et la détection des CTCs.

### **3.1.2. Article N°1 : Liquid biopsy for solid ophthalmic malignancies: an updated review and perspectives.**

Arnaud MARTEL<sup>1,4</sup>, Stephanie BAILLIF<sup>1</sup>, Sacha NAHON-ESTEVE<sup>1</sup>, Lauris GASTAUD<sup>2</sup>, Corine BERTOLOTTO<sup>3</sup>, Barnabé ROMEO<sup>4,5</sup>, Baharia MOGRABI<sup>4,5</sup>, Sandra LASSALLE<sup>4,5,6</sup>, Paul HOFMAN<sup>4,5,6</sup>

From:

1. Cote d'Azur University, Ophthalmology department, University Hospital of Nice, 06 000 Nice, France
2. Oncology Department, Antoine Lacassagne Cancer Centre, 06 000 Nice, France
3. Université Nice Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06 200 Nice, France
4. Cote d'Azur University, CNRS UMR7284, Inserm U1081, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), FHU OncoAge, 06 000 Nice, France
5. Antoine Lacassagne Cancer Center, FHU OncoAge, 06 000 Nice, France.
6. Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, University Hospital of Nice, FHU OncoAge and Biobank BB-0033-00025, IRCAN, 06 000 Nice, France

Corresponding authors:

Sandra LASSALLE, MD, PhD ; Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Pasteur 1 Hospital, 30 voie romaine, 06000 Nice, France E-mail address: lassalle.s@chu-nice.fr; Phone number: +33 4 92 03 88 55

Paul HOFMAN, MD, PhD ; Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Pasteur 1 Hospital, 30 voie romaine, 06000 Nice, France E-mail address: hofman.p@chu-nice.fr; ; Phone number: +33 4 92 03 88 55

### *Simple summary*

To date, there is no treatment for metastatic uveal melanoma. Identifying its metastatic spread is essential. Liquid biopsy can allow early identification of patients at risk of metastatic spread. Here, we aim to summarize the current knowledge on liquid biopsy in ophthalmic malignant tumors, including uveal melanoma. Our objective is to establish the current state of liquid biopsy in the ophthalmic field as well as its perspectives and limitations.

### *ABSTRACT*

A tissue biopsy is considered to be the gold standard when establishing a diagnosis of cancer. However, tissue biopsies of intraocular ophthalmic malignancies are hard to collect and are thought to be associated with a non-negligible risk of extraocular dissemination. Recently, the liquid biopsy (LB) has emerged as a viable, non-invasive, repeatable, and promising way of obtaining a diagnosis, prognosis, and theragnosis of patients with solid tumors. LB refers to

blood as well as any human liquid. The natural history of uveal melanoma (UM) and retinoblastoma (RB) are radically opposed and are accessible to venous blood and aqueous humor liquid biopsy, respectively. Herein, we summarize the current knowledge concerning LB in UM, RB, conjunctival tumors, and choroidal metastases. We also develop the current limitations encountered as well as the perspectives.

Keywords: liquid biopsy, circulating tumor cells, circulating tumor DNA, uveal melanoma, retinoblastoma

## **1. INTRODUCTION**

Tissue biopsy is still considered to be the gold standard for establishing the diagnosis of cancer. However, a tissue biopsy is rarely repeatable over time [1], sometimes associated with significant morbidity, and contraindicated in several malignancies [2]. Recently, the FDA approved the use of Liquid biopsy (LB) as a pertinent diagnosis, prognosis, and monitoring tool [3], [4] in Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) to avoid invasive tissue biopsy in selected cases [5]. Compared to tissue biopsy, LB has indeed the advantages of being non-invasive, collected from multiple body fluids such as blood, urine, saliva, cerebrospinal fluid, and aqueous humor [6]. At molecular diagnosis, LB allows the detection of several biomarkers such as circulating tumor cells (CTC), circulating tumoral DNA (ct-DNA), circulating tumoral RNA (ct-RNA), micro RNA (miRNA), tumor-related exosomes (TRE), and tumor-educated platelets (TEP) [5].

Retinoblastoma (RB) and uveal melanoma (UM) are the most common primary intraocular tumors in childhood and adulthood, respectively [2], [7]. Conversely to other cancers, a tissue

biopsy is usually not readily available in intraocular malignancies. Intraocular biopsy carries the risks of irreversible intraocular damages, tumoral dissemination, and low sensitivity rates due to the low amount of tissue harvested [8], [9]. Therefore, RB and UM are usually treated based on clinical and radiological findings without histological tissue confirmation [10]. This could explain why LB has gained in clinical practice in intraocular malignancies.

Interestingly, RB and UM highlight two radically opposed LB paradigms. RB is an intraocular tumor encountered in children that develops intraocularly even in advanced stages. Metastasis and relapse are exceptional, and the prognosis is currently excellent [2]. UM is encountered in adult patients, develops intraocularly but early disseminates in the bloodstream. It is estimated that about half of the patients will develop further metastases and will die in the next 24 months despite achieving local control of the tumor [7]. Based on these clinical features, RB is more eligible to an “ocular LB,” whereas UM is more eligible to a “systemic LB.”

This review aims to summarize the current knowledge on LB in solid ocular malignancies, its limitations, and future perspectives. This review will focus on UM, RB, conjunctival malignancies, and choroidal metastases. Intraocular and adnexal lymphomas are excluded from the field of this review.

## **2. LIQUID BIOPSY IN UVEAL MELANOMA (UM)**

UM is the most common primary intraocular tumor encountered in adulthood [7]. Local treatments include proton beam therapy and brachytherapy for small to medium-sized tumors, and enucleation of the eyeball for larger tumors. UM diagnosis is based on clinical and B-scan ultrasonography findings. Transscleral and intravitreal UM biopsies have proven to be

challenging, associated with low positivity rates, intraocular complications, and extraocular tumor spread [11]. To date, the main indication for performing a tissue biopsy is to assess whether the patient is at low or high metastatic risk [12]. It has been demonstrated that around 80% of UM harbor GNAQ and GNA11 driver mutations [13], which makes UM genetics radically different from cutaneous and even conjunctival melanomas [14]. Monosomy of chromosome 3 and loss of expression of BAP1 have been incriminated in tissue samples as major negative prognosis factors [15]–[17]. Local control is achieved in up to 95% of cases, even in larger UM [10]. Synchronous metastatic spread at the time of the primary tumor treatment is an exceptional finding [7]. Despite this, it is estimated that around one third to 50% of the patients will experience a metastatic spread in the ten years following the diagnosis highlighting the concept that UM cells escape from the primary tumor very early and remain in dormancy for a while [18], [19]. It is still unclear whether the liver is the primary metastatic site of UM. Despite a better molecular understanding, no treatment has shown efficacy for treating UM metastases [20]. When metastatic spread occurs, the overall survival (OS) does not usually exceed 24 months [21].

For a few years, attention has been directed to classify UM patients as low or high metastatic risk based on chromosomic and genetic abnormalities. The aim is to detect as early as possible the metastatic spread to include patients in ongoing clinical trials [22].

Identifying a reliable biomarker in UM would be of high clinical relevance. The ideal biomarker should be sensitive, specific, non-invasive, and reproducible [5]. Several pathophysiological factors highlight the fact that LB is a very appealing tool in UM [23]: (i) UM disseminates through the bloodstream many months to years before the local treatment, (ii) LB may provide the missing tumor genetic insights of the primary tumor and in-transit metastases, and (iii) given the lack of effective treatment on UM liver metastases, early LB detection of UM spread may

improve patient management with a quicker referral of the patient to clinical trials. Venous LB includes the detection of circulating tumor cells (CTCs), circulating tumoral DNA (ct-DNA) or RNA (ct-RNA), noncoding micro RNA (mi-RNA), tumor-related exosomes (TRE) and tumor educated platelets (TEP).

### 2.1. Circulating Tumor Cells (CTCs)

CTCs were identified for the first time in 1869 by Ashworth, who identified tumor cells in the bloodstream of a freshly dead patient. However, the concept of CTCs detection emerged during the 1990s. CTCs are thought to originate from the most invasive clones of the primary malignancy or its metastases [24]. CTCs may allow a better understanding of the underlying metastatic cascade (Figure 1). Table 1 summarizes the primary studies which investigated CTCs in UM patients.

Authors	Year	Study population	Number of patients	CTC isolation method and device	CTC identification	Mean CTC (range)	Main findings	Follow-up: months (range)
Anand et al.	2019	Primary and metastatic UM	39 patients 20 primary UM 19 metastatic UM	Immunomagnetism Cellsearch	Cellsearch protocol: DAPI+ HMW- MAA+ CD146+ CD45- CD34-	5.9 (1-38)	At initial sampling: CTC detected in 14 out of 39 (36%) patients. CTC detected in 6/20 (30%) primary UM and 8/19 (42%) metastatic UM During the follow-up period: CTC detected in 21/39 (54%) of patients CTC were more likely detected in Class 2 UM (83%)	16.4
Tura et al.	2016	Primary UM	44 UM patients	Immuno-FISH isolation	NKIC3 and MCSP antibodies	Median: 2.4 (0-10.2) Median CTC in Monosomy 3 patients: 3.4 (0.7-10.2) Median CTC without Monosomy 3: 1.2 (0.3-8.4)	CTC detected in 40/44 (91%) patients Monosomy 3 detected in 23/40 (58%) patients Monosomy 3 on CTC associated with a higher TNM stage (T3)	48
Bande et al.	2015	Primary UM Uveal naevi	12 patients 8 primary UM 4 uveal naevi	Immunomagnetism CellSearch	Cellsearch protocol: DAPI+ HMW- MAA+ CD146+ CD45- CD34-	UM: 1 (0-3)	CTC detected in 50% of UM patients and 0% in uveal naevi No relationship between CTC detection and the UM clinical-pathological features	25 (16-27)
Terai et al.	2015	Metastatic UM	17 patients 10 hepatic metastases 7 extra hepatic metastases	Immunomagnetism CellSearch	Cellsearch protocol: DAPI+ HMW- MAA+ CD146+ CD45- CD34-	Arterial: median 5 (1-168) Venous: median 1 (0-5)	No morphological difference between CTC collected through the arterial and venous route Arterial blood: CTC detection in 100% of cases Venous blood: CTC detection in 52.9% of cases No correlation between CTC number and number and size of metastases	None
Tura et al.	2014	Primary UM	31 patients	Immunomagnetism Immunobeads	2 antibodies: NKI/C3, NKI/beteb	Median 3.5 (0-10.2)	CTC detected in 29/31 (93.6%) of patients No correlation between the CTC count and clinical parameters	None
Mazzini et al.	2014	Primary UM Metastatic UM Uveal nevi	31 UM 10 uveal nevi	Isolation by size ISET	Antibodies anti S100, anti MART-1 and anti-tyrosinase	Median 8 (2-50)	CTC detected in 17/31 (55%) of UM patients. No CTC detected in uveal nevi patients No correlation between clinical and biological parameters and CTC positivity Detection of >10 CTC associated with a larger basal diameter, tumor height, disease free survival and OS	24-60
Bidard et al.	2013	Metastatic UM	40 patients	For CTC detection: Immunomagnetism Cellsearch  For ctDNA detection: BiPAP technique with	Cellsearch protocol: DAPI+ HMW- MAA+ CD146+ CD45- CD34-	0 CTC: 70% ≥1 CTC: 30% 1 CTC: 10% 3 CTC: 15% 12 CTC: 2.5% 20 CTC: 2.5%  DNA quantity:	Liver miliary associated with higher ctDNA levels and CTC counts Correlation between CTC, ctDNA and tumor volume assessed by liver MRI Univariate analysis: CTC and ctDNA positivity associated with PFS and OS Multivariate analysis: only ctDNA was associated with PFS and OS	8 (median)



				3 mutations screening: GNAQ c.626A>T, GNAQ c.626A>C and GNA11 c.626A>T		Median: 4.1ng/ml (0.5-512)		
<b>Pinzani et al</b>	2010	Primary UM Healthy Controls	41 primary UM 16 controls	mRNA detected by RT-PCR (41 patients) CTC: isolation by size using ISET device (16 patients) Blood samples repeated every 6 months	CTC morphology: cell size >16-micron, nucleocytoplasmic ratio > 50%, irregular nuclear shape, hyperchromatic nucleus, and basophilic cytoplasm	PCR: median: 0.8 cell equivalent /ml of blood (0.1-14.4) ISET: 5.8, 2.33, 2.00, 1.25, and 0.75 CTC/ml	RT-PCR positivity in 20/41 (49%) of patients among at least one of the blood samples PCR positivity associated with decreased PFS and OS CTC detected in 5/16 (31%) patients Tyrosinase level correlated with CTC detection	55
<b>Suesskind et al</b>	2009	Primary UM	81 primary UM 94 samples before/after treatment	Immunomagnetism MACS	MCSP antibody	Preoperative median CTC count: 1 (1-8) Post treatment: median CTC count: 7.5 (1-26)	CTC count before and after treatment (enucleation =7, radiotherapy stereotaxic =49, endoresection =19, brachytherapy =15, thermotherapy=4) Before treatment: CTC detected in 13/94 (14%) of patients After treatment: CTC detected in 9/94 (10%) of patients No significant difference in terms of the CTC count before and after treatment No relationship between the CTC positivity and patient characteristics and metastatic status	16 (median)
<b>Eide et al</b>	2009	Primary UM	328 patients	Immunomagnetism	Several anti-melanoma antibodies (9.2.27 anti melanoma-associated antibody, IgG1 Ep-1 antibody, 376.96 antibody)	Median cells number: 50 (1-500)	CTC detected in 4/328 (1,6%) patients Tumor cells detected in 98/328 (29,9%) patients in bone marrow No relationship between bone marrow tumor detection and further metastatic spread	60
<b>Ulmer et al</b>	2008	Primary UM Healthy controls	52 primary UM before treatment 20 healthy controls	Immunomagnetism MACS	MCSP antibody	Median: 2.5 (1-5) for 50 ml	CTC detected in 10/52 (19%) of patients No CTC detected in controls CTC positivity associated with ciliary body invasion, advanced local tumor stage and anterior tumor localization Multivariate analysis: only ciliary body involvement associated with CTC positivity	None

Table1: Summary of the main studies investigating circulating tumor cells in uveal melanoma

UM: Uveal Melanoma, NR: Not reported, DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, HMW-MAA: Human high molecular weight-melanoma-associated antigen, OS: Overall survival, PFS: Progression Free survival, MCSP: Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan, MACS: Magnetic Activated Cell Sorting

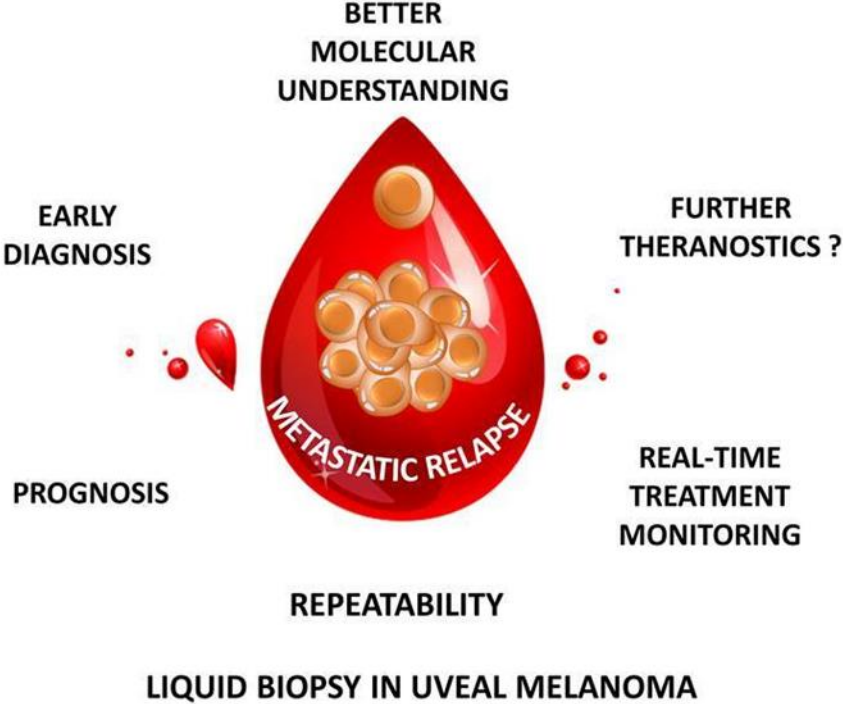
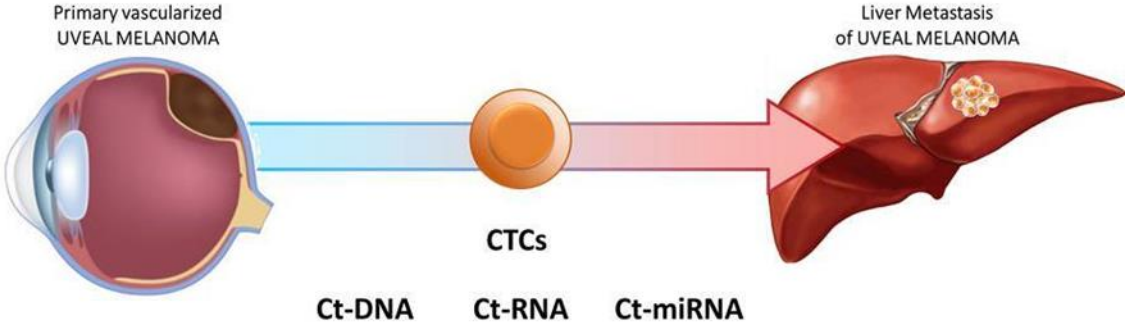


Figure legend:

Interest of liquid biopsy for uveal melanoma. CTCs: circulating tumor cells, ct-DNA: circulating tumor DNA, ct-RNA: circulating tumor RNA, ct-miRNA: circulating mi-RNA

### 2.1.1. CTC isolation

In agreement with previous studies on other solid cancers, most UM studies have considered the venous blood for collecting CTCs. Only one study compared the venous versus the arterial way for collecting CTCs and concluded that arterial samples achieved higher CTCs identification rates (100%) compared to venous samples (52.9%)[25]. However, arterial samples can be associated with increased patient's discomfort and may exceptionally provide complications such as bleeding, ischemia, pseudoaneurysms, and fistula formation [26].

CTCs were collected from blood samples (from 7.5 ml to 50 ml) in combination with anticoagulant agents (heparin or EDTA). CTCs process was performed up to 72 hours following the collection [27], [28]. Immunomagnetic and sizing methods mainly collect CTCs with Cellsearch, which is the only FDA approved CTC collector device [25], [27]–[29]. The advantages of the Cellsearch device include reproducibility even if a lack of sensitivity has been highlighted by several authors [5]. Two studies reported the use of the ISET device [30], [31].

### 2.1.2. CTC identification

CTCs may be identified directly or indirectly. Direct identification is allowed by microscopic examination. UM CTCs are defined as single cells or clusters measuring  $> 16 \mu\text{m}$ , with an oval shape, a nucleocytoplasmic ratio  $> 50\%$ , an irregular and hyperchromatic nucleus, and basophilic cytoplasm [31]. Indirect identification is based on the use of multiple antibodies. Most studies have identified UM CTCs by using the high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA), also called Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP)[23], [25], [27], [28], [32], [33]. The Cellsearch circulating melanoma cell test also stains the cells with CD45 and CD34 antibodies to rule out leukocyte and endothelial cell detection [27]. Tura et al. reported high CTC detection rates using NKI/C3 and NKI/beteb antibodies [34]. Mazzini et al. used anti-S-100, anti-tyrosinase, and anti-MART1 antibodies following ISET filtration for detecting CTC [30]. Regardless of the method, little is known about the UM de-differentiation process during the metastatic spread. So far, most studies argued that screening a combination of surface markers was associated with a more accurate detection rate (3,4).

### 2.1.3. Main clinical findings

CTCs' specificity appears to be reliable. Ulmer et al. were the first in 2008 to investigate CTC detection in UM and healthy patients [32]. By using an immunomagnetic device, they found CTCs in 19 of 52 UM patients (19%), whereas no CTCs were detected among the 20 healthy controls. This result was confirmed by two studies from the same Italian team in 2010 and 2014. Pinzani et al. and Mazzini et al. used the ISET device to detect CTCs in 31% and 55% of their primary and metastatic UM respectively, while no CTCs were detected in their healthy controls [30], [31].

Interestingly, CTC detection appears as being useful for distinguishing benign choroidal naevi from a primary or metastatic UM. By using ISET technology, Mazzini et al. were the first to investigate CTCs in 31 UM and ten benign uveal naevi patients [30]. CTCs were detected in 55% of UM patients, whereas no CTCs were found in uveal naevi patients. Similarly, Bande et al. detected CTCs in 4 of 8 UM patients using the Cellsearch device, whereas no CTC was detected in patients with choroidal naevi [29]. To date, no CTC has never been identified in patients diagnosed with a benign choroidal lesion [29], [30]. Ophthalmologists are sometimes faced with challenging pigmented choroidal lesions [36], and CTCs could help to distinguish benign from malignant lesions.

CTC detection rate is highly variable in the UM literature. The median number of CTCs detected is comprised between 1 [33] and 8 [30], which is relatively low compared to other solid tumors [37]. Suesskind et al. therefore questioned whether surgical manipulation of the primary UM could disseminate CTCs in the bloodstream [33], by taking blood samples before and 30 minutes after the surgery. Even if the median CTC count was more important following surgery (7.5 versus 1), CTCs were detected in 14% and 10% of patients before and postoperatively, respectively. Eide et al. found venous CTCs in only 4 of 328 (1.6%) patients by using an immunomagnetic method despite using multiple anti-melanoma antibodies [38]. By contrast, Tura et al. found CTC in 93.6% of their patients by using an immunomagnetic detection method associated with NKI/C3 and NKI/beteb antibodies[34]. Eide et al. and Terai et al. found a better detection rate when harvesting CTCs from the bone marrow and the arterial bloodstream respectively, compared to the venous compartment [25], [38]. CTC detection rate does not seem to be related to the CTC collection method since immunomagnetic and size isolation devices provided almost the same results [25], [29]–[31]. Of interest, as outlined by some authors, repeating blood samples over follow-up monitoring by using the same method leads to increasing CTCs detection rates [28], [31]. An increased sensitivity rate could explain

this by multiplying the blood samples or by the development of metastatic spread. Anand et al. demonstrated that CTC detection was higher during the metastatic spread (42%) compared to localized tumors (30%)[28].

The relationship between CTCs detection and UM related clinico-biological features is still controversial. CTC detection was found to be correlated with the diameter and height of the primary tumor [30], with ciliary body invasion known to be a pejorative prognosis factor in UM [32], with Class 2 tumors (high-metastatic risk according to the Harbour classification)[28] and with metastatic liver miliary [27]. By contrast, a lot of studies failed to establish any relationship between CTC detection, clinical and biological features [25], [29], [33], [34]. In accordance with several reports in other solid malignancies, Bidard et al. and Mazzini et al. found that CTC detection was associated with lower disease-free survival (DFS) and overall survival (OS)[27], [30]. Monosomy 3 is strongly associated with a poorer prognosis in UM. Interestingly, in 2016 Tura et al. achieved to assess Monosomy 3 status in isolated CTCs by using an immune-Fish isolation technique. Monosomy 3 was found in 23 of 40 (58%) patients and was associated with more advanced TNM stages[34]. CTCs monitoring appears as being a reliable prognostic factor.

## 2.2. Circulating tumoral DNA (ct-DNA) and RNA (ct-RNA)

Cell-free DNA and RNA result from cell apoptosis or necrosis and are often found in the bloodstream under physiological conditions [39]. Among cell-free DNA, circulating tumor DNA (ct-DNA) and RNA (ct-RNA) are thought to originate from the primary tumor itself, the circulating tumor cells, or the micro or macrometastases [1]. Ct-DNA and RNA have been previously validated in several solid malignancies as a reliable diagnosis, prognosis, and disease monitoring tool [24], [40]. Recently, ct-DNA “druggable” mutations have been analyzed for

therapeutic purposes [41]. Only a few studies, summarized in Table 2, have investigated ct-DNA and ct-RNA in UM. Even though ct-RNA is more unstable than ct-DNA, ct-RNA was the most circulating nucleic acid studied in UM.

Authors	Year	Study population	Number of patients	CTC isolation method and device	Main findings	Follow-up: months (range)
<b>Charitoudis et al</b>	2016	Primary UM undergoing surgery	202 patients	RT-PCR screening tyrosinase and MELAN-A/MART-1	RT-PCR tyrosinase positive in 2/184 (1.1%) patients before and 4/180 (2.2%) patients after surgery RT-PCR MELAN-A/MART-1 positive in 20/184 (10.9%) before and in 25/180 (13.9%) patients after surgery RT-PCR results on MELAN-A/MART-1 and Tyrosinase levels were not affected by surgical manipulation	24
<b>Metz et al</b>	2013	Primary and metastatic UM	28 patients	PCR screening GNAQ Q209 (298 bp), GNAQ R183 (212bp), GNA11 Q209 (150 bp), and GNA11 R183 (249 bp)	Oncogenic GNAQ/GNA11 mutations identified in ct-DNA of 9 out of 22 (41%) metastatic patients. ctDNA correlated with the metastatic status ctDNA detected in younger patients with larger metastases	None
<b>Schuster et al</b>	2011	Metastatic UM	68 patients	RT-PCR screening tyrosinase and MELAN-A/MART 1	RT-PCR positive in 43/68 (63%) patients 31 patients positive for tyrosinase 40 patients positive for MELAN-A /MART 1 28 patients positive for both RT-PCR positivity associated with poorer PFS and OS	10 (median)
<b>Schuster et al.</b>	2007	Primary UM	110 patients	RT-PCR screening tyrosinase and MELAN-A / MART1	RT-PCR positive in 11/110 (10%) patients (5 tyrosinase, 5 MALAN-A/MART1, 1 both) No correlation between RT-PCR positivity and clinical features Univariate analysis: relationship between RT-PCR positivity and time to progression and OS RT-PCR positivity indicated an increased risk of metastasis and disease-specific mortality	22 (median)
<b>Callejo et al</b>	2007	Primary UM	30 patients	RT-PCR screening tyrosinase and Melan-A	RT-PCR positive in 29/30 (97%) patients (119 visits, 1360 samples, 2720 PCR performed) No correlation between RT-PCR positivity, tumor size and treatment	NR
<b>Boldin et al</b>	2005	Primary UM	41 patients	RT-PCR screening tyrosinase	RT-PCR positive in 16/41 (39%) patients at baseline 11/16 (69%) patients initially positive were negative after treatment RT-PCR positivity associated with decreased 5-year OS RT-PCR positivity not correlated with tumor size and histology	60-66
<b>Keilholz et al. 2004</b>		Primary and metastatic UM	61 patients 21 primary UM 40 metastatic UM	RT-PCR screening tyrosinase, MELAN-A/MART-1 and GP100	Primary UM: tyrosinase detected in 3 (12.5%) patients, MELAN/MART detected in 1 (4%) patient and GP100 detected in 1 (4%) patient. Metastatic UM: Tyrosinase detected in 24 (60%) patients, Melan/MART 31 (77%) patients and GP100 in 4/26 (15%) patients GP100 positive in 4/40 (10%) samples. Accuracy detection rates: Tyrosinase > Melan > GP100	6

Table 2: Summary of the main studies investigating ct-DNA and ct-RNA in uveal melanoma

RT: Reverse Transcriptase, OS: Overall survival, PFS: Progression Free survival, NR: Not reported

### 2.2.1. Ct-DNA and ct-RNA detection

In all studies, ct-DNA and ct-RNA were extracted from plasma providing from 6 ml to 50 ml of venous blood. The process was based on traditional PCR and RT-PCR techniques. Most studies investigated the tyrosinase and MELAN-A/MART-1 genes [31], [42]–[47]. GNAQ and GNA11 are thought to be the driver and highly prevalent mutations in UM [13]. Therefore, Metz et al. and Bidard et al. investigated GNAQ and GNA11 mutations for the detection of circulating free nucleic acids [27], [48]. Keilholz et al. found higher detection rates by screening tyrosinase over MELAN-A/MART-1 and GP100 [47]. Finally, performing multiple PCR in the same sample improved the ct-RNA detection rate [46].

### 2.2.2. Main clinical findings

To date, no study investigated ct-DNA or RNA detection in non-malignant pigmented uveal lesions. Ct-DNA detection in UM ranged from 1.1% [45] to 63% [44]. In accordance with studies in CTCs, multiplying the samples led to higher detection rates. Callejo et al. attained 97% of ct-DNA positivity thanks to 1360 samples performed in 30 UM patients followed-up over a 17-year-period [46]. In agreement with studies in UM CTCs, metastatic patients were found to have higher ct-DNA detection rates compared to non-metastatic patients [47]. To date, no study found a relationship between ct-DNA detection and the intraocular tumor size or height. Two studies investigated whether the treatment of the intraocular tumor could influence



the detection of ct-DNA. Boldin et al. identified ct-DNA in 16 of 41 (39%) patients preoperatively. During the postoperative follow-up, ct-DNA was no longer detectable in 69% of the previously positive patients [42]. Charitoudis et al. performed a venous blood sample before and 30 minutes after the surgical treatment of the intraocular tumor and failed to identify any ct-DNA release [45].

Not surprisingly, given its role in tumor dissemination, Bidard et al. demonstrated that both CTCs and ct-DNA detection were associated with liver miliary metastatic spread [27]. ct-DNA was found to be strongly associated with reduced Progression-Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) [27], [31], [42]–[44], [48]. Metz et al. reported that ct-DNA detection was associated with larger liver metastases [48]. Bidard et al. aimed to compare ct-DNA and CTCs detection in 40 metastatic UM patients. They monitored CTC by using the Cellsearch device and ct-DNA by screening three different GNAQ and GNA11 mutations. In their univariate analysis, both CTCs and ct-DNA were associated with metastatic spread, PFS, and OS. However, only ct-DNA was found to be correlated with PFS and OS in the multivariate analysis. Further studies with larger samples comparing CTC and ct-DNA are warranted before drawing any conclusion. CTCs and ct-DNA advantages and disadvantages in LB are shown in Table 3.

### 2.3. Noncoding RNAs

There are two types of noncoding RNA based on their size: long and short noncoding RNA, both of which are involved in gene expression regulation.

Micro-RNA (mi-RNA) are small (around 22 nucleotides) noncoding RNAs molecules found in the tissues and the bloodstream [49]. More than 1500 mi-RNA have been identified in humans.

They are involved in the regulation of several biological processes, including post-transcriptional gene expression and cell communication. Mi-RNA act by adding post-transcriptional support in the 3' untranslated region (3'UTR) of their targeted mRNA [50]. Mi-RNAs can be detected in tissue biopsy samples and many body fluids and, thus, would constitute a relevant cancer biomarker. Mi-RNA can be isolated alone (cell-free mi-RNA) or encapsulated in small vesicles (exosomes) by using RT-PCR, microarray, and deep sequencing [49]. Growing evidence has incriminated mi-RNAs as being a significant cancer player by upregulating several oncogenes [51]. In UM, mi-RNAs have been found to be an interesting tool for the diagnosis and prognosis of UM [50]. Several studies aimed to identify specific UM mi-RNA clusters [52]. Stark et al., by collecting serum from 65 consecutive localized and metastatic UM patients, found a panel of 6 mi-RNAs (miRNA-16, miRNA-145, miRNA-146a, miRNA-204, miRNA-211, and miRNA-363-3p) as being useful for distinguishing benign uveal naevi from UM with a sensitivity and specificity of 93% and 100%, respectively [53]. They also found that miRNA-211 was significantly more expressed in metastatic UM compared to localized UM. Low circulating miRNA-204 was the only mi-RNA associated with a poorer OS. Based on the literature, mi-RNA-146a appears as being the most discriminant mi-RNA for diagnosing UM [53]–[56]. In their study conducted in 14 localized UM patients, Russo et al. found that among 754 mi-RNAs tested, mi-RNA-146a was significantly overexpressed in histological samples as well as in venous blood of UM patients [57]. Interestingly, Ragusa et al. also found mi-RNA-146a being overexpressed by three folds in vitreous samples and vitreous exosomes [54]. Mi-RNA-146a has been previously incriminated in other malignancies such as papillary thyroid cancer, hepatocellular carcinoma, or leukemia [58]. Mi-RNA-146a has also been involved in pigmentation and survival of UM cells [59]. However, other studies did not support mi-RNA-146a as being a useful blood biomarker [52], [60]. Other mi-RNAs have been incriminated in the metastatic spread of UM: mi-RNA-199a [61], mi-RNA-34a [62],

mi-RNA-34b [63] among others. It is still unclear how mi-RNAs biologically induce UM growth and dissemination. Mi-RNA-34a is thought to inhibit the oncogene c-Met, and several studies found decreased mi-RNA-34a rates in metastatic UM [62], [63]. Similarly, mi-RNA-137 was found to be dramatically reduced in UM. Mi-RNA-137 is known to play a role in the cell cycle arrest [64] and downregulates the MITF and c-Met oncogenes [65]. In cutaneous melanoma, the downregulation of MITF is known to induce the differentiation and invasiveness of tumor cells [66]. Of interest, it should be noted that the different studies shared only few mi-RNAs, and huge disparities regarding the biological effect of a given mi-RNA have been found [50]. This highlights the complicated interactions of the mi-RNAs with several pathways and the lack of consensus regarding mi-RNA extraction and processing.

Long noncoding RNAs (lncRNA) are a subcategory of RNA with a size larger than 200 nucleotides that do not encode proteins. LncRNAs have been incriminated in several malignancies by modulating the transcriptional and post-transcriptional processes. Several *in vitro* studies demonstrated that lncRNAs played a role in UM tumorigenesis. The lncRNA PVT1 (Plasmacytoma variant translocation 1 gene) was found to be overexpressed in tissue biopsy of 28 UM patients [67]. This finding was consistent with those of Xu et al., who investigated the expression of lncRNA PVT1 by using deep-RNA sequencing data from the UM Cancer Genome Atlas. They found that lncRNA PVT1 was overexpressed in about 75% of primary UM and significantly associated with epithelioid UM, extrascleral extension, and poorer overall survival [68]. Of targets, it is postulated that lncRNA PVT1 acts by repressing mi-RNA 17-3, which interacts with MDM2 and p53 proteins [67]. By promoting autophagy, lncRNA ZNNT1 has also been associated with *in vitro* UM cell death [69]. Other lncRNAs such as lncRNA FTH1P3 [70], lncRNA MALAT1 [71], or HOXA11-AS [72] have also been incriminated in UM tumorigenesis. However, studying lncRNA in UM is limited by a large

number of incriminated lncRNAs and related mi-RNAs [73]. To date, no lncRNA has been established as a reliable UM biomarker.

#### 2.4. Tumor-related exosomes (TRE)

Exosomes are nano-sized extracellular vesicles released by all cell types, including cancer cells [49]. These nanovesicles are thought to participate in tumor growth by acting on the tumoral micro-environment [1]. They are also incriminated in the development of micrometastases niches [74] and in the late UM metastatic spread [75].

As shuttle, exosomes encapsulate proteins as well as RNA (ct-RNA) and other tumor-related genetic material such as Ct-DNA, and mi-RNA. Exosomes protect these nucleic acids from degradation in blood, and other biological fluids, which explains their growing interest. Exosomes can be isolated by centrifugation, density, or immune methods. Of interest, mutational status of certain cancers has been established based on ct-DNA contained in circulating exosomes [49]. Ragusa et al. found similarities between tumor mi-RNA and exosomal mi-RNA, providing from the vitreous cavity of UM patients[54]. Interestingly, mi-RNA-146a was found to be upregulated in both the vitreous cavity and plasma of UM patients [54]. In their study in metastatic UM, Eldh et al. isolated Melan-A exosomes in liver perfusate during isolated hepatic perfusion [75]. They also found higher total exosome concentration in the venous blood of metastatic UM patients compared to healthy controls. Other studies tried to identify specific TRE panels in UM. In other solid malignancies, exosomes were found to be efficient for distinguishing benign from malignant neoplasms [49]. Further studies focusing on the ability of exosomes to distinguish benign from malignant choroidal pigmented lesions are warranted. As in prostatic cancer, establishing a panel of exosomes could better predict the prognosis and metastatic risk of UM [1].

## 2.5. Tumor-educated platelets (TEP)

Platelets originate from the precursor megakaryocyte cell in the bone marrow and are the second most common cells found in the bloodstream. Several large sample-sized cohort studies evidence that antiplatelet medications were associated with a decreased metastatic spread in several cancers and Inversely, high platelet counts were found in disseminated cancers[76], [77]. Based on these indirect correlations, the role of platelets in cancer dissemination has gained in popularity. Platelets are thought to crosstalk with the tumoral cells and microenvironment via the release of extracellular vesicles [78]. In turn, cancer cells can incorporate their genetic material such as RNA within the platelets leading to their “education.” As a result, platelets may harbor specific tumoral RNA signatures and may represent a widely available cancer biomarker. TEPs are very stable compared to free circulating nucleic acids and are available in a great amount. Best et al. demonstrated that screening platelet RNA allowed to distinguish cancer patients from healthy donors [79]. TEP may also be useful for screening and monitoring anti-tumoral targeted therapies. To date, no study investigated TEP in UM.

## 2.6. Future perspectives: towards a better UM understanding?

Despite a better understanding of UM over the past decades, two questions have not yet been resolved: (i) How can UM relapse a few years after the diagnosis despite achieving local control of the disease? (ii) Why is the liver the primary metastatic site? LB may be of prime interest to investigate these unsolved questions.

UM relapse is thought to be based on the concept of dormancy. Tumor dormancy is defined as a biological phenomenon in which circulating tumor cells remain quiescent and undetectable in

a unique and specific microenvironment [80]. For unexplained reasons, these in dormancy cells could be reactivated and will further disseminate to their metastatic site of preference. Several studies showed that UM metastatic spread follows a bimodal curve with early- and late-onset [81]. Late metastatic relapse could be explained by rapid growth and dissemination of previously in dormancy UM cells. Eide et al. conducted in 2009 a pilot study in 328 primary UM patients undergoing peripheral blood and bone marrow samples at the time of the primary eye treatment (6). UM tumor cells were isolated by using an immunomagnetic method associated with several anti-melanoma antibodies. Tumoral cells were found in 1.6% and 29.9% of patients in blood and bone marrow, respectively. The authors hypothesized that peripheral blood could be considered as a transport medium and bone marrow as the reservoir for further in dormancy UM cells. As outlined above, TEP provide from the bone marrow. One might hypothesize that bone marrow UM cells could interact with the platelets in their primary production site to become TEP. The latter will be further released within the bloodstream and could trigger proliferation and dissemination messages to the tumoral in dormancy bone marrow UM cells. However, Eide et al. published in 2015 and 2019 the follow-up and overall survival of their 328 patients and failed to identify bone marrow involvement as a pejorative prognosis factor (35,36). Surprisingly, bone marrow involvement was more common in early TNM stages, highlighting the possibility that more aggressive cancer cells may have lost their surface epitope by a de-differentiation process leading to an underestimation of bone marrow micrometastases. In a subgroup analysis, they found that metastases were more prevalent in patients harboring a low number of bone marrow melanoma cells. The authors hypothesized that, for unknown reasons, most UM cells found in the bone marrow were apoptotic and that only a few UM cells will further develop and spread.

To date, it is still unclear whether UM metastasizes predominantly to the liver. Some authors demonstrated that exosomal integrins could be incriminated in cancer dormancy by guiding the

CTCs to their specific niche and in metastatic dissemination by guiding the CTC to the targeted metastatic organ [82]. Of interest, Peinado et al. demonstrated that melanoma exosomes educated bone marrow progenitor cells [83]. Further investigations regarding the connections between TRE and TEP in the bone marrow microenvironment would be of great clinical relevance.

## 2.7. Limitations

Table 3 summarizes the main limitations encountered with current LB techniques in UM. The most important limitation is the lack of consensus regarding the most appropriate method for isolating and revealing the CTCs. Only two studies compared different liquid biopsy techniques in UM [27], [31]. Only a few amounts of CTC have been identified in the current literature by using mainly immunomagnetic isolation techniques. This could reflect a low bloodstream shedding or a lack of sensitivity with the isolation CTC devices used. Recent significant improvements have emerged regarding CTC isolation technology. New promising devices based on microfluidics [84] could improve CTC detection rates and need further investigations in UM.

It is still unclear whether circulating UM cells undergo a de-differentiation during the metastatic spread [35] as encountered in several carcinomas with the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) [85], [86]. A study conducted in a UM xenograft model highlighted that numerous transcriptional gene modifications, including the expression of Melan A occurred during the metastatic process [87]. Therefore, screening multiple genes or surface markers is warranted in CTCs and ct-DNA detection.

Liquid biopsy feature	ADVANTAGES	DISADVANTAGES
<b>CTC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Allows a better understanding of the metastatic process by screening genetical mutations and surface biomarkers</li> <li>Allows laboratory cell culture and further in vivo investigations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lack of consensus concerning pre- and post-analytic processes</li> <li>May be less reliable than ctDNA according to Bidard et al.</li> </ul>
<b>ctDNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>More reliable and standardized techniques compared to CTC</li> <li>More stable than ct-RNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Less instructive than CTC in understanding the underlying tumorigenesis</li> <li>GNAQ and GNA11 mutations are not found in all UM</li> </ul>
<b>Ct-RNA</b>	Detection by reliable techniques (RT-PCR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Instability (degradation by RNAase)</li> <li>Low abundance</li> <li>Half-life very low</li> </ul>
<b>miRNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Longer half-life especially when encapsulated</li> <li>More stable compared to ct-DNA and ct-RNA</li> <li>Detected by reliable techniques (RT-PCR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lack of consensus regarding pre- and post-analytic processes</li> <li>Conflicting results regarding the role of certain mi-RNAs</li> </ul>
<b>Tumor-related exosomes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stable</li> <li>Long half-life</li> <li>Possibility to investigate mi-RNA, DNA, RNA as well as surface markers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lack of consensus regarding exosome definition (different definitions based on the size to distinguish exosomes from other small extracellular vesicles)</li> <li>Lack of available studies</li> <li>Lack of process standardization</li> </ul>
<b>Tumor-educated platelets</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promising preliminary results in other solid malignancies</li> <li>TEP are easily obtained and processed</li> <li>Available in large amounts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lack of studies into UM</li> </ul>

Table 3: Advantages and limitations of liquid biopsies for uveal melanoma

## 2.8. Conclusion

LB appears to be a non-invasive and particularly useful approach for detecting and studying UM. Blood LB is of great relevance for distinguishing benign from malignant pigmented



choroidal lesions, for detecting relevant mutational status when a tissue biopsy is not available and has been associated with PFS and OS in several studies. However, LB is faced with a lack of consensus regarding the pre and post-analytical processes. Further studies are warranted to determine whether LB may emerge as a viable biomarker that could be used in clinical practice.

### 3. RETINOBLASTOMA (RB)

RB is the most common primary intraocular malignancy in childhood. RB arises from the photoreceptors located into the inner retinal layers. RB is the result of a mutation of the tumor suppressor gene RB1 located on chromosome 13q [17]. Non-inherited forms are usually unilateral, whereas bilateral or trilateral (pineal gland involvement) RBs are mainly encountered in inherited forms. RB is usually diagnosed around 2-year-old [2]. Leukocoria and strabismus are the most common clinical signs leading to the diagnosis. Tissue biopsy is usually contraindicated since it is thought to favor extraocular dissemination. Several differential diagnoses such as Coats disease, persistent fetal vasculature, retinopathy of prematurity, coloboma, and toxocariasis may be misdiagnosed as an RB despite using optical coherence tomography and B scan ultrasonography [2]. Studies on enucleated eyes also found significant somatic copy number alterations such as gains on 1q, 2p, 6p, and losses on 13q and 16q [88]. Treatment is not consensual and is based on the laterality involvement and the TNM classification. Localized intraocular RB can be treated by cryotherapy or laser therapy. Intravitreal seeding can now be safely treated by intravitreal injection of chemotherapy medications [89]. More advanced cases may be treated by intraarterial chemoembolization or enucleation. Rarely, retinoblastoma may spread locally into the orbit and the brain through the

optic nerve and disseminate to the bone marrow and later to visceral organs [2]. Despite this, the prognosis is usually excellent [90].

Tissue biopsy in RB is relevant for two reasons. Firstly, the biopsy allows for diagnosis confirmation. Differencing RB from Coats disease appears as particularly challenging, and some infants may undergo an enucleation for diagnosis purposes [91]. Secondly, the tissue sample allows the assessment of Rb1 mutational status for prognostic counseling [90]. However, RB biopsy is contraindicated due to the fear of extraocular tumor seeding [2], and the rate of enucleation has been dramatically reduced thanks to eye-sparing strategies [89]. Therefore, LB has emerged as a possible useful diagnostic and monitoring tool.

In contrast to UM, the hematogenous spread is rarely encountered in RB, and aqueous humor (AH) sample has gained in interest [88]. AH may provide diagnosis, genetic, prognosis, and treatment response data. AH puncture is an easy, relatively non-invasive, and safe procedure performed under general anesthesia in infants. AH sampling may be combined with eye examination performed under general anesthesia in infants as well as in combination with intravitreal delivery of chemotherapy. Berry et al. demonstrated that a higher AH somatic chromosomal copy number alteration, including 6p gain was predictive of more advanced and aggressive RBs [92], [93]. They found that AH ct-DNA was concordant with ct-DNA providing from a tissue sample of enucleated patients. The same team demonstrated that AH provided a higher ct-DNA sensitivity compared to the blood sample [6]. Gerrish et al. also identified ct-DNA in AH samples of 12 RB patients [94]. AH ct-DNA profile was identical to this found in enucleation samples. Interestingly, a lower quantity of AH ct-DNA was found in patients treated by intravitreal injection of chemotherapy. Kothari et al. recently demonstrated that RB1 mutational status was possible by studying plasmatic circulating tumor DNA in 8 of 10 patients [95].

Other AH contents have been investigated, but most of them are limited by their lack of specificity and the lack of genetic status assessment. AH LDH was found to be increased in locally advanced retinoblastoma compared to healthy controls. However, AH LDH did not correlate with the clinical features, the treatments underwent, and serum LDH. In addition, LDH is not specific and may be elevated in glaucoma (sometimes encountered in locally advanced RB) and Coats disease, which is a challenging differential diagnosis [96]. Some studies investigated the AH detection of Neuron Specific Enolase (NSE) secreted by numerous neuroendocrine tumors. These studies found that NSE was increased in enucleated RB eyes compared to controls but failed to demonstrate a correlation with clinical and pathological features [96]. Survivin and TGF- $\beta$  were found to be elevated in AH and serum of patients with RB with high sensitivity and specificity rates [88]. Unlike the previous biomarkers, they were positively correlated with the clinical and pathological features, especially optic nerve invasion [88], [96]. Further studies on these biomarkers are warranted.

Serum biomarkers have been less investigated. Beta et al demonstrated that several serum miRNAs were up and downregulated in 14 RB patients [97]. They found that miRNA-17, miRNA-18a, and miRNA-20a were upregulated and could be considered as potential biomarkers [97].

The development of AH puncture has led to reconsider the rule, which stated that an RB eye should never be violated. Since tissue biopsy is still contraindicated, retinoblastoma research is now directed to AH analysis for establishing RB diagnosis, prognosis and treatment response monitoring. Relevant and large sample sized studies are currently ongoing to assess the indications of AH puncture and to determine the best biomarker.

#### **4. LIQUID BIOPSY IN CONJUNCTIVAL MALIGNANCIES**

Conjunctival melanoma and squamous cell carcinoma are rare ocular neoplasms. Contrary to intraocular malignancies, the biopsy is routinely performed in conjunctival tumors to confirm the diagnosis and identifying key mutational status [98]. Taken together, this could explain why LB has been little investigated in conjunctival tumors.

Conjunctival melanoma accounts for less than 5% of ocular tumors but is associated with a mortality rate of around 30% [99]. Despite its location, conjunctival melanoma behavior is more related to cutaneous melanoma rather than uveal melanoma [14]. Unlike UM, conjunctival melanomas disseminate through lymphatics and hematogenous routes, harbour NF1, BRAF, NRAS and KRAS mutations [98] and may be treated with targeted therapies [100] and immunotherapies [101], [102]. LB has not been studied specifically in conjunctival melanoma. However, one might hypothesize that LB techniques developed in cutaneous melanoma may be relevant in conjunctival melanoma [103].

Conjunctival squamous cell carcinoma is an exceptional ocular surface malignancy with an incidence of 2-35 per million [104]. Conjunctival carcinoma is strongly related to UV exposition and HIV. Recently, HPV infection has been incriminated in conjunctival carcinoma development [105]. Dissemination may be local to the orbit, lymphatic and/or hematogenous. Treatment involves surgery sometimes associated with topical chemotherapy and/or radiation beam therapy [106]. To date, there is no standard of care of metastatic conjunctival carcinoma.

## **5. LIQUID BIOPSY IN CHOROIDAL METASTASES**

Although being often asymptomatic, choroidal metastases are the most common intraocular malignancies in adulthood [107]. Breast and lung carcinomas are the most common primary tumor encountered [107]. The increasing overall survival seen in several malignancies,

including breast and lung cancers has led to a higher detection rate of choroidal metastases [107]. In most cases, choroidal metastases occur at a late stage of disease, and liquid biopsy does not appear to be useful. LB may be relevant in the case of (i) unknown primary malignancy (ii) difficulty for performing the biopsy of the primary tumor and (iii) if the patient underwent multiple malignancies. Choroidal metastases may be the first clinical manifestation of the underlying malignancy in about one-third of patients [108], [109]. In their study conducted in 420 and 96 patients experiencing choroidal metastases, Shields et al. [109] and Konstantidinis et al. [108] did not know the primary tumor in 34% and 28% of their patients, respectively. Several patients benefited from an intraocular biopsy to identify the primary tumor. This biopsy may be risky and associated with a lack of sensitivity given the low amount of tissue available [8]. LB may be a particularly useful and non-invasive method for identifying the primary tumor. Our team recently reported a patient with bilateral choroidal metastases without a known primary tumor. Plasma ct-DNA providing from a Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC), was found. In addition, EGFR mutation was identified, and targeted therapy was successfully initiated [110]. Aqueous humor analysis may also provide new insights. Daxecker et al. reported 40 years ago, a case of elevated anterior chamber CEA in a patient with bilateral choroidal metastases from breast carcinoma [111].

## **CONCLUSION**

LB is a non-invasive and promising technique for diagnosing and monitoring intraocular malignancies. LB may be useful in daily clinical practice to (i) confirm the cancer diagnosis without tissue biopsy, (ii) to establish a reliable prognostication, (iii) to allow early detection of metastatic spread, and (iv) monitoring treatment response. LB may also provide new pathophysiological insights concerning tumor dissemination and dormancy. Although very

promising, LB suffers from several inherent limitations. To date, there is a lack of consensus regarding the ideal biomarker. Pre- and post-analytic processes differ widely from a study to another, limiting their reproducibility. The biggest challenge will be to establish an international consensus among the ocular oncology centers.

Authors' Contributions: Conceptualization, AM, SL, PH; Methodology: AM, SL, PH, SB; Validation: SL, PH, BM, CB; Original Draft Preparation: AM, SL, PH, BM; Review and editing: SL, PH, SN, LG, BR, CB.

Acknowledgments: none

Conflicts of Interests: The authors declare not conflicts of interests.

#### **References:**

- [1] M. Scarlotta, C. Simsek, and A. K. Kim, "Liquid Biopsy in Solid Malignancy," *Genet Test Mol Biomarkers*, vol. 23, no. 4, pp. 284–296, Apr. 2019, doi: 10.1089/gtmb.2018.0237.
- [2] A. AlAli, S. Kletke, B. Gallie, and W.-C. Lam, "Retinoblastoma for Pediatric Ophthalmologists," *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, vol. 7, no. 3, pp. 160–168, Jun. 2018, doi: 10.22608/APO.201870.
- [3] L. León-Mateos, M. Vieito, U. Anido, R. López López, and L. Muínelo Romay, "Clinical Application of Circulating Tumour Cells in Prostate Cancer: From Bench to Bedside and Back," *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.3390/ijms17091580.
- [4] K. Payne et al., "Circulating Tumour Cell Biomarkers in Head and Neck Cancer: Current Progress and Future Prospects," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 8, Aug. 2019, doi: 10.3390/cancers11081115.

- [5] P. Hofman, “Liquid biopsy for early detection of lung cancer,” *Curr Opin Oncol*, vol. 29, no. 1, pp. 73–78, 2017, doi: 10.1097/CCO.0000000000000343.
- [6] J. L. Berry et al., “Aqueous Humor Is Superior to Blood as a Liquid Biopsy for Retinoblastoma,” *Ophthalmology*, vol. 127, no. 4, pp. 552–554, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ophtha.2019.10.026.
- [7] A. D. Singh, M. E. Turell, and A. K. Topham, “Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival,” *Ophthalmology*, vol. 118, no. 9, pp. 1881–1885, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.ophtha.2011.01.040.
- [8] V. M. Cohen, S. Dinakaran, M. A. Parsons, and I. G. Rennie, “Transvitreal fine needle aspiration biopsy: the influence of intraocular lesion size on diagnostic biopsy result,” *Eye (Lond)*, vol. 15, no. Pt 2, pp. 143–147, Apr. 2001, doi: 10.1038/eye.2001.48.
- [9] N. Eide and L. Walaas, “Fine-needle aspiration biopsy and other biopsies in suspected intraocular malignant disease: a review,” *Acta Ophthalmol*, vol. 87, no. 6, pp. 588–601, Sep. 2009, doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01637.x.
- [10] E. Bensoussan et al., “Outcomes After Proton Beam Therapy for Large Choroidal Melanomas in 492 Patients,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 165, pp. 78–87, May 2016, doi: 10.1016/j.ajo.2016.02.027.
- [11] A. Sellam et al., “Fine Needle Aspiration Biopsy in Uveal Melanoma: Technique, Complications, and Outcomes,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 162, pp. 28-34.e1, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.ajo.2015.11.005.
- [12] M. D. Onken et al., “Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma,” *Ophthalmology*, vol. 119, no. 8, pp. 1596–1603, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.ophtha.2012.02.017.

- [13] M. D. Onken et al., “Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 12, pp. 5230–5234, Dec. 2008, doi: 10.1167/iovs.08-2145.
- [14] C. Pandiani, G. E. Béranger, J. Leclerc, R. Ballotti, and C. Bertolotto, “Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities,” *Genes Dev.*, vol. 31, no. 8, pp. 724–743, 15 2017, doi: 10.1101/gad.296962.117.
- [15] J. Trolet et al., “Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, no. 6, pp. 2572–2580, Jun. 2009, doi: 10.1167/iovs.08-2296.
- [16] J. W. Harbour et al., “Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas,” *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1410–1413, Dec. 2010, doi: 10.1126/science.1194472.
- [17] S. Nahon-Esteve et al., “The Molecular Pathology of Eye Tumors: A 2019 Update Main Interests for Routine Clinical Practice,” *Curr. Mol. Med.*, vol. 19, no. 9, pp. 632–664, 2019, doi: 10.2174/1566524019666190726161044.
- [18] E. Kujala, T. Mäkitie, and T. Kivelä, “Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 11, pp. 4651–4659, Nov. 2003.
- [19] C. L. Shields et al., “Personalized Prognosis of Uveal Melanoma Based on Cytogenetic Profile in 1059 Patients over an 8-Year Period: The 2017 Harry S. Gradle Lecture,” *Ophthalmology*, vol. 124, no. 10, pp. 1523–1531, 2017, doi: 10.1016/j.ophtha.2017.04.003.
- [20] A. Y. Goh and C. J. Layton, “Evolving systemic targeted therapy strategies in uveal melanoma and implications for ophthalmic management: a review,” *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, vol. 44, no. 6, pp. 509–519, Aug. 2016, doi: 10.1111/ceo.12688.



- [21] L. T. Xu et al., “Uveal Melanoma Metastatic to the Liver: Treatment Trends and Outcomes,” *Ocul Oncol Pathol*, vol. 5, no. 5, pp. 323–332, Aug. 2019, doi: 10.1159/000495113.
- [22] A. N. Shoushtari and R. D. Carvajal, “Treatment of Uveal Melanoma,” *Cancer Treat. Res.*, vol. 167, pp. 281–293, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-22539-5\_12.
- [23] M. F. Bande Rodríguez et al., “Blood Biomarkers of Uveal Melanoma: Current Perspectives,” *Clin Ophthalmol*, vol. 14, pp. 157–169, 2020, doi: 10.2147/OPHTH.S199064.
- [24] S. Mader and K. Pantel, “Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives,” *Oncol Res Treat*, vol. 40, no. 7–8, pp. 404–408, 2017, doi: 10.1159/000478018.
- [25] M. Terai et al., “Arterial Blood, Rather Than Venous Blood, is a Better Source for Circulating Melanoma Cells,” *EBioMedicine*, vol. 2, no. 11, pp. 1821–1826, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.09.019.
- [26] J. S. Kang et al., “Finger necrosis after accidental radial artery puncture,” *Clin Exp Emerg Med*, vol. 1, no. 2, pp. 130–133, Dec. 2014, doi: 10.15441/ceem.14.045.
- [27] F.-C. Bidard et al., “Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma,” *Int. J. Cancer*, vol. 134, no. 5, pp. 1207–1213, Mar. 2014, doi: 10.1002/ijc.28436.
- [28] K. Anand et al., “Pilot Study of Circulating Tumor Cells in Early-Stage and Metastatic Uveal Melanoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.3390/cancers11060856.
- [29] M. F. Bande et al., “Detection of circulating melanoma cells in choroidal melanocytic lesions,” *BMC Res Notes*, vol. 8, p. 452, Sep. 2015, doi: 10.1186/s13104-015-1420-5.

- [30] C. Mazzini et al., “Circulating tumor cells detection and counting in uveal melanomas by a filtration-based method,” *Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 1, pp. 323–332, Feb. 2014, doi: 10.3390/cancers6010323.
- [31] P. Pinzani et al., “Tyrosinase mRNA levels in the blood of uveal melanoma patients: correlation with the number of circulating tumor cells and tumor progression,” *Melanoma Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 303–310, Aug. 2010, doi: 10.1097/CMR.0b013e32833906e3.
- [32] A. Ulmer et al., “Visualization of circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with primary uveal melanoma,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 14, pp. 4469–4474, Jul. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0012.
- [33] D. Suesskind et al., “Circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with uveal melanoma before and after different therapies and association with prognostic parameters: a pilot study,” *Acta Ophthalmol*, vol. 89, no. 1, pp. 17–24, Feb. 2011, doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01617.x.
- [34] A. Tura et al., “Identification of circulating melanoma cells in uveal melanoma patients by dual-marker immunoenrichment,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 55, no. 7, pp. 4395–4404, Jun. 2014, doi: 10.1167/iovs.14-14512.
- [35] N. Eide et al., “The Results of Stricter Inclusion Criteria in an Immunomagnetic Detection Study of Micrometastatic Cells in Bone Marrow of Uveal Melanoma Patients - Relevance for Dormancy,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 255–262, Jan. 2019, doi: 10.1007/s12253-017-0355-7.
- [36] C. L. Shields, J. Manalac, C. Das, K. Ferguson, and J. A. Shields, “Choroidal melanoma: clinical features, classification, and top 10 pseudomelanomas,” *Curr Opin Ophthalmol*, vol. 25, no. 3, pp. 177–185, May 2014, doi: 10.1097/ICU.0000000000000041.

- [37] W. J. Allard et al., “Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 20, pp. 6897–6904, Oct. 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0378.
- [38] N. Eide et al., “Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow in uveal melanoma patients,” *Acta Ophthalmol*, vol. 87, no. 8, pp. 830–836, Nov. 2009, doi: 10.1111/j.1755-3768.2008.01378.x.
- [39] G. Poulet, J. Massias, and V. Taly, “Liquid Biopsy: General Concepts,” *Acta Cytol.*, vol. 63, no. 6, pp. 449–455, 2019, doi: 10.1159/000499337.
- [40] L. Cabel et al., “Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study,” *Ann. Oncol.*, vol. 28, no. 8, pp. 1996–2001, Aug. 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx212.
- [41] S. Maheswaran et al., “Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 4, pp. 366–377, Jul. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0800668.
- [42] I. Boldin et al., “Five-year results of prognostic value of tyrosinase in peripheral blood of uveal melanoma patients,” *Melanoma Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 503–507, Dec. 2005, doi: 10.1097/00008390-200512000-00004.
- [43] R. Schuster et al., “Circulating tumor cells as prognostic factor for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 1171–1178, Feb. 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2329.
- [44] R. Schuster et al., “Prognostic relevance of circulating tumor cells in metastatic uveal melanoma,” *Oncology*, vol. 80, no. 1–2, pp. 57–62, 2011, doi: 10.1159/000328283.

- [45] G. Charitoudis, R. Schuster, A. M. Jousen, U. Keilholz, and N. E. Bechrakis, “Detection of tumour cells in the bloodstream of patients with uveal melanoma: influence of surgical manipulation on the dissemination of tumour cells in the bloodstream,” *Br J Ophthalmol*, vol. 100, no. 4, pp. 468–472, Apr. 2016, doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-306955.
- [46] S. A. Callejo, E. Anteck, P. L. Blanco, C. Edelstein, and M. N. Burnier, “Identification of circulating malignant cells and its correlation with prognostic factors and treatment in uveal melanoma. A prospective longitudinal study,” *Eye (Lond)*, vol. 21, no. 6, pp. 752–759, Jun. 2007, doi: 10.1038/sj.eye.6702322.
- [47] U. Keilholz et al., “Quantitative detection of circulating tumor cells in cutaneous and ocular melanoma and quality assessment by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 5, pp. 1605–1612, Mar. 2004, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-0610-3.
- [48] C. H. Metz, M. Scheulen, N. Bornfeld, D. Lohmann, and M. Zeschnigk, “Ultradeep sequencing detects GNAQ and GNA11 mutations in cell-free DNA from plasma of patients with uveal melanoma,” *Cancer Med*, vol. 2, no. 2, pp. 208–215, Apr. 2013, doi: 10.1002/cam4.61.
- [49] S. Junqueira-Neto, I. A. Batista, J. L. Costa, and S. A. Melo, “Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA,” *Acta Cytol.*, vol. 63, no. 6, pp. 479–488, 2019, doi: 10.1159/000493969.
- [50] Z. Li, X. Yu, J. Shen, and Y. Jiang, “MicroRNA dysregulation in uveal melanoma: a new player enters the game,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 7, pp. 4562–4568, Mar. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.2923.

- [51] L. Ys and D. A, “MicroRNAs in Cancer,” Annual review of pathology, 2009. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817506/?from\\_term=micro+rna+cancer+review&from\\_pos=4](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817506/?from_term=micro+rna+cancer+review&from_pos=4) (accessed May 09, 2020).
- [52] X. Xin et al., “Identification of a nine-miRNA signature for the prognosis of Uveal Melanoma,” *Exp. Eye Res.*, vol. 180, pp. 242–249, 2019, doi: 10.1016/j.exer.2019.01.004.
- [53] M. S. Stark et al., “A Panel of Circulating MicroRNAs Detects Uveal Melanoma With High Precision,” *Transl Vis Sci Technol*, vol. 8, no. 6, p. 12, Nov. 2019, doi: 10.1167/tvst.8.6.12.
- [54] M. Ragusa et al., “miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 16, no. 9, pp. 1387–1396, 2015, doi: 10.1080/15384047.2015.1046021.
- [55] S. Achberger, W. Aldrich, R. Tubbs, J. W. Crabb, A. D. Singh, and P. L. Triozzi, “Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease,” *Mol. Immunol.*, vol. 58, no. 2, pp. 182–186, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.molimm.2013.11.018.
- [56] P. Joshi et al., “Expression of natural killer cell regulatory microRNA by uveal melanoma cancer stem cells,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 33, no. 8, pp. 829–838, 2016, doi: 10.1007/s10585-016-9815-9.
- [57] A. Russo et al., “Increased Levels of miRNA-146a in Serum and Histologic Samples of Patients with Uveal Melanoma,” *Front Pharmacol*, vol. 7, p. 424, 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00424.

- [58] A. M. Gómez-Pérez et al., “New molecular biomarkers in differentiated thyroid carcinoma: Impact of miR-146, miR-221 and miR-222 levels in the evolution of the disease,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 91, no. 1, pp. 187–194, 2019, doi: 10.1111/cen.13972.
- [59] M. Aksenenko, N. Palkina, A. Komina, L. Tashireva, and T. Ruksha, “Differences in microRNA expression between melanoma and healthy adjacent skin,” *BMC Dermatol.*, vol. 19, no. 1, p. 1, 05 2019, doi: 10.1186/s12895-018-0081-1.
- [60] P. L. Triozzi, S. Achberger, W. Aldrich, A. D. Singh, R. Grane, and E. C. Borden, “The association of blood angioregulatory microRNA levels with circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients receiving dacarbazine and interferon,” *J Transl Med*, vol. 10, p. 241, Dec. 2012, doi: 10.1186/1479-5876-10-241.
- [61] L. A. Worley, M. D. Long, M. D. Onken, and J. W. Harbour, “Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling,” *Melanoma Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 184–190, Jun. 2008, doi: 10.1097/CMR.0b013e3282feeac6.
- [62] D. Yan et al., “MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, no. 4, pp. 1559–1565, Apr. 2009, doi: 10.1167/iovs.08-2681.
- [63] F. Dong and D. Lou, “MicroRNA-34b/c suppresses uveal melanoma cell proliferation and migration through multiple targets,” *Mol. Vis.*, vol. 18, pp. 537–546, 2012.
- [64] V. K. Eedunuri et al., “miR-137 Targets p160 Steroid Receptor Coactivators SRC1, SRC2, and SRC3 and Inhibits Cell Proliferation,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 29, no. 8, pp. 1170–1183, Aug. 2015, doi: 10.1210/me.2015-1080.

- [65] X. Chen et al., “Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 3, pp. 1193–1199, Mar. 2011, doi: 10.1167/iovs.10-5272.
- [66] Y. Cheli et al., “Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny,” *Oncogene*, vol. 30, no. 20, pp. 2307–2318, May 2011, doi: 10.1038/onc.2010.598.
- [67] S. Wu, H. Chen, N. Han, C. Zhang, and H. Yan, “Long Noncoding RNA PVT1 Silencing Prevents the Development of Uveal Melanoma by Impairing MicroRNA-17-3p-Dependent MDM2 Upregulation,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 60, no. 14, pp. 4904–4914, 01 2019, doi: 10.1167/iovs.19-27704.
- [68] H. Xu, J. Gong, and H. Liu, “High expression of lncRNA PVT1 independently predicts poor overall survival in patients with primary uveal melanoma,” *PLoS ONE*, vol. 12, no. 12, p. e0189675, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0189675.
- [69] P. Li et al., “ZNNT1 long noncoding RNA induces autophagy to inhibit tumorigenesis of uveal melanoma by regulating key autophagy gene expression,” *Autophagy*, pp. 1–14, Sep. 2019, doi: 10.1080/15548627.2019.1659614.
- [70] X. Zheng, H. Tang, X. Zhao, Y. Sun, Y. Jiang, and Y. Liu, “Long non-coding RNA FTH1P3 facilitates uveal melanoma cell growth and invasion through miR-224-5p,” *PLoS ONE*, vol. 12, no. 11, p. e0184746, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0184746.
- [71] L. Sun, P. Sun, Q.-Y. Zhou, X. Gao, and Q. Han, “Long noncoding RNA MALAT1 promotes uveal melanoma cell growth and invasion by silencing of miR-140,” *Am J Transl Res*, vol. 8, no. 9, pp. 3939–3946, 2016.

- [72] Q. Lu, N. Zhao, G. Zha, H. Wang, Q. Tong, and S. Xin, “LncRNA HOXA11-AS Exerts Oncogenic Functions by Repressing p21 and miR-124 in Uveal Melanoma,” *DNA Cell Biol.*, vol. 36, no. 10, pp. 837–844, Oct. 2017, doi: 10.1089/dna.2017.3808.
- [73] B. Xu, R. Ma, H. Ren, and J. Qian, “Genome-Wide Analysis of Uveal Melanoma Metastasis-Associated LncRNAs and Their Functional Network,” *DNA Cell Biol.*, vol. 37, no. 2, pp. 99–108, Feb. 2018, doi: 10.1089/dna.2017.4015.
- [74] U. H. Weidle, F. Birzele, G. Kollmorgen, and R. Ruger, “The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis,” *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 14, no. 1, pp. 1–15, 02 2017, doi: 10.21873/cgp.20015.
- [75] M. Eldh et al., “MicroRNA in exosomes isolated directly from the liver circulation in patients with metastatic uveal melanoma,” *BMC Cancer*, vol. 14, p. 962, Dec. 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-962.
- [76] E. Giovannucci et al., “Aspirin and the risk of colorectal cancer in women,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, no. 10, pp. 609–614, Sep. 1995, doi: 10.1056/NEJM199509073331001.
- [77] T. G. Simon, A.-S. Duberg, S. Aleman, R. T. Chung, A. T. Chan, and J. F. Ludvigsson, “Association of Aspirin with Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Mortality,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, no. 11, pp. 1018–1028, 12 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1912035.
- [78] S. G. J. G. In ’t Veld and T. Wurdinger, “Tumor-educated platelets,” *Blood*, vol. 133, no. 22, pp. 2359–2364, 30 2019, doi: 10.1182/blood-2018-12-852830.
- [79] M. G. Best et al., “RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics,” *Cancer Cell*, vol. 28, no. 5, pp. 666–676, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.018.



- [80] E. T. Goddard, I. Bozic, S. R. Riddell, and C. M. Ghajar, “Dormant tumour cells, their niches and the influence of immunity,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 20, no. 11, pp. 1240–1249, 2018, doi: 10.1038/s41556-018-0214-0.
- [81] P. L. Blanco, L. A. Lim, C. Miyamoto, and M. N. Burnier, “Uveal melanoma dormancy: an acceptable clinical endpoint?,” *Melanoma Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 334–340, Oct. 2012, doi: 10.1097/CMR.0b013e328357bea8.
- [82] A. Hoshino et al., “Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis,” *Nature*, vol. 527, no. 7578, pp. 329–335, Nov. 2015, doi: 10.1038/nature15756.
- [83] H. Peinado et al., “Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET,” *Nat. Med.*, vol. 18, no. 6, pp. 883–891, Jun. 2012, doi: 10.1038/nm.2753.
- [84] E. Sollier et al., “Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 1, pp. 63–77, Jan. 2014, doi: 10.1039/c3lc50689d.
- [85] B. N. Smith and N. A. Bhowmick, “Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance,” *J Clin Med*, vol. 5, no. 2, Jan. 2016, doi: 10.3390/jcm5020017.
- [86] U. D. Kahlert, J. V. Joseph, and F. A. E. Kruyt, “EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities,” *Mol Oncol*, vol. 11, no. 7, pp. 860–877, 2017, doi: 10.1002/1878-0261.12085.
- [87] J.-C. Marshall, A. Nantel, P. Blanco, J. Ash, S. R. Cruess, and M. N. Burnier, “Transcriptional profiling of human uveal melanoma from cell lines to intraocular tumors to metastasis,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 24, no. 5, pp. 353–362, 2007, doi: 10.1007/s10585-007-9072-z.

- [88] J. Sun, H.-Y. Xi, Q. Shao, and Q.-H. Liu, “Biomarkers in retinoblastoma,” *Int J Ophthalmol*, vol. 13, no. 2, pp. 325–341, 2020, doi: 10.18240/ijo.2020.02.18.
- [89] F. L. Munier et al., “Intravitreal chemotherapy for vitreous disease in retinoblastoma revisited: from prohibition to conditional indications,” *Br J Ophthalmol*, vol. 96, no. 8, pp. 1078–1083, Aug. 2012, doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-301450.
- [90] S. E. Soliman, H. Racher, C. Zhang, H. MacDonald, and B. L. Gallie, “Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma--An Update,” *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, vol. 6, no. 2, pp. 197–207, Apr. 2017, doi: 10.22608/APO.201711.
- [91] S. E. Soliman, M. J. Wan, E. Heon, L.-N. Hazrati, and B. Gallie, “Retinoblastoma versus advanced Coats’ disease: Is enucleation the answer?,” *Ophthalmic Genet.*, vol. 38, no. 3, pp. 291–293, Jun. 2017, doi: 10.1080/13816810.2016.1199715.
- [92] J. L. Berry et al., “Genomic cfDNA Analysis of Aqueous Humor in Retinoblastoma Predicts Eye Salvage: The Surrogate Tumor Biopsy for Retinoblastoma,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 16, no. 11, pp. 1701–1712, 2018, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0369.
- [93] L. Xu et al., “Chromosome 6p Amplification in Aqueous Humor Cell-Free DNA Is a Prognostic Biomarker for Retinoblastoma Ocular Survival,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 18, no. 8, pp. 1166–1175, Aug. 2020, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-1262.
- [94] A. Gerrish et al., “Non-invasive diagnosis of retinoblastoma using cell-free DNA from aqueous humour,” *Br J Ophthalmol*, Feb. 2019, doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-313005.
- [95] P. Kothari et al., “Cell-free DNA profiling in retinoblastoma patients with advanced intraocular disease: An MSKCC experience,” *Cancer Med*, Jul. 2020, doi: 10.1002/cam4.3144.

- [96] B. K. Ghiam, L. Xu, and J. L. Berry, “Aqueous Humor Markers in Retinoblastoma, a Review,” *Transl Vis Sci Technol*, vol. 8, no. 2, p. 13, Apr. 2019, doi: 10.1167/tvst.8.2.13.
- [97] M. Beta, N. Venkatesan, M. Vasudevan, U. Vetrivel, V. Khetan, and S. Krishnakumar, “Identification and Insilico Analysis of Retinoblastoma Serum microRNA Profile and Gene Targets Towards Prediction of Novel Serum Biomarkers,” *Bioinform Biol Insights*, vol. 7, pp. 21–34, 2013, doi: 10.4137/BBI.S10501.
- [98] S. L. Scholz et al., “NF1 mutations in conjunctival melanoma,” *Br. J. Cancer*, vol. 118, no. 9, pp. 1243–1247, May 2018, doi: 10.1038/s41416-018-0046-5.
- [99] S. Kaštelan, A. Gverović Antunica, L. Beketić Orešković, J. Salopek Rabatić, B. Kasun, and I. Bakija, “Conjunctival Melanoma - Epidemiological Trends and Features,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 787–796, Oct. 2018, doi: 10.1007/s12253-018-0419-3.
- [100] E. Rossi et al., “Dabrafenib and Trametinib in BRAF Mutant Metastatic Conjunctival Melanoma,” *Front Oncol*, vol. 9, p. 232, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00232.
- [101] O. Sagiv et al., “Immunotherapy With Programmed Cell Death 1 Inhibitors for 5 Patients With Conjunctival Melanoma,” *JAMA Ophthalmol*, vol. 136, no. 11, pp. 1236–1241, Nov. 2018, doi: 10.1001/jamaophthalmol.2018.3488.
- [102] P. T. Finger and A. C. Pavlick, “Checkpoint inhibition immunotherapy for advanced local and systemic conjunctival melanoma: a clinical case series,” *J Immunother Cancer*, vol. 7, no. 1, p. 83, Mar. 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0555-7.
- [103] S. K. Huang and D. S. B. Hoon, “Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients,” *Mol Oncol*, vol. 10, no. 3, pp. 450–463, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.molonc.2015.12.008.

- [104] N. Kenawy, A. Garrick, H. Heimann, S. E. Coupland, and B. E. Damato, “Conjunctival squamous cell neoplasia: the Liverpool Ocular Oncology Centre experience,” *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 253, no. 1, pp. 143–150, Jan. 2015, doi: 10.1007/s00417-014-2860-7.
- [105] S. Gichuhi, S. Ohnuma, M. S. Sagoo, and M. J. Burton, “Pathophysiology of ocular surface squamous neoplasia,” *Exp. Eye Res.*, vol. 129, pp. 172–182, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.exer.2014.10.015.
- [106] A. Santoni et al., “Management of Invasive Squamous Cell Carcinomas of the Conjunctiva,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 200, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1016/j.ajo.2018.11.024.
- [107] T. Mathis et al., “New concepts in the diagnosis and management of choroidal metastases,” *Prog Retin Eye Res*, vol. 68, pp. 144–176, 2019, doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.09.003.
- [108] L. Konstantinidis et al., “Management of patients with uveal metastases at the Liverpool Ocular Oncology Centre,” *Br J Ophthalmol*, vol. 98, no. 1, pp. 92–98, Jan. 2014, doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303519.
- [109] C. L. Shields, J. A. Shields, N. E. Gross, G. P. Schwartz, and S. E. Lally, “Survey of 520 eyes with uveal metastases,” *Ophthalmology*, vol. 104, no. 8, pp. 1265–1276, Aug. 1997, doi: 10.1016/s0161-6420(97)30148-1.
- [110] L. Bouhlel et al., “The liquid biopsy: a tool for a combined diagnostic and theranostic approach for care of a patient with late-stage lung carcinoma presenting with bilateral ocular metastases,” *Expert Rev Anticancer Ther*, vol. 17, no. 12, pp. 1087–1092, 2017, doi: 10.1080/14737140.2017.1398089.

[111] F. Daxecker and M. Zirm, “[Diagnostic value of determining carcino-embryonic antigens in the aqueous humor (author’s transl)],” *Klin Monbl Augenheilkd*, vol. 177, no. 6, pp. 768–771, Dec. 1980, doi: 10.1055/s-2008-1057723.

## **PARTIE III-2 : Comparaison de 4 plateformes de biopsie liquide sur une lignée de mélanome uvéal métastatique et applications en pratique clinique quotidienne.**

### **3.2.1. Résumé de l'étude**

#### **3.2.1.1. Introduction**

A l'issue de notre revue de la littérature (Article N°1), nous avons déterminé que les CTCs constituaient un compartiment pertinent et prometteur des BL dans le but de déterminer le pronostic du MU. Il n'existe cependant aucun consensus concernant la méthodologie idéale pour capturer puis identifier les CTCs. A ce jour, aucune étude n'a jamais comparé plusieurs plateformes de CTCs dans le MU. Seules une dizaine d'études ont comparé 2 plateformes différentes de CTCs dans d'autres tumeurs solides avec des résultats parfois contradictoires (Martel et al., 2023b). La plupart des techniques de capture de CTCs utilisées sont complexes, parfois très chronophages et semblent peu applicable en pratique clinique quotidienne (Jin and Burnier, 2021; Martel et al., 2020b).

Dans ce second article, nous avons comparé 4 plateformes différentes de capture des CTCs et utilisé une technique d'immunocytochimie avec Melan A pour identifier les CTCs à chaque fois que cela était possible. Notre premier objectif était d'uniformiser notre méthodologie afin de limiter au maximum les biais d'une expérience à l'autre. Notre second objectif était d'avoir recours à des dispositifs facilement accessibles et utilisés en pratique quotidienne pour capturer les CTCs afin d'évaluer au mieux une applicabilité en pratique clinique quotidienne.

Nous avons évalué la sensibilité de chaque plateforme (taux de capture) mais également d'autres paramètres indispensables à une pratique clinique quotidienne comme la facilité d'utilisation, la reproductibilité, la standardisation, la durée de traitement, le coût ou encore l'ergonomie au laboratoire.

### **3.2.1.2. Matériel et méthode**

Nous avons conduit une étude au laboratoire entre janvier 2021 et décembre 2022. L'objectif était de déterminer le rendement de chaque plateforme dédiée aux CTCs en filtrant un nombre connu de cellules et en évaluant le nombre final de cellules retrouvées. Pour chaque plateforme, entre 10 et 13 expériences ont été conduites. La filtration était réalisée sur milieu cellulaire RPMI (n=10) et sur du sang veineux d'un donneur sain (n=3), sauf pour le dispositif CellSearch pour lequel uniquement du sang veineux était utilisé.

Nous avons utilisé la lignée cellulaire commerciale de MU métastatique OMM 2.3 (également appelées OMM 2.5) pour réaliser les expériences. Les cellules ont été génétiquement authentifiées (**Annexe 1**). Les cellules OMM 2.3 ont été décongelées puis cultivées dans du milieu cellulaire (RPMI) enrichi. Une confluence d'environ 70% était nécessaire pour chaque expérience.

Afin de compter le nombre de cellules initiales, plusieurs méthodologies ont été essayées en amont au laboratoire : comptage manuel sans puis avec coloration, cytométrie en flux... Nous avons retenu la technique suivante : les cellules OMM 2.3 étaient mises en évidence à l'aide d'un colorant (celltracker green CMFDA<sup>n</sup> Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) puis trypsinées. Les cellules étaient diluées avec pour objectif d'en isoler entre 20-150 cellules, puis comptées manuellement dans une plaque 96 puits à l'aide d'un microscope fluorescent inversé.

Ensuite, les cellules étaient transférées dans un flacon Eppendorf. Une relecture attentive était effectuée sur chaque puits afin de s'assurer qu'aucune cellule n'était restée sur les parois du puits. Lors de chaque manipulation, les cônes de transfert étaient soigneusement rincés dans du RPMI + FBS (Fetal Bovin Serum) et plusieurs aller-retours délicats étaient effectués pour aspirer un maximum de cellules et éviter que ces dernières n'adhèrent aux parois du cône. Pour les expériences conduites sur du sang veineux, les cellules étaient directementensemencées dans des tubes de sang de 4ml à 10 ml en fonction de chaque plateforme.

Le rendement de chaque plateforme était établi de la manière suivante. Le nombre de cellules comptées initialement était désigné sous la terminologie iCN (Initial Cell Number). Les cellules étaient acheminées en moins de 30 minutes au LPCE (pour lutter contre l'anoikose) et filtrées par une des plateformes de CTCs. Le nombre final de cellules était compté et présenté sous la terminologie fCN (final Cell Number). Le rendement de chaque plateforme était évalué suivant la formule suivant :  $fCN / iCN \times 100$ .

Nous avons comparé 4 plateformes différentes :

- Le Vortex (VTX-1, Biosciences, Pleasanton, USA). Il s'agit d'un dispositif de filtration microfluidique relativement récent basé sur le principe d'inertie (taille, forme et déformabilité des CTCs). Les cellules contenues dans le RPMI étaient diluées dans 40 ml de PBS puis filtrées en utilisant 2 cycles (durée totale 50 minutes) conformément aux recommandations (Che et al., 2016). Les CTCs étaient récupérées dans 300 $\mu$ L environ de PBS puis transférées dans une solution de fixation (preservcyt) en s'assurant de bien coater chaque cône avec du RPMI+FBS comme précédemment souligné. Les cellules étaient ensuite fixées sur une lame en utilisant le système Thinprep 2000 (Hologic, France).



- Le ClearCell FX (ClearBridge, Biolidics, Singapore) est un autre système de filtration microfluidique inertiel. Les cellules étaient resuspendues dans un milieu de préparation spécifique. Pour les expériences conduites avec du sang veineux, un tampon de lyse des globules rouges était utilisé (ratio 4/1), puis une centrifugation puis une re suspension était réalisé dans le milieu de préparation spécifique (Lee et al., 2018). La filtration durait ensuite environ 45 minutes et les cellules étaient récupérées dans environ 12 ml de PBS. Les CTCs étaient ensuite transférées dans le milieu de fixation puis fixées sur lame par le système Thinprep 2000 (Hologic, France).
- ISET (Rarecells, Paris, France) est un système de filtration largement utilisé qui repose sur un système de microfiltre qui permet de retenir les CTCs en raison de leur plus grande taille comparativement aux éléments figurés du sang. Les cellules étaient diluées dans le tampon dédié puis filtrées dans des puits. Pour les expériences réalisées avec du sang veineux, une dilution de 10x était réalisée. La filtration était réalisée avec une pression moyenne de 10 kPa (jusqu'à 15 kPa) à travers des microfiltres de 8µm chacun (Ma et al., 2013). Les filtres étaient ensuite rincés puis soigneusement individualisés avant l'immunocytochimie.
- Le CellSearch (Menarini Silicon Biosystems, Florence, Italie) est une plateforme basée sur une rétention des CTCs par immunomagnétisme. A ce jour, il s'agit du seul dispositif ayant bénéficié de l'agrément de la FDA pour le pronostic et le suivi des cancers de la prostate, du sein et colorectal (Poulet et al., 2019). Deux particularités doivent être soulignées. Tout d'abord, le CellSearch nécessite la détection d'une interface sanguine pour son activation. Par conséquent, seules des expérimentations conduites avec du sang veineux de volontaire sain ont pu être conduites. Par ailleurs, nous avons rencontré des difficultés techniques dans la remise en fonctionnement de notre appareil. Devant l'impossibilité constatée par l'équipe technique du CellSearch à fonctionner sur place,

l'ensemble des analyses a été réalisée chez le distributeur à Bologne en Italie (Menarini Silicon Biosystems). Les cellules étaientensemencées dans des tubes dédiés (Cellsave tubes) et traités dans les 72 heures conformément aux recommandations (Swennenhuis et al., 2016). Le fonctionnement est le suivant : les cellules exprimant le CD146 sont capturées par des microbilles immunomagnétiques. Les cellules isolées sont ensuite enrichies avec plusieurs marqueurs (DAPI, HMW-MAA, CD34 et CD45). Il s'agit d'un processus entièrement automatisé. Est comptabilisée comme CTC une cellule ayant une forme ovale exprimant le DAPI, HMW-MAA mais n'exprimant pas le CD34 (cellules endothéliales) ni le CD45 (leucocytes).

Les CTCs obtenues puis fixées sur lame avec les plateformes Vortex VTX-1, ClearCell FX et ISET étaient traitées par immunocytochimie (Benchmark Ultra, Roche Ventana, Tucson, AZ, USA) afin de les identifier grâce au marqueur de surface Melan A.

Dans toutes les expériences, des contrôles étaient réalisés en simultané. L'objectif de ces contrôles était de s'assurer de la bonne viabilité cellulaire, dans la mesure où les expériences ont été réalisées sur une période de 2 ans. La méthodologie était la suivante. Les cellules étaient comptées manuellement, conservées puis transférées dans le milieu de préservation (solution preservcyt). La fixation avait lieu en même temps que l'expérience réalisée à l'aide des dispositifs de filtration des CTCs. Les cellules contrôles étaient ensuite transférées sur lame (thinprep, Hologic, France). L'immunocytochimie Melan A red était ensuite réalisée à l'aide du Benchmark Ultra (Roche Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

Le comptage cellulaire était réalisé à l'aide d'un microscope optique par deux lecteurs en aveugle. Les critères pour considérer une cellule comme une CTC ont été énoncés plus haut. Pour le CellSearch, le comptage était réalisé par la société elle-même (analyse extériorisée en Italie).

Le taux de capture était calculé en réalisant le rapport :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{nombre final de cellules}}{\text{nombre initial de cellules}} \times 100$$

Un taux de capture « ajusté » était calculé afin de prendre en compte les résultats des contrôles. Le calcul de ce taux permet de prendre en compte certains biais comme la viabilité cellulaire et les pertes cellulaires secondaires aux différentes étapes (fixation sur lame, transfert, immunocytochimie...). Ce ratio était calculé de la manière suivante :

$$\text{Rendement ajusté} = \frac{\text{Rendement cellules avec plateformes}}{\text{Rendement cellules controles}} \times 100$$

L'analyse statistique était la suivante. Les statistiques descriptives étaient présentées en nombres et pourcentages. Les comparaisons entre les taux de captures ont été réalisées en utilisant un test de Kruskal-Wallis. Le risque alpha était de 5%. Le logiciel easymedstats a été utilisé pour réaliser les statistiques de l'article.

### **3.2.1.3. Résultats principaux et discussion**

Au total, 10 expériences ont été réalisées sur milieu cellulaire (RPMI) et 3 expériences avec du sang veineux de volontaire sain avec les plateformes Vortex VTX-1, ClearCell FX et ISET. Pour le Cellsearch, 10 expériences ont été réalisées sur du sang veineux de volontaire sain.

Les principaux résultats sont résumés dans le **Tableau 3**.

Plateforme utilisée	Moyenne iCN $\pm$ SD [Range]	Moyenne fCN $\pm$ SD [Range]	Taux de capture total	Taux de capture	Taux de capture ajusté	Taux de capture	Taux de capture ajusté
			RPMI + sang veineux	Dans le milieu RPMI seul (n = 10)	Dans le sang veineux seul (n = 3)		
<b>Vortex (VTX-1) (n = 13)</b>	57.31 $\pm$ 33.93 [23.0; 128.0]	11.31 $\pm$ 6.14 [5.0; 21.0]	22.2%	22.6%	25.6%	20.7%	26.6%
<b>ClearCell FX (n = 13)</b>	54.46 $\pm$ 26.43 [19.0; 94.0]	4.85 $\pm$ 3.93 [1.0; 13.0]	8.9%	10.2%	15.1%	4.7%	7.2%
<b>ISET (n = 13)</b>	42.08 $\pm$ 19.5 [25.0; 84.0]	19.92 $\pm$ 22.39 [1.0; 84.0]	39.2%	30.3%	43.5%	69.1%	89%
<b>Cellsearch (n = 10)</b>	26.9 $\pm$ 11.18 [12.0; 46.0]	0.2 $\pm$ 0.422 [0.0; 1.0]	1.1%	NA	NA	1%	NA

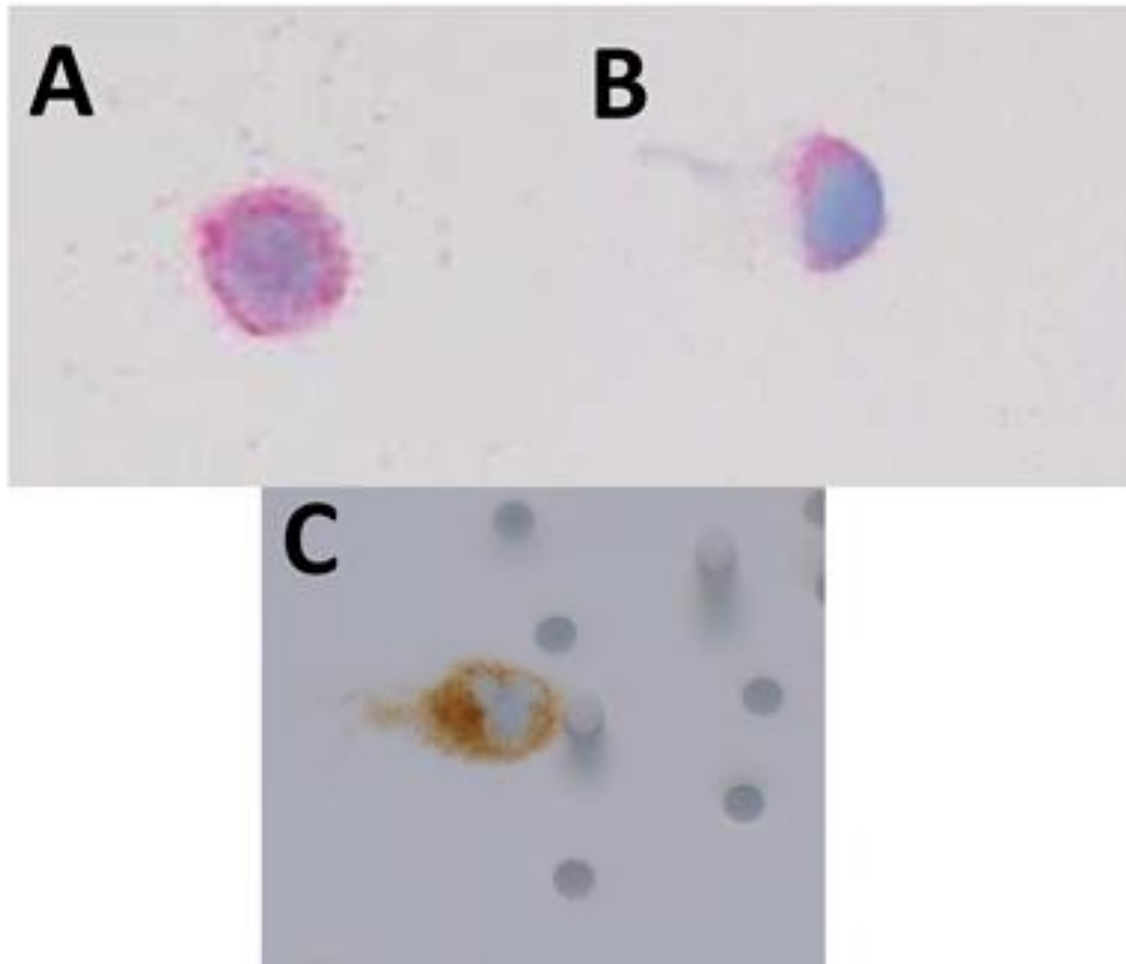
**Tableau 3** : taux de capture sur milieu cellulaire et sang veineux obtenu avec chaque plateforme de CTCs. iCN : initial Cell Number ; fCN : final Cell Number; RPMI : Roswell Park Memorial Institute ; SD : Standard Deviation.

Les principaux résultats étaient les suivants :

- Les taux moyens de détection étaient de 39,2% pour l'ISET, 22,2% pour le Vortex VTX-1, 8,9% pour le ClearCell FX et 1,1% pour le CellSearch.
- L'ISET, le Vortex VTX-1 et le ClearCell FX étaient associés à un taux de capture supérieur au CellSearch ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  et  $p = 0.028$ , respectivement). L'ISET et le Vortex VTX-1 avaient un meilleur rendement comparativement au ClearCell FX

( $p=0.002$  et  $p= 0.019$ , respectivement). Il n'y avait pas de différence entre le Vortex VTX-1 et l'ISET ( $p>0.05$ ).

- Des photographies des CTCs identifiées sont présentées sur la **Figure 9**.



**Figure 9** : A : CTC obtenue avec : (A) Vortex VTX-1 ; (B) ClearCell FX ; (C) ISET.

Nos résultats sont conformes aux données de la littérature (Jin and Burnier, 2021). L'ISET est classiquement associée à de meilleurs rendements comparativement aux autres plateformes (Martel et al., 2023b). Dans le MU, l'ISET a permis la détection de CTCs dans 31% et 55% des cas dans les études de Pinzani et al. (MU primitif) et Mazzini et al. (MU primitif et métastatique) respectivement (Mazzini et al., 2014; Pinzani et al., 2010).

Notre taux de détection avec le Vortex VTX-1 est plus faible que dans d'autres études, cela pouvant être expliqué par une méthodologie différente (utilisation de 50-100 cellules versus 300 dans d'autres études, révélation par immunocytochimie et pas immunofluorescence)(Che et al., 2016). Le Vortex VTX-1 a rarement été comparé à d'autres plateformes. Une étude comparant le Vortex VTX-1 au CellSearch retrouvait un meilleur taux de détection en faveur du Vortex VTX-1(Che et al., 2016). Enfin, notons que notre étude est la première à étudier le Vortex VTX-1 et le ClearCell FX dans le MU.

Dans notre étude, le CellSearch était associé à un taux de récupération particulièrement faible (1,1%), et ce malgré des expériences réalisées par la société commercialisant le dispositif. Ce résultat dénote avec la littérature existante. Notre étude est la première à utiliser le CellSearch sur une lignée cellulaire de MU. Il est important de noter que les études précédentes étaient uniquement conduites in vivo chez des patients présentant un MU primitif et/ou métastatique. Il est donc impossible de connaître le taux de capture réel car le nombre initial de cellules est par définition inconnu in vivo. Anand et al. retrouvaient des CTCs chez 30% et 42% des patients présentant un MU primitif et métastatique respectivement (Anand et al., 2019). Bidard et al. identifiaient des CTCs de MU chez 30% des patients (Bidard et al., 2014). Bande et al. détectaient quant à eux des CTCs chez 50% des patients avec MU (Bande et al., 2015) ce qui est proche de Terai et al avec 52,9% de détection chez des patients avec un MU primitif et métastatique (Terai et al., 2015). Alors, comment expliquer un taux aussi faible de détection dans notre étude ? La capture immunomagnétique des CTCs par le système CellSearch repose sur l'expression du marqueur membranaire CD146. Une fois capturée, l'identification des CTCs repose sur le marqueur membranaire HMW-MAA. Afin de rechercher une explication, nous avons réalisé 2 expériences supplémentaires :

- Nous avons utilisé une lignée cellulaire de mélanome cutané exprimant fortement le CD146 (cellules M229) et les avons filtré avec le CellSearch. La plateforme a permis la détection des cellules M229, contrairement aux cellules de MU OMM 2.3
- Nous avons également vérifié l'expression membranaire du CD146 sur notre lignée de MU OMM 2.3 et avons constaté une absence d'expression par les cellules.
- Nous avons conclu que notre faible taux de détection pouvait être lié à une absence d'expression de CD146. Pourtant, le CD146 est exprimé par les 80 MU présents dans le Cancer Génome Atlas disponible en ligne (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>). Dans la littérature, le taux d'expression de CD146 dans le MU apparaît très variable et dépend : (i) des lignées cellulaires de MU utilisées et notamment de la radiothérapie délivrée lors du traitement initial de la tumeur (Beasley et al., 2021; Lai et al., 2007), du statut primitif ou métastatique des patients, et de la méthode de détection utilisée (Beasley et al., 2021; Beutel et al., 2009). Beasley et al. constataient une expression de CD146 in vitro, bien que cette dernière était variable et moins importante que d'autres marqueurs comme ABC5, Melan A et GP100. Dans la même étude réalisée sur 10 patients avec MU, CD146 n'était exprimé que chez 40% des patients (Beasley et al., 2021). Dans tous les cas, l'absence de détection du CD146 dans notre étude illustre la limite actuelle des systèmes de détection basés sur des marqueurs membranaires spécifiques. Ces systèmes, comme le CellSearch, permettent probablement une meilleure spécificité, mais au prix d'une sensibilité diminuée comparativement à d'autres plateformes basées sur des méthodes purement physiques (taille, forme, déformabilité) (Martel et al., 2023b).

En dehors du taux de détection, d'autres paramètres sont importants à prendre en compte et sont résumés dans le **Tableau 4**. Ces paramètres, développé ci-dessous, sont primordiaux à évaluer en vue d'une potentielle application en pratique clinique quotidienne.

Plateforme utilisée	Mecanisme	Taux de capture dans notre étude	Spécificité (pureté)	Reproductible, facile à utiliser	Durée totale de processing (capture + identification)	Nombre de tubes pouvant être analysés en même temps	Possibilité d'effectuer des analyses en aval (protéomique, génomique, culture...)	Ergonomie
Vortex (VTX-1)	Microfluidique	22,2%	Moyenne	Oui	~180	1	Facile	Oui
ClearCell FX	Microfluidique	8,9%	Moyenne	Oui	~180	1	Facile	Oui
ISET	Par taille	39,2%	Faible	Moyen	~150	4	Plus difficile	Oui
Cellsearch	Immunomagnétique	1,1%	Bonne	Oui	~180	8	Plus difficile	Non

**Tableau 4** : avantages et inconvénients de chaque plateforme dans notre expérience en vue d'une application en pratique clinique quotidienne.

Dans notre expérience :

- **Sensibilité (taux de capture)** : dans nos mains, l'ISET et Vortex VTX-1 étaient associés à la meilleure sensibilité.



- **Spécificité (pureté)** : notre étude n'était pas construite pour répondre à cette question stricto sensu. Cependant, dans notre expérience, il était parfois très difficile de distinguer une CTC d'un élément figuré du sang avec l'ISET (risque de faux positif). Cela était plus aisé avec le Vortex VTX-1 et le ClearCell FX. Le CellSearch est associé à la plus grande spécificité en raison de son automatisation et de son principe reposant sur la détection positive de marqueurs de surface (CD146, HMW-MAA) et détection négative (CD34, CD45) afin d'éliminer les éléments figurés du sang.
- **La durée de la procédure** : pour être applicable en pratique clinique quotidienne, la manipulation doit être rapide. Si la filtration avec l'ISET était la plus rapide (en 1 à 2 minutes contre 50- 75 min pour les autres), la phase de révélation était en revanche beaucoup plus longue (> 1h), totalement manuelle, parfois ardue et nécessitait une courbe d'apprentissage (plusieurs échantillons perdus pendant les expériences). Au total, la durée de manipulation était à peu près identique entre toutes les plateformes (environ 3 heures, hors lecture).
- **La reproductibilité** : dans notre méthodologie, nous avons tenté d'automatiser autant que possible les étapes en utilisant des dispositifs utilisés en pratique clinique quotidienne (Immunocytochimie, analyse monocouche). Le CellSearch est 100% automatisé (filtration et révélation). Seule la lecture demande confirmation, sachant qu'une formation délivrée par la société est obligatoire lors de la livraison de l'appareil. En utilisant la fixation monocouche sur lame à l'aide du thinprep (Hologic, France) et en réalisant l'immunocytochimie à l'aide du Benchmark Ultra ((Roche Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)), la reproductibilité était bonne pour le Vortex VTX-1 et le ClearCell FX. Comme développé plus haut, l'ISET était le dispositif nécessitant le plus de travail

manuel entre la filtration et l'immunocytochimie, rendant cette technique moins automatisée comparativement aux autres avec un risque de biais inter-opérateur.

- ***Analyses complémentaires d'aval*** : à l'origine, les CTCs étaient uniquement comptées à visée diagnostique et pronostique. Progressivement, des analyses complémentaires ont été réalisées sur les CTCs isolées : protéomique, génomique, culture cellulaire voire xenogreffe (Poulet et al., 2019). Avec le Vortex VTX-1 et le ClearCell FX, les CTCs sont collectées en milieu liquide (dans du PBS) ce qui rend les analyses en aval plus simples à réaliser (Kidess-Sigal et al., 2016; Liu et al., 2017; Sinkala et al., 2017; Takahashi et al., 2020). Il est plus difficile de récupérer les CTCs filtrées avec l'ISET et le CellSearch, même si plusieurs études ont démontré leur faisabilité (Buim et al., 2015; Laget et al., 2017; Ma et al., 2013; Vona et al., 2000).
- ***L'ergonomie*** : critère devenu indispensable, notamment dans un laboratoire comme le nôtre (LPCE) qui regroupe d'autres activités comme le stockage d'échantillons biologiques via notre biobanque (Martel et al., 2023a). L'ISET, le Vortex VTX-1 et le ClearCell FX sont toutes ergonomiques et l'identification des CTCs est permise grâce à d'autres appareils utilisés en pratique quotidienne (thinprep, Benchmark Ultra) rendant leur ergonomie excellente au quotidien. En revanche, le CellSearch se compose de 2 modules de grande taille, un module pour capturer les CTCs (Automated Celltracks Autoprep) et un second pour lire les résultats (CellTracks analyzer).
- ***Le prix*** : au-delà du prix de la plateforme, le consommable doit être pris en considération. Il nous est difficile de réaliser une comparaison précise entre chaque machine car certaines sont en notre possession depuis plusieurs années et certaines ont bénéficié de remises commerciales.

- ***Au total*** : aucune plateforme n'est parfaite et le choix d'utiliser une plateforme plutôt qu'une autre dépend de l'utilisation que l'on souhaite en faire. A visée diagnostique et thérapeutique, un simple comptage des CTCs est suffisant. Il convient alors d'utiliser les plateformes les plus sensibles (ISET) et faciles d'utilisation (microfluidiques). Si des analyses complémentaires sur les CTCs isolées sont souhaitées, les systèmes microfluidiques sont à privilégier.

### **3.2.2. Article : Assessment of Different Circulating Tumor Cell Platforms for Uveal Melanoma: Potential Impact for Future Routine Clinical Practice**

Arnaud Martel <sup>1,2,†</sup>, Baharia Mograbi <sup>2</sup>, Barnabe Romeo <sup>2</sup>, Lauris Gastaud <sup>3</sup>, Salome Lalvee <sup>4</sup>, Katia Zahaf <sup>4</sup>, Julien Fayada <sup>4</sup>, Sacha Nahon-Esteve <sup>1,5</sup>, Christelle Bonnetaud <sup>4</sup>, Myriam Salah <sup>4</sup>, Virginie Tanga <sup>4</sup>, Stéphanie Baillif <sup>1</sup>, Corine Bertolotto <sup>5</sup>, Sandra Lassalle <sup>2,4,\*,†</sup> and Paul Hofman <sup>2,4,\*,†</sup>

From:

1 Ophthalmology Department, University Hospital of Nice, Cote d'Azur University, 06 000 Nice, France;

2 Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), FHU OncoAge, Cote d'Azur University, 06000 Nice, France;

3 Oncology Department, Antoine Lacassagne Cancer Center, 06 000 Nice, France;

4 Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, University Hospital of Nice, FHU OncoAge, Cote d'Azur University, Biobank BB-0033-00025, 06 000 Nice, France;

5 Inserm, Biology and Pathologies of Melanocytes, Team1, Equipe labellisée Ligue 2020 and Equipe labellisée ARC 2019, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, 06100 Nice, France;

\* Correspondence: lassalle.s@chu-nice.fr (S.L.); hofman.p@chu-nice.fr (P.H.)

† These authors contributed equally to this work.

## Abstract

Liquid biopsy and circulating tumor cell (CTC) screening has gained interest over the last two decades for detecting almost all solid malignancies. To date, the major limitation in terms of the applicability of CTC screening in daily clinical practice is the lack of reproducibility due to the high number of platforms available that use various technologies (e.g., label-dependent versus label-free detection). Only a few studies have compared different CTC platforms. The aim of this study was to compare the efficiency of four commercially available CTC platforms (Vortex (VTX-1), ClearCell FX, ISET, and Cellsearch) for the detection and identification of uveal melanoma cells (OMM 2.3 cell line). Tumor cells were seeded in RPMI medium and venous blood from healthy donors, and then processed similarly using these four platforms. Melan-A immunohistochemistry was performed to identify tumor cells, except when the Cellsearch device was used (automated identification). The mean overall recovery rates (with mean recovered cells) were 39.2% (19.92), 22.2% (11.31), 8.9% (4.85), and 1.1% (0.20) for the ISET, Vortex (VTX-1), ClearCell FX, and CellSearch platforms, respectively. Although paramount, the recovery rate is not sufficient to assess a CTC platform. Other parameters, such as the purpose for using a platform (diagnosis, genetics, drug sensitivity, or patient-derived xenograft models), reproducibility, purity, user-friendliness, cost-effectiveness, and ergonomics, should also be considered before they can be used in daily clinical practice and are discussed in this article.

**Keywords:** uveal melanoma; liquid biopsy; Cellsearch; ClearCell FX 5; Vortex (VTX-1); ISET; circulating tumor cells

## 1. Introduction

Uveal melanoma (UM) is the most common primary intraocular malignancy in adulthood [1]. UM remains rarely encountered with an annual incidence of five cases per million inhabitants in Western countries [2]. In the case of localized disease, conservative strategies (e.g., proton radiotherapy, brachytherapy) or primary enucleation are the best treatment [1]. Although primary ocular treatment has been associated with almost 95% of oncologic success [3,4], metastases will occur in about 50% of patients at 10 years [2]. Recent advances in UM pathophysiology have been reported. Of interest, it has been demonstrated that mutations in the GNAQ, GNA11, and BAP1 genes act, respectively, as driver and prognostic mutations during UM carcinogenesis [5]. Despite this, there is still no treatment available for managing metastatic spread, and patients usually die within 2 years [6]. UM is genetically different from cutaneous melanoma, explaining why targeted therapies and immunotherapies have been very disappointing in UM until now [5,7]. However, recently, new hopes have been raised by the development of tebentafusp, which is a TCR/Anti-CD3 bispecific fusion protein targeting gp100 [8]. It is noteworthy that tebentafusp can only be administered to HLA-A\*02:01-positive patients, and its overall survival is modest (73% versus 59%) at one year; studies with longer follow-ups (at least 5 years) are warranted and a precise country-by-country medico-economic analysis is still lacking [9].

UM is known to disseminate through the bloodstream and has an exceptional, still unexplained, tropism for the liver [10,11]. Several reliable prognostic factors have been reported, including chromosomal abnormalities (loss of chromosome 3, gain of 8q) [12] and class 2 UMIs [13] and have been associated with a metastatic spread and poor overall survival. However, these prognostic factors are usually identified in enucleated specimens or when transvitreal or

transscleral tissue biopsy is performed [14]. The use of tissue biopsy in UM is debated because of the risk of extraocular dissemination [14]. Therefore, there is an urgent need to identify reliable and non-invasive biomarkers to identify patients with a high metastatic risk.

Liquid biopsy (LB) is a non-invasive, reliable, and repeatable technique for the diagnosis, prognosis, and follow-up of various solid malignancies [15]. In ocular malignancies, LB allows several tumor-related features to be monitored through the collection of accessible liquids such as blood or aqueous humor [16–18]. LB appears particularly promising in UM because (i) the metastatic spread is strictly hematogenous, (ii) tissue biopsy is not routinely performed [14,19], and (iii) detecting circulating tumor cells (CTCs) at the time of diagnosis or during the follow-up may help to predict the risk of subsequent metastatic spread [17]. LB contains many components, including CTCs, circulating free DNA (cfDNA), circulating RNA, small and long non-coding RNAs, ribosomes, exosomes, plasma proteins, and tumor-educated platelets [20,21]. CTCs reflect the tumor's spatio-temporal heterogeneity through the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which promotes tumor dissemination, as they re-main alive when captured and may be further genetically analyzed and/or cultured [22]. However, compared to cfDNA, CTCs are generally not used in routine clinical practice due to various limitations, in particular some technical issues impairing the sensitivity and specificity of the technique [23,24].

As shown in Table 1, “hunting” a CTC requires three phases which should be individualized: CTC capture, CTC identification, and CTC downstream analyses.

The platforms used for CTC capture are based on label-dependent or label-free properties, explaining the high number of commercially available devices [24]. It should be noted that even when the same CTC platform is used, the pre-analytical phase (blood collection, transport,

buffer) as well as the CTC identification method may differ from one study to another one, leading at the end to a lack of consensus on the “ideal” methodology [17,24].

Phase	CTC Capture	CTC Identification	CTC Downstream Analyses
<b>Examples</b>	Immunoaffinity with positive or negative enrichment (immunomagnetic, microfluidic)	Immunohistochemistry	Genomics
	Biophysical (“label-free”):	Immunofluorescence	Transcriptomics
	• Size	Flow cytometry	Proteomics
	• Deformability	Spectrophotometry	CTC culture
	• Density	Electrical impedance	Cell line-derived xenografts (CDX)
	• Microfluidics		
	• Electrophoresis		

Table 1. Summary of the various analytical phases of CTC screening [22,24].

To date, only the immunomagnetic Cellsearch platform (Menarini Silicon Biosystems, Florence, Italy) has been approved—by the Food and Drug Administration (FDA) in 2004—for the diagnosis and prognosis of metastatic breast, colorectal, and prostate cancers [18]. The last decade has been marked by major technological advances, especially in the development of physical microfluidic platforms [24,25]. Ideally, a CTC platform should combine the following features: high sensitivity (high recovery or identification rate), high specificity/purity, high reproducibility, standardized, recovery of viable CTC, user-friendly, rapid processing, ergonomic, and cost-effective. The daily clinical application is often eluded in the literature but is essential for clinicians [17]. To date, only a few studies have compared the efficiency of different CTC platforms [26–33]. To our knowledge, no study has compared different CTC platforms using UM cells [17]. The aim of this study was to compare the efficiency of four different CTC devices by assessing the cell recovery rate for each device



using a UM cell line (OMM 2.3). Their potential daily clinical applicability in UM patient management in the near future was then discussed.

## 2. Results

The main results are presented in Table 2 and Figure 1.

CTC Platform	Mean iCN ± SD	Mean fCN ± SD	Overall Recovery Rate in RPMI + Venous Blood	Recovery Rate in RPMI Alone (n = 10)	Adjusted Recovery Rate	Recovery Rate in Venous Blood Alone (n = 3)	Adjusted Recovery Rate
	[Range]	[Range]					
<b>Vortex (VTX-1) (n = 13)</b>	57.31 ± 33.93 [23.0; 128.0]	11.31 ± 6.14 [5.0; 21.0]	22.2%	22.6%	25.6%	20.7%	26.6%
<b>ClearCell FX (n = 13)</b>	54.46 ± 26.43 [19.0; 94.0]	4.85 ± 3.93 [1.0; 13.0]	8.9%	10.2%	15.1%	4.7%	7.2%
<b>ISET (n = 13)</b>	42.08 ± 19.5 [25.0; 84.0]	19.92 ± 22.39 [1.0; 84.0]	39.2%	30.3%	43.5%	69.1%	89%
<b>Cellsearch (n = 10)</b>	26.9 ± 11.18 [12.0; 46.0]	0.2 ± 0.422 [0.0; 1.0]	1.1%	NA	NA	1%	NA

Table 2. CTC recovery rates obtained with four CTC isolation platforms. iCN: initial Cell Number; fCN: final Cell Number; NA: Non-Applicable.

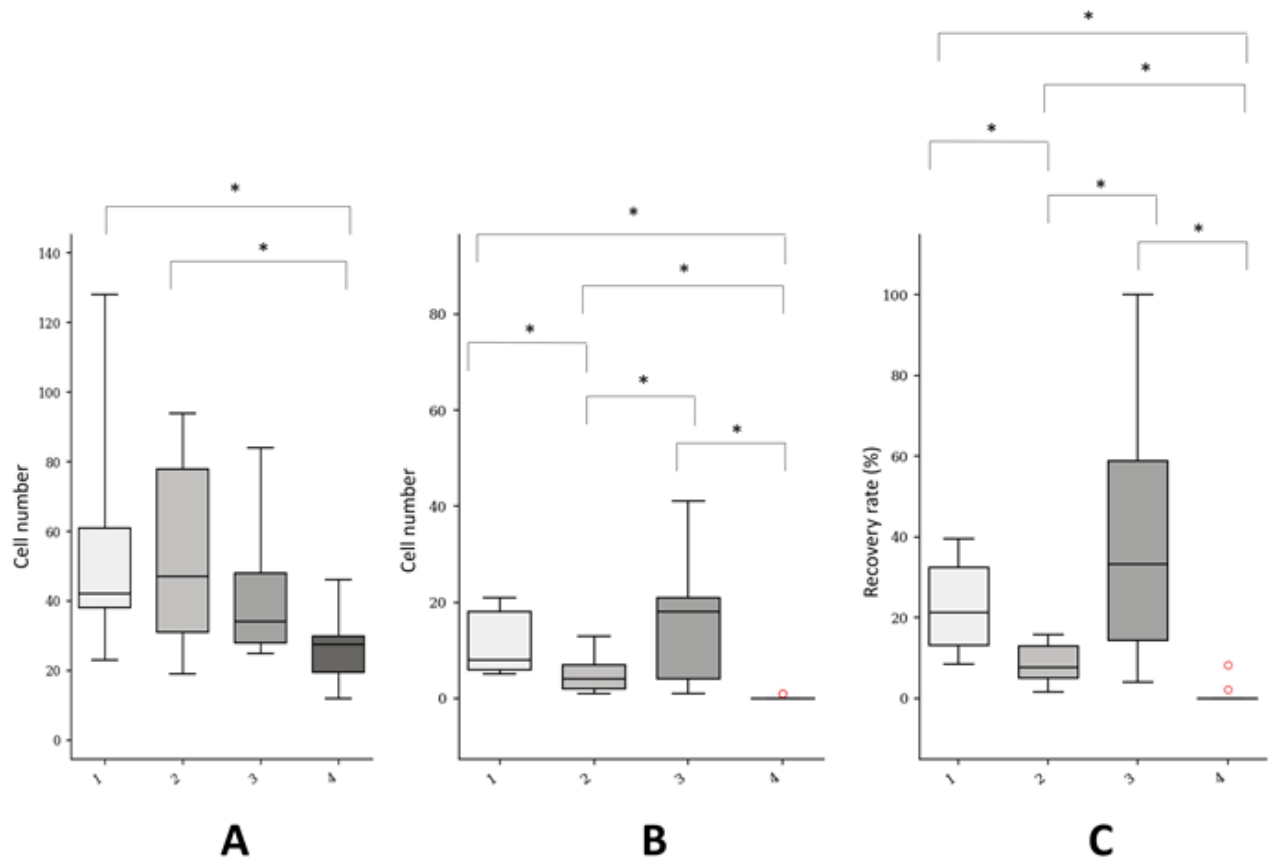


Figure 1. Summary of the CTC recovery rates of four CTC isolation platforms using the OMM 2.3 UM cell line. (A) initial cell number (iCN); (B) final cell number (fCN); (C) overall recovery rate (in RPMI + venous blood); 1: Vortex (VTX-1); 2: ClearCell FX; 3: ISET; 4: Cellsearch. (\*) statistically significant.

The median number of initial cells was, respectively, 42.0 (interquartile range [IQR]: 23.0), 47.0 (IQR: 47.0), 34.0 (IQR: 20.0), and 27.5 (IQR: 10.25) using the Vortex (VTX-1),

Cellsearch, ISET, and Cellsearch devices ( $p = 0.014$ ). Pairwise analyses revealed significant differences between the Cellsearch and Vortex (VTX-1) devices ( $p = 0.003$ ) and between the Cellsearch and ClearCell FX devices ( $p = 0.007$ ). No difference was observed between the Vortex (VTX-1) and ISET devices and between the Vortex (VTX-1) and ClearCell FX devices.

The median number of final cells was, respectively, 8.0 (IQR: 12.0), 4.0 (IQR: 5.0), 18.0 (IQR: 17.0), and 0.0 (IQR: 0.0) using the Vortex (VTX-1), Cellsearch, ISET, and Cell-search devices ( $p < 0.001$ ). Pairwise analyses revealed significant differences between the ClearCell FX and Vortex (VTX-1) devices ( $p = 0.035$ ), between the ISET and Clear-Cell FX devices ( $p = 0.022$ ), between the Cellsearch and Vortex (VTX-1) devices ( $p < 0.001$ ), between the Cellsearch and ClearCell FX devices ( $p = 0.008$ ), and between the Cellsearch and ISET devices ( $p < 0.001$ ).

The median overall CTC recovery rate was, respectively, 21.2 (IQR: 19.4), 7.7 (IQR: 7.8), 33.3 (IQR: 44.5), and 0.0 (IQR: 0.0) using the Vortex (VTX-1), Cellsearch, ISET, and Cellsearch devices ( $p < 0.001$ ). Pairwise analyses revealed significant differences between the ClearCell FX and Vortex (VTX-1) devices ( $p = 0.019$ ), between the ISET and ClearCell FX devices ( $p = 0.002$ ), between the Cellsearch and Vortex (VTX-1) devices ( $p < 0.001$ ), between the Cellsearch and ClearCell FX devices ( $p = 0.028$ ), and between the Cellsearch and ISET devices ( $p < 0.001$ ). No difference was found between the Vortex (VTX-1) and ISET devices.

Illustrative photographs of the stained CTC collected using the different platforms are presented in Figure 2.

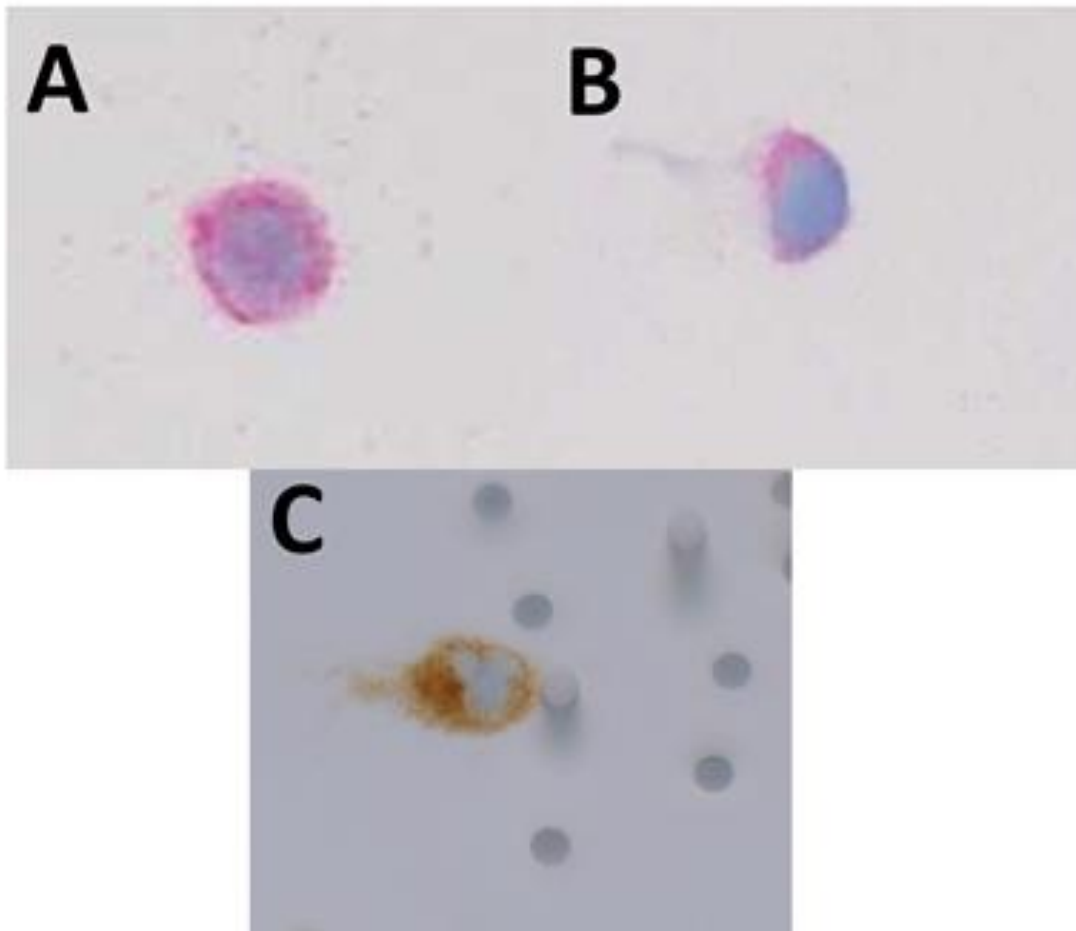


Figure 2. Illustrative photographs of the CTC collected using the (A) Vortex (VTX-1); (B) Clear-Cell FX; (C) and ISET devices. OMM 2.3 cells were stained with Melan-A red (A and B), and with Melan-A (C). (A–C: immunohistochemistry; Melan-A; A103 clone, ready to use, Roche Ventana, Tucson, AZ, USA; original magnification  $\times 400$ ).

### 3. Discussion

CTC “hunting” has gained interest over the last two decades [34]. New devices allow insight into tumor heterogeneity and downstream single-cell analyses are now possible [22,35,36]. However, the current limitation is the lack of reproducibility regarding CTC capture and

identification. This lack of standardization partly explains why CTC screening is not routinely used in daily clinical practice [17,24].

Only a few studies have compared different CTC platforms. This could be explained by the cost of each device and reagent. The Clinical and Experimental Pathology Laboratory (LPCE) located at Nice University Hospital (France) has set up a unique LB platform for CTC detection with four different CTC devices based on immunoaffinity and immunomagnetic (Cellsearch, Menarini, Silicon Biosystems, Florence, Italy) isolation according to the size (ISET, Rarecells, Paris, France) and microfluidic (Vortex [VTX-1], Biosciences, Pleasanton, USA, and ClearCell FX, ClearBridge, Biolidics, Singapore) technologies. For the first time, we compared four different CTC platforms for UM cell isolation and identification.

### **3.1. CTC Recovery Rates**

A single UM cell line, cultured in our institution, was used to assess the CTC platforms. Cell lines are often used to compare different methods because they allow a fairer comparison [29,37]. Indeed, cell characteristics, such as size, deformability, and antigen expression levels, were identical when comparing different devices. This allows the experimental conditions to be standardized and the experimental variability to be minimized, especially when comparing the performance of CTC platforms.

We found a significantly higher recovery rate with the ISET (39.2%) and Vortex (VTX-1) (22.2%) platforms compared to the ClearCell FX (8.9%) and Cellsearch (1.1%) devices. Although not significant compared to the Vortex (VTX-1) device, the ISET device was the most sensitive CTC platform in our study.

Our results are in accordance with other studies that have compared various CTC platforms for detecting several solid malignancies [26,28–33,38]. As shown in Table 3, the detection rate

using the ISET device ranged between 36% and 100%, regardless of the malignancy. Compared to other CTC platforms, the ISET device always provided the highest CTC detection rates (Table 3). With the ISET platform, Mazzini et al. detected CTCs in 55% of cases in 31 primary and metastatic UM patients [39]. Using the same device, Pinzani et al. found a lower detection rate of 31% in 41 UM patients [40], which could be explained by the inclusion of primary UM patients while patients with a metastatic disease were excluded.

The ClearCell FX device is a microfluidic platform for the physical isolation of CTCs based on the inertial focusing process (isolation based on the size, shape, and de-formability). In our study, the detection rate obtained with the ClearCell FX device was low (8.9%) and was lower than that obtained with the Vortex (VTX-1) and ISET platforms. Kulasinghe et al. found a detection rate of 47.8% and 51.5% in patients with head and neck cancer and with non-small cell lung cancer, respectively [41]. Yap et al. reported a detection rate of 75.9% in 108 patients with breast cancer [42]. However, these studies were not comparative, and most patients had a metastatic disease. Chudasama et al. found a high detection rate (78.4%) in 32 lung cancer patients [43]. However, the authors only used standard hematoxylin and eosin staining for CTC identification with a high risk of false positives. In their cohort of healthy patients, they found atypical cancer cells in 47%. In our study, the detection rate with the Clear-Cell FX device was much lower than those reported in the literature. However, comparing our results is challenging because other studies have investigated the efficiency of ClearCell FX using different cell lines and cells from patients with primary and metastatic cancers.

The Vortex (VTX-1) device is a physical microfluidic platform also based on the inertial focusing process [44,45]. In a study published in 2016, the recovery rate of breast carcinoma cell lines was about 38% after two cycles [37]. In patients with advanced prostate cancer, Vortex (VTX-1) identified CTCs in 80% of cases [46]. Our recovery rate (22.2%) was lower than those

reported in previous studies. This could be explained by the fact that we were the first to use a UM cell line. Fewer UM cells were used for the experiments (15–150 cells in our experiments vs. ~300 cells usually) despite the fact that we performed two cycles as recommended by the manufacturer [37]. Also, we used a different CTC detection method based on the immunocytochemistry staining of monolayer cultures vs. immunofluorescence [37]. As outlined in Table 3 and in line with our results, Che et al. also found that the Vortex (VTX-1) device allowed higher recovery rates to be achieved (85%) than the Cellsearch device (15%) in 13 patients with breast or lung carcinomas [37].

The Cellsearch platform uses a label-dependent approach for CTC enrichment with automatic capture and identification of CTC. The immunomagnetic-based Cell-search device is the only FDA-approved CTC platform for metastatic breast, prostate, and colon carcinomas to date [15]. For carcinomas, immunomagnetic antibodies directed against the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), an epithelial cell surface marker, have been used to target CTCs [47]. Melanoma cells do not express EpCAM. The Cellsearch Circulating Melanoma Cell assay uses a human high-molecular-weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA), called Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4 or MCSP), as an identification marker in addition to CD146 (also known as MCAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule) or MUC 18) to enrich CTCs from blood [48,49]. Melanoma CTCs must express CD146 and HMW-MAA receptors but not the leukocyte and endothelial cell markers (CD45 and CD34) to be considered CTCs [33]. The advantages of Cellsearch are its high specificity (purity) with positive enrichments allowing leukocyte elimination as well as its full automation, allowing a better reproducibility of the results from one study to another [17,24]. The Cellsearch device has been extensively compared to the ISET device in certain solid tumors and has shown lower recovery rates (Table 3). Several studies have investigated the efficiency of the Cellsearch device in UM [18,48–50]. Anand et al. detected CTC in 30% and 42% of primary and metastatic UM patients (n = 39),

with a mean number of 5.9 CTCs isolated [49]. In another study conducted in 20 patients, Bande et al. detected CTCs in 50% of primary and metastatic UM patients and none in patients with benign naevi, with a mean number of only one CTC isolated [51]. Terai et al. identified CTCs in 52.9% of 34 primary and metastatic UM patients [50]. Interestingly, they also demonstrated a higher sensitivity in arterial blood samples (detection rate = 100%) compared to venous blood samples (detection rate = 52.9%). Finally, Bidard et al. identified CTCs in 30% of metastatic UM patients (n = 40) and found a positive correlation between the number of CTCs and the presence of miliary liver metastases [48]. In line with Li et al., who identified CTCs in only 1.8% of esophageal cancer patients [38], we found a very low recovery rate (1.1%) using the Cellsearch platform. Of interest, all the experiments were performed externally by the manufacturer itself (Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italy). A positive control (the M229 cutaneous melanoma cell line) was also used to confirm the identification of melanoma cells by the platform. Therefore, we hypothesized that our OMM 2.3 cells did not express CD146 at their surface. CD146 is a cell adhesion glycoprotein strongly expressed by cutaneous melanoma and UM cells. Beutel et al. found that 100% of 35 primary UM cells positively expressed CD146 by immunohistochemistry. However, its expression was highly heterogeneous [52]. They also found a stronger expression of CD146 in metastatic (82.3%) vs. primary (35.4%) UM patients. Lai et al. also demonstrated that CD146 was expressed by seven and three primary and metastatic UM cell lines, respectively, by RT-PCR, immunoblotting, and immunohistochemistry. Immunoblotting has shown variable CD146 levels depending on the cell lines [53]. While the OMM 2.3 cell line has not been analyzed in this study, lower CD146 levels have been found in UM cell lines previously treated with iodine radioactive plaques, such as the OMM 2.3 cell line, compared to untreated cell lines [53]. Similarly, Beasley et al. [54] performed several immunohistochemistry analyses in five different UM cell lines (OMM 2.3 cells were not studied). CD146 expression was highly variable from one cell line to another



(from no to moderate marker intensity). ABCB5, MART 1, and GP 100 were the most strongly expressed markers in almost all the studies of UM cell lines. Flow cytometry revealed strong CD146 expression in all investigated UM cell lines. Interestingly, CD146 was not expressed in 6 out of 10 UM patients and MCSP was not detected in any of the UM specimens [54]. Finally, CD146 was expressed in all the 80 UM samples available in The Cancer Genome Atlas analyses [55]. We analyzed CD146 by immunohistochemistry in OMM 2.3 and M229 cell lines (see Supplementary Figure S1). The expression was negative in OMM 2.3 cells and positive in M229 cell lines.

To our knowledge, our study was the first to isolate *in vitro* UM cells using the CellSearch device. According to us, the variable and heterogeneous expression of CD146 could explain the low recovery rate and the discrepancies found in the literature. Furthermore, a highly variable expression of the antigen in identical cell lines cultured in different institutions has already been reported, resulting in recovery rates ranging between 12 and up to 83% for a given epithelial cell line when the CellSearch system was used [56]. This finding highlights a limitation of the label-dependent Cell-search platform. Unlike other CTC platforms based on label-free approaches, UM cells weakly expressing CD-146 might not be enriched, leading to inaccurate results. Although CD146 tends to be more strongly expressed in metastatic UM cells [52], the mesenchymal transition of metastatic UM cells remains poorly investigated. This limitation could explain why previous studies have used other immunoaffinity- and immunomagnetic-based isolation methods to capture UM CTCs. In the literature, large differences have been found depending on the immunomagnetically embedded anti-body used. Tura et al. used a dual-immunomagnetic enrichment (NKI/C3, NKI/beteb immunobeads) and identified CTCs in 93.6% of primary UM patients [57]. Ulmer et al. [58] and then Suesskind et al. [59] used the anti-melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan (MCSP) antibody conjugated with microbeads and identified CTCs in 19% and 14% of UM patients, respectively. Eide et al.

used sheep anti-mouse IgG antibody-coated superparamagnetic particles conjugated with several antibodies (9.2.27 anti-melanoma-associated antibody, Ep-1 IgG1 antibody, and 376.96 antibody) and found CTCs in only 1.6% (n = 328) of UM patients [60]. More recently, Beasley et al. used a multimarker panel of immunomagnetic beads directed against anti-ABCB5, anti-gp100, anti-CD146, and anti-MCSP antibodies and identified CTCs in 86% of patients with localized UM (n = 43) [54].

<b>Authors, year</b>	<b>In Vitro or In Vivo Study</b>	<b>Cancer Type</b>	<b>CTC Platform Used (Detection or Recovery Rate)</b>
<b>Present study</b>	In vitro	Uveal melanoma	Vortex (VTX-1) (22.2%) ClearCell FX (8.9%) ISET (42.2%) Cellsearch (1.1%)
<b>Tammaing et al., 2020 [26]</b>	In vivo	Non-small cell lung carcinoma	ISET (88%) Cellsearch (69%)
<b>Yin et al., 2019 [27]</b>	In vivo	Breast cancer	ClearCell FX (27.8%) Cellsearch (27.8%)
<b>Bai et al., 2018 [28]</b>	In vivo	Renal cell carcinoma	ISET (36.1%) Cellsearch (19.4%)
<b>Che et al., 2016 [37]</b>	In vivo	Breast and lung cancer	Vortex (VTX-1) (85%) Cellsearch (15%)
<b>Kallergi et al., 2016 [29]</b>	In vitro	Breast cancer	ISET (95%) Cellsearch (52%)
<b>Li et al. 2015 [38]</b>	In vivo	Esophageal cancer	ISET (32.8%) Cellsearch (1.8%)
<b>Morris et al., 2014 [30]</b>	In vivo	Hepatocellular cancer	ISET (100%) Cellsearch (28%)
<b>Krebs et al., 2012 [31]</b>	In vivo	Non-small cell lung carcinoma	ISET (80%) Cellsearch (23%)
<b>Khoja et al., 2012 [32]</b>	In vivo	Pancreatic cancer	ISET (93%) Cellsearch (40%)
<b>Hofman et al., 2011 [33]</b>	In vivo	Non-small cell lung carcinoma	ISET (50%) Cellsearch (39%)

Table 3. Summary of the previous studies comparing the CTC platforms used in the current study.

### 3.2. Other Features to Be Considered

Although paramount, the recovery rate (sensitivity) is insufficient to assess a CTC platform. In our opinion and experience, the ideal CTC platform should have the following characteristics: (i) reliable with satisfactory sensitivity and specificity rates, (ii) reproducible between multiple experiments, (iii) user-friendly and not requiring extensive training, (iv) capable of capturing CTCs regardless of their phenotypic characteristics, (v) able to process several samples simultaneously, (vi) allow downstream analyses to be performed (genetics, proteomics, culture, CDX), (vii) associated with rapid processing to minimize the time between blood collection and CTC isolation, (viii) cost attractive, and (ix) ergonomic. Overall, the goal of a CTC platform is to be used in daily clinical practice (Table 4).

CTC Platform	Mechanism	Reliability (Capture Rate) in the Present Study	Reproducible and User-Friendly	Total Duration in Minutes (CTC Capture and Identification)	Number of Samples That Can Be Processed at the Same Time	Ease of Performing Downstream Analyses	Ergonomic
<b>Vortex (VTX-1)</b>	Microfluidic	22.2%	Yes	~180	1	Easy	Yes
<b>ClearCell FX</b>	Microfluidic	8.9%	Yes	~180	1	Easy	Yes
<b>ISET</b>	Isolation according to the size	39.2%	Variable	~150	4	More difficult	Yes
<b>Cellsearch</b>	Immunomagnetic	1.1%	Yes	~180	8	More difficult	No

Table 4. Comparison of the four CTC platforms used in the present study.

Capturing CTCs is considered a time-consuming procedure, which limits its daily clinical application. The low throughput and the inability to process large sample volumes are two well-established limitations of physical microfluidic platforms [24]. In-deed, the Vortex (VTX-1) and ClearCell FX platforms can only process one sample at a time compared to ISET (up to four samples simultaneously) and Cellsearch (up to eight samples simultaneously). Of the four CTC platforms compared, ISET was the fastest device, achieving filtration in just 1–2 min. However, the prefiltration time, including thawing of RareCells Buffer, PHmetry [61], and the time for the manual transfer of pores to a plate for immunocytochemistry, lengthened the process. Based on our experience, the processing time was similar for all the CTC platforms and other CTC detection methods.

Another feature to take into account is the time required to process the samples. A significant difference between the processing times may induce a confounding bias. In our study, all samples were processed within 2 h. In clinical studies, the time to process a sample mainly depends on the collector tube used to collect the blood rather than on the platform itself. Usually, CTCs are processed within a few hours and up to 72 h, depending on the blood collection tubes used. CTCs isolated with EDTA tubes should be processed within 24 h, whereas streck or Cellsave tubes allow the analysis to be delayed for up to 72 h [33,62]. This feature is of prime interest for future multicentric studies in which a longer processing time will be required.

Good reproducibility is essential for application in daily clinical practice [24]. In our experience, automation is paramount and manual processing should be reduced as much as possible to reduce the interoperator variability. All the platforms we compared were relatively user-friendly. In our experience, CTC identification with the ISET platform, which consisted of manually cutting the pores, was a bit tedious and time-consuming. Due to manual errors, we

had to repeat the experiments several times to achieve  $n = 13$ . In our experience, the Vortex (VTX-1) device combined several qualities such as a simple dilution with sterile PBS, automatic filtration, and collection of CTCs in a PBS solution, allowing simple and rapid plate fixation before automated immuno-cytochemistry.

Recently, the counting of CTCs has been supplanted by their molecular characterization [24]. Downstream analyses using the Vortex (VTX-1) [63–65] and ClearCell FX [66] platforms have been published. Recovering CTCs using Cellsearch is often considered difficult due to the strong immunomagnetic interactions with the platform surface [22]. Despite this, several articles have demonstrated the feasibility of genetic analyses and even of a CTC-derived explant using the Cellsearch platform [67]. Molecular analyses have also been performed using the ISET technology [68–70] as well as the collection of live cells using the Rarecells protocol [61]. In our experience, down-stream analyses are easier to perform when CTCs are freely collected in liquid as is the case with the Vortex (VTX-1) and ClearCell FX devices.

Although it has not been investigated in detail due to a very low recovery rate, the Cellsearch device is considered the most specific CTC device, yielding the best purity. This can be explained by the use of positive immunomagnetic enrichments [24]. In addition, specific training is mandatory and provided by the manufacturer. This probably limits the interoperator variability and the false-positive detection rates [71]. In contrast, size-dependent isolation techniques, as with the ISET platform, are associated with very low purity rates [24].

Collecting viable CTCs has become a priority in order to offer personalized medicine. Patient-derived xenografts (PDX) from previously isolated CTCs have been re-reported with the Vortex (VTX-1) [72], ISET [61] and Cellsearch [67] platforms. The chemosensitivity of previously isolated CTCs has been reported in vitro with the ClearCell FX device [73]. Inertial focusing technologies (e.g., with the Vortex (VTX-1) and ClearCell FX) are known to exert little

mechanical stress on CTCs and are thought to yield a higher rate of viable CTCs compared to other technologies [24].

Today, laboratory ergonomics has become an issue and even a priority [74], particularly in our department, which offers additional biobanking activities [75]. The four CTC capture devices are ergonomic. CTC identification was performed using the same immunohistochemistry platform (Benchmark Ultra, Roche Diagnostics, Tucson, AZ, USA) for the Vortex (VTX-1), ClearCell FX, and ISET devices. This immunohistochemistry platform is commonly used in daily clinical practice and is present in many pathology laboratories, and therefore requires no additional space in our workplace. The Cellsearch device comprises a CTC tracker to capture CTCs (Automated Celltracks Autoprep system) and a large CTC analyzer dedicated to CTC revelation (Celltracks Analyzer II system), which is not used in our daily clinical practice.

The price of the device, dedicated equipment, and after-sales service will not be discussed because our devices were acquired at different dates and contracts are generally negotiated on a case-by-case basis. A careful health economics analysis investigating the impact of LB in UM with the aim of providing dedicated and personalized medicine would be of strong interest in the near future [76].

As already mentioned, the choice of the ideal CTC platform differs greatly from one team to another [24]. For diagnostic/prognostic purposes (CTC counting), a high recovery rate (sensitivity) as well as rapid processing are mandatory, as offered by physical and label-free platforms (e.g., the ISET), or by the FDA-approved Cellsearch in metastatic breast, colorectal, and prostate cancers [18]. For drug testing and CDX experiments, viable CTCs are needed and label-free platforms based on the inertial focusing process should be preferred (e.g., the Vortex (VTX-1) and ClearCell FX).

### **3.3. Strengths of the Study and Perspectives**

Our study was the first to compare the efficiency of four different commercially available CTC platforms using a UM cell line. Using a single UM cell line allowed a direct comparison to be made and the experimental conditions to be standardized, thus limiting variability due to the cells and experimental conditions. Only one study has compared ctDNA levels with the CTC count using the Cellsearch platform [73]. In other solid malignancies, only a few studies have directly compared various CTC isolation techniques [29].

We developed a standardized and reproducible methodology for collecting and detecting CTCs using the Vortex (VTX-1) and ClearCell FX microfluidic platforms. Melan-A red immunocytochemistry was performed using the automated BenchMark Ultra system (Roche Diagnostics, Tucson, AZ, USA), which is used in daily clinical practice. In our opinion, this allows a reduction in the interoperator variability.

It is estimated that a tumor lesion detectable using conventional imaging techniques is composed of about 10<sup>9</sup> cells [78]. Therefore, CTC identification prior to the diagnosis of metastatic spread could allow early diagnosis and “preventive” treatment [17]. This is of prime interest in UM since no curative treatment is currently available for metastatic UM [10]. Therefore, treatment administered at a very early stage, when CTCs are circulating, could represent a promising therapeutic approach in the near future.

The number of CTCs recovered has been associated with a poorer prognosis in UM. Anand et al. observed a greater number of CTCs in patients with metastatic disease and demonstrated that the number of CTCs correlated with class 2 UM [49]. Mazzini et al. found that the detection of >10 CTCs was significantly associated with aggressive histological types and reduced overall survival [39]. Bidard et al. found that the number of CTCs correlated with the presence of miliary liver metastases [48]. The loss of chromosome 3 and the loss of BAP1 nuclear expression have been strongly associated with the metastatic spread of UM [79,80].

Interestingly, Tura et al. studied chromosome 3 status in CTCs isolated from 44 non-metastatic UM patients using an immuno-FISH isolation technique (anti-NKIC3 and anti-MCSP antibodies) [57]. They found that CTCs with chromosome 3 monosomy were significantly associated with a higher TNM stage than CTCs with chromosome 3 disomy. An interesting perspective would be to monitor BAP1 expression along with Melan-A expression by multiplex immunocytochemistry in order to identify CTCs and obtain additional prognostic in-sights. The prognostic power of CTC identification and the loss of BAP1 expression could help to predict with high accuracy the metastatic risk in a patient with primary UM.

### **3.4. Limitations**

This study has several limitations. First, we compared four different devices at different time periods (study period was from January 2021 to December 2022) and over several weeks (except for Cellsearch, where all the experiments were carried out the same day). However, it was impossible to realize all the analyses on the same day because the Vortex VTX1 and ClearCell FX instruments require sample processing one by one. In addition, it took a while to order the different buffers, restart some platforms, and unfreeze the cells before experiments with a new platform. Similarly, we compared four platforms with different throughputs and therefore different processing times. CTC filtration with the ISET device was very fast ( $\approx 1-2$  min) compared to the other three CTC platforms ( $\approx 60$  min). It could be assumed that the longer the processing time, the lower the cell viability and the lower the recovery rate. We tried to reduce this potential bias by using a specific control (see Materials and Methods section) in each experiment to determine an adjusted recovery rate (Table 1). We did not observe any significant differences between the non-adjusted and adjusted recovery rates. We even observed an improvement in the adjusted recovery rate with the ISET device, suggesting that this bias was very limited. All the experiments were carried out by the same operator and we used



automated devices as much as possible to increase the daily clinical application of our protocol. Therefore, we do not think that intravariability represents a major issue in this study.

Secondly, our study was an *in vitro* study, which could be considered a limitation or an advantage. On the one hand, CTC viability is thought to be higher in venous blood due to continuous interactions with the microenvironment (other blood cells such as neutrophils and platelets, cytokines, growth factors, etc.) [81] compared to *in vitro* conditions in RPMI media where the cells are more likely to die from anoikis [22,81]. The *in vitro* handling of tumor cells in culture could alter their viability. This could have led to an underestimation of the actual recovery rate in our *in vitro* assessment. We tried to take this into account by performing several experiments using venous blood. In addition, *in vivo* UM CTCs may carry several mutations (frequent chromosome 3 monosomy, loss of BAP1) and surface marker changes during the EMT [64], which probably distinguishes them from other commercially available UM cell lines. On the other hand, only *in vitro* experiments allow the recovery rate of a given CTC platform to be assessed with a limited risk of false positives. Indeed, when processing a patient's blood, it is impossible to accurately assess the initial number of venous CTCs, and several cells may be wrongly identified as CTCs (false positives). Therefore, it is essential to distinguish between the recovery rate, which can only be assessed in *in vitro* experiments, and the detection rate, which is assessed in *in vivo* experiments conducted in patients. Most studies have found variable CTC detection rates using different CTC platforms (Table 3) [24]. For reproducibility purposes, we chose to systematically target Melan-A in all our experiments, except for the Cellsearch device (automatic detection of the HMW-MAA and CD146). Melan-A is expressed in primary and metastatic UM, thus limiting an underestimation bias [82].

Thirdly, we only assessed the sensitivity of each platform by determining a specific recovery rate. However, the specificity or purity of the devices was NOT calculated. Indeed, the number

of CTCs collected/total number of cells collected was not assessed [24]. Purity has been shown to be essential for downstream analyses, such as genomics and proteomics, by reducing confounding DNA or RNA from leukocytes [24].

Fourthly, the experiments performed with the Cellsearch device were inconclusive. The recovery rate was low, as discussed above. Our results differ from those previously published for Cellsearch in UM patients. The most plausible explanation would be the low expression of CD146 in our OMM 2.3 cells. This highlights a limitation of the Cellsearch device and of all label-dependent capture devices.

Fifthly, the initial number of cells seeded was not strictly identical between the experiments, the lowest number being observed when assessing the ISET and Cell-search devices (Table 2). However, as the ISET was associated with the best recovery rates, we do not believe that this feature was of primary interest. In addition, we seed-ed about 15–150 cells per experiment, which is lower than previously reported ( $\approx 300$ ) in other in vitro studies [83].

Finally, only positive controls but no negatives controls were performed in this study. Negative controls are not useful for experiments conducted in RPMI but would have been relevant for experiments conducted in venous blood.

## **4. Materials and Methods**

### **4.1. Study Protocol**

An in vitro study was conducted at Nice University Hospital between January 2021 and December 2022. For each CTC platform, 10–13 experiments were performed depending on the CTC device used after seeding a definite number of metastatic UM cells (OMM 2.3 cell line) diluted in RPMI medium and/or venous blood from a healthy donor. The efficiency of each

CTC platform was determined by calculating the cell recovery rate. A dedicated control was used to obtain an adjusted recovery rate when possible. The whole protocol is summarized in Figure 3.

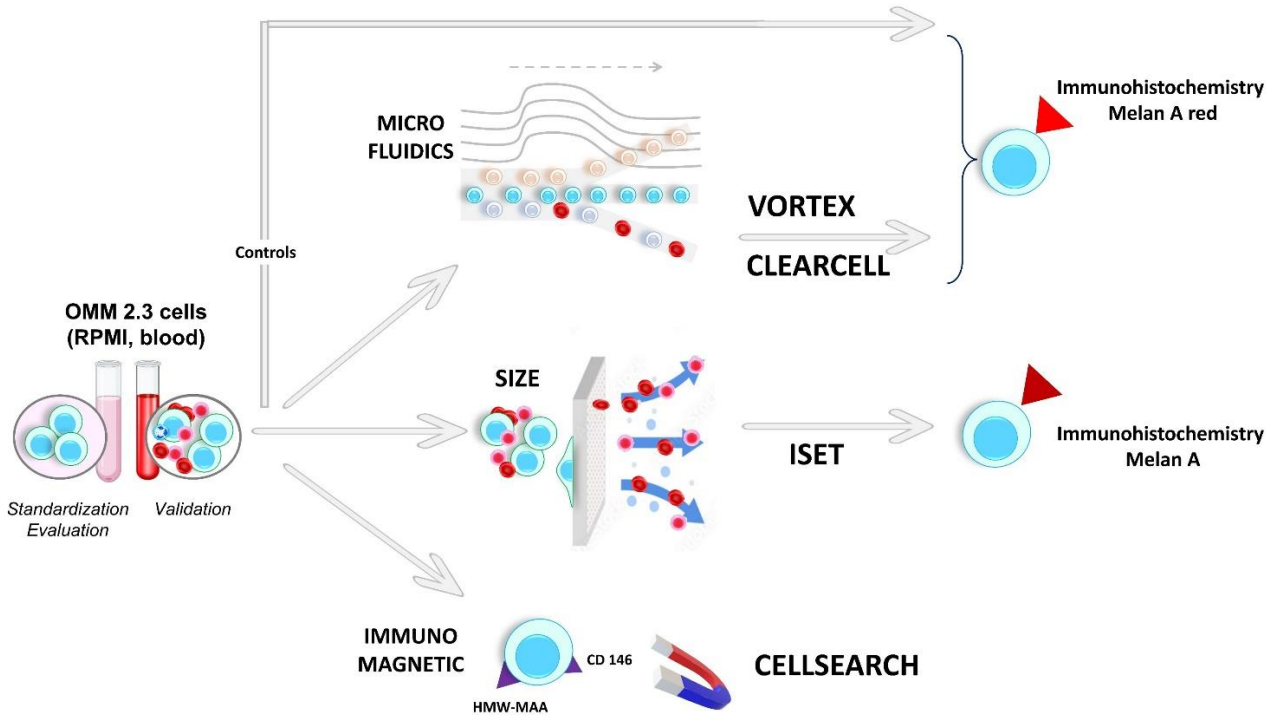


Figure 3. Summary of the whole protocol. HMW-MAA: high-molecular-weight melanoma-associated antigen.

**4.1.1. Cell Preparation**

The metastatic OMM 2.3 (also called OMM 2.5) UM cell line was used in all the experiments. OMM 2.3 cells were kindly provided by Dr. Jager MJ from Leiden University Medical Center

(Leiden, The Netherlands). OMM 2.3 cell characteristics are summarized in Table 5 [84,85]. Our OMM 2.3 cell line was externally authenticated (Northgene, UK, available on request).

<b>OMM 2.3 Cell Characteristics</b>	
<b>Age of the donor</b>	80 years old
<b>Gender of the donor</b>	Male
<b>Primary treatment</b>	Iodine-125 plaque followed by secondary enucleation
<b>Cellularity</b>	Mixed with a predominance of epithelioid cells (70%)
<b>Ciliary body involvement</b>	Yes
<b>Mitotic index</b>	11 mitotic figures per ten 40× high-power fields
<b>Necrosis</b>	Yes (post-radiation plaque)
<b>Extraocular extent</b>	Yes, through the emissary venous channels
<b>Time to metastases</b>	8 years
<b>Time between liver biopsy and death</b>	1 month
<b>Chromosome 3 status</b>	Disomy 3
<b>BAP 1 status</b>	Expressed
<b>Melan-A expression</b>	80% of cells

Table 5. Summary of the OMM 2.3 cell line characteristics.

OMM 2.3 cells were used to determine the efficiency of four CTC platforms. OMM 2.3 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, Thermofisher, Scientific, Waltham, MA USA) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub>. When a confluence of 70% was reached, the OMM 2.3 cells were stained with the Celltracker green CMFDA dye (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a concentration of 1 μM (Figure 4A). After 30 min, the medium and the dye were removed by aspiration. TrypLE Ex-press (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to dissociate the cells. As shown in Figure 4B, the mean diameter of OMM 2.3

cells was  $\approx 20\text{--}25\ \mu\text{m}$  (the diameter of a CTC and a white blood cell is  $12\text{--}25\ \mu\text{m}$  and  $8\text{--}14\ \mu\text{m}$ , respectively [24]).

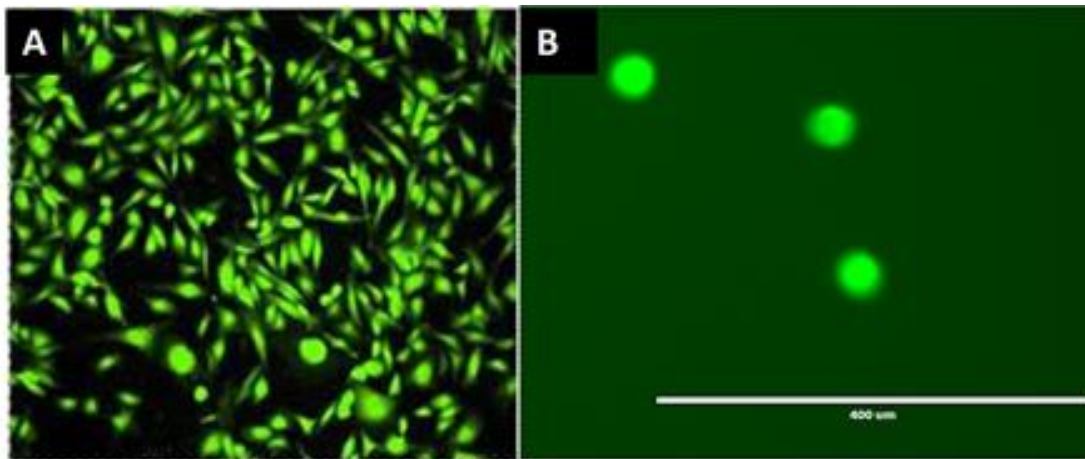


Figure 4. (A) Staining of OMM 2.3 cells with the Celltracker green CMFDA dye (magnification  $\times 60$ ). (B) The size of OMM 2.3 cells after dissociation with TrypLE Express was approximately  $25\ \mu\text{m}$ .

The cells were successively diluted in RPMI medium supplemented with FBS. The cells were seeded in a 96-well plate ( $\approx 100\text{--}150\ \mu\text{L}/\text{well}$ ). Cells were manually counted twice by the same operator using an inverted EVOS fluorescent microscope. Wells containing  $\approx 15\text{--}150$  cells were used immediately for further experiments with the CTC platforms. The cells were added to 1.5 mL Eppendorf tubes (Figure 5). Empty wells were counted again to ensure that no residual cells adhered to the plate. If any cells had not detached from the plate, the latter were removed from the cell count. The initial cell number (iCN) was calculated as follows: cell count in Eppendorf tube minus cells stood attached to the plate. In all experiments and all the protocol steps, all the

cones and tubes were coated with RPMI medium supplemented with FBS to avoid cell adherence to their walls. OMM 2.3 control cells were counted and then added to 1.5 mL Eppendorf tubes containing RPMI, as described above. Control cells were processed simultaneously. For experiments performed in venous blood, a venous puncture was performed on the same day and blood was collected in a 10 mL EDTA tube for the Vortex (VTX-1), ClearCell FX, and ISET devices or in a 10 mL Cellsave tube for the Cellsearch device (Figure 5). The total duration of cell preparation was about 90 min.

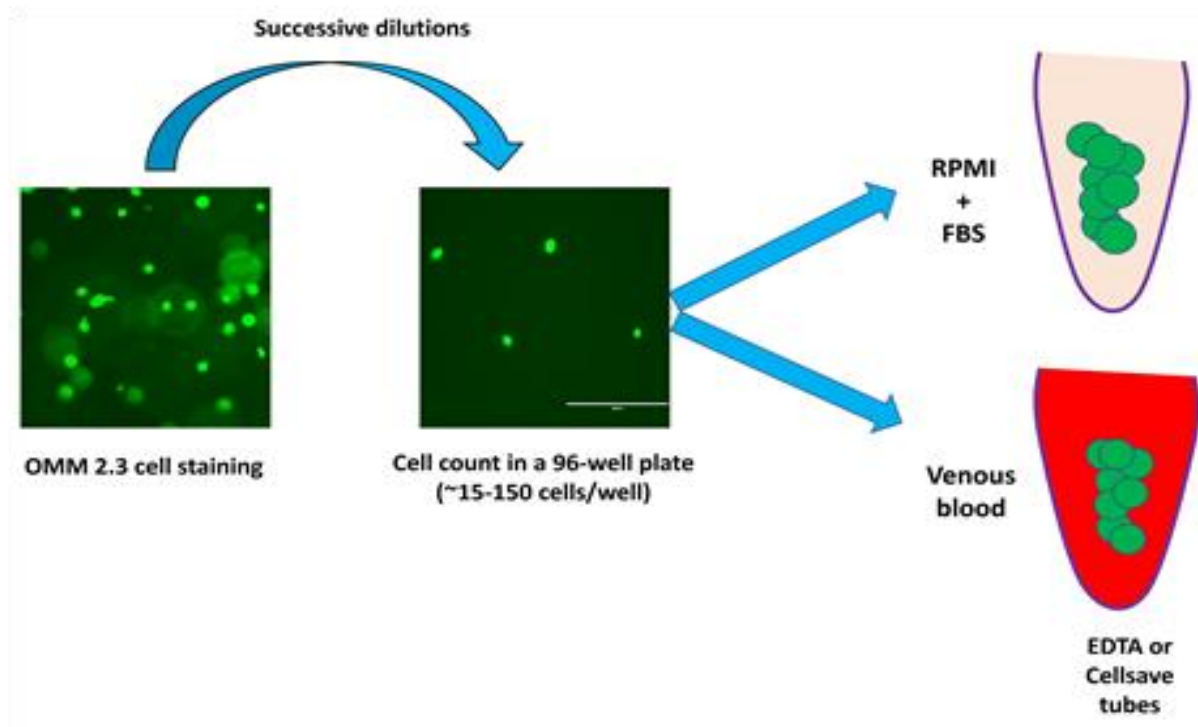


Figure 5. OMM 2.3 UM cell preparation (magnification x60). FBS: fetal bovine serum.

#### 4.1.2. OMM 2.3 Cell Capture

In this study, 4 different CTC platforms were compared. For the Vortex (VTX-1), ClearCell FX, and ISET platforms, 10 and 3 experiments were performed on freshly isolated OMM 2.3

cell suspensions in RPMI medium and venous blood from a healthy donor, respectively. The Cellsearch experiments can only be performed on blood samples, so 10 experiments were performed in venous blood.

The Vortex (VTX-1) device (Biosciences, Pleasanton, CA, USA) is a microfluidic platform based on the inertial focusing process. Cells were diluted into 40 mL of sterile PBS. When healthy blood was used, 4 mL of blood was diluted into 36 mL of sterile PBS as recommended by the manufacturer [37]. Two cycles were performed as recommended by the manufacturer for a total duration of  $\approx 50$  min [37]. Performing 2 cycles has been shown to be associated with a good balance between the purity and the recovery rate [37]. About 300  $\mu$ L of filtered OMM 2.3 cell suspension was collected in PBS in a dedicated 1.5 mL Eppendorf tube. An FBS+RPMI-coated cone was used to incubate the cells with the PreservCyt solution (ThinPrep, Hologic, France; 20 mL) for fixation. The cells were immediately transferred to a 96-well plate using the Thinprep 2000 platform (Hologic, France).

ClearCell FX (ClearBridge, Biolidics, Singapore) is another microfluidic platform based on the inertial focusing process [42]. Cells were resuspended in ClearCell FX re-suspension buffer. For blood experiments, a red cell lysis buffer (G-Bioscience, St Louis, MO, USA) was added to the 7.5 mL of blood at a 4:1 ratio (vol/vol), followed by centrifugation (1500 rpm for 10 min at room temperature) as recommended by the manufacturer [41]. The supernatant was discarded, and 4 mL of ClearCell FX resuspension buffer was added. In all experiments, a single run was performed for a total duration of  $\approx 45$  min, allowing approximately 12 mL of filtered cells to be collected in PBS. The cells were transferred, using coated cones, to the PreservCyt solution (20 mL) and processed as described above.

The ISET platform (Rarecells, Paris, France) captures cells according to their size. OMM 2.3 cells were incubated in 10 mL of venous blood from healthy donors. The blood was then diluted

with the Rarecells buffer solution with a 10-fold dilution as previously described [61]. The Rarecells cartridge was then used to filter the diluted blood through the dedicated filter containing 10 pores of 8  $\mu\text{m}$  size each with a 10 kPa pressure. Sterile PBS was used before and after filtration as recommended by the manufacturer [61]. Filtration did not exceed 1–2 min per sample. The 10 pores were manually fixed on a Superfrost Slide (Thermofisher Scientific, Waltham, USA) before performing immunochemistry.

Cellsearch (Menarini Silicon Biosystems, Florence, Italy) is the only FDA-approved CTC device, and was approved in 2004. Cellsearch's technology is based on immunomagnetic capture with positive and negative enrichments [18]. OMM 2.3 cells were incubated in 7.5 mL Cellsave tubes with venous blood from healthy donors. No in vitro analyses with RPMI could be performed with the Cellsearch device because a blood interface is needed to launch the device. Therefore, 10 experiments were performed using venous blood from healthy donors. A control (M229 cell line) derived from cutaneous melanoma was used, and the expression of CD146 was also assessed to ensure the proper functioning of the Cellsearch device. The manufacturer externally processed the Cellsave tubes within 72 h. Briefly, CD146+ cells were immunomagnetically enriched and stained with 4,2-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), a phycoerythrin-conjugated antibody (clone 9.2.27) that binds to HMW-MAA, and a mixture of two allophycocyanin-conjugated antibodies to identify leukocytes (CD45, clone HI30) and endothelial cells (CD34, clone 581) [48,51]. Oval-shaped cells positive for DAPI and HMW-MAA and negative for CD45 and CD34 were considered OMM 2.3 cells.

Controls. When possible, a dedicated control was used with the Vortex (VTX-1), ClearCell FX, and ISET devices to confirm cell viability and better assess each platform's recovery rate. OMM 2.3 cells were cultured in  $\approx 300\text{--}400$   $\mu\text{L}$  of RPMI medium supplemented with FBS). OMM 2.3 control cells were fixed in the PreservCyt solution (20 mL) using FBS-coated cones



at the same time as the processing of the tested samples. This “simultaneous” fixation allowed a reduction in any bias related to cell viability and cell lysis due to the duration of the experiment. The control cells were then seeded into a 96-well plate using the Thinprep platform (Hologic, France), as described above.

#### **4.1.3. Immunocytochemistry**

Immunocytochemistry was performed using the BenchMark Ultra automated staining instrument (Roche Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) for cells re-covered with the Vortex (VTX-1), ClearCell FX, and ISET platforms. An anti-melan-A (A103 clone, ready-to-use, Roche Ventana, Tucson, AZ, USA) antibody was used. The Fast Red IHC Detection Kit (Roche Ventana, Tucson, AZ, USA) was used according to the manufacturer’s recommendations for cells recovered using the Vortex (VTX-1) and ClearCell FX platforms. Sections were counter-stained with hematoxylin and bluing reagent. For cells recovered with the ISET platform, an anti-melan-A antibody and the Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tucson, AZ, USA) without Fast Red IHC Detection Kit were used. Each IHC staining included positive and negative controls.

#### **4.1.4. Cell Counting and Recovery Rate**

The final cell number (fCN) was determined manually by 2 blinded investigators using a dedicated microscope (AM, SL). The fCN was the mean of the 2 counts. A cell was considered a captured OMM 2.3 UM cell if it had (i) a round-shaped appearance, (ii) a high nucleus/cytoplasmic ratio, and (iii) was positive for Melan-A or Melan-A red staining (Figure 2). The recovery rate (RR) was calculated as the final cell number (fCN) divided by the initial cell number (iCN). The adjusted recovery rate (aRR) was calculated as the RR obtained with the CTC platforms divided by the RR of the corresponding controls. For the Cellsearch device,

the CTC count was automatically determined by the manufacturer, so no aRR could be calculated.

## **4.2. Statistics**

Descriptive statistics are presented as numbers and percentages. Data normality and heteroskedasticity were assessed using the Shapiro–Wilk test and Levene’s test. The difference between the initial and final cell counts, as well as the recovery rates depending on the CTC platform used, were assessed using the Kruskal–Wallis test. If the null hypothesis of the Kruskal–Wallis test was rejected, post hoc pairwise analyses were performed using the Dunn–Bonferoni test. The alpha risk was set at 5% ( $\alpha = 0.05$ ). Statistical analyses were performed with EasyMedStat (version 3.22; [www.easymedstat.com](http://www.easymedstat.com) accessed on 12 april 2023).

## **5. Conclusions**

We found the highest tumor cell recovery rates with the ISET and Vortex (VTX-1) platforms compared to the ClearCell FX and Cellsearch devices using our UM cell line. However, other parameters such as the reason for choosing a platform (diagnosis, genetics, drug sensitivity, CDX models), reproducibility, purity, user-friendliness, cost-effectiveness, and ergonomics should also be taken into account before using these devices in daily clinical practice.

Author Contributions: Conceptualization, A.M., S.N.-E., S.L. (Sandra Lassalle), P.H., B.M., C.B. (Corine Bertolotto), and L.G. Methodology: A.M., S.L. (Sandra Lassalle), S.L. (Salome Lalvee), M.S., B.R., K.Z., J.F. S.N.-E., and V.T. Validation: S.B., S.L. (Sandra Lassalle), L.G., B.M., and P.H. Original Draft Preparation: A.M., S.L. (Sandra Lassalle), B.M., and P.H.; Review and Edit-ing: A.M., B.M., S.L. (Sandra Lassalle), and P.H. Statistical Plan: C.B.

(Christelle Bonnetaud) and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was founded by the GIRCI Méditerranée, via the VALO DATA 2021 grant.

Institutional Review Board Statement: not applicable

Informed Consent Statement: not applicable

Data Availability Statement: not applicable

Acknowledgements: The authors thank the Fondation des Aveugles de Guerre for their kind support.

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

## References

1. Singh, A.D.; Turell, M.E.; Topham, A.K. Uveal melanoma: Trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 2011, 118, 1881–1885. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.01.040>.
2. Kaliki, S.; Shields, C.L. Uveal melanoma: Relatively rare but deadly cancer. *Eye* 2017, 31, 241–257. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.275>.
3. Caujolle, J.-P.; Paoli, V.; Chamorey, E.; Maschi, C.; Baillif, S.; Herault, J.; Gastaud, P.; Hannoun-Levi, J.M. Local recurrence after uveal melanoma proton beam therapy: Recurrence types and prognostic consequences. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2013, 85, 1218–1224. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.10.005>.

4. Bensoussan, E.; Thariat, J.; Maschi, C.; Delas, J.; Schouver, E.D.; Hérault, J.; Baillif, S.; Caujolle, J.-P. Outcomes After Proton Beam Therapy for Large Choroidal Melanomas in 492 Patients. *Am. J. Ophthalmol.* 2016, 165, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2016.02.027>.
5. Lamas, N.J.; Martel, A.; Nahon-Estève, S.; Goffinet, S.; Macocco, A.; Bertolotto, C.; Lassalle, S.; Hofman, P. Prognostic Bi-omarkers in Uveal Melanoma: The Status Quo, Recent Advances and Future Directions. *Cancers* 2021, 14, 96. <https://doi.org/10.3390/cancers14010096>.
6. Reichstein, D.; Brock, A.; Lietman, C.; McKean, M. Treatment of metastatic uveal melanoma in 2022: Improved treatment regimens and improved prognosis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2022, 33, 585–590. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000905>.
7. Pandiani, C.; Béranger, G.E.; Leclerc, J.; Ballotti, R.; Bertolotto, C. Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. *Genes Dev.* 2017, 31, 724–743. <https://doi.org/10.1101/gad.296962.117>.
8. Nathan, P.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; Baurain, J.-F.; Butler, M.O.; Schlaak, M.; Sullivan, R.J.; Ochsenreither, S.; Dummer, R.; Kirkwood, J.M.; et al. Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, 1196–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2103485>.
9. Mela, A.; Poniatowski, Ł.A.; Drop, B.; Furtak-Niczyporuk, M.; Jaroszyński, J.; Wrona, W.; Staniszewska, A.; Dąbrowski, J.; Czajka, A.; Jagielska, B.; et al. Overview and Analysis of the Cost of Drug Programs in Poland: Public Payer Expenditures and Coverage of Cancer and Non-Neoplastic Diseases Related Drug Therapies from 2015-2018 Years. *Front. Pharmacol.* 2020, 11, 1123. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01123>.

10. Carvajal, R.D.; Schwartz, G.K.; Tezel, T.; Marr, B.; Francis, J.H.; Nathan, P.D. Metastatic disease from uveal melanoma: Treatment options and future prospects. *Br. J. Ophthalmol.* 2017, 101, 38–44. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309034>.
11. Seitz, T.; John, N.; Sommer, J.; Dietrich, P.; Thasler, W.E.; Hartmann, A.; Evert, K.; Lang, S.A.; Bosserhoff, A.; Hellerbrand, C. Role of Fibroblast Growth Factors in the Crosstalk of Hepatic Stellate Cells and Uveal Melanoma Cells in the Liver Meta-static Niche. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11524. <https://doi.org/10.3390/ijms231911524>.
12. Trolet, J.; Hupé, P.; Huon, I.; Lebigot, I.; Decraene, C.; Delattre, O.; Sastre-Garau, X.; Saule, S.; Thiéry, J.-P.; Plancher, C.; et al. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009, 50, 2572–2580. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2296>.
13. Onken, M.D.; Worley, L.A.; Char, D.H.; Augsburger, J.J.; Correa, Z.M.; Nudleman, E.; Aaberg, T.M.; Altaweel, M.M.; Bardenstein, D.S.; Finger, P.T.; et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: Prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* 2012, 119, 1596–1603. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.02.017>.
14. Frizziero, L.; Midena, E.; Trainiti, S.; Londei, D.; Bonaldi, L.; Bini, S.; Parrozzani, R. Uveal Melanoma Biopsy: A Review. *Cancers* 2019, 11, E1075. <https://doi.org/10.3390/cancers11081075>.
15. Poulet, G.; Massias, J.; Taly, V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol.* 2019, 63, 449–455. <https://doi.org/10.1159/000499337>.

16. Im, D.H.; Peng, C.-C.; Xu, L.; Kim, M.E.; Ostrow, D.; Yellapantula, V.; Bootwalla, M.; Biegel, J.A.; Gai, X.; Prabakar, R.K.; et al. Potential of Aqueous Humor as a Liquid Biopsy for Uveal Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 6226. <https://doi.org/10.3390/ijms23116226>.
17. Martel, A.; Baillif, S.; Nahon-Esteve, S.; Gastaud, L.; Bertolotto, C.; Roméo, B.; Mograbi, B.; Lassalle, S.; Hofman, P. Liquid Biopsy for Solid Ophthalmic Malignancies: An Updated Review and Perspectives. *Cancers* 2020, 12, 3284. <https://doi.org/10.3390/cancers12113284>.
18. Jin, E.; Burnier, J.V. Liquid Biopsy in Uveal Melanoma: Are We There Yet? *Ocul. Oncol. Pathol.* 2021, 7, 1–16. <https://doi.org/10.1159/000508613>.
19. De Bruyn, D.P.; Beasley, A.B.; Verdijk, R.M.; van Poppelen, N.M.; Paridaens, D.; de Keizer, R.O.B.; Naus, N.C.; Gray, E.S.; de Klein, A.; Brosens, E.; et al. Is Tissue Still the Issue? The Promise of Liquid Biopsy in Uveal Melanoma. *Biomedicines* 2022, 10, 506. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020506>.
20. Hofman, P. Liquid biopsy for lung cancer screening: Usefulness of circulating tumor cells and other circulating blood bi-omarkers. *Cancer Cytopathol.* 2021, 129, 341–346. <https://doi.org/10.1002/cncy.22367>.
21. Beasley, A.B.; Chen, F.K.; Isaacs, T.W.; Gray, E.S. Future perspectives of uveal melanoma blood based biomarkers. *Br. J. Cancer* 2022, 126, 1511–1528. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01723-8>.
22. Lin, D.; Shen, L.; Luo, M.; Zhang, K.; Li, J.; Yang, Q.; Zhu, F.; Zhou, D.; Zheng, S.; Chen, Y.; et al. Circulating tumor cells: Biology and clinical significance. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021, 6, 404. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>.

23. Ilie, M.; Hofman, V.; Long, E.; Bordone, O.; Selva, E.; Washetine, K.; Marquette, C.H.; Hofman, P. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann. Transl. Med.* 2014, 2, 107. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.11>.
24. Ferreira, M.M.; Ramani, V.C.; Jeffrey, S.S. Circulating tumor cell technologies. *Mol. Oncol.* 2016, 10, 374–394. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.007>.
25. Di Capua, D.; Bracken-Clarke, D.; Ronan, K.; Baird, A.-M.; Finn, S. The Liquid Biopsy for Lung Cancer: State of the Art, Limitations and Future Developments. *Cancers* 2021, 13, 3923. <https://doi.org/10.3390/cancers13163923>.
26. Tamminga, M.; Andree, K.C.; Hiltermann, T.J.N.; Jayat, M.; Schuurin, E.; van den Bos, H.; Spierings, D.C.J.; Lansdorp, P.M.; Timens, W.; Terstappen, L.W.M.M.; et al. Detection of Circulating Tumor Cells in the Diagnostic Leukapheresis Product of Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Comparing CellSearch® and ISET. *Cancers* 2020, 12, E896. <https://doi.org/10.3390/cancers12040896>.
27. Yin, J.; Wang, Z.; Li, G.; Lin, F.; Shao, K.; Cao, B.; Hou, Y. Characterization of circulating tumor cells in breast cancer patients by spiral microfluidics. *Cell Biol. Toxicol.* 2019, 35, 59–66. <https://doi.org/10.1007/s10565-018-09454-4>.
28. Bai, M.; Zou, B.; Wang, Z.; Li, P.; Wang, H.; Ou, Y.; Cui, K.; Bian, J.; Li, S.; Xu, X. Comparison of two detection systems for circulating tumor cells among patients with renal cell carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.* 2018, 50, 1801–1809. <https://doi.org/10.1007/s11255-018-1954-2>.

29. Kallergi, G.; Politaki, E.; Alkahtani, S.; Stournaras, C.; Georgoulas, V. Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tu-mor Cells (CTCs). *Cell. Physiol. Biochem.* 2016, 40, 411–419. <https://doi.org/10.1159/000452556>.
30. Morris, K.L.; Tugwood, J.D.; Khoja, L.; Lancashire, M.; Sloane, R.; Burt, D.; Shenjere, P.; Zhou, C.; Hodgson, C.; Ohtomo, T.; et al. Circulating biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014, 74, 323–332. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2508-7>.
31. Krebs, M.G.; Hou, J.-M.; Sloane, R.; Lancashire, L.; Priest, L.; Nonaka, D.; Ward, T.H.; Backen, A.; Clack, G.; Hughes, A.; et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 2012, 7, 306–315. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823c5c16>.
32. Khoja, L.; Backen, A.; Sloane, R.; Menasce, L.; Ryder, D.; Krebs, M.; Board, R.; Clack, G.; Hughes, A.; Blackhall, F.; et al. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. *Br. J. Cancer* 2012, 106, 508–516. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.545>.
33. Hofman, V.; Ilie, M.I.; Long, E.; Selva, E.; Bonnetaud, C.; Molina, T.; Vénissac, N.; Mouroux, J.; Vielh, P.; Hofman, P. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: Comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int. J. Cancer* 2011, 129, 1651–1660. <https://doi.org/10.1002/ijc.25819>.



34. Racila, E.; Euhus, D.; Weiss, A.J.; Rao, C.; McConnell, J.; Terstappen, L.W.; Uhr, J.W. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 4589–4594. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4589>.
35. Pandiani, C.; Strub, T.; Nottet, N.; Cheli, Y.; Gambi, G.; Bille, K.; Husser, C.; Dalmaso, M.; Béranger, G.; Lassalle, S.; et al. Single-cell RNA sequencing reveals intratumoral heterogeneity in primary uveal melanomas and identifies HES6 as a driver of the metastatic disease. *Cell Death Differ.* 2021, 28, 1990–2000. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00730-7>.
36. Strub, T.; Martel, A.; Nahon-Esteve, S.; Baillif, S.; Ballotti, R.; Bertolotto, C. Translation of single-cell transcriptomic analysis of uveal melanomas to clinical oncology. *Prog. Retin. Eye Res.* 2021, 85, 100968. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100968>.
37. Che, J.; Yu, V.; Dhar, M.; Renier, C.; Matsumoto, M.; Heirich, K.; Garon, E.B.; Goldman, J.; Rao, J.; Sledge, G.W.; et al. Classification of large circulating tumor cells isolated with ultra-high throughput microfluidic Vortex technology. *Oncotarget* 2016, 7, 12748–12760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7220>.
38. Li, H.; Song, P.; Zou, B.; Liu, M.; Cui, K.; Zhou, P.; Li, S.; Zhang, B. Circulating Tumor Cell Analyses in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *Medicine* 2015, 94, e1565. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001565>.
39. Mazzini, C.; Pinzani, P.; Salvianti, F.; Scatena, C.; Paglierani, M.; Ucci, F.; Pazzagli, M.; Massi, D. Circulating tumor cells detection and counting in uveal melanomas by a filtration-based method. *Cancers* 2014, 6, 323–332. <https://doi.org/10.3390/cancers6010323>.

40. Pinzani, P.; Mazzini, C.; Salvianti, F.; Massi, D.; Grifoni, R.; Paoletti, C.; Ucci, F.; Molinara, E.; Orlando, C.; Pazzagli, M.; et al. Tyrosinase mRNA levels in the blood of uveal melanoma patients: Correlation with the number of circulating tumor cells and tumor progression. *Melanoma Res.* 2010, 20, 303–310. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32833906e3>.
41. Kulasinghe, A.; Kapeleris, J.; Kimberley, R.; Mattarollo, S.R.; Thompson, E.W.; Thiery, J.-P.; Kenny, L.; O’Byrne, K.; Pu-nyadeera, C. The prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck and non-small-cell lung cancer. *Cancer Med.* 2018, 7, 5910–5919. <https://doi.org/10.1002/cam4.1832>.
42. Yap, Y.-S.; Leong, M.C.; Chua, Y.W.; Loh, K.W.J.; Lee, G.E.; Lim, E.H.; Dent, R.; Ng, R.C.H.; Lim, J.H.-C.; Singh, G.; et al. Detection and prognostic relevance of circulating tumour cells (CTCs) in Asian breast cancers using a label-free microfluidic platform. *PLoS ONE* 2019, 14, e0221305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221305>.
43. Chudasama, D.Y.; Freydina, D.V.; Freidin, M.B.; Leung, M.; Montero Fernandez, A.; Rice, A.; Nicholson, A.G.; Karteris, E.; Anikin, V.; Lim, E. Inertia based microfluidic capture and characterisation of circulating tumour cells for the diagnosis of lung cancer. *Ann. Transl. Med.* 2016, 4, 480. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.12.28>.
44. Dhar, M.; Wong, J.; Karimi, A.; Che, J.; Renier, C.; Matsumoto, M.; Triboulet, M.; Garon, E.B.; Goldman, J.W.; Rettig, M.B.; et al. High efficiency vortex trapping of circulating tumor cells. *Biomicrofluidics* 2015, 9, 064116. <https://doi.org/10.1063/1.4937895>.
45. Sollier, E.; Go, D.E.; Che, J.; Gossett, D.R.; O’Byrne, S.; Weaver, W.M.; Kummer, N.; Rettig, M.; Goldman, J.; Nickols, N.; et al. Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology. *Lab. Chip* 2014, 14, 63–77. <https://doi.org/10.1039/c3lc50689d>.

46. Renier, C.; Pao, E.; Che, J.; Liu, H.E.; Lemaire, C.A.; Matsumoto, M.; Triboulet, M.; Srivinas, S.; Jeffrey, S.S.; Rettig, M.; et al. Label-free isolation of prostate circulating tumor cells using Vortex microfluidic technology. *NPJ Precis. Oncol.* 2017, 1, 15. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0015-0>.
47. Swennenhuis, J.F.; van Dalum, G.; Zeune, L.L.; Terstappen, L.W.M.M. Improving the CellSearch® system. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2016, 16, 1291–1305. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1255144>.
48. Bidard, F.-C.; Madic, J.; Mariani, P.; Piperno-Neumann, S.; Rampanou, A.; Servois, V.; Cassoux, N.; Desjardins, L.; Milder, M.; Vaucher, I.; et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int. J. Cancer* 2014, 134, 1207–1213. <https://doi.org/10.1002/ijc.28436>.
49. Anand, K.; Roszik, J.; Gombos, D.; Upshaw, J.; Sarli, V.; Meas, S.; Lucci, A.; Hall, C.; Patel, S. Pilot Study of Circulating Tumor Cells in Early-Stage and Metastatic Uveal Melanoma. *Cancers* 2019, 11, 856. <https://doi.org/10.3390/cancers11060856>.
50. Terai, M.; Mu, Z.; Eschelman, D.J.; Gonsalves, C.F.; Kageyama, K.; Chervoneva, I.; Orloff, M.; Weight, R.; Mastrangelo, M.J.; Cristofanilli, M.; et al. Arterial Blood, Rather Than Venous Blood, is a Better Source for Circulating Melanoma Cells. *EBioMedicine* 2015, 2, 1821–1826. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.019>.
51. Bande, M.F.; Santiago, M.; Muínelo-Romay, L.; Blanco, M.J.; Mera, P.; Capeans, C.; Pardo, M.; Piñeiro, A. Detection of circulating melanoma cells in choroidal melanocytic lesions. *BMC Res. Notes* 2015, 8, 452. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1420-5>.
52. Beutel, J.; Wegner, J.; Wegner, R.; Ziemssen, F.; Nassar, K.; Rohrbach, J.M.; Hilgers, R.-D.; Lüke, M.; Grisanti, S. Possible implications of MCAM expression in metastasis and non-

metastatic of primary uveal melanoma patients. *Curr. Eye Res.* 2009, 34, 1004–1009. <https://doi.org/10.3109/02713680903262205>.

53. Lai, K.; Sharma, V.; Jager, M.J.; Conway, R.M.; Madigan, M.C. Expression and distribution of MUC18 in human uveal melanoma. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 2007, 451, 967–976. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0498-0>.

54. Beasley, A.B.; Isaacs, T.W.; Vermeulen, T.; Freeman, J.; DeSousa, J.-L.; Bhikoo, R.; Hennessy, D.; Reid, A.; Chen, F.K.; Ben-tel, J.; et al. Analysis of Circulating Tumour Cells in Early-Stage Uveal Melanoma: Evaluation of Tumour Marker Expression to Increase Capture. *Cancers* 2021, 13, 5990. <https://doi.org/10.3390/cancers13235990>.

55. Robertson, A.G.; Shih, J.; Yau, C.; Gibb, E.A.; Oba, J.; Mungall, K.L.; Hess, J.M.; Uzunangelov, V.; Walter, V.; Danilova, L.; et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* 2017, 32, 204–220.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.003>.

56. Mentink, A.; Isebia, K.T.; Kraan, J.; Terstappen, L.W.M.M.; Stevens, M. Measuring antigen expression of cancer cell lines and circulating tumour cells. *Sci. Rep.* 2023, 13, 6051. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33179-y>.

57. Tura, A.; Lüke, J.; Merz, H.; Reinsberg, M.; Lüke, M.; Jager, M.J.; Grisanti, S. Identification of circulating melanoma cells in uveal melanoma patients by dual-marker immunoenrichment. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014, 55, 4395–4404. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14512>.

58. Ulmer, A.; Beutel, J.; Süsskind, D.; Hilgers, R.-D.; Ziemssen, F.; Lüke, M.; Röcken, M.; Rohrbach, M.; Fierlbeck, G.; Bartz-Schmidt, K.-U.; et al. Visualization of circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with primary uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.*

Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 2008, 14, 4469–4474. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0012>.

59. Suesskind, D.; Ulmer, A.; Schiebel, U.; Fierlbeck, G.; Spitzer, B.; Spitzer, M.S.; Bartz-Schmidt, K.U.; Grisanti, S. Circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with uveal melanoma before and after different therapies and association with prognostic parameters: A pilot study. *Acta Ophthalmol.* 2011, 89, 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01617.x>.

60. Eide, N.; Faye, R.S.; Høifødt, H.K.; Øvergaard, R.; Jebsen, P.; Kvalheim, G.; Fodstad, Ø. Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow in uveal melanoma patients. *Acta Ophthalmol.* 2009, 87, 830–836. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2008.01378.x>.

61. Laget, S.; Broncy, L.; Hormigos, K.; Dhingra, D.M.; BenMohamed, F.; Capiod, T.; Osteras, M.; Farinelli, L.; Jackson, S.; Paterlini-Bréchet, P. Technical Insights into Highly Sensitive Isolation and Molecular Characterization of Fixed and Live Circulating Tumor Cells for Early Detection of Tumor Invasion. *PLoS ONE* 2017, 12, e0169427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169427>.

62. Dhar, M.; Wong, J.; Che, J.; Matsumoto, M.; Grogan, T.; Elashoff, D.; Garon, E.B.; Goldman, J.W.; Sollier Christen, E.; Di Carlo, D.; et al. Evaluation of PD-L1 expression on vortex-isolated circulating tumor cells in metastatic lung cancer. *Sci. Rep.* 2018, 8, 2592. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19245-w>.

63. Sinkala, E.; Sollier-Christen, E.; Renier, C.; Rosàs-Canyelles, E.; Che, J.; Heirich, K.; Duncombe, T.A.; Vlassakis, J.; Yamau-chi, K.A.; Huang, H.; et al. Profiling protein expression

in circulating tumour cells using microfluidic western blotting. *Nat. Commun.* 2017, 8, 14622. <https://doi.org/10.1038/ncomms14622>.

64. Liu, H.E.; Triboulet, M.; Zia, A.; Vuppalapaty, M.; Kidess-Sigal, E.; Coller, J.; Natu, V.S.; Shokoohi, V.; Che, J.; Renier, C.; et al. Workflow optimization of whole genome amplification and targeted panel sequencing for CTC mutation detection. *NPJ Genom. Med.* 2017, 2, 34. <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0034-3>.

65. Kidess-Sigal, E.; Liu, H.E.; Triboulet, M.M.; Che, J.; Ramani, V.C.; Visser, B.C.; Poultides, G.A.; Longacre, T.A.; Marziali, A.; Vysotskaia, V.; et al. Enumeration and targeted analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in CTCs captured by a label-free platform: Comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* 2016, 7, 85349–85364. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13350>.

66. Takahashi, Y.; Shirai, K.; Ijiri, Y.; Morita, E.; Yoshida, T.; Iwanaga, S.; Yanagida, M. Integrated system for detection and molecular characterization of circulating tumor cells. *PLoS ONE* 2020, 15, e0237506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237506>.

67. Morrow, C.J.; Trapani, F.; Metcalf, R.L.; Bertolini, G.; Hodgkinson, C.L.; Khandelwal, G.; Kelly, P.; Galvin, M.; Carter, L.; Simpson, K.L.; et al. Tumourigenic non-small-cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: A clinical case study. *Ann. Oncol.* 2016, 27, 1155–1160. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw122>.

68. Vona, G.; Sabile, A.; Louha, M.; Sitruk, V.; Romana, S.; Schütze, K.; Capron, F.; Franco, D.; Pazzagli, M.; Vekemans, M.; et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am. J. Pathol.* 2000, 156, 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64706-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64706-2).

69. Ma, Y.-C.; Wang, L.; Yu, F.-L. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2013, 12, 295–309. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500328>.
70. Buim, M.E.; Fanelli, M.F.; Souza, V.S.; Romero, J.; Abdallah, E.A.; Mello, C.A.; Alves, V.; Ocea, L.M.; Mingues, N.B.; Bar-bosa, P.N.; et al. Detection of KRAS mutations in circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 2015, 16, 1289–1295. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1070991>.
71. Cummings, J.; Morris, K.; Zhou, C.; Sloane, R.; Lancashire, M.; Morris, D.; Bramley, S.; Krebs, M.; Khoja, L.; Dive, C. Method validation of circulating tumour cell enumeration at low cell counts. *BMC Cancer* 2013, 13, 415. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-415>.
72. Razmara, A.M.; Sollier, E.; Kisirkoi, G.N.; Baker, S.W.; Bellon, M.B.; McMillan, A.; Lemaire, C.A.; Ramani, V.C.; Jeffrey, S.S.; Casey, K.M. Tumor shedding and metastatic progression after tumor excision in patient-derived orthotopic xenograft models of triple-negative breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 2020, 37, 413–424. <https://doi.org/10.1007/s10585-020-10033-3>.
73. Ju, L.; Yang, J.; Zhai, C.; Chai, S.; Dong, Z.; Li, M. Survival, Chemotherapy and Chemosensitivity Predicted by CTC Cul-tured In Vitro of SCLC Patients. *Front. Oncol.* 2021, 11, 683318. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.683318>.
74. Wilson, L.S. New benchmarks and design criteria for laboratory consolidations. *Clin. Leadersh. Manag. Rev. J. CLMA* 2003, 17, 90–98.
75. Martel, A.; Gastaud, L.; Bonnetaud, C.; Nahon-Esteve, S.; Washetine, K.; Bordone, O.; Salah, M.; Tanga, V.; Fayada, J.; Lespinet, V.; et al. Need for a Dedicated Ophthalmic

Malignancy Clinico-Biological Biobank: The Nice Ocular Malignancy (NOMA) Biobank. *Cancers* 2023, 15, 2372. <https://doi.org/10.3390/cancers15082372>.

76. Mela, A.; Rdzanek, E.; Tysarowski, A.; Sakowicz, M.; Jaroszyński, J.; Furtak-Niczyporuk, M.; Żurek, G.; Poniowski, Ł.A.; Jagielska, B. The impact of changing the funding model for genetic diagnostics and improved access to personalized medicine in oncology. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 2023, 23, 43–54. <https://doi.org/10.1080/14737167.2023.2140139>.

77. Bidard, F.-C.; Madic, J.; Mariani, P.; Piperno-Neumann, S.; Rampanou, A.; Servois, V.; Cassoux, N.; Desjardins, L.; Milder, M.; Vaucher, I.; et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int. J. Cancer* 2014, 134, 1207–1213. <https://doi.org/10.1002/ijc.28436>.

78. Alix-Panabières, C.; Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* 2014, 14, 623–631. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>.

79. Coupland, S.E.; Lake, S.L.; Zeschnigk, M.; Damato, B.E. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye* 2013, 27, 230–242. <https://doi.org/10.1038/eye.2012.255>.

80. Abdel-Rahman, M.H.; Cebulla, C.M.; Verma, V.; Christopher, B.N.; Carson, W.E.; Olencki, T.; Davidorf, F.H. Monosomy 3 status of uveal melanoma metastases is associated with rapidly progressive tumors and short survival. *Exp. Eye Res.* 2012, 100, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.04.010>.

81. Heeke, S.; Mograbi, B.; Alix-Panabières, C.; Hofman, P. Never Travel Alone: The Crosstalk of Circulating Tumor Cells and the Blood Microenvironment. *Cells* 2019, 8, E714. <https://doi.org/10.3390/cells8070714>.



82. Chattopadhyay, C.; Kim, D.W.; Gombos, D.S.; Oba, J.; Qin, Y.; Williams, M.D.; Esmaeli, B.; Grimm, E.A.; Wargo, J.A.; Woodman, S.E.; et al. Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* 2016, 122, 2299–2312. <https://doi.org/10.1002/cncr.29727>.
83. Che, J.; Yu, V.; Dhar, M.; Renier, C.; Matsumoto, M.; Heirich, K.; Garon, E.B.; Goldman, J.; Rao, J.; Sledge, G.W.; et al. Classification of large circulating tumor cells isolated with ultra-high throughput microfluidic Vortex technology. *Oncotarget* 2016, 7, 12748–12760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7220>.
84. Jager, M.J.; Magner, J.A.B.; Ksander, B.R.; Dubovy, S.R. Uveal Melanoma Cell Lines: Where do they come from? (An American Ophthalmological Society Thesis). *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 2016, 114, T5.
85. Griewank, K.G.; Yu, X.; Khalili, J.; Sozen, M.M.; Stempke-Hale, K.; Bernatchez, C.; Wardell, S.; Bastian, B.C.; Woodman, S.E. Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines. *Pigment. Cell Melanoma Res.* 2012, 25, 182–187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.00971.x>.

## **PARTIE III-3 : Importance d'une biobanque dédiée à l'onco-ophtalmologie**

A la suite des résultats précédents, nous avons déterminé que la détection des CTCs de MU par l'utilisation de la technologie microfluidique avec le Vortex VTX-1 était prometteuse. L'étape suivante consistait à élaborer un protocole d'application chez l'humain. Pour cela, 2 étapes ont été nécessaires :

- (i) Mise en place d'une étude clinique coopérative entre le service d'ophtalmologie du CHU de Nice (MU primitifs) et le Centre Antoine Lacassagne (MU métastatiques). Une convention a été rédigée entre nos deux centres pour inclure des patients avec MU primitifs et métastatique (étude « Liquid Mel Uv »). Deux sources de financement ont été obtenues : bourse du GIRCI MED (valo data, 2021) d'un montant de 35 000 euros et une bourse individuelle de la fondation des aveugles de guerre d'un montant de 30 000 euros.
- (ii) Mise en place d'une biobanque dédiée. Il est indispensable de stocker des prélèvements (sanguins, tissulaires, humeur aqueuse) de qualité avant de les analyser. Une biobanque dédiée et certifiée est indispensable et a fait l'objet d'un article résumé ci-dessous.

### **3.3.1. Résumé de l'article Importance d'une biobanque dédiée à l'onco-Ophtalmologie : l'exemple de la NOMA (Nice Ocular MelanomA) biobanque.**

Le concept de biobanque a réellement émergé en 1996 et s'est rapidement popularisé. Aujourd'hui, toutes les tumeurs disposent de plusieurs biobanques à travers le monde afin de promouvoir la recherche clinique translationnelle (Hewitt and Watson, 2013).

Constituer une biobanque dédiée à l'onco-ophtalmologie est important pour plusieurs raisons :

- (i) En raison de la rareté des tumeurs rencontrées. Par exemple, l'incidence du MU aux Etats-Unis est estimée à 6 par million d'habitants (Singh et al., 2011). En France, entre 400 et 450 cas seulement sont diagnostiqués annuellement.
- (ii) En raison de la grande diversité des tumeurs rencontrées. C'est au niveau de la région péri-oculaire que la plus grande diversité en mélanomes est observée : mélanome uvéal, conjonctival, palpébral, orbitaire avec des lésions de nature primitive ou métastatique. Pourtant si proches d'un point de vue anatomique (éloignés de quelques millimètres à centimètres), tous ces mélanomes possèdent des caractéristiques onco-génétiques parfois proches, parfois radicalement différentes. Par exemple, le mélanome cutané est plus proche du mélanome conjonctival (mutations BRAF, NRAS, NF1, c-Kit) que du mélanome uvéal (mutation GNAQ-GNA11, SF3B1, EIF1AX). Cela explique que les traitements conventionnels (anti BRAF + anti MEK) dans le mélanome cutané ne fonctionnent pas dans le MU (Pandiani et al., 2017).
- (iii) En raison de la rareté des prélèvements. La biopsie tissulaire est exceptionnelle dans le MU. Seuls les patients énucléés bénéficieront d'une analyse histologique, histopronostique et onco-génétique de précision. Stocker ces échantillons rares est donc

primordial pour mener des études translationnelles sur un nombre suffisants d'échantillons.

- (iv) Il n'existe actuellement aucun modèle animal reconnu de MU (Uner et al., 2022). La recherche doit donc s'effectuer sur des prélèvements humains de qualité.
- (v) L'émergence des biopsies liquides dans le MU est probablement expliquée par sa dissémination strictement hématogène et l'absence de biopsie tissulaire. Depuis plus d'une décennie, les études sur la biopsie liquide dans le MU se sont multipliées nécessitant le stockage de ces prélèvements (plasma notamment) réalisés en abondance (avant, pendant et après le traitement du MU).

Le LPCE dispose depuis 2013 d'une biobanque, avec une collection dédiée à l'onco-ophtalmologie (BB-0033-00025, <https://biobank-cotedazur.fr>). Disposer d'une biobanque sous-entend la nécessité de traiter plusieurs problématiques et explique peut-être le faible nombre de biobanques dédiées à l'onco-ophtalmologie (Gao et al., 2021) :

(i) *Aspects légaux*

Notre biobanque a reçu l'agrément NF S96-900, ISO 9001 et ISO20387 témoignant de sa qualité. De plus, le LPCE est accrédité COFRAC ISO15189 pour son activité d'anatomie pathologie, notamment en ophtalmologie.

(ii) *Aspects économiques*

L'activité de biobanque est une activité coûteuse et souvent peu rentable. Le fonctionnement financier de notre biobanque est soutenu à la fois sur le plan national (mission MERRI « Mission Enseignement Recherche Référence et Innovation », programme DGOS « Direction

Générale de l'Offre de Soins ») et sur le plan local par déstockage des prélèvements (via des MTA : Material Transfer Agreement).

*(iii) Aspects techniques et informatiques*

Collecter les prélèvements nécessite une organisation spécifique en amont avec :

- Consentement écrit du patient
- Envoi des prélèvements dans un délai contraint
- Traitement et stockage des prélèvements dès réception
- Implémentation avec les données cliniques, paracliniques, histologiques et génétiques

Dans le MU, le circuit est le suivant. Un examen clinique complet et une échographie oculaire notamment sont systématiquement réalisés. Après information et consentement éclairé du patient, 4 tubes de sang sont systématiquement prélevés au bloc opératoire avant traitement (Tubes de 10 ml EDTA). Aucune PCA ou biopsie transsclérale ne sont réalisées dans notre centre en routine. En cas d'énucléation, l'œil est énucléé puis une PCA et une ponction de vitré sont réalisées sur table opératoire. Les prélèvements sont acheminés par un système pneumatique au LPCE dans la foulée.

Lorsque la taille de la tumeur le permet, des prélèvements tissulaires sont congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C. Des prélèvements tissulaires sont également mis en paraffine et les blocs sont conservés à 4°C. A partir de tubes de sang veineux en EDTA, les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) sont extraits par centrifugations à l'aide de tubes Lymphoprep sur environ 5ml de sang, la quantité de cellule en suspension est évaluée, puis les PBMC passent par une phase de descente en température progressive (Boîte spéciale cellules à

-80°C entre 24h et 1 semaine) avant d'être conservés à -196°C. Avec le reste de sang, du plasma est extrait par centrifugation (10min à 1000g à TA) et conservé à -80°C. L'humeur aqueuse est également conservée directement à -80°C après aliquotage. Les données cliniques et paracliniques sont enregistrées dans un logiciel dédié SYNAPSE (âge, sexe, antécédents carcinologiques personnels et familiaux, acuité visuelle, pression intra oculaire, cataracte, décollement de rétine, extension extra sclérale, injections intra vitréennes réalisées, diamètre et épaisseur tumorale, envahissement du corps ciliaire, classification pTNM, type cellulaire, mitoses, nécrose, infiltrats inflammatoires, statut immunohistochimique de BAP1, type de resection (R0, R1, R2), classification chromosomique de Trolet, suivi : métasases, survie)(Martel et al., 2023a).

En 2023, la composition de notre biobanque était la suivante :

- 207 patients inclus depuis 2013 dont 160 MU.
- Parmi les 160 MU, 66 patients (41%) avaient bénéficié d'une énucléation primaire ou secondaire et 124 patients (77,5%) avaient bénéficié d'une biopsie liquide veineuse.
- Parmi les 66 MU énuclées, plus de la moitié présentaient un stade pT3 selon la classification TNM, l'épaisseur moyenne était de 12,1 mm (0,2-20), le sous type cellulaire épithélioïde était majoritaire (67%), une extension extra sclérale était notée dans 20% des cas, un tiers des cas présentaient une infiltration des corps ciliaires et trois quart présentaient une perte de l'expression nucléaire de BAP-1.
- Parmi les 66 MU énuclées, 28 (42%) ont bénéficié d'une analyse génétique complémentaire. Plus des deux tiers (69%) étaient classifiés à haut risque métastatique (perte du chromosome 3 et gain 8q) selon la classification de Trolet.

L'établissement d'une biobanque en onco-ophtalmologie combine plusieurs avantages :

(i) *Développement de la recherche clinique translationnelle*

Récemment, plusieurs équipes ont rapporté l'intérêt de l'humeur aqueuse et du prélèvement veineux dans le diagnostic de MU, notamment en cas de faible taille tumorale (Grisanti et al., 2023; Im et al., 2022). Dans une pathologie où la biopsie tissulaire n'est pas réalisée en routine, ces nouveaux outils s'avèrent particulièrement prometteurs. Une meilleure pronostication du risque métastatique est également capitale afin d'inclure les patients à haut risque métastatique dans des essais cliniques avec mise en place de traitements adjuvants (i.e. lors du traitement du primitif oculaire)(Valsecchi et al., 2018). L'intérêt de la biobanque repose également sur son caractère transversal dans le temps. Comparer la cytogénétique tumorale entre le traitement primitif, après radiothérapie (Dogrusöz et al., 2015) et lors du processus métastatique peut permettre une meilleure compréhension de la dissémination tumorale (Mariani et al., 2023).

(ii) *Coopérations internationales*

Dans le cadre de notre activité en onco-ophtalmologie, plusieurs coopérations cliniques et fondamentales ont été développées avec notamment le Centre anti-cancéreux Antoine Lacassagne (Nice), l'équipe Inserm C3M (Nice), le service d'ophtalmologie du CHU de Lyon, l'Hôpital Ophtalmique Jules Gonin (Lausanne, Suisse), le service de pathologie du CHU de Porto (Portugal) et le service d'onco-ophtalmologie et de pathologie de Liverpool (Royaume Uni).

(iii) *Publications*

Plusieurs études, se basant entre autres sur les données obtenues via notre biobanque, ont été publiées ces dernières années. A titre indicatif, le nombre de publications est passé de 4 en 2018 à 11 en 2021 (28 publications au total entre 2018 et 2021).

(iv) Emploi

Le développement de la biobanque au LPCE a permis la création d'un Master de science dédié « *biobanks and complex data management* » à l'Université Cote d'Azur. Ce Master permet la formation des futurs data managers et des coopérations nationales et internationales avec d'autres centres académiques et l'industrie.

Cependant, notre biobanque dédiée à l'onco-ophtalmologie possède plusieurs limites. Tout d'abord, sa taille est assez réduite (n=207 patients) bien que supérieure aux précédentes études sur le sujet (Gao et al., 2021). Cela est expliqué avant tout par la rareté des tumeurs rencontrées. Par ailleurs, nous ne stockons actuellement pas les métastases hépatiques des MU pour des raisons organisationnelles. De même, les biopsies liquides (ponction veineuse, humeur aqueuse) ne sont actuellement réalisées que ponctuellement lors du traitement du primitif oculaire. Les biopsies liquides ne sont pas répétées dans le temps au cours du suivi. Cela ne nous permet pas une étude transversale et longitudinale complète de la dissémination du MU. Parmi les MU inclus, la plupart sont agressifs et de mauvais pronostics. Nous ne disposons pas de suffisamment d'échantillons de MU de petite et moyenne taille. Cela est expliqué par le fait qu'aucune biopsie tissulaire n'est réalisée en pratique clinique quotidienne et que les échantillons tissulaires sont uniquement issus des patients ayant bénéficié d'une énucléation primaire ou secondaire.



### **3.3.2. Article N°3: Need for a dedicated ophthalmic malignancy clinico-biological biobank: the Nice Ocular MAlignancy (NOMA) biobank.**

Arnaud MARTEL<sup>\*1, 2</sup>, Lauris GASTAUD<sup>3</sup>, Christelle BONNETAUD<sup>4</sup>, Sacha NAHON-ESTEVE<sup>1</sup>, Kevin WASHETINE<sup>4,5</sup>, Olivier BORDONE<sup>5</sup>, Myriam SALAH<sup>4</sup>, Virginie TANGA<sup>4</sup>, Julien FAYADA<sup>4</sup>, Virginie LESPINET<sup>5</sup>, Maryline ALLEGRA<sup>4</sup>, Salome LALVEE<sup>4</sup>, Katia ZAHAF<sup>4</sup>, Stephanie BAILLIF<sup>1</sup>, Corine BERTOLOTTO<sup>6</sup>, Baharia MOGRABI<sup>2</sup>, Sandra LASSALLE<sup>\*2,4,5</sup>, and Paul HOFMAN<sup>\*2,4,5</sup>

From:

1. Ophthalmology Department, Nice University Hospital, 06001 Nice, France
2. Côte d'Azur University, Institute of Research on Cancer and Aging in Nice (IRCAN), Team 4, Centre Antoine Lacassagne, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OncoAge, F-06189 Nice, France
3. Oncology Department, Antoine Lacassagne Cancer Centre, 06 000 Nice, France
4. Hospital-Integrated Biobank (BB-0033-00025), FHU OncoAge, Université Côte d'Azur, CHU de Nice, 06001 Nice CEDEX 1, France
5. Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, FHU OncoAge, Université Côte d'Azur, Nice, France.
6. Nice Côte d'Azur University, INSERM, C3M, 06 200 Nice, France

\*Contributed equally to this work

Correspondence:

Sandra LASSALLE, MD, PhD; Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Pasteur 1 Hospital, 30 voie romaine, 06000 Nice, France. E-mail: lassalle.s@chu-nice.fr; phone number: +33 4 92 03 88 55

Paul HOFMAN, MD, PhD; Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Pasteur 1 Hospital, 30 voie romaine, 06000 Nice, France. E-mail: hofman.p@chu-nice.fr; phone number: +33 4 92 03 88 55

### **Simple summary**

Ophthalmic malignancies refer to rare, highly diversified, aggressive neoplasms. Unlike other types of solid tumours, tissue biopsy is not recommended for intraocular malignancies so that a limited number of tissue samples is available for translational research programs. To date, only very few biobanks dedicated to ophthalmic malignancies have been reported. The aim of this article was to present the challenges raised by ophthalmic malignancies in order to obtain biospecimens for research purposes, and the biobank dedicated to ophthalmic malignancies set up in our institution (Côte d'Azur University, Nice, France) was detailed. There is an urgent need to develop ocular malignancy biobanks to enhance translational research projects, develop international collaborations, and ultimately to optimize customized medicine for treating these tumours.

## Abstract

Ophthalmic malignancies include various rare neoplasms involving the conjunctiva, the uvea or the periocular area. These tumours are characterized by their scarcity as well as their histological, and sometimes genetic diversity. Uveal melanoma (UM) is the most common primary intraocular malignancy. UM raises three main challenges highlighting the specificity of ophthalmic malignancies. First, UM is a very rare malignancy with an estimated incidence of 6 cases per million inhabitants. Second, tissue biopsy is not routinely recommended due to the risk of extraocular dissemination. Third, UM is an aggressive cancer because it is estimated that about 50% of patients will experience metastatic spread without any curative treatment available at this stage. These challenges better explain the two main objectives to create a dedicated UM biobank. First, collecting UM samples is essential due to tissue scarcity. Second, large-scale translational research programs based on stored human samples will help to better determine UM pathogenesis with the aim to identify new biomarkers allowing early diagnosis and new targeted treatment modalities. Other periocular malignancies such as conjunctival melanomas or orbital malignancies also raise specific concerns. In this context, the number of biobanks worldwide dedicated to ocular malignancies is very limited. The aims of this article were, (i) to describe the specific challenges raised by a dedicated ocular malignancy biobank, (ii) to report our experience in setting up such a biobank, and, (iii) to discuss future perspectives in this field.

Keywords: biobank, ophthalmic malignancies, uveal melanoma, tissue biopsy, liquid biopsy database

## 1. Introduction

Ophthalmic malignancies include a wide spectrum of highly variable tumours involving the conjunctiva, the uvea, the eyelids, and the orbit. Most of these tumours are considered rare and there is no consensus standard of care [1]. Uveal melanoma (UM) is the most common primary intraocular malignancy, with an incidence of only 6 cases per million inhabitants in Western countries [2]. Therefore, UM is considered a rare but aggressive malignancy [3]. The last decade has been marked by dramatic molecular and genetic improvements related to UM. However, a daily clinical management of patients is lacking and it is estimated that 50% of UM patients will experience metastatic spread [4]. To date, there is no curative treatment available for metastatic UM. Current animal models are scarce, especially metastatic models, and do not allow generalizing the findings to humans [5]. Therefore, there is an urgent need to develop customized targeted treatments through collaborative translational and clinical research based on robust clinical, imaging, biological and genetic data obtained from patients [6].

In 1996, the term “biobank” was first introduced and was rapidly popularized [7]. Most human malignancies now have dedicated biobanks [8]. However, ophthalmic malignancy biobanks are poorly reported in the literature, thus limiting data sharing and international collaborations [9]. Since 2013, the Laboratory of Clinical and Experimental Pathology of Nice University (France) has created an accredited biobank dedicated to ophthalmic malignancies that belongs to the Cote d’Azur Biobank (BB-0033-00025, <https://biobank-cotedazur.fr>).

The aims of this article were to detail the Nice Ophthalmic Malignancy (NOMA) biobank and to highlight the current challenges, objectives and limitations encountered when setting up such a dedicated ophthalmic malignancy biobank.

## 2. What are the specific challenges associated with ophthalmic malignancies?

### 2.1. A wide variety of malignancies

The periocular area is a unique and exceptional example of melanoma diversity in the human body. Several types of melanomas may be found in clinical practice such as primary or metastatic cutaneous melanomas, conjunctival melanomas (CM), UM, primary or secondary orbital melanomas (Fig 1). For example, although anatomically close (only a few millimetres), CM and UM are very different genetically [10]. It is now well established that UM and primary orbital melanoma result from driver mutations in the GNAQ and GNA11 genes whereas cutaneous melanoma and CM result from mutations in the BRAF, NRAS, NF1 and c-Kit genes [11]. These molecular differences explain why CM has benefited from the therapeutic opportunities developed for cutaneous melanoma with anti-BRAF and anti-MEK targeted therapies unlike UM [1,12]. Another major difference is the role of the immune system in UM, CM, and cutaneous melanoma. Due to the “immune privilege”, most conventional anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies have failed to demonstrate any benefit in UM, while they are effective in cutaneous melanoma and CM [13]. Tebentafusp, a specific anti-GP100 immunotherapy, has recently shown promising results in metastatic UM but a longer follow-up is needed to ascertain its efficacy [14].

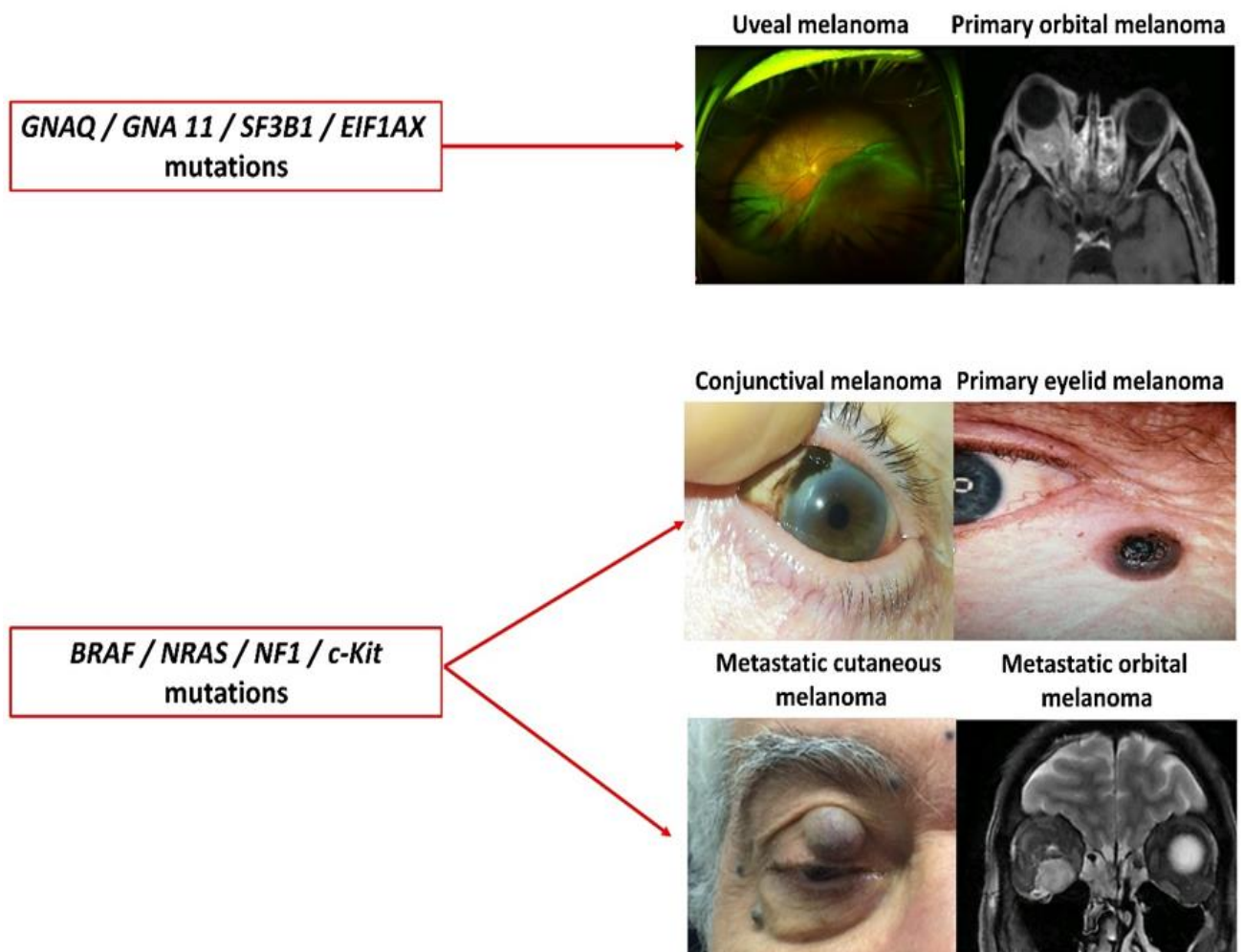


Fig 1: The spectacular variety of periocular melanomas.

## 2.2. A wide variety of clinical presentations and aggressiveness

In line with other tumours located elsewhere, the clinical presentation may vary greatly from one patient to another. A few decades ago, the prognosis of UM was essentially based on histological findings, and the epithelioid subtype, a high mitotic index or an extraocular extent were considered poor prognostic factors [15]. More recently, the loss of expression of BAP1 has been shown to be a major pejorative prognostic factor through the induction of tumour dissemination in UM [16] and is now systematically investigated in daily clinical practice [17]. Lately, chromosomal and genetic findings have revolutionized the prognosis of UM patients by

allowing distinguishing patients with a low versus high metastatic risk [16]. Monosomy of chromosome 3 associated with chromosome 8q gain has been shown to be highly predictive of the metastatic spread by Trolet et al [18]. Also, Onken et al. have shown that 15-gene expression profiling in UM allowed distinguishing accurately class 1 (low risk) from class 2 (high risk) metastatic risk [19].

### 2.3. Tumour rarity

Except for eyelid basal cell carcinoma, most ophthalmic malignancies are extremely rare, thus limiting the collection of numerous tissue samples. The annual incidence per million inhabitants of several ophthalmic malignancies is summarized in Table 1. A slight increase in CM incidence has been found over the last decades [20], but has not been confirmed in UM [15,21].

<b>Tumour histology</b>	<b>Incidence per million inhabitants (reference)</b>
<b>UM</b>	6 (Jager et al., 2020)
<b>CM</b>	0.8 (Brouwer et al., 2022)
<b>Conjunctival squamous cell carcinoma</b>	0.3 (Höllhumer et al., 2021)
<b>Primary eyelid melanoma</b>	1 (Quigley et al., 2019)

Table 1: Incidence of the main ophthalmic malignancies. UM: uveal melanoma; CM: conjunctival melanoma.

### 2.4. Lack of tissue biopsy: the UM example.

Unlike most malignancies, the diagnosis of UM is based on clinical and ocular ultrasound findings with no need for tissue biopsy. Transscleral or transvitreal UM biopsies are not recommended and are even contraindicated because they are considered unsafe (risk of intravitreal haemorrhage, retinal detachment) with a non-negligible risk of extraocular tumour dissemination [24]. The only interest of tissue biopsy would be to assess tumour prognosis. However, because there is no curative treatment for disseminated UM, this argument is widely discussed, and the benefit/risk balance of UM biopsy does not appear to be favourable. About 90% of UM cases will be treated conservatively with proton therapy, radiosurgery or brachytherapy with favourable local outcomes [15]. Only large or diffuse intraocular disseminated tumours are treated with enucleation. The last decade has been marked by an increase in eye-sparing indications and even large UM are increasingly eligible to conservative treatments without major side effects [25]. Taken together, these data explain why UM samples are usually not collected to build biobanks.

## 2.5. Emergence of liquid biopsies

Because most ophthalmic malignancies are rare and since tissue biopsy is not routinely performed in these latter tumours, liquid biopsies (LBs) have been recently popularized [26]. LB in onco ophthalmology domain mainly refers to the collection of any potential tumour fluids such as venous blood or aqueous humour (AH). Several features may be monitored, including circulating tumour cells (CTCs), circulating tumour DNA (ctDNA), circulating tumour RNA (ctRNA), circulating vesicles such as exosomes, and, tumour-educated platelets [26]. The advantages of LB include: (i) its non-invasiveness, (ii) the fact that it may be repeated as often as required, thus allowing disease monitoring, (iii) the large amounts of fluid available, (iv) the fact that it better reflects the metastatic spread of the disease in case of venous LB, (v) the fact



that it allows establishing a reliable prognosis in various malignancies [26]. Thus, two types of LBs are currently investigated in the field of ophthalmic malignancies.

#### 2.5.1. Venous liquid biopsies: the UM example

CTC and ctDNA have been studied in various prospective studies in UM. CTCs were first investigated in UM in 2008 by Ulmer et al. [27]. CTCs appear to be tumour-specific since they have never been identified in healthy patients and benign lesions. Higher CTC counts have been found in metastatic versus primary UM and in class 2 versus class 1 tumours [26]. It is still unclear whether CTCs detection in primary UM might predict further metastatic spread. This feature is of strong interest because it could justify the use of systemic adjuvant treatment for the management of primary UM. The limitations include the use of a wide variety of CTCs isolation and identification methods [26].

Higher ctDNA levels have also been found in metastatic UM compared to primary UM. Only one study has compared the CTC counts and ctDNA levels in 40 patients with metastatic UM, and CTC were detected using the CellSearch® device in only 30% of patients while the ctDNA was detected in 84% of patients [28]. Interestingly, only the ctDNA significantly correlated with the progression-free survival and overall survival in the multivariate analysis [28].

#### 2.5.2. Aqueous humour (AH) biopsies

AH collection is a simple minimally-invasive procedure usually performed on an outpatient basis. AH LBs have been mainly studied in retinoblastoma which is the most common primary intraocular malignancy found in childhood. A body of evidence indicates that AH collection is useful for the diagnosis and monitoring of treatment response [29]. It has been shown that AH

collection is much more reliable than venous LB [30]. Only a few studies have investigated AH LBs in UM and they have suggested that the AH could be used as a diagnostic and prognostic biomarker in the future [31,32].

### 3. Legal, economic, and technical aspects

#### 3.1. Legal considerations

The NOMA biobank is part of the Hospital-integrated Cote d'Azur biobank stored in and managed by Nice University Hospital (France). The Cote d'Azur biobank has developed several platforms, including tissue, LB, and molecular pathology platforms, located in the Laboratory of Clinical and Experimental Pathology ([www.biobank-cotedazur.fr](http://www.biobank-cotedazur.fr)) [33]. The main tumours stored have been collected from patients with lung, thyroid, skin, head and neck, and more recently ocular diseases. The Côte d'Azur biobank has obtained the NF S96-900 certification (National French Standard) in 2010. In 2022, it obtained the ISO 9001 certification as well as the international ISO 20387 standard specific for biobanking activity [34]. These standards guarantee the high quality of the whole biobanking process. Moreover, the LPCE has obtained an accreditation according to the ISO 15189 norm in 2013 for surgical and molecular pathology diagnosis, notably for ophthalmopathology, therefore ensuring the quality of preanalytical, analytical and post analytical steps, before transferring samples into the Côte d'Azur Biobank.

#### 3.2. Funding considerations

A major issue regarding biobanks, especially biobanks dedicated to a specific pathology, is their financial viability in terms of development and long-term maintenance [9,35,36]. Creating a biobank requires an expert team, various costly processing and equipment, in particular for

sample storage, along with computer software [33,37]. The business model of the Côte d'Azur Biobank (BB-0033-00025) is partially supported by French public funding programs funded by the French Ministry of Health such as the MERRI (“Mission d'Enseignement, Recherche, Reference et Innovation”) and DGOS (“Direction Générale de l'Offre de Soins”) programs. To a lesser extent, different material transfer agreements (MTAs) with public and private institutes allow biobank funding [33]. These public-public and public-private partnerships were included in the yearly Côte d'Azur Biobank budget [33,38]. In this regard, a costing policy for samples and various associated expertise provided by the biobankers to scientists, and contracts and MTAs have been elaborated in association with the Research and Innovation Department of Nice University Hospital. These costs and their applications have been assessed according to national and international recommendations while taking into account the share of investment for the biobank and the scientific collaboration level [39]. The contracts signed by the scientists and other partners require mentioning the biobank in their publications, at different sections depending on the contribution of the biobank members (co-author, citation of the biobank in the Material and Methods section or in the Acknowledgments section).

### 3.3. Technical, space and computer considerations

The implementation of the NOMA biobank is summarized in Table 2. Tissue biopsy, liquid biopsy and AH puncture were stored in the NOMA biobank in 2013, 2018 and 2020, respectively.

Year	Solid biopsy samples	Liquid biopsy samples	AH puncture samples
2013	4	0	0
2014	5	0	0
2015	40	0	0
2016	131	0	0
2017	87	0	0
2018	94	710	0
2019	152	188	0
2020	97	307	11
2021	118	870	14
2022	108	647	14

Table 2: Summary of the NOMA biobank sample processing (all ocular tumours).

### 3.3.1. Biobanking process for UM

The biobanking process, illustrated for UM, is summarized in Figure 2. Briefly, the diagnosis of UM is based on clinical and ultrasound findings obtained by ocular oncologists at Nice University Hospital, one of the two tertiary referral care centres in ocular oncology in France [40]. Preoperative examination includes dilated fundus examination, ultra-wide-field retinography (Optomap, Optos PLC, Dunfermline, Scotland, UK), OCT, and ICG angiography, when required. Systemic work-up includes liver MRI or ultrasonography. A written informed consent is signed preoperatively by the patients in order to be able to include them into the biobank database.

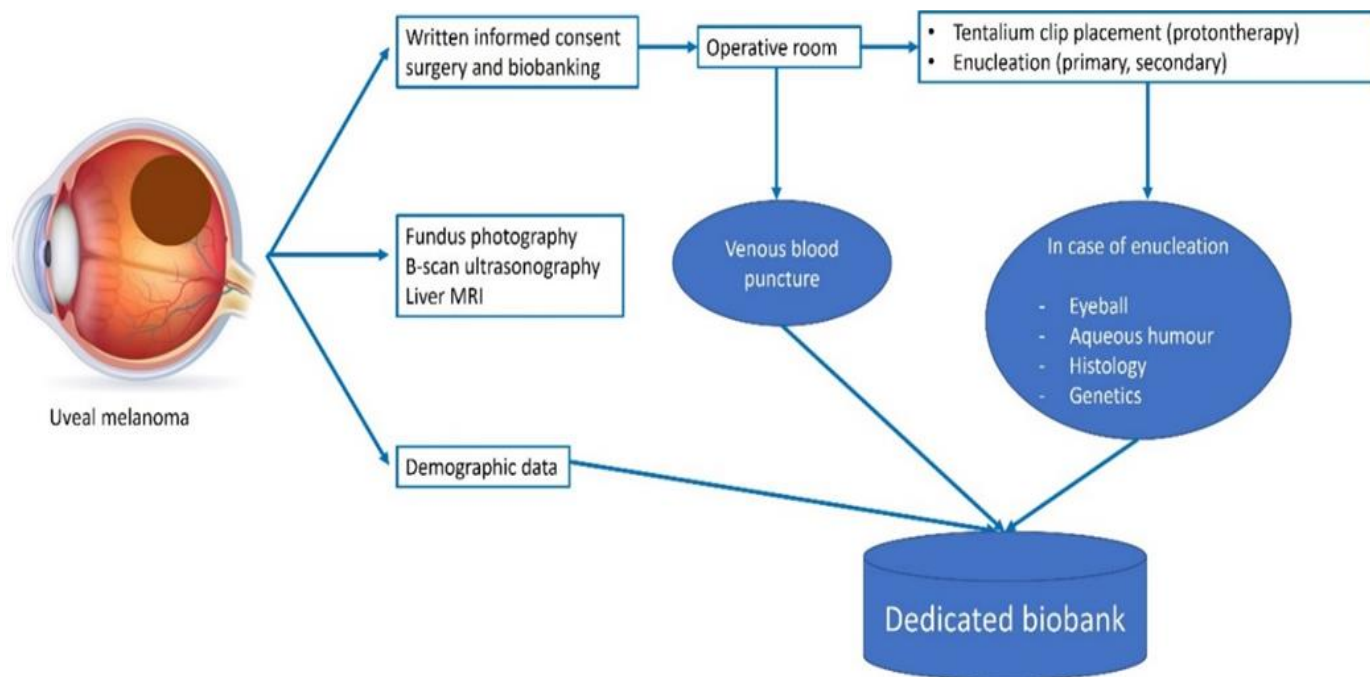


Fig 2: Whole biobanking process for UM patients.

In UM patients undergoing conservative surgery (placement of tantalum clips followed by proton therapy), venous LBs (4 EDTA blood collection tubes of 8 mL) may be performed at the time of initial surgery. We no longer perform transscleral biopsies due to their low yield and the risk of extraocular tumour dissemination. In patients undergoing primary or secondary enucleation, AH collection (once the eye has been enucleated), LB, tissue histology, and genetic analyses may be performed. The NOMA biobank and the LPCE are located in the same department. The operative rooms are closely connected to the laboratory with the use of an intra-hospital pneumatic tube transportation system. Solid and LB samples are usually processed within 15 minutes of receipt in the laboratory. The processing, amount and storage conditions for each sample type are summarized in Table 3.

Type of sample	Processing	Amount	Storage condition
<b>Tissue</b>			
Frozen tumour tissue	None	5-50 mg	-80°C
Frozen healthy choroid	None	5-50 mg	-80°C
Paraffin-embedded tumour tissue	Paraffin protocol (*)	1-5 FFPE blocks	4°C
Paraffin-embedded healthy choroid	Paraffin protocol (*)	1 FFPE blocks	4°C
<b>Blood</b>			
Whole blood	None	1 mL per aliquot	-80°C
Plasma	Centrifugation (**)	1 mL per aliquot	-80°C
PBMC	Centrifugation (***)	0.5-10 million per 1-mL aliquot	-196°C (liquid nitrogen)
Aqueous humour	None	10-50 µL per aliquot	-80°C

Table 3: Summary of collected samples in terms of dedicated processing, amount, and storage conditions. (\*) the paraffin protocol has been previously described [41]; (\*\*) two consecutive centrifugations at 2,000 G at 4°C; (\*\*\*) first centrifugation at 1,000 G for 20 minutes in a dedicated Ficoll tube, followed by a second centrifugation at 400 G for 10 minutes at room temperature. FFPE: formalin-fixed paraffin embedded. PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

Regarding the various procedures for tissue sample collection, the diagnosis was made and the specimens to be collected for the biobank were selected by a pathologist expert in ophthalmology (SL). When possible, the tumour tissue as well as the healthy adjacent tissue were both frozen or fixed in formalin and stored. For each tumour with frozen samples, a mirror sample was embedded in paraffin for quality control and assessment of the percentage of tumour cells, and one fragment was dedicated to the diagnosis while the others were stored for research purposes. Each tissue sample was weighted before freezing. All the samples were processed and stored in appropriate facilities in accordance with standard guidelines for

equipment, computing, and safety. Clinical and imaging data are stored in a dedicated accredited database (Synapse medical, [www.synapse-medical.fr](http://www.synapse-medical.fr), Table 4). Synapse software is a specific health data warehouse approved by the CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés; <https://www.cnil.fr/>). Biological, histological, and genetic data are saved in another dedicated software belonging to the Cote d'Azur biobank (<https://biobank-cotedazur.fr>). We acquired recently MBioLIMS BIOBANKING® software (Modul-bio) specifically dedicated to biobanking activities. It will allow having a complete view of all the samples stored and statistical reports on the biobank activity [42]. Trolet classification has been established in 2009 based on the tumoral chromosomal abnormalities [18]. Two subtypes based on chromosome 3 disomy (Trolet 1a, 1b) and chromosome 3 monosomy (Trolet 2a, 2b, 2c) have been established. Gain of 8q associated with monosomy 3 was classified as Trolet 2b or 2c and has been strongly associated with an increased risk of metastatic spread [18,43]. In this work, tumoral DNA extraction was performed on paraffin tissue sections using the Maxwell automate (PROMEGA, USA) with a dedicated kit. Genomic hybridation and nucleotidic polymorphism were established by using CGH-array and SNP-array analyses with the Genechip Oncoscan Array (Affymetrix, USA).

<b>Demographics</b>	<b>Clinical and radiological data</b>	<b>Tumour-related radiological data</b>	<b>Histological data</b>	<b>Genetic data</b>
---------------------	---------------------------------------	---	--------------------------	---------------------

<b>Gender</b>	Visual acuity	Diameter	pTNM classification	Chromosomal abnormalities
<b>Age</b>	Intraocular pressure	Thickness	Cell type (epithelioid, fusiform, mixed)	Trolet classification
<b>Personal and family history of cancer</b>	Cataract	Ciliary body involvement	Mitoses	
	Retinal detachment		Extraocular extent	
	Optic nerve involvement		Necrosis	
	Extraocular extent		Inflammatory infiltration	
	Intravitreal injections		Optic nerve involvement	
	Follow-up		BAP 1 status	
			Extent of resection (R0, R1, R2)	

Table 4: Summary of the data collected in the dedicated SYNAPSE database.

### 3.3.2. Process for other ophthalmic malignancies

The storage process for other ophthalmic malignancies is similar to that described above. Table 5 summarizes the main data recorded for other ophthalmic malignancies.

<b>Demographics</b>	<b>Histological data</b>
<b>Age</b>	Histological diagnosis
<b>Gender</b>	pTNM classification of the relevant tumour
<b>Date of surgery or collection</b>	Tumour size
	% of tumour cells
	Cold ischemia time
	Primary <i>vs</i> recurrent tumour
	Inflammatory infiltrate
	Ulceration
	Mitotic index
	Extent of resection (R0, R1, R2)

Table 5: Summary of the data collected in the LPCE database (for all tumours except UM).

## 4. Resources of the NOMA biobank



#### 4.1. All tumours

Overall, 207 patients were included in the NOMA biobank since 2013. As shown in Figure 3, 160 patients had an UM, 31 had a CM, and 16 had an orbital malignancy. Table 6 summarizes the main histological subtypes of the tumours stored in the NOMA biobank. For the 160 patients with an UM, 41% and 77.5% of samples were stored as LBs and solid biopsies, respectively. This preponderance of LB samples is easily explained by the fact that tissue biopsy is not routinely performed in case of UM and is only obtained when enucleation is performed. The low number of conjunctival and orbital tumours included in the NOMA biobank is explained by the fact that the tumour size is usually too small to be able to include tissues in a biobank and the samples are only used for clinical diagnostic purposes.

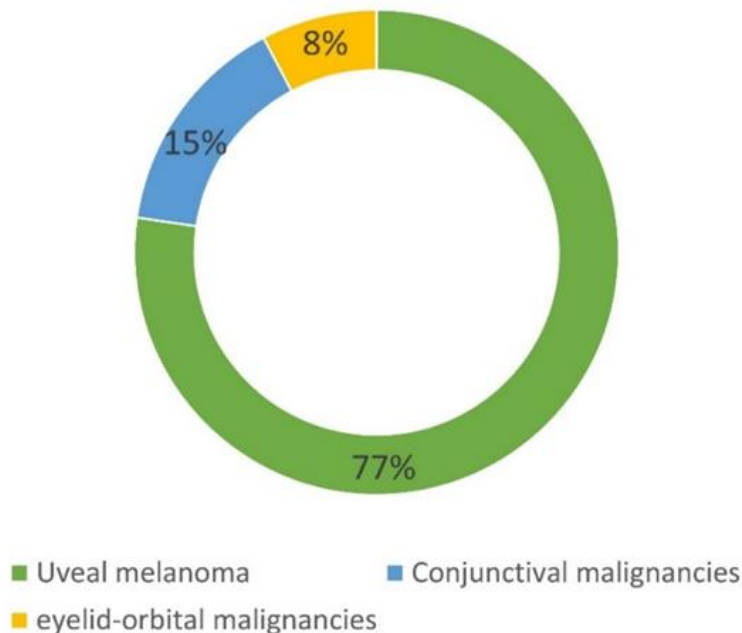


Figure 3: Composition of the NOMA biobank samples.

<b>Tumour location</b>	<b>Histological subtype: number (%)</b>	<b>Tissue biopsy: number (%)</b>	<b>Venous liquid biopsy: number (%)</b>
<b>Intraocular</b> N=160	Uveal melanoma: 160 (100)	66 (41)	124 (77.5)
<b>Conjunctival</b> N=31	Conjunctival melanoma: 21 (68) Conjunctival naevus: 8 (25.5) Squamous cell carcinoma: 2 (6.5)	31 (100)	11 (35.5)
<b>Orbit</b> N=16	Lymphoma: 8 (50) Carcinoma: 4 (25) Schwanoma: 3 (19) Solitary fibrous tumour: 1 (6)	16 (100)	0 (0)

Table 6: Detailed composition of the NOMA biobank samples.

#### 4.2. Uveal melanoma

The number of UM samples available in the NOMA biobank is summarized in Figure 4. Regarding LBs, most samples were prepared and stored as plasma samples. Only a few AH samples (15 patients) were available in our biobank. This is explained by the fact that we systematically collect the AH from enucleated eyeballs only since 2020.

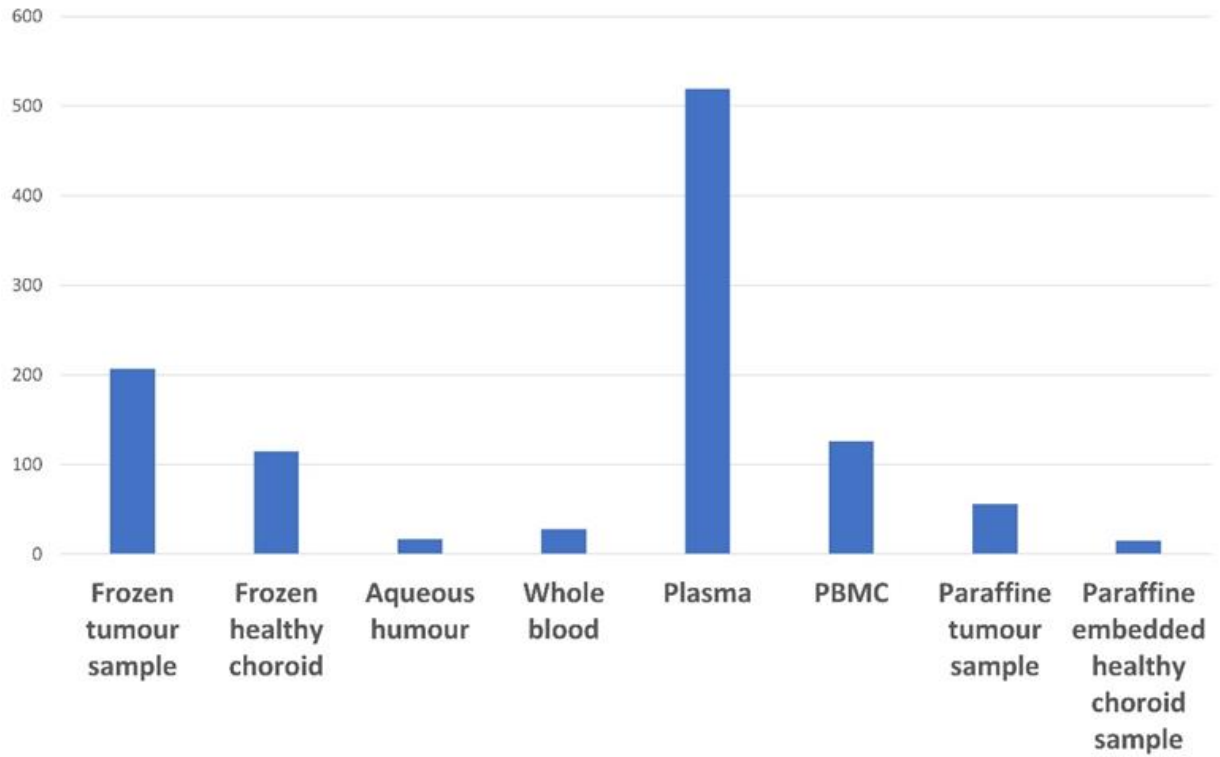


Fig 4: Summary of the UM tissue and liquid biopsy samples available in the NOMA biobank.

Among the 160 UM patients included in the NOMA biobank, 66 (41%) were enucleated, thus allowing tissue collection (Figure 5).

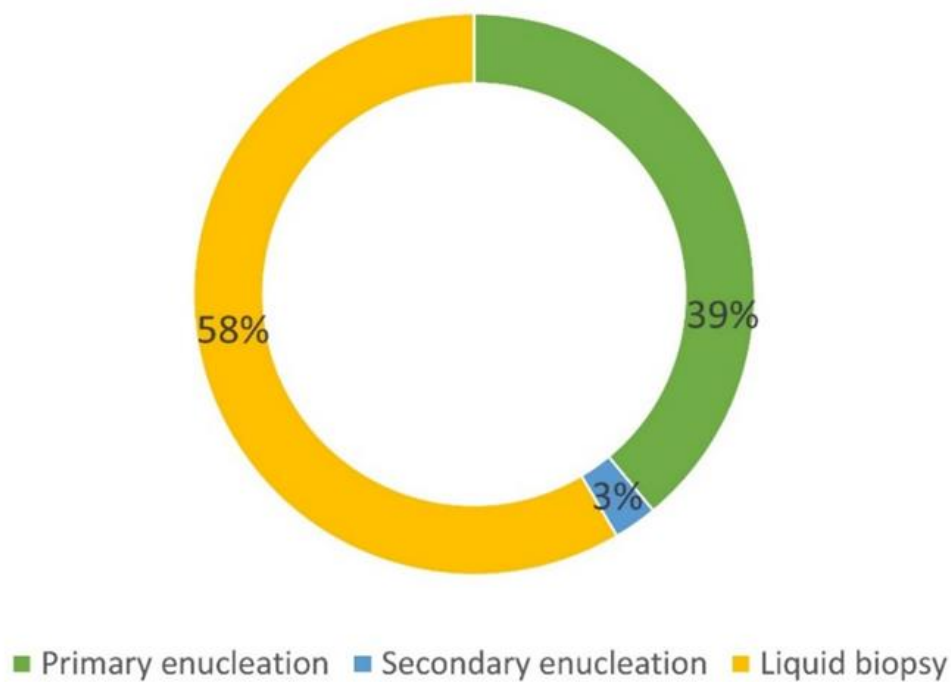


Figure 5: Details of the origin of UM samples included in the NOMA biobank. Primary enucleation: no treatment before surgery. Secondary enucleation: treatment before surgery (proton therapy).

The histological features of the enucleated eyeballs are provided in Table 7. Among the patients who underwent secondary enucleation, only those referred for tumour recurrence were included. Patients who underwent secondary enucleation for painful and blind eye due to extensive necrosis of the tumour with proton therapy were not included in the biobank. The cold ischemia time was defined as the time between enucleation and sample freezing for the biobank. The BAP 1 status was assessed by immunohistochemistry. Most of the UM tumours showed histological signs of aggressiveness (67% of cases with epithelioid cells, 20% of cases with extraocular extent, 33% of cases with ciliary body involvement).

<b>Number of enucleated patients (%)</b>	<b>66 (100)</b>
<b>Primary enucleation</b>	<b>62 (94)</b>
<b>Secondary enucleation</b>	<b>4 (6)</b>
<b>Tumour thickness in mm: mean (range)</b>	12.1 (0.2-20)
<b>Epithelioid subtype: number (%)</b>	44 (67)
<b>Extraocular extent: number (%)</b>	13 (19.7)
<b>Ciliary body infiltration: number (%)</b>	22 (33)
<b>Mitoses/mm<sup>2</sup>: mean number (range)</b>	1.9 (0-21)
<b>% of tumour cells in frozen sample: mean (range)</b>	75.2 (0-95)
<b>Cold ischemia time in min: mean (range)</b>	34.8 (15-180)
<b>BAP 1 loss: number (%)*</b>	30 (75)

Table 7: Histological features of enucleated UM patients. Cold ischemia time (time between resected specimen collection in the operative room and the freezing procedure); \* n=40 patients.

The pathological Tumour-Node-Metastasis (pTNM) classification of the tumours of enucleated patients is provided in Figure 6. About half of the patients had a pT3 UM.

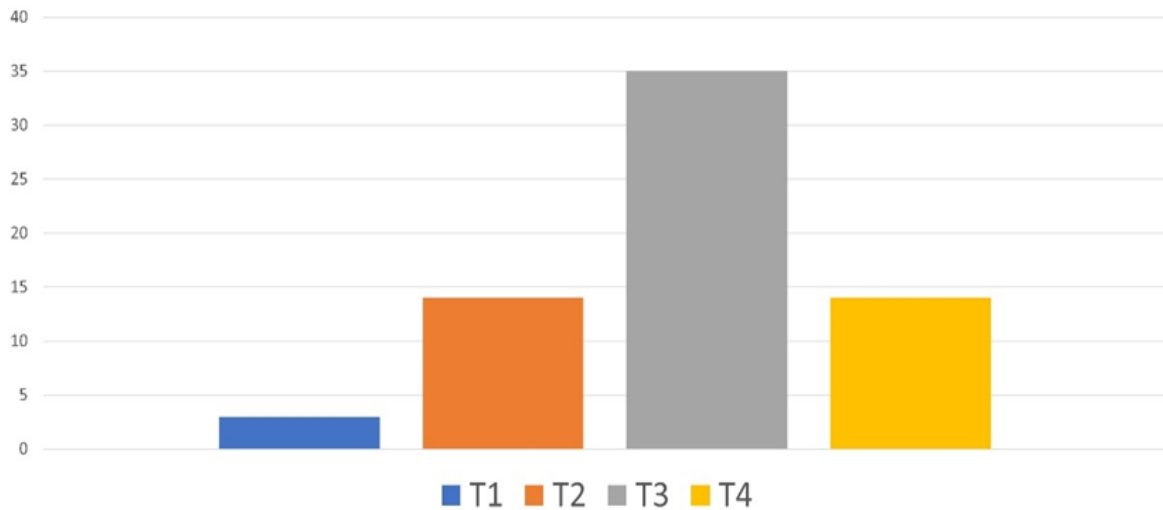


Figure 6: Pathological TNM classification of the tumours of enucleated patients.

Among the 66 enucleated patients, genetic analyses were performed in 28 (42%) patients. The chromosomal abnormalities as well as the subsequent Trolet classification are shown in Figure 7. Overall, most patients were classified as “poor prognosis” with the loss of a chromosome 3 and a chromosome 8q gain and 64% were classified as “Trolet 2b and 2c”. These findings were consistent with the histological features described above.

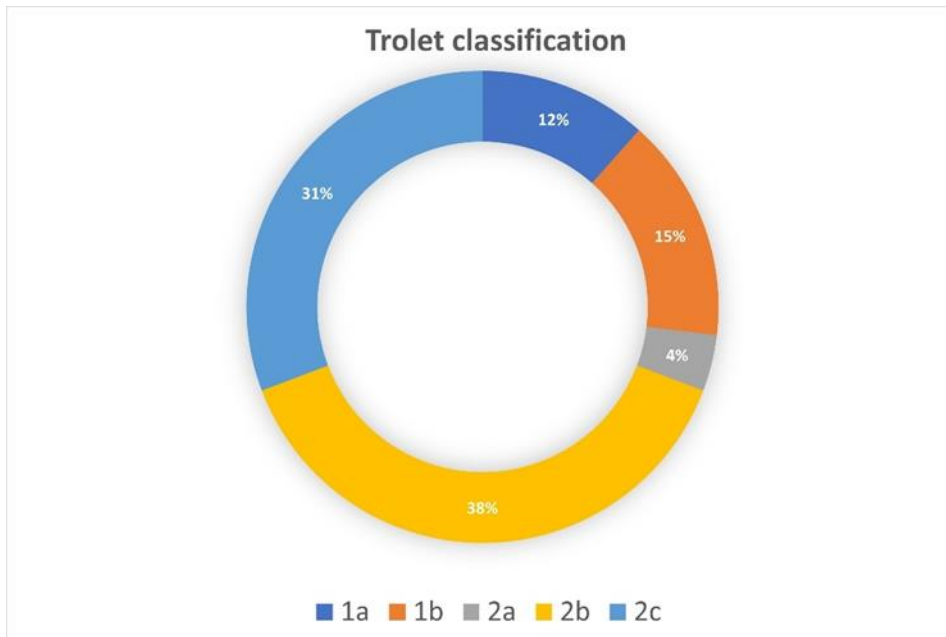
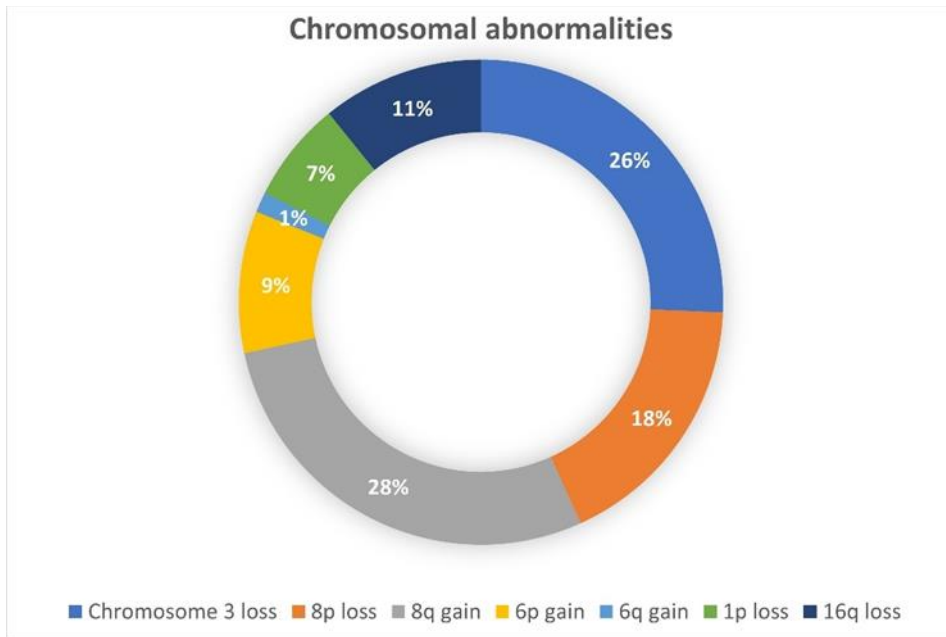


Figure 7: Chromosomal abnormalities and Trotet classification of 28 enucleated UM patients.

## 5. Objectives of setting up a dedicated ophthalmic malignancy biobank

### 5.1. Diagnosis

The diagnosis of a conjunctival or periocular malignancy is routinely made by pathologists. However, in certain circumstances such as UM, a tissue biopsy is not advocated, and treatment is only based on clinical and radiological findings with the risk of diagnosis inaccuracy such as enucleation of a non-tumour intraocular mass. AH collection is not routinely performed for the diagnosis of UM. However, it is a minimally-invasive procedure performed on an outpatient basis. Several studies have recently shown that the presence of driver mutations in the GNAQ and GNA11 genes could be used as a reliable diagnostic biomarker in UM, thus highlighting the need for a dedicated venous blood and AH biobank in UM [32].

## 5.2. Translational research and precision medicine

Healthy and tumour tissues as well as LBs from ocular tumours are stored in our biobank, allowing translational research and tumorigenesis exploration. As highlighted above, very rare samples such as AH samples are systematically collected prospectively. AH samples should allow identifying biomarkers for the diagnosis of UM and retinoblastoma follow-up [31]. To date, no targeted therapy has been found to be effective in the treatment of metastatic UM nor to prevent metastatic spread [12]. In 2018, the tyrosine kinase inhibitor sunitinib administered in adjuvant therapy in high risk (loss of chromosome 3, gain 8q, Class 2, T3-T4 by American Joint Committee on Cancer classification) primary UM was considered as promising by improving the overall survival [44]. However, the study was not randomized (since the control group was an historical cohort) and results were not subsequently validated in an independent cohort. However, this study highlights the urgent need to discover new targeted therapies that should be administered, and open rooms for adjuvant therapeutic decision making during the primary treatment of ocular malignant tumours. In this context, the systematic storage of UM samples is of strong value for translational research identifying future therapeutic targets.



### 5.3. Impact of radiotherapy on UM genetics

Storing secondary enucleation samples following previous radiotherapy is of high interest and has been little studied until now. The impact of radiotherapy in genetic abnormalities and subsequent prognosis is still debated since controversial studies on this setting have been reported. Genetic abnormalities have been found to be more prevalent and more complex in previously irradiated tumours [45]. In contrast, another study found that chromosome 3 status and subsequent prognosis were not modified by radiotherapy [46]. There is also a debate regarding the difficulty to assess genetic status (especially chromosome 3) in previously irradiated UM. So, karyotyping and FISH detection were found to be significantly altered by radiotherapy [45], whereas in another study detection of chromosome 3 microsatellite analysis was successfully determined [47]. In our experience, genetic testing depends on the aetiology of secondary enucleation. Secondary enucleations performed for blind and/or painful eyes are associated with a high rate of post-radiotherapy necrosis leading genetic testing not conclusive. Conversely, secondary enucleation performed for tumour recurrence can be more easily processed. However, it is not always clear whether genetic testing in this case is carried out on a recurrent tumour (i.e. tumour resistance to radiotherapy) or on a primary tumour located outside the field of irradiation.

### 5.4. Pretreatment screening

A biobank may also be useful to investigate whether a patient might be eligible to a given treatment. Until recently, there was not standard of care for metastatic UM. Tebentafusp, a specific anti-GP100 immunotherapy, has been recently approved by the Food and Drug

Administration but only in HLA-A\*02:01 UM patients [48]. The HLA status of patients with cryopreserved blood samples may be easily determined and might help clinicians to determine whether or not a patient is a good candidate for tebentafusp treatment.

5.5. Scientific output

A biobank dedicated to a specific pathology should be managed by an expert team involved in the setting up and development of research projects in tight collaboration with physicians, surgical and molecular pathologists, and researchers. Thus, a specific biobank should be acknowledged and cited in scientific publications. As shown in Figure 8, the number of publications related to ocular oncology published by our department has markedly increased over the last years both for fundamental and clinical research programs, mainly through the use of ocular resources from the biobank. Several articles based on the NOMA biobank resources have recently been published in peer-reviewed journals with high impact factors [1,6,49–51].

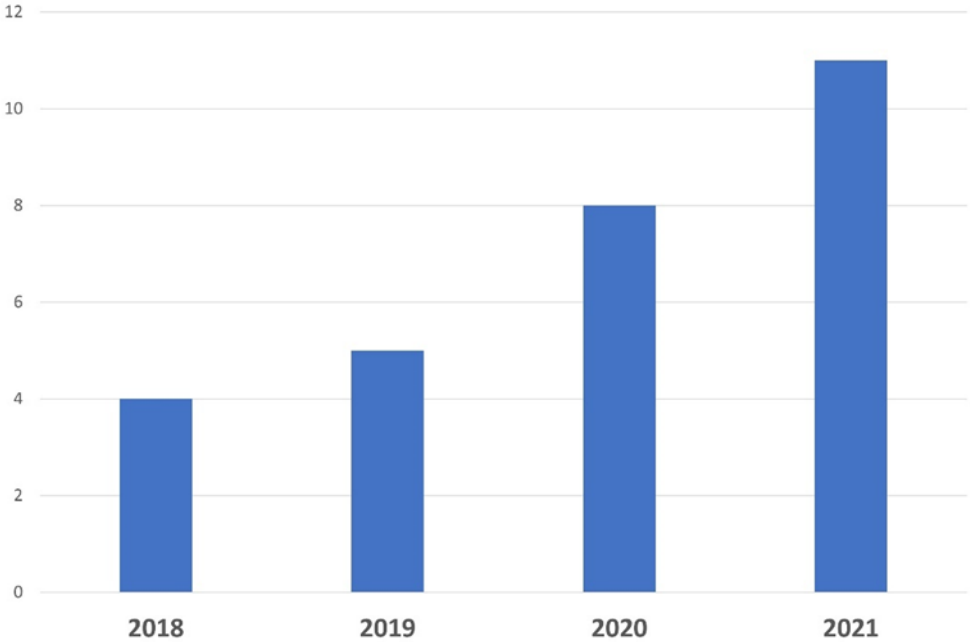


Figure 8: Number of scientific publications related to ocular oncology and translational research published over the last 4 years by Nice University Hospital thanks to the use of samples.

## 5.6. National and International collaborations

Data sharing enabled Nice University Hospital to collaborate with several internationally recognized ocular oncology departments, as summarized in Table 8. Of the 369 FFPE samples stored in the NOMA biobank, 44 (11.9%) have been used for collaborative scientific projects. A specific scientific and ethics committee is mandated to assess each public or private request to use samples according to the current regulations.

<b>Institution</b>	<b>Type of collaboration (recent related articles)</b>
<b>Oncology department, Antoine Lacassagne Cancer Centre, Nice, France</b>	Fundamental and clinical (Martel et al., 2021a, 2021c, 2021b, 2021d, 2020b; Monjanel et al., 2021; Nahon-Estève et al., 2021)
<b>Team 1, Molecular Mediterranean Medicine Centre (C3M), Nice, France</b>	Fundamental (Bellini et al., 2020; Krossa et al., 2022; Pandiani et al., 2021; Strub et al., 2021)
<b>Ophthalmology department, Lyon University Hospital, France</b>	Clinical (Thariat et al., 2022)
<b>Oculoplastic department, Jules Gonin Eye Hospital, Lausanne, Switzerland</b>	Clinical (Martel et al., 2022, 2021a, 2018)
<b>Anatomic Pathology Service, Pathology Department, Centro Hospitalar e Universitário do Porto, Portugal</b>	Fundamental (Lamas et al., 2021)
<b>Liverpool ocular oncology research department, United Kingdom</b>	Fundamental

Table 8: Current national and international collaborations

## 5.7. Information for patients and other health professionals

Because clear and accurate information is mandatory before obtaining any written informed consent, our Ocular Oncology department has recently developed a dedicated website for patients referred to our tertiary care centre (<https://www.cancerdesyeux.fr>). This website provides valuable information on patients' care, follow-up, as well as research projects. A dedicated website has also been created by the Clinical and Experimental Pathology Laboratory department of Nice University Hospital to provide useful information to patients and health professionals (<http://biobank-cotedazur.fr/>). Scientific congresses and relevant learned societies such as the ISOO (International Society of Ocular Oncology), OOG (Ocular Oncology Group), ESOPRS (European Society of Ophthalmic Plastic and Reconstructive surgery), and SFO (Société Française d'Ophthalmologie) allow diffusing knowledge about ophthalmic malignancies, including biobanks.

#### 5.8. Education and training

A Master in Science (MSc) degree entitled “Biobanks and complex data management” has been set up by the Côte d'Azur University (Nice, France). Developed by recognized experts in the field, this program is the first European MSc degree in the field offered by a public university (<https://univ-cotedazur.eu/msc/biobanks-complex-data-management>). Dedicated to Biological Sciences, this unique program is intended for students aiming at acquiring professional skills in order to provide evolving biobank services, meet regulatory and user requirements, and manage biobanks.

The “Biobanks and Complex Data Management” MSc allows international exchanges through a wide network of leading academic and industry partners.

## 6. Strengths of the NOMA biobank

The strengths of our biobank are as follows:

- (i) The NOMA biobank is certified (ISO 9001, NF-96S-900) and accredited (ISO 20387) and belongs to an already well-established biobank (Cote d'Azur biobank) ([www.biobank-cotedazur.fr](http://www.biobank-cotedazur.fr)),
- (ii) It is stored in a university pathology laboratory (LPCE, Nice) accredited for clinical and molecular pathology according the ISO 15189 standard,
- (iii) Clinical, imaging, histological, biological, and genetic data are collected for each patient,
- (iv) Its business model is supported by public funding programs,
- (v) It has allowed increasing the number of translational research conducted,
- (vi) It allows increasing the number of scientific publications and national and international collaborations,
- (vii) A master degree entitled “biobanks and complex data management” has been set up by the Côte d'Azur University (Nice, France) to train students to become biobankers.

## 7. Limitations

However, the NOMA biobank also has several limitations. First, its small sample size could be explained by the fact that both UM and CM are rarely found in daily clinical practice. In addition, as mentioned already previously, a tissue biopsy is not routinely performed in UM. Despite this, this dedicated ophthalmic biobank is larger than other published ocular malignancy biobanks [9]. Second, this biobank does not currently include metastases, in particular liver metastases in UM. Also, there is no retinoblastoma samples included in the biobank because treatment is centralized at the Curie Institute in Paris. Third, there are high numbers of patients with a poor prognosis and aggressive UM (most tumours classified as pT3, high rate of extraocular extent, loss of chromosome 3, most tumours classified as Trolet 2b and 2c). This could be explained by the fact that more advanced UM are better managed with enucleation rather than with proton therapy. This could limit the possibilities of translational research in early UM stages. Fourth, samples are mainly collected at the time of initial tumour management and collection is not repeated during the follow-up, thus limiting the ability of our biobank to monitor treatment response. Finally, a common challenge for most biobanks is the difficulty to synthesize all clinical, histological, biological, and genetic data in a single database. In our case, clinical and imaging data are stored in one database (Synapse) while biological, histological, and genetic data are stored in another database.

## 8. Conclusions

Dedicated secured and accredited biobanks are essential to collect high-quality samples to promote translational and multicentric ocular oncology research with the final aim to offer customized medicine. This is especially true for ophthalmic malignancies due to their scarcity and the lack of tissue biopsy in intraocular malignancies. Setting up such biobanks is time-, staff-, and cost-consuming and should be financially supported. The existing biobanks need to

be promoted and new biobanks need to be created to develop outstanding international collaborations.

Supplementary Materials: none.

Author Contributions: Conceptualization, AM, SN, SL, PH; Methodology: AM, KW, OB, MS, VT, JF, VL, MA, LG, SL, PHs, SB; Validation: LG, SL, CB, SB, BM, PH; Original Draft Preparation: AM, CB, SL, PH, BM; Review and editing: SL, PH, SN, LG, BR, PH

Funding: GIRCI MED “valo data”.

Acknowledgements: Fondation des Aveugles de Guerre. The authors thank Pr F.Pedeutour from the genetics department of the University Hospital of Nice, France.

Conflicts of Interest: The authors declare not conflicts of interests.

## References:

1. Nahon-Estève, S.; Bertolotto, C.; Picard-Gauci, A.; Gastaud, L.; Baillif, S.; Hofman, P.; Groulier, A.; Maschi, C.; Caujolle, J.-P.; Lassalle, S.; et al. Small but Challenging Conjunctival Melanoma: New Insights, Paradigms and Future Perspectives. *Cancers* 2021, 13, 5691, doi:10.3390/cancers13225691.
2. Jager, M.J.; Shields, C.L.; Cebulla, C.M.; Abdel-Rahman, M.H.; Grossniklaus, H.E.; Stern, M.-H.; Carvajal, R.D.; Belfort, R.N.; Jia, R.; Shields, J.A.; et al. Uveal Melanoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2020, 6, 24, doi:10.1038/s41572-020-0158-0.

3. Kaliki, S.; Shields, C.L. Uveal Melanoma: Relatively Rare but Deadly Cancer. *Eye Lond. Engl.* 2017, 31, 241–257, doi:10.1038/eye.2016.275.
4. Carvajal, R.D.; Schwartz, G.K.; Tezel, T.; Marr, B.; Francis, J.H.; Nathan, P.D. Metastatic Disease from Uveal Melanoma: Treatment Options and Future Prospects. *Br. J. Ophthalmol.* 2017, 101, 38–44, doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309034.
5. Uner, O.E.; Gandrakota, N.; Azarcon, C.P.; Grossniklaus, H.E. Animal Models of Uveal Melanoma. *Ann. Eye Sci.* 2022, 7, 7, doi:10.21037/aes-21-30.
6. Lamas, N.J.; Martel, A.; Nahon-Estève, S.; Goffinet, S.; Macocco, A.; Bertolotto, C.; Lassalle, S.; Hofman, P. Prognostic Biomarkers in Uveal Melanoma: The Status Quo, Recent Advances and Future Directions. *Cancers* 2021, 14, 96, doi:10.3390/cancers14010096.
7. Hewitt, R.; Watson, P. Defining Biobank. *Biopreservation Biobanking* 2013, 11, 309–315, doi:10.1089/bio.2013.0042.
8. Clavreul, A.; Soulard, G.; Lemée, J.-M.; Rigot, M.; Fabbro-Peray, P.; Bauchet, L.; Figarella-Branger, D.; Menei, P.; FGB network The French Glioblastoma Biobank (FGB): A National Clinicobiological Database. *J. Transl. Med.* 2019, 17, 133, doi:10.1186/s12967-019-1859-6.
9. Gao, Z.; Tan, J.; Wang, S.; Yu, H.; Zhou, Z.; Zhang, Y.; Zhou, M.; Xia, X.; Yao, F.; Huang, J. The Xiangya Ocular Tumor Bank: A Disease-Specific Biobank for Advancing Translational Research Into Ocular Tumors. *Front. Med.* 2021, 8, 774624, doi:10.3389/fmed.2021.774624.
10. Rodrigues, M.; Koning, L. de; Coupland, S.E.; Jochemsen, A.G.; Marais, R.; Stern, M.-H.; Valente, A.; Barnhill, R.; Cassoux, N.; Evans, A.; et al. So Close, yet so Far: Discrepancies



between Uveal and Other Melanomas. A Position Paper from UM Cure 2020. *Cancers* 2019, 11, 1032, doi:10.3390/cancers11071032.

11. Pandiani, C.; Béranger, G.E.; Leclerc, J.; Ballotti, R.; Bertolotto, C. Focus on Cutaneous and Uveal Melanoma Specificities. *Genes Dev.* 2017, 31, 724–743, doi:10.1101/gad.296962.117.

12. Reichstein, D.; Brock, A.; Lietman, C.; McKean, M. Treatment of Metastatic Uveal Melanoma in 2022: Improved Treatment Regimens and Improved Prognosis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2022, 33, 585–590, doi:10.1097/ICU.0000000000000905.

13. Komatsubara, K.M.; Carvajal, R.D. Immunotherapy for the Treatment of Uveal Melanoma: Current Status and Emerging Therapies. *Curr. Oncol. Rep.* 2017, 19, 45, doi:10.1007/s11912-017-0606-5.

14. Nathan, P.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; Baurain, J.-F.; Butler, M.O.; Schlaak, M.; Sullivan, R.J.; Ochsenschreier, S.; Dummer, R.; Kirkwood, J.M.; et al. Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, 1196–1206, doi:10.1056/NEJMoa2103485.

15. Singh, A.D.; Turell, M.E.; Topham, A.K. Uveal Melanoma: Trends in Incidence, Treatment, and Survival. *Ophthalmology* 2011, 118, 1881–1885, doi:10.1016/j.ophtha.2011.01.040.

16. Smit, K.N.; Jager, M.J.; de Klein, A.; Kiliç, E. Uveal Melanoma: Towards a Molecular Understanding. *Prog. Retin. Eye Res.* 2020, 75, 100800, doi:10.1016/j.preteyeres.2019.100800.

17. Stålhammar, G.; Grossniklaus, H.E. Intratumor Heterogeneity in Uveal Melanoma BAP-1 Expression. *Cancers* 2021, 13, 1143, doi:10.3390/cancers13051143.

18. Trolet, J.; Hupé, P.; Huon, I.; Lebigot, I.; Decraene, C.; Delattre, O.; Sastre-Garau, X.; Saule, S.; Thiéry, J.-P.; Plancher, C.; et al. Genomic Profiling and Identification of High-Risk Uveal Melanoma by Array CGH Analysis of Primary Tumors and Liver Metastases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009, 50, 2572–2580, doi:10.1167/iovs.08-2296.
19. Onken, M.D.; Worley, L.A.; Char, D.H.; Augsburger, J.J.; Correa, Z.M.; Nudleman, E.; Aaberg, T.M.; Altaweel, M.M.; Bardenstein, D.S.; Finger, P.T.; et al. Collaborative Ocular Oncology Group Report Number 1: Prospective Validation of a Multi-Gene Prognostic Assay in Uveal Melanoma. *Ophthalmology* 2012, 119, 1596–1603, doi:10.1016/j.ophtha.2012.02.017.
20. Brouwer, N.J.; Verdijk, R.M.; Heegaard, S.; Marinkovic, M.; Esmaeli, B.; Jager, M.J. Conjunctival Melanoma: New Insights in Tumour Genetics and Immunology, Leading to New Therapeutic Options. *Prog. Retin. Eye Res.* 2022, 86, 100971, doi:10.1016/j.preteyeres.2021.100971.
21. Aronow, M.E.; Topham, A.K.; Singh, A.D. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013). *Ocul. Oncol. Pathol.* 2018, 4, 145–151, doi:10.1159/000480640.
22. Höllhumer, R.; Williams, S.; Michelow, P. Ocular Surface Squamous Neoplasia: Management and Outcomes. *Eye Lond. Engl.* 2021, 35, 1562–1573, doi:10.1038/s41433-021-01422-3.
23. Quigley, C.; Deady, S.; Hughes, E.; McElnea, E.; Zgaga, L.; Chetty, S. National Incidence of Eyelid Cancer in Ireland (2005-2015). *Eye Lond. Engl.* 2019, 33, 1534–1539, doi:10.1038/s41433-019-0437-8.

24. Frizziero, L.; Midena, E.; Trainiti, S.; Londei, D.; Bonaldi, L.; Bini, S.; Parrozzani, R. Uveal Melanoma Biopsy: A Review. *Cancers* 2019, 11, 1075, doi:10.3390/cancers11081075.
25. Bensoussan, E.; Thariat, J.; Maschi, C.; Delas, J.; Schouver, E.D.; Hérault, J.; Baillif, S.; Caujolle, J.-P. Outcomes After Proton Beam Therapy for Large Choroidal Melanomas in 492 Patients. *Am. J. Ophthalmol.* 2016, 165, 78–87, doi:10.1016/j.ajo.2016.02.027.
26. Martel, A.; Baillif, S.; Nahon-Esteve, S.; Gastaud, L.; Bertolotto, C.; Roméo, B.; Mograbi, B.; Lassalle, S.; Hofman, P. Liquid Biopsy for Solid Ophthalmic Malignancies: An Updated Review and Perspectives. *Cancers* 2020, 12, 3284, doi:10.3390/cancers12113284.
27. Ulmer, A.; Beutel, J.; Süsskind, D.; Hilgers, R.-D.; Ziemssen, F.; Lüke, M.; Röcken, M.; Rohrbach, M.; Fierlbeck, G.; Bartz-Schmidt, K.-U.; et al. Visualization of Circulating Melanoma Cells in Peripheral Blood of Patients with Primary Uveal Melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2008, 14, 4469–4474, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0012.
28. Bidard, F.-C.; Madic, J.; Mariani, P.; Piperno-Neumann, S.; Rampanou, A.; Servois, V.; Cassoux, N.; Desjardins, L.; Milder, M.; Vaucher, I.; et al. Detection Rate and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Metastatic Uveal Melanoma. *Int. J. Cancer* 2014, 134, 1207–1213, doi:10.1002/ijc.28436.
29. Ghiam, B.K.; Xu, L.; Berry, J.L. Aqueous Humor Markers in Retinoblastoma, a Review. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 2019, 8, 13, doi:10.1167/tvst.8.2.13.
30. Berry, J.L.; Xu, L.; Polski, A.; Jubran, R.; Kuhn, P.; Kim, J.W.; Hicks, J. Aqueous Humor Is Superior to Blood as a Liquid Biopsy for Retinoblastoma. *Ophthalmology* 2020, 127, 552–554, doi:10.1016/j.ophtha.2019.10.026.

31. Wierenga, A.P.A.; Cao, J.; Mouthaan, H.; van Weeghel, C.; Verdijk, R.M.; van Duinen, S.G.; Kroes, W.G.M.; Dogrusöz, M.; Marinkovic, M.; van der Burg, S.S.H.; et al. Aqueous Humor Biomarkers Identify Three Prognostic Groups in Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019, 60, 4740–4747, doi:10.1167/iops.19-28309.
32. Im, D.H.; Peng, C.-C.; Xu, L.; Kim, M.E.; Ostrow, D.; Yellapantula, V.; Bootwalla, M.; Biegel, J.A.; Gai, X.; Prabakar, R.K.; et al. Potential of Aqueous Humor as a Liquid Biopsy for Uveal Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 6226, doi:10.3390/ijms23116226.
33. Washetine, K.; Heeke, S.; Bonnetaud, C.; Kara-Borni, M.; Ilić, M.; Lassalle, S.; Butori, C.; Long-Mira, E.; Marquette, C.H.; Cohen, C.; et al. Establishing a Dedicated Lung Cancer Biobank at the University Center Hospital of Nice (France). Why and How? *Cancers* 2018, 10, 220, doi:10.3390/cancers10070220.
34. De Blasio, P.; Biunno, I. New Challenges for Biobanks: Accreditation to the New ISO 20387:2018 Standard Specific for Biobanks. *Biotech Basel Switz.* 2021, 10, 13, doi:10.3390/biotech10030013.
35. De Souza, Y.G. Sustainability of Biobanks in the Future. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015, 864, 29–35, doi:10.1007/978-3-319-20579-3\_3.
36. Vaught, J.; Rogers, J.; Carolin, T.; Compton, C. Biobankonomics: Developing a Sustainable Business Model Approach for the Formation of a Human Tissue Biobank. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2011, 2011, 24–31, doi:10.1093/jncimonographs/lgr009.
37. Harati, M.D.; Williams, R.R.; Movassaghi, M.; Hojat, A.; Lucey, G.M.; Yong, W.H. An Introduction to Starting a Biobank. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2019, 1897, 7–16, doi:10.1007/978-1-4939-8935-5\_2.

38. Hofman, P.; Bréchet, C.; Zatloukal, K.; Dagher, G.; Clément, B. Public-Private Relationships in Biobanking: A Still Underestimated Key Component of Open Innovation. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 2014, 464, 3–9, doi:10.1007/s00428-013-1524-z.
39. Clément, B.; Yuille, M.; Zatloukal, K.; Wichmann, H.-E.; Anton, G.; Parodi, B.; Kozera, L.; Bréchet, C.; Hofman, P.; Dagher, G.; et al. Public Biobanks: Calculation and Recovery of Costs. *Sci. Transl. Med.* 2014, 6, 261fs45, doi:10.1126/scitranslmed.3010444.
40. Mathis, T.; Cassoux, N.; Tardy, M.; Piperno, S.; Gastaud, L.; Dendale, R.; Maschi, C.; Nguyen, A.-M.; Meyer, L.; Bonnin, N.; et al. [Management of uveal melanomas, guidelines for oncologists]. *Bull. Cancer (Paris)* 2018, 105, 967–980, doi:10.1016/j.bulcan.2018.07.011.
41. Hofman, V.; Ilie, M.; Long, E.; Lassalle, S.; Butori, C.; Bence, C.; Washetine, K.; Lalvee, S.; Hofman, P. [Immunohistochemistry and personalised medicine in lung oncology: advantages and limitations]. *Bull. Cancer (Paris)* 2014, 101, 958–965, doi:10.1684/bdc.2014.2041.
42. Jacotot, L.; Woodward, M.; de Montalier, A.; Vaglio, P. Utilizing Modular Biobanking Software in Different Types of Biobanking Activities. *Biopreservation Biobanking* 2022, 20, 417–422, doi:10.1089/bio.2022.0076.
43. van Beek, J.G.M.; Koopmans, A.E.; Vaarwater, J.; de Rooi, J.J.; Paridaens, D.; Naus, N.C.; de Klein, A.; Verdijk, R.M.; Kiliç, E. The Prognostic Value of Extraocular Extension in Relation to Monosomy 3 and Gain of Chromosome 8q in Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014, 55, 1284–1291, doi:10.1167/iovs.13-13670.
44. Valsecchi, M.E.; Orloff, M.; Sato, R.; Chervoneva, I.; Shields, C.L.; Shields, J.A.; Mastrangelo, M.J.; Sato, T. Adjuvant Sunitinib in High-Risk Patients with Uveal Melanoma:

Comparison with Institutional Controls. *Ophthalmology* 2018, 125, 210–217, doi:10.1016/j.ophtha.2017.08.017.

45. Dogrusöz, M.; Kroes, W.G.M.; van Duinen, S.G.; Creutzberg, C.L.; Versluis, M.; Bleeker, J.C.; Marinkovic, M.; Luyten, G.P.M.; Jager, M.J. Radiation Treatment Affects Chromosome Testing in Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015, 56, 5956–5964, doi:10.1167/iovs.15-17092.

46. Coupland, S.E.; Kalirai, H.; Ho, V.; Thornton, S.; Damato, B.E.; Heimann, H. Concordant Chromosome 3 Results in Paired Choroidal Melanoma Biopsies and Subsequent Tumour Resection Specimens. *Br. J. Ophthalmol.* 2015, 99, 1444–1450, doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307057.

47. Thornton, S.; Coupland, S.E.; Heimann, H.; Hussain, R.; Groenewald, C.; Kacperek, A.; Damato, B.; Taktak, A.; Eleuteri, A.; Kalirai, H. Effects of Plaque Brachytherapy and Proton Beam Radiotherapy on Prognostic Testing: A Comparison of Uveal Melanoma Genotyped by Microsatellite Analysis. *Br. J. Ophthalmol.* 2020, 104, 1462–1466, doi:10.1136/bjophthalmol-2019-315363.

48. Dhillon, S. Tebentafusp: First Approval. *Drugs* 2022, 82, 703–710, doi:10.1007/s40265-022-01704-4.

49. Lassalle, S.; Nahon-Esteve, S.; Frouin, E.; Boulagnon-Rombi, C.; Josselin, N.; Cassoux, N.; Barnhill, R.; Scheller, B.; Baillif, S.; Hofman, P. PD-L1 Expression in 65 Conjunctival Melanomas and Its Association with Clinical Outcome. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9147, doi:10.3390/ijms21239147.

50. Pandiani, C.; Strub, T.; Nottet, N.; Cheli, Y.; Gambi, G.; Bille, K.; Husser, C.; Dalmaso, M.; Béranger, G.; Lassalle, S.; et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals

Intratumoral Heterogeneity in Primary Uveal Melanomas and Identifies HES6 as a Driver of the Metastatic Disease. *Cell Death Differ.* 2021, 28, 1990–2000, doi:10.1038/s41418-020-00730-7.

51. Krossa, I.; Strub, T.; Martel, A.; Nahon-Esteve, S.; Lassalle, S.; Hofman, P.; Baillif, S.; Ballotti, R.; Bertolotto, C. Recent Advances in Understanding the Role of HES6 in Cancers. *Theranostics* 2022, 12, 4374–4385, doi:10.7150/thno.72966.

52. Martel, A.; Baillif, S.; Nahon-Esteve, S.; Gastaud, L.; Bertolotto, C.; Lassalle, S.; Lagier, J.; Hamedani, M.; Poissonnet, G. Orbital Exenteration: An Updated Review with Perspectives. *Surv. Ophthalmol.* 2021, 66, 856–876, doi:10.1016/j.survophthal.2021.01.008.

53. Martel, A.; Lassalle, S.; Picard-Gauci, A.; Gastaud, L.; Montaudie, H.; Bertolotto, C.; Nahon-Esteve, S.; Poissonnet, G.; Hofman, P.; Baillif, S. New Targeted Therapies and Immunotherapies for Locally Advanced Periocular Malignant Tumours: Towards a New “Eye-Sparing” Paradigm? *Cancers* 2021, 13, 2822, doi:10.3390/cancers13112822.

54. Martel, A.; Baillif, S.; Nahon-Esteve, S.; Gastaud, L.; Bertolotto, C.; Lassalle, S.; Lagier, J.; Hamedani, M.; Poissonnet, G. Orbital Exenteration: An Updated Review with Perspectives. *Surv. Ophthalmol.* 2021, 66, 856–876, doi:10.1016/j.survophthal.2021.01.008.

55. Martel, A.; Lassalle, S.; Picard-Gauci, A.; Gastaud, L.; Montaudie, H.; Bertolotto, C.; Nahon-Esteve, S.; Poissonnet, G.; Hofman, P.; Baillif, S. New Targeted Therapies and Immunotherapies for Locally Advanced Periocular Malignant Tumours: Towards a New “Eye-Sparing” Paradigm? *Cancers* 2021, 13, 2822, doi:10.3390/cancers13112822.

56. Monjanel, B.; Baillif, S.; Lagier, J.; Gastaud, L.; Poissonnet, G.; Martel, A. Efficacy and Safety of an Artificial Dermal Graft for the Reconstruction of Exenterated Sockets: A

Preliminary Report. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. 2021, 259, 2827–2835, doi:10.1007/s00417-021-05155-7.

57. Strub, T.; Martel, A.; Nahon-Esteve, S.; Baillif, S.; Ballotti, R.; Bertolotto, C. Translation of Single-Cell Transcriptomic Analysis of Uveal Melanomas to Clinical Oncology. *Prog. Retin. Eye Res.* 2021, 85, 100968, doi:10.1016/j.preteyeres.2021.100968.

58. Bellini, L.; Strub, T.; Habel, N.; Pandiani, C.; Marchetti, S.; Martel, A.; Baillif, S.; Bailly-Maitre, B.; Gual, P.; Ballotti, R.; et al. Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Resistance to BCL-2 Inhibitor in Uveal Melanoma Cells. *Cell Death Discov.* 2020, 6, 22, doi:10.1038/s41420-020-0259-2.

59. Thariat, J.; Martel, A.; Matet, A.; Loria, O.; Kodjikian, L.; Nguyen, A.-M.; Rosier, L.; Herault, J.; Nahon-Estève, S.; Mathis, T. Non-Cancer Effects Following Ionizing Irradiation Involving the Eye and Orbit. *Cancers* 2022, 14, 1194, doi:10.3390/cancers14051194.

60. Martel, A.; Baillif, S.; Thomas, P.; Almairac, F.; Galatoire, O.; Hamedani, M.; Fontaine, D.; Lanteri-Minet, M. Phantom Vision after Eye Removal: Prevalence, Features and Related Risk Factors. *Br. J. Ophthalmol.* 2022, 106, 1603–1609, doi:10.1136/bjophthalmol-2021-319091.

61. Martel, A.; Oberic, A.; Moulin, A.; Tieulie, N.; Hamedani, M. [Clinical, radiological, pathological features, treatment and follow-up of periocular and/or orbital amyloidosis: Report of 6 cases and literature review]. *J. Fr. Ophtalmol.* 2018, 41, 492–506, doi:10.1016/j.jfo.2017.11.027.



## **PARTIE IV- DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

### **4.1.Synthèse des principaux résultats de la thèse**

A l'issue de ce travail de thèse, nous avons synthétisé les connaissances actuelles relatives à la BL dans le MU. Nous avons déterminé que l'identification des CTCs représentait une voie de développement et de recherche très prometteuse. Dans un second temps, nous avons comparé plusieurs plateformes de biopsie liquide afin de déterminer celle qui remplissait au mieux les caractéristiques suivantes : sensibilité (taux de récupération), utilisation simple et rapide en pratique clinique quotidienne et possibilités d'analyses en aval (génétique, culture...). Nous avons déterminé que le système microfluidique VORTEX VTX-1 représentait, dans nos mains, la plateforme la plus optimale. Enfin, nous avons mis en place un protocole de coopération clinique entre le CHU de Nice et le Centre Antoine Lacassagne afin de collecter du matériel biologique sanguin provenant de patients présentant un MU primitif et métastatique. Nous avons également optimisé et synthétisé les données relatives à notre biobanque dédiée à l'onco-ophtalmologie permettant le stockage d'échantillons tissulaires et biologiques de qualité en vue d'une étude clinique chez l'homme.

### **4.2. Etude clinique : résultats préliminaires**

#### **4.2.1. Patients et méthode**

Nous conduisons depuis 2 ans une étude prospective chez des patients présentant un MU primitif ou métastatique (étude *Liquid-MelUV*). Les patients présentant un MU primitif sont inclus par le service d'ophtalmologie. Avant l'intervention chirurgicale (pose de clips pré protonthérapie ou énucléation), 4 tubes de sang veineux de 10 mL sont prélevés (tubes EDTA)

puis envoyés par pneumatique au LPCE. Un des tubes est conservé pour la biopsie liquide est techniqué dans les 4 heures. Les patients adressés au Centre Antoine Lacassagne pour MU métastatique sont inclus par leur oncologue. 4 tubes de sang sont également prélevés et envoyés en anatomopathologie. Nous avons également inclus 5 contrôles (volontaires sains) dont les tubes de sang ont été acheminés de la même manière au LPCE. Dans cette étude, nous utilisons la plateforme microfluidique Vortex VTX-1. Brièvement, 4 mL de sang veineux sont prélevés et dilués avec 36 mL de PBS. Pour chaque expérience, 2 runs (2 filtrations) sont effectuées conformément aux recommandations du fabricant et conformément à notre article précédent (Martel et al., 2023b). Les CTCs sont récupérées dans 300  $\mu$ L de PBS environ. A l'aide d'une pipette préalablement coatée avec du RPMI + SVF, le liquide est aspiré et fixé dans la solution PreservCyt (Thinprep, Hologic, Villepinte, France). Les CTCs sont ensuite fixées sur lame en utilisant le ThinPrep 2000 (Hologic, Villepinte, France). Une immunocytochimie Melan A red est ensuite réalisée à l'aide du Benchmark Ultra (Roche, Tucson, USA). Les lames sont lues par 2 analystes spécialisés ayant participé à l'étude précédente sur lignée de MU (AM, SL). Était considérée comme CTC une cellule arrondie, avec un ratio nucléo-cytoplasmique élevé et positif à l'immunocytochimie Melan A red. Était considéré comme CTM (Circulating Tumor Microemboli) un groupement d'au moins 3 CTCs. Plusieurs données cliniques, d'imagerie, anatomopathologique et de génétique (en cas d'énucléation) étaient également collectées. Une analyse statistique visant à corréler la positivité des CTCs ou des CTM et/ou leur nombre avec les données cliniques et paracliniques collectées a été réalisée. La normalité des données a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Les données continues ont été comparées en utilisant un test t de Student, un test de Welch ou un test U Mann-Whitney selon la distribution des variables. Les données non continues étaient comparées à l'aide d'un test du Chi 2 ou d'un test Exact de Fisher. Le risque alpha était de 5% et un  $p \leq 0.05$  considéré comme statistiquement significatif. Le logiciel utilisé était easymedstats (version 3.28; [www.easymedstat.com](http://www.easymedstat.com)).

#### 4.2.2. Résultats préliminaires

Les résultats préliminaires sont les suivants. Nous avons inclus 48 patients dont les principales caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 5**.

<b>Données recueillies</b>	<b>Nombre (%)</b>	<b>Moyenne (range)</b>
<b>Age</b>		67,9 (30-91)
<b>Sexe</b>		
<b>Homme</b>	25 (52,1)	
<b>Femme</b>	23 (47,9)	
<b>Statut tumoral</b>		
<b>Primitif</b>	38 (79,2)	
<b>Métastatique</b>	10 (20,8)	
<b>Traitement du primitif oculaire</b>		
<b>Protonthérapie</b>	22 (45,8)	
<b>Enucléation</b>	26 (54,2)	
<b>Dont primaire</b>	19 (39,6)	
<b>Ou secondaire</b>	7 (14,6)	
<b>Epaisseur tumorale (en mm)</b>		7,4 (1-20)
<b>Diamètre tumoral (en mm)</b>		13,9 (3,2-25)
<b>Classification pTNM chez les patients énuclées (n=26)</b>		
<b>T1</b>	2 (7,7)	
<b>T2</b>	2 (7,7)	
<b>T3</b>	13 (50)	
<b>T4</b>	9 (34,6)	
<b>Type cellulaire chez les patients énuclées (n=26)</b>		
<b>Epithélioïde</b>	8 (32)	
<b>Fusifforme</b>	6 (24)	
<b>Mixte</b>	11 (44)	
<b>Envahissement corps ciliaires chez les patients énuclées (n=26)</b>		
<b>Oui</b>	13 (50)	
<b>Non</b>	13 (50)	
<b>Engainement péri nerveux chez les patients énuclées (n=25)</b>		
<b>Oui</b>	2 (8)	
<b>Non</b>	23 (92)	
<b>Embole vasculaire chez les patients énuclées (n=25)</b>		
<b>Oui</b>	4 (16)	
<b>Non</b>	21 (84)	

<b>Extension extra sclérale chez les patients énuclées (n=25)</b>		
Oui	6 (24)	
Non	19 (76)	
<b>Nombre de mitose / mm<sup>2</sup> chez les patients énuclées (n=25)</b>		1,7 (0-9)
<b>Nécrose tumorale chez les patients énuclées (n=25)</b>		18,5 (0-90)
Oui	11 (44)	
Non	14 (56)	
<b>Pigment mélanique chez les patients énuclées (n=25)</b>		
Aucun	5 (20,8)	
Minime	11 (45,8)	
Abondant	8 (33,4)	
<b>Contingent inflammatoire sur les patients énuclées (n=25)</b>		
Oui	3 (12,5)	
Non	21 (87,5)	
<b>Expression nucléaire de BAP-1 sur les patients énuclées (n=22)</b>		
expression conservée	9 (40,9)	
Perte de l'expression	13 (59,1)	
<b>Perte du chromosome 3 sur les patients énuclées (n=21)</b>		
Oui	13 (61,9)	
Non	8 (38,1)	
<b>Gain 8q sur les patients énuclées (n=21)</b>		
Oui	16 (76,2)	
Non	5 (23,8)	
<b>Classification chromosomique de Trolet chez les patients énuclées (n=21)</b>		
Stades 1	8 (38,1)	
Stades 2	13 (61,9)	

**Tableau 5** : caractéristiques des 48 patients inclus.

Parmi les patients inclus (n=48), nous avons identifié des CTCs chez 20 patients (41,6%). Parmi les patients non métastatiques (n= 38), 14 patients (37%) avaient des CTCs détectables. Parmi les patients métastatiques (n=10), 6 patients (60%) avaient des CTCs détectables.

Au total, 103 CTCs ont été comptées chez les patients positifs, soit une moyenne de 5,1 par patient. Parmi les patients positifs (n=20), 13 comptabilisaient au moins 3 CTCs. Parmi les 20 patients positifs, 9 patients présentaient des CTM.

Nous avons également inclus 5 contrôles (2 hommes, 3 femmes, âge moyen 47,2 ans). Aucune CTC n'a été détectée dans le groupe contrôle.

Nous avons ensuite recherché un lien entre les CTCs et les CTM et l'ensemble des données collectées. Le **Tableau 6** présente les résultats en dichotomisant les patients selon la positivité ou pas des CTCs.

<b>Données</b>	<b>Présence de CTCs N=20</b>	<b>Absence de CTCs N= 28</b>
<b>Age moyen (SD)</b>	73.3 (9.4)	64 (16.8)
<b>Sexe</b>		
<b>Homme</b>	12	12
<b>Femme</b>	8	15
<b>Stade tumoral</b>		
<b>Primitif</b>	14	23
<b>Métastatique</b>	6	4
<b>Traitement du primitif oculaire</b>		
<b>Proton</b>	9	13
<b>Enucleation</b>	11	14
<b>Diamètre moyen en mm (SD)</b>	14,9 (3,7)	12,7 (5,1)
<b>Epaisseur moyenne en mm (SD)</b>	7,6 (3,4)	7,2 (5)
<b>Classification pTNM (n=25)</b>		
<b>T1</b>	0	2
<b>T2</b>	0	2
<b>T3</b>	7	6
<b>T4</b>	4	4
<b>Type cellulaire (n=25)</b>		
<b>Epithélioïde</b>	3	4
<b>Fusifforme</b>	1	5
<b>Mixte</b>	6	5
<b>Nombre moyen de mitoses (SD) (N=25)</b>	2,8 (3,2)	1 (1,4)
<b>Présence d'une nécrose tumorale (N=25)</b>	5	6
<b>Présence d'une extension extra sclérale (N=25)</b>	4	2
<b>Présence d'un envahissement ciliaire (N=25)</b>	7	4
<b>Présence d'un engainement nerveux (N=25)</b>	2	0
<b>Présence d'un embole vasculaire (N=25)</b>	3	1
<b>Expression de BAP-1</b>	6	6
<b>Perte chromosome 3 (N=21)</b>	8	5
<b>Gain 8q (N=21)</b>	8	8
<b>Classification de Trolet (N=21)</b>		
<b>Stades 1</b>	1	7
<b>Stades 2</b>	8	5

**Tableau 6** : principaux résultats dans le groupe de patients CTC positive versus CTC négative.

Les analyses statistiques préliminaires en fonction de la positivité des CTCs, du nombre de CTCs ( $\geq 3$ ) et de la présence d'un CTM sont présentées dans le **Tableau 7**. Seul l'âge plus élevé (73,3 ans dans le groupe CTC positive versus 64,0 ans dans le groupe CTC négative) était statistiquement associé avec la détection d'au moins une CTC ( $p=0.021$ ). Seule l'extension extra-sclérale était associée à une détection  $\geq 3$  CTCs ( $p=0.035$ ). Aucun facteur n'était associé à la détection des CTM.

Donnée	$\geq 1$ CTC P value	$\geq 3$ CTC P value	$\geq 1$ CTM P value
Age	<b>0.021</b>	0.081	0.448
Sexe	0.447	0.429	0.461
Stade tumoral (primitif vs métastatique)	0.286	0.429	0.172
Proton versus enucleation	0.999	0.328	0.470
Diamètre	0.213	0.916	0.565
Epaisseur	0.354	0.586	0.717
Classification TNM	0.430	0.849	0.999
Type cellulaire	0.385	0.999	0.999
Nombre de mitoses	0.100	0.420	0.437
Nécrose tumorale	0.788	0.634	0.361
Extension extra sclérale	0.150	<b>0.035</b>	0.078
Envahissement ciliaire	0.095	0.300	0.630
Engainement nerveux	0.163	0.312	0.380
Embole vasculaire	0.272	0.544	0.999
Pigment mélanique	0.859	0.106	0.439
Contingent inflammatoire	0.538	0.453	0.539
Expression de BAP-1	0.367	0.999	0.999
Perte chromosome 3	0.067	0.111	0.606
Gain 8q	0.338	0.999	0.999
Classification de Trolet	0.067	0.111	0.606

**Tableau 7** : résultats statistiques préliminaires sur le nombre de CTC et/ou CTM comptabilisés avec les données cliniques paracliniques des 48 patients. CTM = Circulating Tumor Micro-thrombus.

#### 4.2.3. Discussion des résultats préliminaires

Nos résultats préliminaires sont comparés à la littérature dans le **Tableau 8**.

Auteurs (référence)	Population d'étude	Plateforme utilisée	Taux de détection	Nombre moyen de CTCs détecté	Facteurs associés à une positivité des CTCs
<b>Martel et al. (en cours)</b>	N=48 (primitif+métastatique)	Vortex VTX-1 (microfluidique)	41,6%	5,1	Age élevé
<b>Grisanti et al. (Grisanti et al., 2023)</b>	N=47 (primitif)	NC (immunomagnétisme)	53%	NC	Diamètre, épaisseur, fluide sous rétinien
<b>Beasley et al. (Beasley et al., 2021)</b>	N=43 (primitif)	Manuelle (immunomagnétisme)	86%	7,5	Age, survie globale
<b>Anand et al. (Anand et al., 2019)</b>	N= 39 (primitif+métastatique)	CellSearch (immunomagnétisme)	36%	5,9	Tumeurs de Classe 2
<b>Tura et al. (Tura et al., 2014)</b>	N=44 (primaire)	Manuelle (immunomagnétisme)	91%	2,4 (médiane)	Stade TNM
<b>Bande et al. (Bande et al., 2015)</b>	N=8 (primaire)	CellSearch (immunomagnétisme)	50%	1	Aucun
<b>Terai et al. (Terai et al., 2015)</b>	N=17 (métastatiques)	CellSearch (immunomagnétisme)	52,9%	1 (médiane)	Aucun
<b>Mazzini et al. (Mazzini)</b>	N=31 (primitif+métastatique)	ISET (filtration par taille)	55%	8 (médiane)	Aucune



<b>et al., 2014)</b>					
<b>Pinzani et al. (Pinzani et al., 2010)</b>	N=41 5(primaire)	ISSET (filtration par taille)	31%	NC	Aucune
<b>Bidard et al. (Bidard et al., 2014)</b>	N=40 (métastatique)	CellSearch (immunomagnétisme)	30%	NC	Volume tumoral miliaire hépatique
<b>Suesskind et al. (Suesskind et al., 2011)</b>	N=81 (primaire)	Manuel (immunomagnétisme)	14%	1(médiane)	Aucune
<b>Eide et al. (Eide et al., 2009)</b>	N=328 (primaire+métastatique)	Manuel (immunomagnétisme)	1,6%	50 (médiane)	Aucune
<b>Ulmer et al. (Ulmer et al., 2008)</b>	N=52 (primaire)	Manuel (Immunomagnétisme)	19%	2.5 (médiane)	Envahissement des corps ciliaires

**Tableau 8 :** comparaison des études sur la détection des CTCs dans le MU. NC = Non Communiqué.

Notre étude figure parmi les plus importantes d'un point de vue effectif. Elle est à ce jour la seule à avoir utilisé une plateforme de détection microfluidique. Notre taux de détection de 41,6% se situe dans la moyenne des résultats précédents. Certaines études rapportaient des taux de détection extrêmement importants, de l'ordre de 86% et 91% pour Beasley et al. et Tura et al. respectivement. Ces résultats sont d'autant plus impressionnants qu'ils étaient réalisés sur une population de MU primitif. Cependant, les auteurs ont utilisé une technologie immunomagnétique multi-marqueurs non commercialisée. Comparativement à notre étude qui ne détectait qu'un seul marqueur (Melan A), ces études permettent une meilleure sensibilité,

mais au détriment d'une difficulté méthodologique accrue difficilement compatible, selon nous, avec une pratique clinique quotidienne.

Il est surprenant que la positivité des CTCs dans notre étude ne soit pas corrélée au stade de la maladie (primitif vs métastatique). Cela peut être expliqué par le faible nombre de patients métastatiques inclus (n=10) responsable d'un manque de puissance, mais aussi par le grand nombre de patients ayant une tumeur primitive de mauvais pronostic (donc possiblement associée à une diffusion de CTCs) se traduisant par un grand nombre de patients énuclées (n=26). De même, la détection et le nombre de CTCs n'était pas corrélé aux critères histopronostiques contrairement à certaines études. Cela peut être expliqué par un manque de puissance (données disponibles uniquement sur les 26 énucléations réalisées).

A ce stade, aucune donnée de suivi n'est encore disponible. Il sera important de déterminer si la détection des CTCs au stade primitif est associé ou pas à la survenue de métastases hépatiques. Il s'agit de la donnée la plus importante de notre étude.

### **4.3. Perspectives**

#### **4.3.1. Perspectives à court terme**

Pour la première fois, nous avons comparé 4 plateformes différentes dans la détection d'une lignée cellulaire de MU. La principale limite à l'application clinique des CTCs est le manque de consensus concernant le protocole idéal (de la phase pré-analytique à la phase post-analytique) et la plateforme idéale. D'autres études comparant les différentes plateformes apparaissent indispensables, notamment dans l'évaluation des nouvelles plateformes de dernière génération.

Dans notre expérience, la variabilité inter-observateur lors du comptage des CTCs est un élément capital à prendre en considération. Un process 100% automatisé serait bien sûr souhaitable, comme cela est le cas pour le CellSearch. Si l'automatisation n'est pas possible, comme dans notre méthodologie avec le Vortex VTX-1, nous recommandons un comptage des CTCs par des pathologistes formés et expérimentés à cette lecture afin de limiter les biais. La mise en place de systèmes de détection automatisés basés sur l'intelligence artificielle pourrait s'avérer utile dans l'avenir.

Notre étude déterminera prochainement si la positivité des CTCs, leur nombre ou la présence d'un CTM est prédictif de mauvais pronostic. Afin d'accroître encore l'intérêt des CTCs dans le MU, il pourrait être intéressant d'implémenter notre méthode de capture des CTCs par une recherche systémique de certains facteurs pronostics péjoratifs comme la perte d'expression de BAP-1 et/ou la perte du chromosome 3 (Stålhammar and Grossniklaus, 2021; Trolet et al., 2009) sur les CTCs isolées, comme cela a déjà été fait par l'équipe de Tura et al. (Grisanti et al., 2023; Tura et al., 2014). Nous avons d'ores et déjà réalisé des expérimentations préliminaires visant à réaliser une double immunocytochimie (Melan A en surface, BAP-1 au niveau nucléaire). Ces résultats devront être approfondis sur d'autres expériences in vitro dans un premier temps.

Enfin, l'application de la biopsie liquide étendue à l'humeur aqueuse pourrait s'avérer utile dans le diagnostic et pronostic de MU (Peng et al., 2023).

#### **4.3.2. Perspectives à moyen-long terme**

Notre travail de thèse a montré que le taux de détection in vitro des CTCs de MU était au maximum de 39% avec l'ISET. Cela illustre le fait que la BL n'a actuellement d'intérêt qu'en

cas de résultat positif. Sa négativité ne peut en aucun cas éliminer le diagnostic de dissémination métastatique ou rassurer quant au pronostic général.

A terme, les biopsies liquides dans le MU pourraient permettre 2 objectifs :

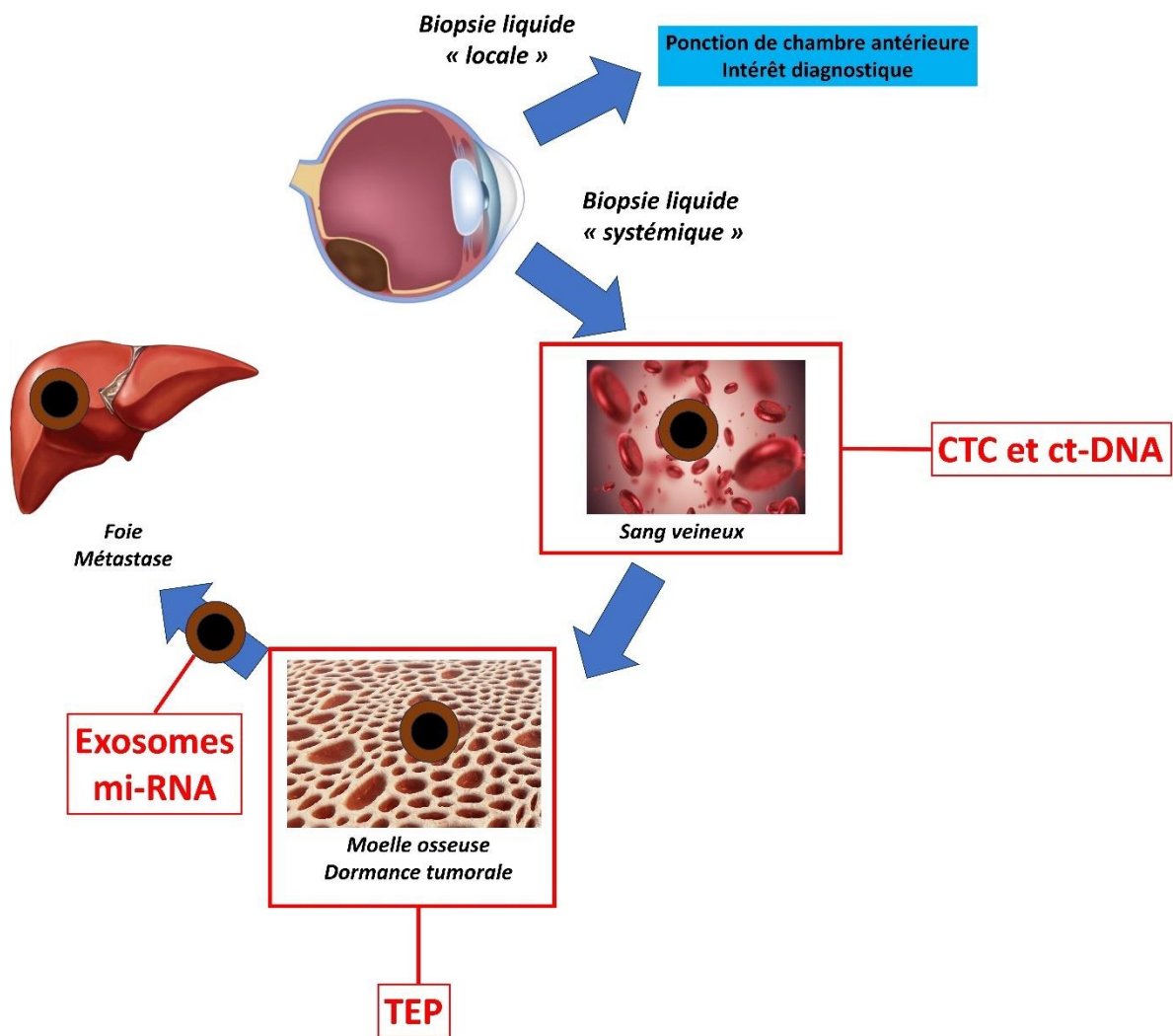
- Mise en place d'un traitement systémique précoce : actuellement, il n'existe aucun traitement de référence permettant de guérir la maladie à son stade métastatique et le décès survient généralement dans les 2 ans suivant le diagnostic de métastase (Rantala et al., 2022). Les BL, au premier rang desquelles la détection des CTCs dans le sang veineux, pourrait permettre d'identifier très précocement la dissémination hématogène. En cas de BL positive lors du traitement du mélanome primitif oculaire (protonthérapie ou énucléation), la prescription d'un traitement systémique adjuvant avant la survenue de la métastase pourrait constituer une option thérapeutique. A ce jour, le traitement le plus prometteur est le tebentafusp (Nathan et al., 2021), même si ce dernier ne peut être administré qu'aux patients HLA-A\*02:01-positifs. Dans tous les cas, l'inclusion des patients dans des essais thérapeutiques est souhaitable.
- Une meilleure compréhension de la dissémination tumorale : malgré un grand nombre de progrès dans la génétique du MU primitif, la dissémination métastatique demeure imparfaitement élucidée. Plusieurs études ont montré qu'il existait 2 pics de dissémination métastatique, vers 3 ans et 10 ans après le diagnostic du primitif oculaire, sans qu'aucune explication n'ait pu réellement être apportée (Nichols et al., 2017; Smit et al., 2020). De même, le tropisme hépatique des métastases de MU demeure encore non élucidé (Seitz et al., 2022). Il est communément admis que les CTCs interagissent avec l'ensemble des cellules sanguines (polynucléaires neutrophiles, plaquettes...) au cours de leur transit dans la circulation sanguine afin de les protéger des contraintes

hémodynamiques et du système immunitaire (Heeke et al., 2019). Dans tous les cas, les BL pourraient permettre une meilleure compréhension de la dissémination métastatique.

- Isoler une CTC dans le sang veineux circulant permet une analyse moléculaire et génétique précise permettant de mieux appréhender la transition épithélio-mésenchymateuse commune à toute dissémination métastatique. Dans cette optique, il est indispensable de disposer de biobanques de qualités permettant le stockage du primitif oculaire, du plasma, et de la métastase hépatique pour comparer les anomalies moléculaires retrouvées à celles des CTC (Martel et al., 2023a).
- A l'instar des autres cancers, un des modèles les plus consensuels du processus métastatique est celui de la dormance tumorale (Recasens and Munoz, 2019). Il s'agit d'un état cellulaire dans lequel la cellule tumorale devient quiescente pendant plusieurs mois voire des années, avant de se réactiver. Cette notion de dormance tumorale expliquerait pourquoi certains patients peuvent développer des métastases des décennies après le traitement de leur MU primitif (Nichols et al., 2017). La dormance tumorale n'a été que peu étudiée dans le MU. Une étude conduite par Eide et al. a retrouvé la présence de CTCs de MU dans la moelle osseuse chez 29% des patients ayant bénéficié d'une ponction biopsie osseuse durant le suivi carcinologique (contre seulement 1,6% de positivité des CTCs veineuses) (27). Bien que la présence de ces CTCs de MU dans la moelle osseuse n'ait pas été corrélée au risque métastatique, cette étude a le mérite de démontrer pour la première fois la présence de CTCs au sein de la moelle osseuse et suggère que la moelle osseuse pourrait servir de réservoir à CTCs de MU en phase de quiescence.

- Pour des raisons encore inexplicées, ces CTCs en dormance se réactiveraient et éduqueraient des plaquettes (TEP) produites au niveau de la moelle osseuse, afin de faciliter leur dissémination dans la circulation sanguine. Il n'est pas encore vraiment établi si le transit entre le lieu de dormance et le site de métastase s'effectue via des CTCs entières (probablement avec d'autres éléments figurés du sang) ou via des acides nucléiques contenus dans des exosomes tumoraux. Il est possible que certains mi-RNA et certaines intégrines exosomales « guident » les fragments tumoraux jusqu'au foie expliquant le tropisme hépatique du MU.
- Une fois implanté dans le site métastatique, certains mi-RNA permettraient de favoriser un micro-environnement favorable au développement métastatique.

L'intérêt des BL vers une meilleure compréhension de la dissémination métastatique est résumé dans la **Figure 10**.



**Figure 10** : figure résumant l'intérêt des biopsies liquides pour une meilleure compréhension physiopathologique du processus de dissémination métastatique dans le MU.

## V- CONCLUSION

Dans ce travail de thèse, nous avons montré l'intérêt des BL dans le MU. Les BL « *in situ* » prélevées par ponction de chambre antérieure avec analyse du ct-DNA ou du protéome pourraient permettre un diagnostic plus précoce des MU de petite taille ce d'autant qu'aucune biopsie tissulaire n'est généralement réalisée, alors que les biopsies liquides « *systémiques* » et

notamment veineuses à la recherche des CTCs pourraient permettre d'identifier les patients à haut risque métastatique et de mieux comprendre la physiopathologie tumorale. Les CTCs apparaissent comme une fraction des BL prometteuse. Pour la première fois, nous avons comparé plusieurs plateformes de capture de CTCs du MU entre elles. Nous avons montré que les systèmes de filtration parfois les plus simples comme l'ISSET (filtration par taille) sont associés aux meilleurs taux de capture et souligné les limites de certains systèmes de détection ciblés comme le CellSearch dont l'expression de certains marqueurs spécifiques est indispensable à leur activation. Cependant, nous avons également souligné l'importance de prendre en compte d'autres facteurs comme la reproductibilité inter-opérateur, la facilité d'utilisation, le coût ou encore l'ergonomie d'une plateforme afin d'envisager une application en pratique clinique quotidienne. Nous avons déterminé que les systèmes de captures microfluidiques de dernière génération permettaient dans notre laboratoire d'allier l'ensemble de ces paramètres. Nous avons également souligné l'importance de disposer d'échantillons biologiques de qualité au sein de biobanques dédiées afin de conduire des études translationnelles. Enfin, nous avons débuté une étude prospective visant à établir l'intérêt d'une plateforme de détection microfluidique chez nos patients présentant un MU primitif ou métastatique applicable en pratique clinique quotidienne. Les résultats de cette étude nous permettront de déterminer si la détection des CTCs en pratique clinique quotidienne est corrélée à la survenue métastatique. La positivité des CTCs pourrait permettre la prescription de traitements adjuvants au stade du primitif oculaire, avant la survenue des métastases hépatiques. Enfin, seules les BL permettront de mieux comprendre l'ensemble du processus métastatique dans le MU, de l'extravasation tumorale, à la métastase hépatique, en passant par le stade de dormance tumorale.



## PARTIE VI- REFERENCES

- Al Harby, L., Sagoo, M.S., O'Day, R., Hay, G., Arora, A.K., Keane, P.A., Cohen, V.M.-L., Damato, B., 2021. Distinguishing Choroidal Nevi from Melanomas Using the MOLES Algorithm: Evaluation in an Ocular Nevus Clinic. *Ocul. Oncol. Pathol.* 7, 294–302. <https://doi.org/10.1159/000511363>
- Anand, K., Roszik, J., Gombos, D., Upshaw, J., Sarli, V., Meas, S., Lucci, A., Hall, C., Patel, S., 2019. Pilot Study of Circulating Tumor Cells in Early-Stage and Metastatic Uveal Melanoma. *Cancers* 11, 856. <https://doi.org/10.3390/cancers11060856>
- Andree, K.C., van Dalum, G., Terstappen, L.W.M.M., 2016. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol. Oncol.* 10, 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.12.002>
- Aronow, M.E., Topham, A.K., Singh, A.D., 2018. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013). *Ocul. Oncol. Pathol.* 4, 145–151. <https://doi.org/10.1159/000480640>
- Asnaghi, L., Gezgin, G., Tripathy, A., Handa, J.T., Merbs, S.L., van der Velden, P.A., Jager, M.J., Harbour, J.W., Eberhart, C.G., 2015. EMT-associated factors promote invasive properties of uveal melanoma cells. *Mol. Vis.* 21, 919–929.
- Bande, M.F., Santiago, M., Muinelo-Romay, L., Blanco, M.J., Mera, P., Capeans, C., Pardo, M., Piñeiro, A., 2015. Detection of circulating melanoma cells in choroidal melanocytic lesions. *BMC Res. Notes* 8, 452. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1420-5>
- Beasley, A., Isaacs, T., Khattak, M.A., Freeman, J.B., Allcock, R., Chen, F.K., Pereira, M.R., Yau, K., Bentel, J., Vermeulen, T., Calapre, L., Millward, M., Ziman, M.R., Gray, E.S., 2018. Clinical Application of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Uveal Melanoma. *JCO Precis. Oncol.* 2, PO.17.00279. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00279>
- Beasley, A.B., Chen, F.K., Isaacs, T.W., Gray, E.S., 2022. Future perspectives of uveal melanoma blood based biomarkers. *Br. J. Cancer* 126, 1511–1528. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01723-8>
- Beasley, A.B., de Bruyn, D.P., Calapre, L., Al-Ogaili, Z., Isaacs, T.W., Bentel, J., Reid, A.L., Dwarkasing, R.S., Pereira, M.R., Khattak, M.A., Meniawy, T.M., Millward, M., Brosens, E., de Klein, A., Chen, F.K., Kiliç, E., Gray, E.S., 2023. Detection of metastases using circulating tumour DNA in uveal melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* <https://doi.org/10.1007/s00432-023-05271-3>
- Beasley, A.B., Isaacs, T.W., Vermeulen, T., Freeman, J., DeSousa, J.-L., Bhikoo, R., Hennessy, D., Reid, A., Chen, F.K., Bentel, J., McKay, D., Conway, R.M., Pereira, M.R., Mirzai, B., Calapre, L., Erber, W.N., Ziman, M.R., Gray, E.S., 2021. Analysis of Circulating Tumour Cells in Early-Stage Uveal Melanoma: Evaluation of Tumour Marker Expression to Increase Capture. *Cancers* 13, 5990. <https://doi.org/10.3390/cancers13235990>
- Bellini, L., Strub, T., Habel, N., Pandiani, C., Marchetti, S., Martel, A., Baillif, S., Bailly-Maitre, B., Gual, P., Ballotti, R., Bertolotto, C., 2020. Endoplasmic reticulum stress mediates resistance to BCL-2 inhibitor in uveal melanoma cells. *Cell Death Discov.* 6, 22. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0259-2>
- Bensoussan, E., Thariat, J., Maschi, C., Delas, J., Schouver, E.D., Hérault, J., Baillif, S., Caujolle, J.-P., 2016. Outcomes After Proton Beam Therapy for Large Choroidal Melanomas in 492 Patients. *Am. J. Ophthalmol.* 165, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2016.02.027>
- Berry, J.L., Xu, L., Polski, A., Jubran, R., Kuhn, P., Kim, J.W., Hicks, J., 2020. Aqueous Humor Is Superior to Blood as a Liquid Biopsy for Retinoblastoma. *Ophthalmology* 127, 552–554. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.10.026>
- Beutel, J., Wegner, J., Wegner, R., Ziemssen, F., Nassar, K., Rohrbach, J.M., Hilgers, R.-D., Lüke, M., Grisanti, S., 2009. Possible implications of MCAM expression in metastasis and non-

- metastatic of primary uveal melanoma patients. *Curr. Eye Res.* 34, 1004–1009. <https://doi.org/10.3109/02713680903262205>
- Bidard, F.-C., Madic, J., Mariani, P., Piperno-Neumann, S., Rampanou, A., Servois, V., Cassoux, N., Desjardins, L., Milder, M., Vaucher, I., Pierga, J.-Y., Lebofsky, R., Stern, M.-H., Lantz, O., 2014. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int. J. Cancer* 134, 1207–1213. <https://doi.org/10.1002/ijc.28436>
- Branisteanu, D.C., Bogdanici, C.M., Branisteanu, D.E., Maranduca, M.A., Zemba, M., Balta, F., Branisteanu, C.I., Moraru, A.D., 2021. Uveal melanoma diagnosis and current treatment options (Review). *Exp. Ther. Med.* 22, 1428. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10863>
- Brouwer, N.J., Verdijk, R.M., Heegaard, S., Marinkovic, M., Esmali, B., Jager, M.J., 2022. Conjunctival melanoma: New insights in tumour genetics and immunology, leading to new therapeutic options. *Prog. Retin. Eye Res.* 86, 100971. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100971>
- Buim, M.E., Fanelli, M.F., Souza, V.S., Romero, J., Abdallah, E.A., Mello, C.A., Alves, V., Ocea, L.M., Mingues, N.B., Barbosa, P.N., Tyng, C.J., Chojniak, R., Chinen, L.T., 2015. Detection of KRAS mutations in circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 16, 1289–1295. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1070991>
- Bustamante, P., Tsering, T., Coblenz, J., Mastromonaco, C., Abdouh, M., Fonseca, C., Proença, R.P., Blanchard, N., Dugé, C.L., Andujar, R.A.S., Youhnovska, E., Burnier, M.N., Callejo, S.A., Burnier, J.V., 2021. Circulating tumor DNA tracking through driver mutations as a liquid biopsy-based biomarker for uveal melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 40, 196. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01984-w>
- Cassoux, N., Rodrigues, M.J., Plancher, C., Asselain, B., Levy-Gabriel, C., Lumbroso-Le Rouic, L., Piperno-Neumann, S., Dendale, R., Sastre, X., Desjardins, L., Couturier, J., 2014. Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma. *Br. J. Ophthalmol.* 98, 769–774. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-303867>
- Caujolle, J.-P., Paoli, V., Chamorey, E., Maschi, C., Baillif, S., Herault, J., Gastaud, P., Hannoun-Levi, J.M., 2013. Local recurrence after uveal melanoma proton beam therapy: recurrence types and prognostic consequences. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 85, 1218–1224. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.10.005>
- Charitoudis, G., Schuster, R., Joussem, A.M., Keilholz, U., Bechrakis, N.E., 2016. Detection of tumour cells in the bloodstream of patients with uveal melanoma: influence of surgical manipulation on the dissemination of tumour cells in the bloodstream. *Br. J. Ophthalmol.* 100, 468–472. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2015-306955>
- Chattopadhyay, C., Kim, D.W., Gombos, D.S., Oba, J., Qin, Y., Williams, M.D., Esmali, B., Grimm, E.A., Wargo, J.A., Woodman, S.E., Patel, S.P., 2016. Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* 122, 2299–2312. <https://doi.org/10.1002/cncr.29727>
- Che, J., Yu, V., Dhar, M., Renier, C., Matsumoto, M., Heirich, K., Garon, E.B., Goldman, J., Rao, J., Sledge, G.W., Pegram, M.D., Sheth, S., Jeffrey, S.S., Kulkarni, R.P., Sollier, E., Di Carlo, D., 2016. Classification of large circulating tumor cells isolated with ultra-high throughput microfluidic Vortex technology. *Oncotarget* 7, 12748–12760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7220>
- Dogrusöz, M., Kroes, W.G.M., van Duinen, S.G., Creutzberg, C.L., Versluis, M., Bleeker, J.C., Marinkovic, M., Luyten, G.P.M., Jager, M.J., 2015. Radiation Treatment Affects Chromosome Testing in Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 5956–5964. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17092>
- Eide, N., Faye, R.S., Høifødt, H.K., Øvergaard, R., Jebsen, P., Kvalheim, G., Fodstad, Ø., 2009. Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow in uveal melanoma patients. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* 87, 830–836. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2008.01378.x>

- Ferreira, M.M., Ramani, V.C., Jeffrey, S.S., 2016. Circulating tumor cell technologies. *Mol. Oncol.* 10, 374–394. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.007>
- Frizziero, L., Midena, E., Trainiti, S., Londei, D., Bonaldi, L., Bini, S., Parrozzani, R., 2019. Uveal Melanoma Biopsy: A Review. *Cancers* 11, 1075. <https://doi.org/10.3390/cancers11081075>
- Gao, Z., Tan, J., Wang, S., Yu, H., Zhou, Z., Zhang, Y., Zhou, M., Xia, X., Yao, F., Huang, J., 2021. The Xiangya Ocular Tumor Bank: A Disease-Specific Biobank for Advancing Translational Research Into Ocular Tumors. *Front. Med.* 8, 774624. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.774624>
- Grisanti, S., Schindler, F., Merz, H., Kakkassery, V., Sonntag, S.R., Tura, A., 2023. Detection of circulating tumor cells in patients with small choroidal melanocytic lesions. *Ophthalmology* S0161-6420(23)00533-X. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2023.07.025>
- Heeke, S., Mograbi, B., Alix-Panabières, C., Hofman, P., 2019. Never Travel Alone: The Crosstalk of Circulating Tumor Cells and the Blood Microenvironment. *Cells* 8, 714. <https://doi.org/10.3390/cells8070714>
- Hewitt, R., Watson, P., 2013. Defining biobank. *Biopreservation Biobanking* 11, 309–315. <https://doi.org/10.1089/bio.2013.0042>
- Höllhumer, R., Williams, S., Michelow, P., 2021. Ocular surface squamous neoplasia: management and outcomes. *Eye Lond. Engl.* 35, 1562–1573. <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01422-3>
- Im, D.H., Peng, C.-C., Xu, L., Kim, M.E., Ostrow, D., Yellapantula, V., Bootwalla, M., Biegel, J.A., Gai, X., Prabakar, R.K., Kuhn, P., Hicks, J., Berry, J.L., 2022. Potential of Aqueous Humor as a Liquid Biopsy for Uveal Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 6226. <https://doi.org/10.3390/ijms23116226>
- In 't Veld, S.G.J.G., Wurdinger, T., 2019. Tumor-educated platelets. *Blood* 133, 2359–2364. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-12-852830>
- Jager, M.J., Shields, C.L., Cebulla, C.M., Abdel-Rahman, M.H., Grossniklaus, H.E., Stern, M.-H., Carvajal, R.D., Belfort, R.N., Jia, R., Shields, J.A., Damato, B.E., 2020. Uveal melanoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 6, 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0158-0>
- Jin, E., Burnier, J.V., 2021. Liquid Biopsy in Uveal Melanoma: Are We There Yet? *Ocul. Oncol. Pathol.* 7, 1–16. <https://doi.org/10.1159/000508613>
- Ju, S., Chen, C., Zhang, J., Xu, L., Zhang, X., Li, Z., Chen, Y., Zhou, J., Ji, F., Wang, L., 2022. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark. Res.* 10, 58. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00403-2>
- Kidess-Sigal, E., Liu, H.E., Triboulet, M.M., Che, J., Ramani, V.C., Visser, B.C., Poultsides, G.A., Longacre, T.A., Marziali, A., Vysotskaia, V., Wiggin, M., Heirich, K., Hanft, V., Keilholz, U., Tinhofer, I., Norton, J.A., Lee, M., Sollier-Christen, E., Jeffrey, S.S., 2016. Enumeration and targeted analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in CTCs captured by a label-free platform: Comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* 7, 85349–85364. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13350>
- Krossa, I., Strub, T., Martel, A., Nahon-Esteve, S., Lassalle, S., Hofman, P., Baillif, S., Ballotti, R., Bertolotto, C., 2022. Recent advances in understanding the role of HES6 in cancers. *Theranostics* 12, 4374–4385. <https://doi.org/10.7150/thno.72966>
- Laget, S., Broncy, L., Hormigos, K., Dhingra, D.M., BenMohamed, F., Capiod, T., Osteras, M., Farinelli, L., Jackson, S., Paterlini-Bréchet, P., 2017. Technical Insights into Highly Sensitive Isolation and Molecular Characterization of Fixed and Live Circulating Tumor Cells for Early Detection of Tumor Invasion. *PLoS One* 12, e0169427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169427>
- Lai, K., Sharma, V., Jager, M.J., Conway, R.M., Madigan, M.C., 2007. Expression and distribution of MUC18 in human uveal melanoma. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 451, 967–976. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0498-0>
- Lamas, N.J., Martel, A., Nahon-Estève, S., Goffinet, S., Macocco, A., Bertolotto, C., Lassalle, S., Hofman, P., 2021. Prognostic Biomarkers in Uveal Melanoma: The Status Quo, Recent Advances and Future Directions. *Cancers* 14, 96. <https://doi.org/10.3390/cancers14010096>

- Lee, Y., Guan, G., Bhagat, A.A., 2018. ClearCell® FX, a label-free microfluidics technology for enrichment of viable circulating tumor cells. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 93, 1251–1254. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23507>
- Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu, F., Zhou, D., Zheng, S., Chen, Y., Zhou, J., 2021. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 404. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>
- Liu, H.E., Triboulet, M., Zia, A., Vuppapalaty, M., Kidess-Sigal, E., Collier, J., Natu, V.S., Shokoohi, V., Che, J., Renier, C., Chan, N.H., Hanft, V.R., Jeffrey, S.S., Sollier-Christen, E., 2017. Workflow optimization of whole genome amplification and targeted panel sequencing for CTC mutation detection. *NPJ Genomic Med.* 2, 34. <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0034-3>
- Ma, Y.-C., Wang, L., Yu, F.-L., 2013. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology. *Technol. Cancer Res. Treat.* 12, 295–309. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500328>
- Mariani, P., Bidard, F.-C., Rampanou, A., Houy, A., Servois, V., Ramtohl, T., Pierron, G., Chevrier, M., Renouf, B., Lantz, O., Gardrat, S., Vincent-Salomon, A., Sergio-Roman, S., Rodrigues, M., Piperno-Neumann, S., Cassoux, N., Stern, M.-H., Renault, S., 2023. Circulating tumor DNA as a Prognostic Factor in Patients with Resectable Hepatic Metastases of Uveal Melanoma. *Ann. Surg.* <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000005822>
- Martel, A., Baillif, S., Nahon-Esteve, S., Gastaud, L., Bertolotto, C., Lassalle, S., Lagier, J., Hamedani, M., Poissonnet, G., 2021a. Orbital exenteration: an updated review with perspectives. *Surv. Ophthalmol.* 66, 856–876. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2021.01.008>
- Martel, A., Baillif, S., Nahon-Esteve, S., Gastaud, L., Bertolotto, C., Roméo, B., Mograbi, B., Lassalle, S., Hofman, P., 2020a. Liquid Biopsy for Solid Ophthalmic Malignancies: An Updated Review and Perspectives. *Cancers* 12, 3284. <https://doi.org/10.3390/cancers12113284>
- Martel, A., Baillif, S., Thomas, P., Almairac, F., Galatoire, O., Hamedani, M., Fontaine, D., Lanteri-Minet, M., 2022. Phantom vision after eye removal: prevalence, features and related risk factors. *Br. J. Ophthalmol.* 106, 1603–1609. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2021-319091>
- Martel, A., Gastaud, L., Bonnetaud, C., Nahon-Esteve, S., Washetine, K., Bordone, O., Salah, M., Tanga, V., Fayada, J., Lespinet, V., Allegra, M., Lalvee, S., Zahaf, K., Baillif, S., Bertolotto, C., Mograbi, B., Lassalle, S., Hofman, P., 2023a. Need for a Dedicated Ophthalmic Malignancy Clinico-Biological Biobank: The Nice Ocular MAlignancy (NOMA) Biobank. *Cancers* 15, 2372. <https://doi.org/10.3390/cancers15082372>
- Martel, A., Lassalle, S., Picard-Gauci, A., Gastaud, L., Montaudie, H., Bertolotto, C., Nahon-Esteve, S., Poissonnet, G., Hofman, P., Baillif, S., 2021c. New Targeted Therapies and Immunotherapies for Locally Advanced Periocular Malignant Tumours: Towards a New “Eye-Sparing” Paradigm? *Cancers* 13, 2822. <https://doi.org/10.3390/cancers13112822>
- Martel, A., Mograbi, B., Romeo, B., Gastaud, L., Lalvee, S., Zahaf, K., Fayada, J., Nahon-Esteve, S., Bonnetaud, C., Salah, M., Tanga, V., Baillif, S., Bertolotto, C., Lassalle, S., Hofman, P., 2023b. Assessment of Different Circulating Tumor Cell Platforms for Uveal Melanoma: Potential Impact for Future Routine Clinical Practice. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 11075. <https://doi.org/10.3390/ijms241311075>
- Martel, A., Oberic, A., Moulin, A., Tieulie, N., Hamedani, M., 2018. [Clinical, radiological, pathological features, treatment and follow-up of periocular and/or orbital amyloidosis: Report of 6 cases and literature review]. *J. Fr. Ophtalmol.* 41, 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2017.11.027>
- Mazzini, C., Pinzani, P., Salvianti, F., Scatena, C., Paglierani, M., Ucci, F., Pazzagli, M., Massi, D., 2014. Circulating tumor cells detection and counting in uveal melanomas by a filtration-based method. *Cancers* 6, 323–332. <https://doi.org/10.3390/cancers6010323>
- Möller, A., Lobb, R.J., 2020. The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 20, 697–709. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00299-w>

- Monjanel, B., Baillif, S., Lagier, J., Gastaud, L., Poissonnet, G., Martel, A., 2021. Efficacy and safety of an artificial dermal graft for the reconstruction of exenterated sockets: a preliminary report. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. 259, 2827–2835. <https://doi.org/10.1007/s00417-021-05155-7>
- Nahon-Estève, S., Bertolotto, C., Picard-Gauci, A., Gastaud, L., Baillif, S., Hofman, P., Groulier, A., Maschi, C., Caujolle, J.-P., Lassalle, S., Martel, A., 2021. Small but Challenging Conjunctival Melanoma: New Insights, Paradigms and Future Perspectives. *Cancers* 13, 5691. <https://doi.org/10.3390/cancers13225691>
- Nathan, P., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Baurain, J.-F., Butler, M.O., Schlaak, M., Sullivan, R.J., Ochsenreither, S., Dummer, R., Kirkwood, J.M., Joshua, A.M., Sacco, J.J., Shoushtari, A.N., Orloff, M., Piulats, J.M., Milhem, M., Salama, A.K.S., Curti, B., Demidov, L., Gastaud, L., Mauch, C., Yushak, M., Carvajal, R.D., Hamid, O., Abdullah, S.E., Holland, C., Goodall, H., Piperno-Neumann, S., IMCgp100-202 Investigators, 2021. Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 385, 1196–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2103485>
- Nichols, E.E., Richmond, A., Daniels, A.B., 2017. Micrometastatic Dormancy in Uveal Melanoma: A Comprehensive Review of the Evidence, Mechanisms, and Implications for Future Adjuvant Therapies. *Int. Ophthalmol. Clin.* 57, 1–10. <https://doi.org/10.1097/IIO.000000000000160>
- Onken, M.D., Worley, L.A., Char, D.H., Augsburger, J.J., Correa, Z.M., Nudleman, E., Aaberg, T.M., Altaweel, M.M., Bardenstein, D.S., Finger, P.T., Gallie, B.L., Harocopos, G.J., Hovland, P.G., McGowan, H.D., Milman, T., Mruthyunjaya, P., Simpson, E.R., Smith, M.E., Wilson, D.J., Wirostko, W.J., Harbour, J.W., 2012. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* 119, 1596–1603. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.02.017>
- Onken, M.D., Worley, L.A., Long, M.D., Duan, S., Council, M.L., Bowcock, A.M., Harbour, J.W., 2008. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5230–5234. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2145>
- Pandiani, C., Béranger, G.E., Leclerc, J., Ballotti, R., Bertolotto, C., 2017. Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. *Genes Dev.* 31, 724–743. <https://doi.org/10.1101/gad.296962.117>
- Pandiani, C., Strub, T., Nottet, N., Cheli, Y., Gambi, G., Bille, K., Husser, C., Dalmaso, M., Béranger, G., Lassalle, S., Magnone, V., Pédeutour, F., Irondelle, M., Maschi, C., Nahon-Estève, S., Martel, A., Caujolle, J.-P., Hofman, P., LeBrigand, K., Davidson, I., Baillif, S., Barbry, P., Ballotti, R., Bertolotto, C., 2021. Single-cell RNA sequencing reveals intratumoral heterogeneity in primary uveal melanomas and identifies HES6 as a driver of the metastatic disease. *Cell Death Differ.* 28, 1990–2000. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00730-7>
- Peng, C.-C., Sirivolu, S., Pike, S., Kim, M.E., Reiser, B., Li, H.-T., Liang, G., Xu, L., Berry, J.L., 2023. Diagnostic Aqueous Humor Proteome Predicts Metastatic Potential in Uveal Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 6825. <https://doi.org/10.3390/ijms24076825>
- Pinzani, P., Mazzini, C., Salvianti, F., Massi, D., Grifoni, R., Paoletti, C., Ucci, F., Molinara, E., Orlando, C., Pazzagli, M., Neri, B., 2010. Tyrosinase mRNA levels in the blood of uveal melanoma patients: correlation with the number of circulating tumor cells and tumor progression. *Melanoma Res.* 20, 303–310. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32833906e3>
- Poulet, G., Massias, J., Taly, V., 2019. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol.* 63, 449–455. <https://doi.org/10.1159/000499337>
- Quigley, C., Deady, S., Hughes, E., McElnea, E., Zgaga, L., Chetty, S., 2019. National incidence of eyelid cancer in Ireland (2005-2015). *Eye Lond. Engl.* 33, 1534–1539. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0437-8>
- Ragusa, M., Barbagallo, C., Statello, L., Caltabiano, R., Russo, A., Puzzo, L., Avitabile, T., Longo, A., Toro, M.D., Barbagallo, D., Valadi, H., Di Pietro, C., Purrello, M., Reibaldi, M., 2015. miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients:

- Pathological and diagnostic implications. *Cancer Biol. Ther.* 16, 1387–1396.  
<https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1046021>
- Rantala, E.S., Hernberg, M.M., Piperno-Neumann, S., Grossniklaus, H.E., Kivelä, T.T., 2022. Metastatic uveal melanoma: The final frontier. *Prog. Retin. Eye Res.* 90, 101041.  
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101041>
- Raval, V., Racher, H., Wrenn, J., Singh, A.D., 2022. Aqueous humor as a surrogate biomarker for retinoblastoma tumor tissue. *J. AAPOS Off. Publ. Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* 26, 137.e1-137.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2022.03.005>
- Recasens, A., Munoz, L., 2019. Targeting Cancer Cell Dormancy. *Trends Pharmacol. Sci.* 40, 128–141.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.12.004>
- Reichstein, D., Brock, A., Lietman, C., McKean, M., 2022. Treatment of metastatic uveal melanoma in 2022: improved treatment regimens and improved prognosis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 33, 585–590. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000905>
- Robertson, A.G., Shih, J., Yau, C., Gibb, E.A., Oba, J., Mungall, K.L., Hess, J.M., Uzunangelov, V., Walter, V., Danilova, L., Lichtenberg, T.M., Kucherlapati, M., Kimes, P.K., Tang, M., Penson, A., Babur, O., Akbani, R., Bristow, C.A., Hoadley, K.A., Iype, L., Chang, M.T., Cherniack, A.D., Benz, C., Mills, G.B., Verhaak, R.G.W., Griewank, K.G., Felau, I., Zenklusen, J.C., Gershenwald, J.E., Schoenfield, L., Lazar, A.J., Abdel-Rahman, M.H., Roman-Roman, S., Stern, M.-H., Cebulla, C.M., Williams, M.D., Jager, M.J., Coupland, S.E., Esmaeli, B., Kandoth, C., Woodman, S.E., 2017. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* 32, 204-220.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.003>
- Rodrigues, M., Koning, L. de, Coupland, S.E., Jochemsen, A.G., Marais, R., Stern, M.-H., Valente, A., Barnhill, R., Cassoux, N., Evans, A., Galloway, I., Jager, M.J., Kapiteijn, E., Romanowska-Dixon, B., Ryll, B., Roman-Roman, S., Piperno-Neumann, S., UM Cure 2020 Consortium, 2019. So Close, yet so Far: Discrepancies between Uveal and Other Melanomas. A Position Paper from UM Cure 2020. *Cancers* 11, 1032. <https://doi.org/10.3390/cancers11071032>
- Seitz, T., John, N., Sommer, J., Dietrich, P., Thasler, W.E., Hartmann, A., Evert, K., Lang, S.A., Bosserhoff, A., Hellerbrand, C., 2022. Role of Fibroblast Growth Factors in the Crosstalk of Hepatic Stellate Cells and Uveal Melanoma Cells in the Liver Metastatic Niche. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 11524. <https://doi.org/10.3390/ijms231911524>
- Seyhan, A.A., 2023. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers in Pancreatic Cancer-Advances and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 13340. <https://doi.org/10.3390/ijms241713340>
- Shields, C.L., Demirci, H., Materin, M.A., Marr, B.P., Mashayekhi, A., Shields, J.A., 2004. Clinical factors in the identification of small choroidal melanoma. *Can. J. Ophthalmol. J. Can. Ophthalmol.* 39, 351–357. [https://doi.org/10.1016/s0008-4182\(04\)80005-x](https://doi.org/10.1016/s0008-4182(04)80005-x)
- Singh, A.D., Turell, M.E., Topham, A.K., 2011. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 118, 1881–1885. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.01.040>
- Sinkala, E., Sollier-Christen, E., Renier, C., Rosàs-Canyelles, E., Che, J., Heirich, K., Duncombe, T.A., Vlassakis, J., Yamauchi, K.A., Huang, H., Jeffrey, S.S., Herr, A.E., 2017. Profiling protein expression in circulating tumour cells using microfluidic western blotting. *Nat. Commun.* 8, 14622. <https://doi.org/10.1038/ncomms14622>
- Smit, K.N., Jager, M.J., de Klein, A., Kiliç, E., 2020. Uveal melanoma: Towards a molecular understanding. *Prog. Retin. Eye Res.* 75, 100800.  
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100800>
- Solé, C., Tramonti, D., Schramm, M., Goicoechea, I., Armesto, M., Hernandez, L.I., Manterola, L., Fernandez-Mercado, M., Mujika, K., Tuneu, A., Jaka, A., Tellaetxe, M., Friedländer, M.R., Estivill, X., Piazza, P., Ortiz-Romero, P.L., Middleton, M.R., Lawrie, C.H., 2019. The Circulating Transcriptome as a Source of Biomarkers for Melanoma. *Cancers* 11, 70.  
<https://doi.org/10.3390/cancers11010070>
- Stålhammar, G., Grossniklaus, H.E., 2021. Intratumor Heterogeneity in Uveal Melanoma BAP-1 Expression. *Cancers* 13, 1143. <https://doi.org/10.3390/cancers13051143>

- Strub, T., Martel, A., Nahon-Esteve, S., Baillif, S., Ballotti, R., Bertolotto, C., 2021. Translation of single-cell transcriptomic analysis of uveal melanomas to clinical oncology. *Prog. Retin. Eye Res.* 85, 100968. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100968>
- Suesskind, D., Ulmer, A., Schiebel, U., Fierlbeck, G., Spitzer, B., Spitzer, M.S., Bartz-Schmidt, K.U., Grisanti, S., 2011. Circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with uveal melanoma before and after different therapies and association with prognostic parameters: a pilot study. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* 89, 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01617.x>
- Suvilesh, K.N., Nussbaum, Y.I., Radhakrishnan, V., Manjunath, Y., Avella, D.M., Staveley-O'Carroll, K.F., Kimchi, E.T., Chaudhuri, A.A., Shyu, C.-R., Li, G., Pantel, K., Warren, W.C., Mitchem, J.B., Kaifi, J.T., 2022. Tumorigenic circulating tumor cells from xenograft mouse models of non-metastatic NSCLC patients reveal distinct single cell heterogeneity and drug responses. *Mol. Cancer* 21, 73. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01553-5>
- Swennenhuis, J.F., van Dalum, G., Zeune, L.L., Terstappen, L.W.M.M., 2016. Improving the CellSearch® system. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 16, 1291–1305. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1255144>
- Takahashi, Y., Shirai, K., Ijiri, Y., Morita, E., Yoshida, T., Iwanaga, S., Yanagida, M., 2020. Integrated system for detection and molecular characterization of circulating tumor cells. *PLoS One* 15, e0237506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237506>
- Terai, M., Mu, Z., Eschelmann, D.J., Gonsalves, C.F., Kageyama, K., Chervoneva, I., Orloff, M., Weight, R., Mastrangelo, M.J., Cristofanilli, M., Sato, T., 2015. Arterial Blood, Rather Than Venous Blood, is a Better Source for Circulating Melanoma Cells. *EBioMedicine* 2, 1821–1826. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.019>
- Thariat, J., Martel, A., Matet, A., Loria, O., Kodjikian, L., Nguyen, A.-M., Rosier, L., Herault, J., Nahon-Estève, S., Mathis, T., 2022. Non-Cancer Effects following Ionizing Irradiation Involving the Eye and Orbit. *Cancers* 14, 1194. <https://doi.org/10.3390/cancers14051194>
- Trolet, J., Hupé, P., Huon, I., Lebigot, I., Decraene, C., Delattre, O., Sastre-Garau, X., Saule, S., Thiéry, J.-P., Plancher, C., Asselain, B., Desjardins, L., Mariani, P., Piperno-Neumann, S., Barillot, E., Couturier, J., 2009. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 2572–2580. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2296>
- Tura, A., Lüke, J., Merz, H., Reinsberg, M., Lüke, M., Jager, M.J., Grisanti, S., 2014. Identification of circulating melanoma cells in uveal melanoma patients by dual-marker immunoenrichment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 4395–4404. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14512>
- Ulmer, A., Beutel, J., Süßkind, D., Hilgers, R.-D., Ziemssen, F., Lüke, M., Röcken, M., Rohrbach, M., Fierlbeck, G., Bartz-Schmidt, K.-U., Grisanti, S., 2008. Visualization of circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with primary uveal melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 4469–4474. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0012>
- Uner, O.E., Gandrakota, N., Azarcon, C.P., Grossniklaus, H.E., 2022. Animal Models of Uveal Melanoma. *Ann. Eye Sci.* 7, 7. <https://doi.org/10.21037/aes-21-30>
- Valsecchi, M.E., Orloff, M., Sato, R., Chervoneva, I., Shields, C.L., Shields, J.A., Mastrangelo, M.J., Sato, T., 2018. Adjuvant Sunitinib in High-Risk Patients with Uveal Melanoma: Comparison with Institutional Controls. *Ophthalmology* 125, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.08.017>
- Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schütze, K., Capron, F., Franco, D., Pazzagli, M., Vekemans, M., Lacour, B., Bréchet, C., Paterlini-Bréchet, P., 2000. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am. J. Pathol.* 156, 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64706-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64706-2)

## **PARTIE VII- ANNEXES**

### **Annexe 1 : authentification externe de notre lignée cellulaire OMM 2.3**



#### **Cell Line Authentication Report for Case Number C-27155a**

##### Statement

We have now completed DNA analysis of the samples presented for Cell Line Authentication

**A DNA Profile has been generated from the sample provided by University Hospital of Nice and compared to a profile located on the Cellosaurus Database. A Matching Percentage has been calculated and a value of 100% obtained. Please refer to the detailed results on the second page for further information and interpretation.**

Analysis has been conducted using 8 loci allowing identical matches an approximate power of discrimination of 1 in 1,000,000,000. Please note that some cell lines may exhibit genetic instability as they proliferate leading to discrepancies within the DNA profiles examined.

Details of the DNA analysis as tested by PowerPlex® Fusion are shown on the next page.

14/11/2022

NorthGene™ is a trading name of Biofortuna Limited  
2 Tenth Asvenue Deeside Industrial Park Deeside CH5 2UA

This report shall not be reproduced, except in full, without written approval of the laboratory. The validity of these results depends on the quality of the sample provided and the identification of samples being correct.

1  
2



### Laboratory Report

Test Requested Cell Line Authentication

Case Number C-27155a

Date Sample Received 07/11/2022

Date Sample Tested 07/11/2022

Date Sample Reported 11/11/2022

Sample Name	Sample/Comparison Profile Source	Sample Number	DNA Number
OMM 1.3	University Hospital of Nice	S-1061822	D-1061822
OMM 2.3	Cellosaurus Database	N/A	N/A

### Table of Allelic Data

STR Locus	Genotypes		Match vs. Mis-Match
	OMM 1.3 (Test Sample)	OMM 2.3 (Comparison Sample)	
D5	12   12	12   12	Match
D13	12   12	12   12	Match
D7	8   9	8   9	Match
D16	12   12	12   12	Match
vWA	17   18	17   18	Match
Amel	X   Y	X   Y	Match
TPOX	10   10	10   10	Match
CSF1PO	11   11	11   11	Match
TH01	6   9	6   9	Match

Matching Percentage:

**100%**

Outcome:

**Related**

The outcome percentage is calculated using a formulae which compares the number of alleles present against the number of alleles shared between the two DNA profiles. The outcome is designated one of the following statements based upon the outcome percentage:

Related (>80%) The Cell Lines are considered to be related.  
 Inconclusive (56-79%) Further profiling is required to determine whether the profiles are related.  
 No Match (55%>) It is considered that the two cell lines are unrelated.  
 Misidentified Cell Lines have been found to match a different donor within the database

Reported By: Ms. Georgina Fair (Laboratory Scientist)



Authorised By: Mr. Benjamin Hickey (Laboratory Scientist)



Date: 14/11/2022

These test results should only be used in conjunction with a client's information. The results relate only to the items sampled, as received and tested at this time.

2  
2