

<p>UE11 – Parcours Bases et prérequis de la biologie cellulaire et moléculaire Cours n°1 17/10/2018 Pr. Patrizia Paterlini-Brechot</p>	<p>RT : Marie-Emmanuelle Yvert & Johanna Zitzmann-Andrieu RL : Lina Yataghene</p>
--	---

Cellules Rares Circulant dans le sang : un outil pour la médecine de demain : personnalisée, prédictive et non-invasive

Plan :

I. L'angiogénèse

- A. Capacité des cellules à envahir**
- B. Différents types de cancer**
- C. Les processus d'angiogénèse et d'invasion tumorale**

II. Les cellules rares circulantes

- A. La découverte des cellules rares circulantes**
- B. Les expériences pour isoler les cellules tumorales circulantes**

III. Les étapes de transformation des cellules qui conduisent à la formation de métastases

- A. Epithelial to Mesenchymal Transition**
- B. Mesenchymal to Epithelial Transition**
- C. Les cellules en « dormancy », « perivascular niche » et hybrides**

IV. Rôle des CTCs dans le pronostic et le théranostic

- A. Les CTC, plus qu'un biomarqueur**
- B. Le théranostic**
- C. Aller plus loin avec la cytopathologie pour améliorer la prise en charge des patients ?**
- D. Les CTC dans le diagnostic précoce de cancers invasifs**

Introduction

Les cellules rares circulantes sont des cellules qui circulent dans le sang mais qui ne sont ni des globules blancs ni des globules rouges.

Elles constituent un nouveau domaine de la médecine.

Dans 1mL de sang, on trouve une à quelques cellules rares circulantes. Jusqu'à récemment, on ignorait leur existence, elles n'étaient pas observées dans les examens du sang. En effet, les examens sont effectués sur quelques microlitres de sang. On sait désormais qu'elles existent grâce aux nouvelles technologies, aux nouvelles méthodes d'examen et d'observation.

Différents types de Cellules Rares Circulantes

- **cellules circulantes épithéliales** : elles sont différentes selon les organes. Suite à une inflammation ou une chute, ces cellules peuvent passer dans le sang.
- **cellules endothéliales** : ce sont les cellules qui bordent la partie intérieure des vaisseaux sanguins. Elles peuvent passer dans le sang lors d'un choc, si le patient souffre d'athérosclérose (= angiopathie (maladies des vaisseaux)), s'il fait un infarctus du myocarde ou un infarctus cérébral.
—> *un infarctus est un blocage des vaisseaux accompagné ou non d'une nécrose. Il implique parfois un passage des cellules dans le sang.*
- **cellules cancéreuses** : elles sont un pont entre la tumeur primitive et la métastase.
- **cellules foetales** : diffusées dans le sang à partir du placenta et qui contient l'ADN du foetus.
- **cellules sanguines infectées** : par exemple des macrophages infectés par des parasites intracellulaires (par le toxoplasme, drépanosome, plasmodium...)
- **cellules souches** : physiologiques (chez les individus sains) ou tumorales (chez les malades)

I. L'angiogénèse

A. Capacité des cellules à envahir

Les cellules ont une capacité à envahir les tissus. Cette capacité à envahir est à l'origine de la vie et de la mort :

- la vie : le trophoblaste doit envahir le tissu de l'utérus, c'est l'invasion trophoblastique. C'est un processus nécessaire à la survie de l'embryon.
- la mort : la capacité à envahir des cellules est à l'origine des cancers. Les métastases envahissent le corps, ce qui conduit le patient au décès.

—> *Les métastases conduisent à la survie et à la croissance des cellules tumorales à distance du lieu d'origine de la tumeur. Elles sont aussi le reflet de l'expression de la malignité de la tumeur.*

B. Différents types de cancer

On distingue les cancers solides des cancers liquides. Les cancers solides sont ceux qui dérivent d'un organe et les cancers liquides sont ceux dits du sang, comme les leucémies par exemple.

Parmi les cancers solides, on remarque que la probabilité de donner des métastases dans un organe dépend de la localisation de la tumeur primitive :

- Le cancer du foie donne plus facilement des métastases au poumon.
- Les cancers du côlon, du pancréas ou de l'estomac => métastases au foie
- Le cancer de la prostate => métastases au niveau des os
- Le cancer du poumon => métastases au cerveau et au niveau des os

Les métastases que l'on voit en imagerie sont les grosses métastases. On ne voit pas les petites et par conséquent, elles peuvent être partout sans qu'on le sache, rendant difficile ou tardif le diagnostic de certains cancers.

C. Les processus d'angiogénèse et d'invasion tumorale

Un processus nécessaire pour la naissance d'une tumeur et des métastases s'appelle l'**ANGIOGÉNÈSE**

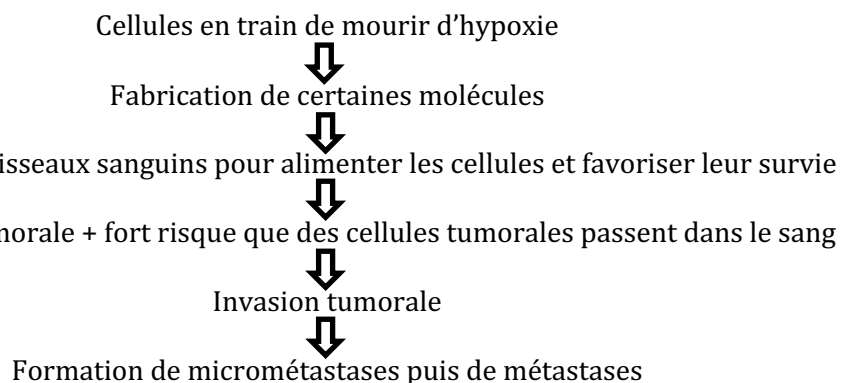
L'angiogénèse est le phénomène de production de vaisseaux sanguins.

Lorsqu'on voit en imagerie une masse d'1 mm de diamètre, on sait qu'il y a au moins 1 million de cellules cancéreuses. Certaines de ces cellules sont donc situées loin des vaisseaux, elles recevront par conséquent très peu d'oxygène et de nutriments et mourront d'hypoxie. Avant de mourir, les cellules cancéreuses réalisent l'autophagie, c'est-à-dire qu'elles digèrent leurs organelles pour tenter de survivre.

L'hypoxie stimule l'angiogénèse. En effet, des molécules sont libérées pour activer la fabrication de nouveaux vaisseaux sanguins. Ainsi il y a croissance de la tumeur grâce à l'oxygène et aux nutriments présents dans le sang. La présence de vaisseaux sanguins favorise également l'apparition de métastases via le passage des cellules tumorales dans le sang.

Le processus d'autophagie est la cible d'un traitement. Il s'agit du traitement contre la malaria (la chloroquine). La chloroquine bloque l'autophagie. Sans autophagie et donc sans énergie provenant de la digestion des organelles, les cellules tumorales qui sont en hypoxie vont mourir plus vite et n'auront pas le temps de favoriser l'angiogénèse. On peut tuer ainsi les cellules tumorales dès le début du développement de la maladie.

EN RÉSUMÉ



Cependant ce processus est très inefficace. En effet, la plupart des cellules tumorales qui se détachent et qui partent dans le sang meurent.

Plusieurs phénomènes expliquent la mort des cellules qui se détachent :

- Si les cellules ne sont pas assez malignes, elles rentrent en apoptose.
- Le système immunitaire attaque la cellule cancéreuse.
- Les cellules sont faites pour résister quand elles sont en contact les unes avec les autres ce qui n'est pas le cas quand une cellule tumorale s'échappe.
- Le micro-environnement différent. Les cellules des organes sont faites pour résister à un environnement précis. Lorsqu'elles sont sorties de leur environnement, il est possible qu'elles ne puissent pas avoir de croissance, qu'elles ne puissent pas se multiplier ou qu'elles ne survivent pas à la différence de conditions.

—> *Comme si les êtres humains devaient fonder une famille dans une autre galaxie, ce serait compliqué voire impossible car l'environnement est complètement différent.*

« Une graine donne une plante quand il y a bon terrain », c'est le principe du Seed & Soil. Le bon terrain consiste en un mélange de préférence relative à la circulation et de bon micro-environnement :

- préférence relative à la circulation : il est assez évident, par exemple, qu'une cellule tumorale du système digestif envahisse le foie via la veine porte.
- bon micro-environnement : cellules immunitaires, cellules fibrostatiques et...

Quand elles deviennent assez malignes, certaines cellules survivent et peuvent entraîner la formation de métastases.

Le processus d'invasion tumorale est très inefficace, lent, multi-étape et sélectif. Environ 1 cellule tumorale sur 10 000 peut donner naissance à une métastase. Cependant, cela dépend du type de cancer et de l'individu.

II. Les cellules rares circulantes

A. La découverte des cellules rares circulantes

Les cellules rares circulantes ont été découvertes par un médecin australien en 1869. Il suivait un jeune patient finalement décédé d'un cancer diffus. Le cancer était si diffus que le patient avait des nodules un peu partout sur le corps. Après biopsie et analyse des nodules, on y découvre les mêmes cellules et fait la liaison : **des cellules qui proviennent de la tumeur primitive passent dans le sang pour former des métastases.**

Pendant le siècle suivant, les chercheurs ont essayé d'observer ces cellules rares circulantes chez des patients vivants ayant des métastases. Ils n'ont jamais réussi à les observer et ce à cause de leur rareté.

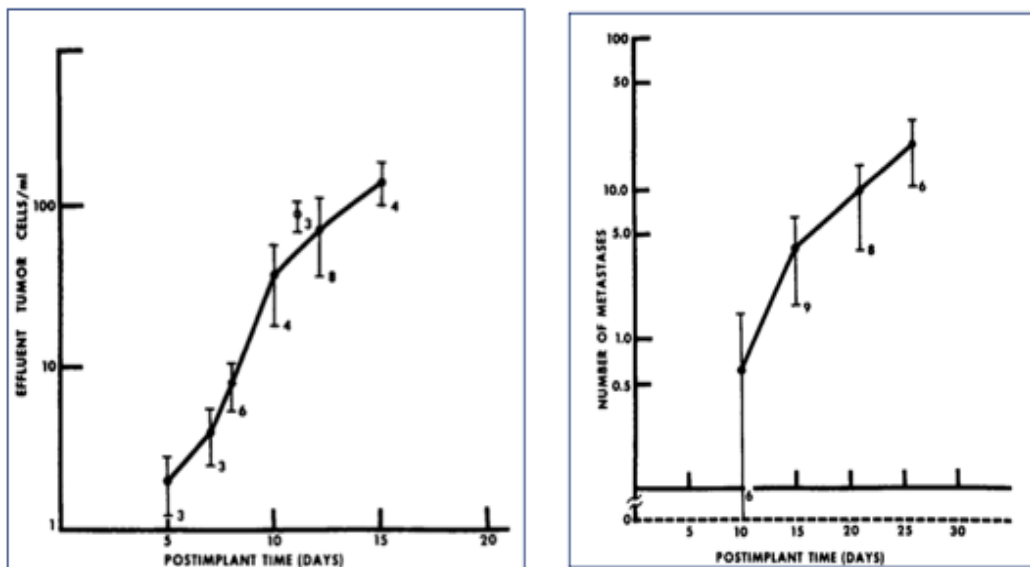
Confirmation que les cellules tumorales circulantes sont à l'origine des métastases

L'étude a été menée sur des animaux. Des cellules tumorales de mélanome ont été injectées dans la queue de souris saines, et les cellules circulant dans le sang ont été suivies grâce à des techniques de fluorescence. Au 3ème jour après l'injection, 80% des cellules injectées sont sorties des vaisseaux sanguins : elles sont **extravasées** et peuvent donc passer dans d'autres tissus. La plupart des cellules extravasées meurent du fait des différences de micro-environnement. On estime qu'une cellule sur 40 peut former une micro-métastase une fois arrivée dans les tissus.

Au 13ème jour après l'injection, on observe qu'une cellule sur 100 parmi celles qui ont formé une micro-métastase peut donner une métastase. Les autres cellules ont différentes destinées :

- apoptose
- destruction par le système immunitaire
- « dormancy », les cellules sont en veille

Cette expérience confirme que les cellules tumorales circulantes sont à l'origine des métastases car les souris de l'expérience étaient saines avant de développer des métastases, uniquement après l'injection de cellules tumorales dans le sang circulant.



Liotta LA et al Cancer Research 1974
Butler T & Gullino P Cancer Research, 1975

B. Les méthodes pour isoler les cellules tumorales circulantes (CTC)

Lors du diagnostic de cancer, s'il n'y a pas de masse autre que la tumeur primitive, on dit que le cancer est localisé. En vérité, il peut déjà y avoir des cellules tumorales circulant dans le sang capables de former des métastases. On voit donc la nécessité de savoir s'il y a des cellules tumorales circulantes et ainsi de développer les techniques et méthodes pour y parvenir.

Un homme adulte a environ 5L de sang. On sait que, chez les animaux testés, 0,05% des cellules tumorales circulantes peuvent conduire à la formation d'une métastase. Ainsi on estime que chez l'Homme, 2 à 10 cellules par mL de sang peuvent conduire à la formation de métastases.

De plus, l'augmentation du nombre de cellules tumorales dans le sang entraîne une augmentation du risque de formation de métastases. Il est donc nécessaire de mettre au point des techniques de détection puissantes et fiables.

1) *Détection de l'ARN tumoral dans le sang*

En 1995, la technique de RT-PCR se développe et permet une détection bien plus sensible des ARN.

Avec la technique classique du frottis, il faudrait de 20 à 50 lames pour pouvoir espérer voir des cellules rares circulantes (CRC). Cet examen est donc inimaginable sur des personnes vivantes.

Les chercheurs ont développé une alternative :

- étape 1 : lyse des cellules du sang
- étape 2 : RT-PCR et recherche des ARN spécifiques des cellules tumorales
- étape 3 : si ces ARN sont trouvés, cela signifie que des cellules tumorales étaient présentes dans le sang et qu'il s'agit donc de CTC.

Carr et Kar, deux chercheurs, ont utilisé cette méthode. Ils ont cherché des transcrits de l'albumine pour détecter un cancer de la prostate. Ils sont alors confrontés aux limites de cette technique :

- il n'y a pas de marqueur spécifique tumoral. Les seuls marqueurs connus sont des marqueurs de la prolifération : leur quantité explose dans le cas des tumeurs. Ainsi, une grande quantité de marqueurs indique souvent la présence d'une tumeur, mais ce n'est pas toujours le cas. Nous sommes donc dans un cas de faible spécificité.
- La deuxième limite concerne la **transcription illégitime**. Dans le cas de l'albumine, elle est exprimée par des cellules du foie mais aussi par des leucocytes qui font une transcription illégitime. L'examen perd encore en spécificité.

—> *Transcription illégitime : des cellules expriment un transcrit à bas bruit alors qu'elles n'ont aucune raison de l'exprimer.*

2) *Détection d'antigène épithélial dans le sang*

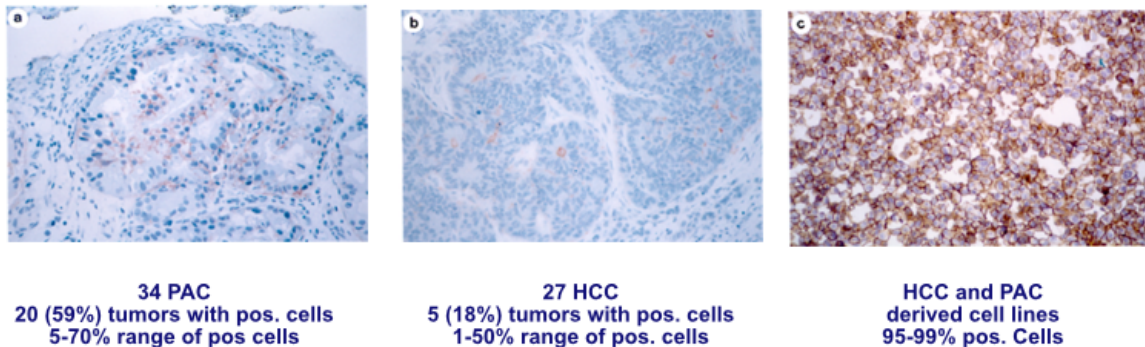
Pendant longtemps, retrouver une cellule épithéliale dans le sang signifiait qu'elle était tumorale. Pour cette raison les chercheurs ont utilisé la détection d'antigène épithélial pour tester la présence d'un cancer et des CTC.

Dans une première expérience, des chercheurs ont fait 3 groupes de personnes : un groupe d'individus sains, un groupe de patients atteints de cancer de la prostate et un groupe de patients atteints de prostatite (maladie de la prostate non cancéreuse). Des antigènes épithéliaux ont été recherchés et retrouvés dans les 3 groupes, y compris chez les individus contrôles sains ou chez les individus atteints de prostatite. Ainsi, se baser sur la présence d'antigènes épithéliaux ne peut constituer un examen fiable et spécifique des cancers et CTCs.

Dans une deuxième expérience (qui illustre les liens entre recherche biologique et recherche clinique avec la nécessité d'expérimenter sur des patients), deux chirurgiens-chercheurs ont isolé deux groupes : le premier groupe est composé de patients atteints d'un cancer du foie ayant comme marqueur l'alpha-foeto-protéine (AFP) ; le second groupe de patients sans cancer mais nécessitant une chirurgie hépatique. L'expérience est menée en 5 temps :

- 1) avant l'intervention
- 2) après la mobilisation (=compression du foie par le chirurgien pour pouvoir clamer les voies biliaires et les vaisseaux)
- 3) après la transection du foie (=cisaillement du parenchyme du foie)
- 4) après la suture, c'est-à-dire à la fin de la chirurgie
- 5) 4 jours après l'intervention

Dès le deuxième temps, après compression, chez des patients sans cancer, des cellules de foie non-tumorales exprimant l'AFP circulent dans le sang. Encore une fois, la technique n'est pas spécifique.



Ces expériences montrent que l'on peut trouver des cellules épithéliales dans le sang en cas de tumeur mais aussi et le plus souvent après un choc, une compression, une chute, une inflammation, une échographie, une infection etc... Donc, lors d'une biopsie, si des cellules épithéliales sont trouvées, il ne faut jamais considérer le cancer comme acquis.

De plus, une troisième expérience datant de 1999 montre que dans les tissus tumoraux, toutes les cellules tumorales n'expriment pas les antigènes épithéliaux. L'image de gauche et l'image du milieu sont des vraies tumeurs, l'image de droite est une tumeur fabriquée en laboratoire où toutes les cellules sont marquées.

Pour pallier ce manque de spécificité, des chercheurs américains ont réalisé une quatrième expérience. Des billes microscopiques magnétiques ont été couplées à un anticorps dirigé contre des antigènes épithéliaux (EpCAM) pour capturer les cellules épithéliales dans le sang (parmi elles, des cellules tumorales circulantes). Deux tests sont faits sur ces cellules: présence de la cytokératine (antigène épithélial) et CD45 (marqueur des leucocytes qui sert de contrôle négatif). Si le test pour la cytokératine est positif et le CD45 est négatif, il s'agit de cellules tumorales. Cette méthode permet d'augmenter la spécificité.

3) *Oncoquick*

L'oncoquick est une méthode qui consiste à faire une centrifugation du sang pour récupérer un groupe de cellules qui inclut les cellules tumorales mais aussi d'autres cellules épithéliales. Cette méthode étant très peu sensible, elle a rapidement été abandonnée.

4) *ISET*

Toutes ces expériences permettent d'affirmer qu'on ne peut pas utiliser de marqueur ARN ni de détection d'antigène pour isoler ou observer les CTC. Il faut donc les isoler physiquement, les garder intactes pour étudier leurs caractéristiques morphologiques, immunologiques et moléculaires. Les cellules du sang étant les plus petites de l'organisme, on peut les séparer des cellules rares circulantes qui sont beaucoup plus grosses. Cependant les filtres classiques sont inutilisables, car le grand nombre de cellules présentes dans le sang les font colmater. Les chercheurs ont utilisé un outil pour filtrer le lait et retirer certaines bactéries, ont adapté les paramètres (taille du pore, densité etc...) et lancé l'expérience test.

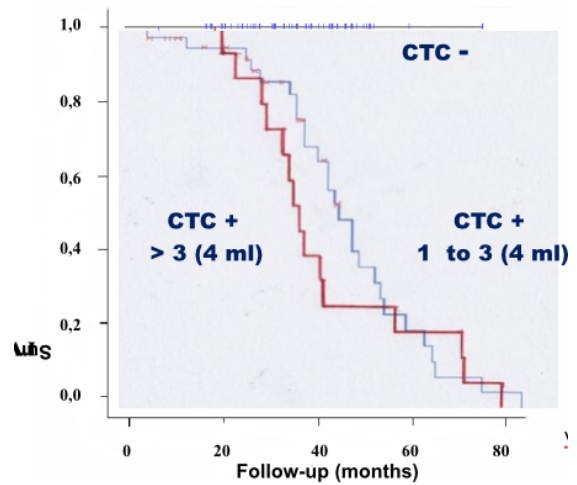
Une cellule tumorale est mélangée à du sang sain, puis l'on filtre et l'on cherche la cellule tumorale. L'expérience est un succès.

La technique est appelée **ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells)**.

Beaucoup d'expériences utilisant ce filtre ont été réalisées pour trouver la bonne sensibilité. La sensibilité actuelle est de 95%. Plus l'examen est sensible, mieux les CTCs sont repérées et meilleure est la caractérisation de la tumeur.

La technique ISET permet également de ne récupérer qu'une seule cellule tumorale et d'analyser ses mutations.

50% des cancers de la prostate sont diagnostiqués comme localisés car aucune métastase n'a été repérée. Les patients sont opérés pour retirer la tumeur primitive mais 30% des patients font une récurrence à cause des CTC. Le test ISET permet d'éviter ces erreurs de diagnostic.



Ce graphique montre que lorsqu'il n'y a pas de CTC détectées avec ISET, il n'y a pas de récurrence dans les mois qui suivent (courbe CTC-). Il montre également que lorsqu'il y a des CTC détectées avec ISET, il y a des récurrences dans les mois qui suivent (courbes CTC+).

L'efficacité de ISET a entraîné la création d'une compagnie pour créer un appareil spécial. 10mL de sang sont dilués avec une solution adéquate pour former 100mL. Le tout est versé dans le filtre et en moins d'une minute, les cellules rares circulantes sont isolées.

III. Les étapes de transformation des cellules qui conduisent à la formation de métastases

A. Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)

Les cellules tumorales se détachent de la tumeur primitive, sont capables de migrer et de mimer phénotypiquement les leucocytes en exprimant des antigènes mésenchymateux et en réprimant l'expression d'antigènes épithéliaux (les leucocytes sont des cellules mésenchymateuses). C'est le phénomène d'**Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)**. Cette transition est possible grâce à la capacité de **plasticité** des cellules tumorales (*RAPPEL : cellules mésenchymateuses = celles qui circulent dans le sang*).

Un test simple pour prouver ceci est le test à la vimentine (protéine exprimée par les cellules mésenchymateuses).

Cette transformation commence dans la tumeur primitive. Lorsque des cellules tumorales passent dans le sang, les plaquettes les entourent et les masquent, elles ne sont pas détectées par le système immunitaire et sont protégées. Les plaquettes stimulent également l'EMT grâce à des facteurs qu'elles sécrètent. L'angiogénèse est également favorisée. Les plaquettes rendent donc le phénotype de la tumeur encore plus malin.

Un traitement préventif contre les cancers est l'aspirine à faible dose puisqu'elle limite l'action des plaquettes.

B. Mesenchymal to Epithelial Transition (MET)

Les CTC expriment maintenant des antigènes mésenchymateux. Mais les cellules mésenchymateuses ne peuvent pas former de masses. Pour former des micro-métastases (=micro-emboles), les cellules tumorales ont donc besoin de faire le chemin inverse, c'est-à-dire de réexprimer les antigènes épithéliaux. C'est la **Mesenchymal to Epithelial Transition (MET)**. Suite à cette transformation, les cellules sont capables de former des micro-emboles.

—> *Micro-embole = amas de cellules tumorales et de cellules immunitaires. Elle se bloque dans un organe, et s'il y a un micro-environnement adéquat, elle peut donner une micro-métastase puis une métastase.*

C'est un processus très inefficace qui prend plusieurs années. Cela dépend cependant du type de cancer :

- cancer ORL, cancer du poumon, du pancréas et de l'estomac : cancers très invasifs, la formation de métastases est rapide
- cancer du sein et de la prostate : la formation de métastases prend beaucoup plus de temps.

Les mécanismes de transformation des micro-métastases en métastases ne sont pas connus, néanmoins certaines hypothèses mettent en jeu le processus inflammatoire. De plus la transformation peut survenir même des années après l'ablation de la tumeur primitive.

—> *Un transplanté rénal est décédé après la chirurgie d'un mélanome généralisé alors qu'il n'avait pas de cancer avant sa transplantation. Un deuxième cas identique est déclaré peu après. Les médecins ont découvert que les deux reins provenaient de la même personne. C'était une femme traitée pour un cancer et déclarée guérie. Donc même en étant considéré comme guéri, des cellules tumorales peuvent rester dans l'organisme sans entraîner de phénotype malade. Mais s'il y a une baisse des défenses immunitaires (dans le cas d'un traitement contre le rejet de greffe), il peut y avoir une invasion par ces cellules tumorales.*

C. Les cellules en « dormancy », « perivascular niche » et hybrides

Certaines cellules tumorales, après être passées dans le sang, se mettent en veille. Ce sont les cellules en « **dormancy** ». Le mécanisme est le suivant : le cancer primitif sécrète l'**angiostatine**, une molécule qui bloque la prolifération des cellules. Donc les cellules en veille ne peuvent pas proliférer. Après ablation de la tumeur primitive par chirurgie, la source d'angiostatine est supprimée et les cellules en veille se réveillent et prolifèrent rapidement. Les médecins disent que « ça flambe », plein de métastases se forment dès lors que la tumeur primitive est retirée.

Les CTC circulent dans le sang mais aussi le long des vaisseaux. Cela a été démontré chez l'animal, pour le cancer du pancréas et le mélanome, et observé par un chirurgien qui, lors d'une chirurgie, a trouvé les vaisseaux du pancréas entouré de cellules tumorales. Les cellules tumorales ont en effet besoin de beaucoup d'O₂ et de nutriments, elles sont donc attirées par les vaisseaux sanguins. Elles imitent les péricytes et s'immiscent sous eux, ce phénomène s'appelle le **Perivascular Niche**. En 2000, il a été démontré que certaines cellules tumorales remplaçaient les cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux.

De plus certaines cellules tumorales peuvent fusionner avec des macrophages et ainsi devenir des hybrides extrêmement malins (voir l'analyse de l'article *Cell Fusion potentiates Tumor heterogeneity and reveals circulating hybrids cells that correlates with stage and survival*)

Il y a deux barrières à la formation de métastases : la difficulté des cellules extravasées individuelles à former des micro-métastases et la difficulté de transition entre micro-métastase et métastase.

Les cellules rares circulantes sont extrêmement hétérogènes en plus d'être rares. Avec l'étude des cellules tumorales circulantes, on étudie l'identité même du cancer directement dans le sang, sans faire de biopsie.

30% des patients opérés de cancer localisé font une récurrence et développent des métastases, ce qui signifie que tout n'a pas été enlevé lors de la chirurgie d'où la nécessité d'avoir un moyen plus puissant de détecter le cancer quand il n'est pas visible par imagerie.

IV. Rôle des CTC dans le pronostic et le théranostic

A. Cellules Tumorales Circulantes, plus qu'un biomarqueur

Les CTC sont des cellules très hétérogènes et à distinguer des autres Cellules Rares Circulantes (CRC). Lorsque l'on cherche des marqueurs de cellules tumorales par analyse sanguines, tel que l'AFP, on passe par une voie de détection indirecte. En ciblant les CTC, on cible une partie du cancer lui-même, car celles-ci constituent un marqueur important de toutes les étapes de la maladie.

Il s'agit également de détecter les cancers avant la formation de métastases en recherchant les CTC circulant dans le sang avant qu'elles ne s'implantent dans les tissus. L'enjeu est alors de trouver les cancers non visibles en imagerie afin de mieux suivre les patients, grâce à un contrôle de l'efficacité du traitement anti-cancéreux proposé sur les CTC.

B. Théranostic

Qu'est-ce que le théranostic ?

Contraction thérapie-diagnostic → Approche médicale permettant la mise en place d'un traitement ciblé, efficace uniquement si les cellules tumorales contiennent une mutation donnée et identifiée. Les médicaments développés sont alors ciblés, et seules les cellules exprimant les marqueurs de cette mutation seront détruites.

Ex : Certains cancers du poumon ont une mutation Alk, combattue par le médicament Crizotinib qui a obtenu l'autorisation de la FDA très rapidement grâce à son efficacité.

Problème : l'hétérogénéité génétique des cellules tumorales. Une drogue ciblée tue les cellules porteuses de la mutation, sélectionnant à ses dépens les clones porteurs d'autres mutations, qui permettront une récurrence du cancer plus tard.

Comment utiliser les CTC comme moyen de diagnostic ?

- Méthode basée sur des AC anti-Ag épithéliaux Cellsearch : détecte les cellules portant des marqueurs épithéliaux, ainsi les cellules ne sont pas forcément tumorales! La méthode n'est donc pas assez spécifique puisque des faux positifs et faux négatifs sont obtenus.

Faux positifs : chez les sujets ayant une inflammation (type rectocolite), des cellules épithéliales non tumorales sont repérées dans le sang. Même chez les patients sains on trouve des CRC en provenance d'organes, portant ces marqueurs dans le sang.

Faux négatifs : En effet les cellules les plus malignes passant dans le sang n'expriment plus ces marqueurs épithéliaux (puisqu'elles effectuent la transition épithélio-mésenchymateuse), et de ce fait ne sont pas détectées. Le nombre de CTC semble baisser, ce qui est faux, puisque le cancer est en train de métastaser.

Autre exemple : le sarcome, cancer solide des cellules mésenchymateuses. Ces cellules n'expriment pas de marqueurs épithéliaux et ne sont pas détectables par la méthode décrite.

- Méthode ISET par filtrage : plus efficace, utilise la **cytopathologie** comme critère, les cellules tumorales ayant un phénotype spécial, plus grosses... On peut donc retrouver des CTC chez les sujets atteints de cancer. La méthode est très **sensible** ! (confirmé par de nombreuses publications)

→ Dans le domaine des cellules rares à chaque étape d'isolation, séparation, gradient, on perd de la sensibilité.

Pour ISET : pour une cellule sur 10ml de sang, on la détecte dans 85 à 100% des cas (sensibilité=LLOD)

Les critères cytopathologiques, valables pour détecter les cellules tumorales dans les urines, le LCR... ont été prouvés aussi **spécifiques** des CTC du sang ; les CTC sont uniquement retrouvées chez les patients atteints de cancer.

Pour tous les cancers testés, la détection de CTC est pronostique et a une valeur prédictive.

Comment est fait le théranostic ?

- On effectue une biopsie du cancer, ou un prélèvement lors d'une chirurgie.

- On recherche la présence de mutation éligible à un traitement ciblé

- On administre ainsi un traitement ciblé (targeting treatment)

Problème : certains patients trop faibles (cancer du poumon avancé) ne peuvent être ni biopsiés ni opérés → on peut alors utiliser les CTC filtrées par ISET pour détecter la mutation éligible, très bonne concordance avec la biopsie du tissu démontrée (Ex : Braf pour le mélanome, Mek et Alk pour le cancer du poumon...)

C. Aller plus loin avec la cytopathologie pour améliorer la prise en charge des patients ?

Dans les leucémies de nombreuses mutations retrouvées dans les cellules sanguines sont diagnostiques du type de cancer. Ceci n'est pas valable pour les cancers solides, excepté pour le cancer du rein à cellules claires où dans 83% des cas la mutation VHL retrouvée est diagnostique. Or chaque fois qu'une cellule est diagnostiquée tumorale par le cytopathologiste, elle porte la même mutation VHL que celle de la tumeur avec une sensibilité de 50 à 70%. (Le cytopathologiste classe les cellules incertaines dans la catégorie UMF, Uncertain Maligned Features).

La médecine peut donc progresser, puisque actuellement le diagnostic du cancer est histologique et porte sur les tissus. L'imagerie a un rôle important mais demain pourrait aller plus loin avec le **diagnostic cellulaire et moléculaire**.

Cependant le processus reste difficile : les pathologies étudiées étaient **bénignes** (ne se transformant jamais en cancer) et portaient des mutations oncogènes. On explique cela par le fait qu'un cancer provient généralement de plusieurs mutations oncogènes associées.

Nombreuses études sur l'ADN plasmatique (cellfree DNA): ADN muté de cellules cancéreuses retrouvé dans le sang après leur nécrose ou apoptose. La méthode GRAIL l'utilise pour le diagnostic précoce de cancer, par séquençage NGS (Next Generation Sequencing).

→ Amplification de l'ADN retrouvé ou du transcriptome et séquençage par NGS au niveau de la cellule unique.

Attention ! Lors d'infections ou d'inflammations on peut retrouver de l'ADN muté (faux positif) ... ces mutations sont-elles diagnostiques du cancer ? De plus pour qu'il y ait mort cellulaire (ici en général par nécrose), la masse cancéreuse doit être suffisamment importante.

Néanmoins cette méthode de recherche permet d'avancer vers une médecine personnalisée, préventive et non invasive ; avec une limite de coût !

De nouvelles pistes sont alors mises à l'essai pour limiter l'impact financier du NGS, en utilisant par exemple des nanogouttes contenant des nanolitres de réactifs.

D. Les CTC dans le diagnostic précoce de cancers invasifs

En science, il est généralement considéré comme modèle de cancer une tumeur qui se développe, gagne en malignité et en taille et devient de plus en plus capable d'envahir.

→ Démonstré par l'utilisation de la classification TNM (tumeur, nœud lymphatique, métastase).
Actuellement on avance vers une distinction, les cancers naissent localisés ou invasifs.

Cancer localisé : masse qui grandit sans envahir, puis qui devient capable d'envahir d'autres tissus par métastases.

Cancer invasif : commence à diffuser des cellules tumorales dès le début de l'angiogenèse. Constituant 40 à 50% des cancers chez l'homme, ces cancers sont diagnostiqués au stade métastatique.

Exemple : cancer du pancréas chez la souris (cancer très invasif)

Des CTC sont retrouvées dans le sang dès le stage carcinome in situ.

→ On pourrait donc détecter le cancer avant l'imagerie ? L'équipe d'ISET a suivi tous les ans sur 6 ans des patients à risque de cancer, atteints de BPCO (maladie développée par les fumeurs). Des micro-embolies tumorales (petite masse de cellules cancéreuses circulants dans le sang) et des CTC exprimant la vimentine ont ainsi été retrouvées 1 à 4 ans avant que le scanner ne détecte les masses tumorales. Les patients opérés de façon précoce sont ainsi aujourd'hui considérés comme guéris (après 5 ans de suivi).

De même le diagnostic du cancer du poumon se fait classiquement au scanner. Or il y a 90% de faux positifs (étude sur 56000 sujets). Donc si un nodule est détecté, il faut attendre plusieurs mois puis observer à nouveau : si le volume de la masse a augmenté, une opération est demandée. Cependant le cancer du poumon est meurtrier : à 5 ans du diagnostic, seuls 10-12% des patients sont encore vivants.

Il est donc théoriquement possible de détecter le cancer invasif avant l'imagerie, mais il doit être capable d'envahir le sang.

Dans une récente publication, des scientifiques ont suivi 256 patients à risque de développer différents types de cancer, notamment cancer de l'ovaire, du sein, de la prostate, du rein, du poumon et mélanome. Ils ont trouvé des CTC chez la moitié de ces patients, et les ont suivis par imagerie. Seulement 10 mois après, des masses tumorales ont été détectées chez 20% des patients à l'imagerie → confirmation de ce qui a été dit précédemment.

Frontière de la science : l'organisme est-il capable d'éliminer les CTC lorsqu'elles sont encore peu nombreuses ? Les scientifiques ont coaché ces patients, leur mode de vie, rythme nyctéméral pour stimuler la réponse immune. Ils ont publié que le nombre de cellules tumorales diminuait et disparaissait suite à la stimulation du système immunitaire.

Dans la course mondiale pour la détection du cancer, une équipe a développé une méthode alliant analyse de l'AND libre et de certains marqueurs protéiques comme le PSA. Test positif chez 40% des cancers au stage précoce → ISET reste la seule méthode capable de détecter le cancer avant l'imagerie.

Abréviations :

CRC : cellules rares circulantes

CTC : cellules tumorales circulantes

NGS : next generation sequencing

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

CTC = cellules tumorales circulantes

CRC = cellules rares circulantes

Mot du RT :

Au prochain cours, le professeur parlera des cellules fœtales circulantes.

Le professeur a précisé que 10 ou 20% de la note sera constituée de la présentation d'un article en équipe de 10 élèves (possible à chaque cours, il suffit de préparer l'article).

FICHE RECAPITULATIVE

CRC : cellules circulantes dans le sang, n'étant pas physiologiquement d'origine sanguine, mais issues d'organes → **non tumorales** = physiologiques, issues de différents organes
→ **tumorales** = à l'origine des cancers métastasés

Processus de formation des métastases : formation d'amas de cellules tumorales → leur survie est possible grâce au processus d'**angiogenèse** = production de vaisseaux sanguins

: extravasation des cellules vers le sang → processus de

Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) = exposition de marqueurs mésenchymateux à la surface des CRC, afin de perdre les capacités d'adhérence caractéristiques des cellules épithéliales = expression de la **plasticité** des CTC

: si les CRC survivent au **changement de micro-**

environnement, les CRC arrivent dans un organe cible et forment des micrométastases puis des métastases après le processus de Mesenchymal to Epithelial Transition (MET) = exposition de marqueurs épithéliaux à la surface des cellules afin de retrouver les capacités d'adhérence

: certaines cellules restent en « **dormancy** » via la

sécrétion d'angiostatine par les cellules du cancer primitive → l'ablation du cancer primitif peut entraîner un phénomène de « réveil » des cellules en dormancy par suppression de la source d'angiostatine, potentialisant le phénomène métastatique

Méthode d'isolation des CRC : • Détection d'**ARN tumoral de CRC** dans le sang par RT-PCR

→ il n'existe pas de marqueur tumoral particulier ; on utilise des marqueurs de prolifération qui ne sont pas spécifiques des masses cancéreuses

→ phénomène de **transcription illégitime** = expression d'ARNm à bas bruit par des cellules qui ne devraient pas ; on perd donc en spécificité de l'examen

- Détection d'**antigènes épithéliaux** dans les cellules sanguines

→ cette méthode manque de spécificité, puisque les CRC tumorales mais aussi les cellules saines portent les antigènes épithéliaux, il y a donc de nombreux faux négatifs et faux positifs

- Oncoquick : méthode utilisant la centrifugation, mais trop peu spécifique et vite abandonnée

- Isolation by Size of Epithelial Tumor cells (**ISET**) : les CTC sont isolées grâce à un filtre de manière très sensible et spécifique → cette méthode est utilisée en **théranostic** (thérapie ciblée selon la mutation identifiée sur les CTC isolées)

La détection des CTC dans le sang permettrait d'améliorer la prise en charge des patients, en détectant les cancers avant que ceux-ci ne soient visibles en imagerie. Et l'analyse de CTC permettrait de mettre en place de thérapies ciblées et adaptées aux mutations oncogéniques de chaque patient. Cependant le ciblage de certaines mutations entraînera une sélection de clones porteurs d'une autre mutation, possiblement à l'origine de récurrence du cancer.