

## Les cellules tumorales circulantes (CTC)

### I. Terminologie et bref historique

**Tumeur** : prolifération de cellules de type bénigne ou maligne.

On a des *tumeurs primitives* (on parle de cancer du sein, cancer du poumon...) : c'est la tumeur qui est en place.

On a également les *métastases* qui sont les tumeurs qui se développent à distance de la tumeur primitive → c'est un 2<sup>ème</sup> site de prolifération.

**Les cellules tumorales circulantes constituent le lien entre la tumeur primitive et la métastase.**

Ces cellules transitent :

- par le **sang** (ex : cancer du poumon)
- ou par les **vaisseaux lymphatiques** (ex : cancer du sein → par les vaisseaux lymphatiques (les étages de Berg permettent de classer le niveau d'invasion ganglionnaire dans le cancer du sein)).

**Ce n'est pas parce que des cellules tumorales circulent dans le sang qu'elles vont donner des métastases !** Un grand nombre d'entre elles s'apoptosent et seulement un très **faible pourcentage** de ces cellules franchissent la barrière endothéliale et s'implantent dans les tissus. D'ailleurs certains d'entre nous ont sûrement des cellules tumorales qui circulent dans leur corps mais ce n'est pas pour autant qu'ils ont un cancer primitif ou qu'ils vont développer des métastases.

NB : On fait tous un jour ou l'autre un cancer mais des fois ce sont des micro-cancers c'est à dire des amas de 5 ou 6 cellules qui dérapent. L'organisme, grâce à son immunité innée (natural killer...), élimine ces cellules. **Les cellules tumorales circulantes ne sont donc pas toutes des cellules métastatiques !**

Dans le sang on peut avoir :

- ✓ Des **cellules tumorales qui circulent en colonie** → on appelle cela des micro-embolies et ce ne sont pas forcément des métastases.
- ✓ Des **cellules épithéliales circulantes** QUI NE SONT PAS FORCÉMENT DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES !!

Ex du pneumothorax :

Air dans la cavité pleurale avec douleur brutale basithoracique irradiant entre les 2 omoplates comme un coup de poignard associé à une toux sèche. On a des brèches vasculaires avec des **cellules épithéliales qui passent dans les vaisseaux mais ce ne sont pas des CTC !**

- ✓ des **cellules endothéliales circulantes.**
- ✓ des **cellules souches circulantes.**

Toutes ces cellules sont regroupées sous le nom de **Cellules Circulantes Non Hématologiques** = toutes cellules étrangères anormalement présentes dans le sang.

L'existence de cellules tumorales circulantes est un concept très ancien remontant à plus d'une centaine d'années. Elles furent décrites par un jeune cytopathologiste australien. Cependant ce concept a évolué permettant progressivement de **mieux comprendre l'histoire naturelle des cancers.**

NB : Ce concept a d'abord débuté par une période pré-clinique, période de recherche sans applications pour l'être humain.

S'en est suivie ensuite une période clinique et de développement c'est à dire que les chercheurs ont tenté d'utiliser leurs travaux sur les CTC à des fins thérapeutiques.

NB : Les CTC ont fait la première page de la célèbre revue Nord-Américaine Clinical Cancer Research (CCR).

La FDA a validé en 2004 l'utilisation de la technique CellSearch aux Etats-Unis pour le suivi des patients métastatiques alors qu'en France c'est toujours interdit : la technique de CellSearch n'est autorisée *qu'à des fins de recherche* !

En France il n'y a que 5 villes (dont Nice) qui étudient les CTC alors qu'en Allemagne on dénombre 251 centres d'étude. De même il n'y a que 53 articles parus en France à ce sujet tandis qu'on en dénombre plusieurs milliers Aux Etats-Unis.

## II. Périmètre

« Le sang est une poubelle ». On trouve un grand nombre de déchets de cellules. On a notamment :

- de l'**ADN libre circulant**.
- de l'**ARN libre circulant**.
- de l'**ARN non codant** dont les micro ARN circulants (séquences d'acides aminés qui vont se fixer à l'ARN messager et bloquer ainsi la synthèse protéique).
- des **biomarqueurs protéiques circulants**.

## III. Physiopathologie

Avant de former des métastases, les cellules tumorales circulantes quittent le foyer tumoral d'origine en se détachant de la tumeur primitive. Elles créent une **brèche dans un vaisseau** et **passent dans la circulation**.

NB : certaines tumeurs peuvent parfois engendrer des hémorragies internes lorsque les cellules tumorales forment une brèche dans une artère de diamètre important !

Lorsque les cellules passent dans un vaisseau il se produit le phénomène de **transition épithélio-mésenchymateuse** : les cellules perdent leur phénotype épithéliale et se transforment en cellules mésenchymateuse. Cela signifie que les cellules diminuent l'expression des protéines épithéliales (diminution des cytokératines) alors que des protéines spécifiquement mésenchymateuses sont exprimées (notamment les vimentines). Cela permet de **faciliter le déplacement des cellules tumorales circulantes dans le sang** : elles sont plus ***souples***, plus ***résistantes*** à la pression sanguine...

Lorsque les CTC arrivent à leur **lieu de métastase** elles subissent une **transition mésenchymo-épithéliale**. C'est le ***phénomène inverse*** au cours de laquelle les cellules perdent leur filament de vimentines et gagnent des filaments de cytokératine.

Les cellules tumorales ont donc un ***phénotype qui varie*** dans le temps.

NB : Il existe aussi des cellules dites « dormantes » qui peuvent dormir plusieurs années et se réveiller brutalement suite à un stress intense ou à une immunodépression par exemple.

Ex : un naevus (prolifération mélanocytaire bénigne) qui disparaît puis qui ressurgit quelques années plus tard sous forme de mélanome.

#### IV. Méthode de détection

Les cellules tumorales circulantes sont présentes en très faible quantité dans le sang : ce sont des évènements très **rares** → 3 ou 4 dans 10mL de sang. Pour détecter les CTC dans le sang il faut donc procéder à des méthodes d'enrichissement et de purification.

Il existe des méthodes indirectes et des méthodes directes :

- ⇒ **Méthodes indirectes** (c'est à dire qu'on ne voit pas la cellule) : comprennent les méthodes d'immunodétection et les méthodes de biologie moléculaire.
- ⇒ **Méthodes directes** (on peut voir la cellule au microscope) : comprennent les méthodes de séparation des cellules et les méthodes d'enrichissement des cellules.

Il y a environ une trentaine de méthodes mais seulement 2 nous intéressent : **la technique CellSearch et la technique ISET.**

Il existe 3 grands principes de détection des CTC qui nous permettent de les identifier :

- ❖ **les CTC sont plus grosses que les autres cellules du sang** : > 25-30 microns (Globule Rouge = 7 microns, Lymphocyte non activé = 9-10 microns, PNN non activé = 15-20 microns).
- ❖ **Les CTC sont plus denses que les autres cellules.**
- ❖ **Les CTC peuvent être captées par des anticorps.**

Technique	Technique CellSearch	Technique ISET → Isolation by Size of Epithelial Tumor cells
Méthode	Indirecte	Directe (surnommée « méthode Nespresso » par le prof)
Principe	<p>Le sang périphérique est prélevé dans un tube de 10mL.</p> <p>On réalise ensuite <u>3 enrichissements immunomagnétiques</u> successifs c'est à dire que l'on introduit successivement 3 types d'anticorps qui vont nous permettre de sélectionner les CTC par formation de complexe antigène-anticorps :</p> <p><b>1-</b> On introduit les <b>anticorps anti-EpCAM</b> qui permettent de sélectionner toutes les cellules épithéliales.</p> <p><b>2-</b> On introduit les <b>anticorps anti-cytokératine</b> qui permettent d'isoler les cellules ayant les filaments de cytokératine (par immunomarquage de fluorescence verte). On isole à ce niveau les CTC ET les monocytes qui possèdent également des cytokératines.</p> <p><b>3-</b> On introduit <b>l'anticorps anti-CD45</b> (qui réalise un immunomarquage de fluorescence rouge).</p> <p>Les galeries d'images obtenues sont ensuite <u>analysées par un observateur</u>.</p>	<p>Cette technique isole les CTC par <b>leur taille</b> car les CTC sont plus grosses que les autres cellules mais aussi par un mécanisme cytologique.</p> <p>Le sang est <b>filtré à pression négative</b> sur un <b>filtre contenant des pores de 8 microns</b> qui laissent passer toutes les cellules hématologiques et retiennent les grosses cellules. Les cellules hématologiques de plus de 8 microns parviennent à passer à travers les pores car ce sont des cellules souples ! <b>Les CTC sont retenues au niveau du filtre.</b></p>
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>👍 On peut <b>quantifier</b> les cellules tumorales circulantes</li> <li>👍 Le sang peut être utilisé jusqu'à <b>90h après son prélèvement</b> et peut donc être transporté</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>👍 <b>sensibilité</b> (capable de retrouver une cellule tumorale parmi 50.10<sup>9</sup> cellules présentes dans 10mL de sang !)</li> <li>👍 <b>spécificité</b></li> <li>👍 <b>analyse visuelle</b></li> <li>👍 <b>coût réduit</b> (40€ par patient)</li> <li>👍 <b>rapide</b></li> <li>👍 <b>analyse moléculaire potentielle</b></li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>👎 <b>coût élevé</b> (500 millions d'€ la machine puis 900€ par patient)</li> <li>👎 <b>variation inter observateur</b> : il est parfois difficile d'identifier l'image observée</li> <li>👎 <b>volume important des prélèvements</b> (7,5-10mL)</li> <li>👎 <b>problème de spécificité</b> car les cellules épithéliales détectées par la présence des cytokératines ne sont pas forcément des cellules tumorales (cela peut être des monocytes et la 3<sup>ème</sup> étape d'immunomarquage n'est pas toujours parfaite). De plus la transition épithélio-mésenchymateuse fait que certaines CTC n'expriment pas forcément à un moment donné les cytokératines. Et enfin les CTC observées ne sont pas toutes vivantes car un grand nombre subit l'apoptose donc il est difficile d'évaluer leur potentiel agressif.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>👎 <b>variation inter observateur</b></li> <li>👎 <b>difficile à quantification</b></li> <li>👎 <b>analyse dans les 2h</b></li> </ul>

#### IV. Caractérisation des CTC

Des questions se posent pour caractériser les CTC :

- Comment savoir si elles sont **malignes** ? Il n'y a **aucun moyen de savoir**, c'est très difficile. Peut être qu'elles ne font que circuler comme des navettes...
- Ont-elle un **phénotype d'organe** ? (ex. viennent de la prostate) **NON** elles se ressemblent toutes.
- Réponse aux **thérapeutiques ciblées** ? On cherche à trouver **dans les CTC des marqueurs biologiques prédictifs d'une réponse à une thérapie ciblée**, comme par ex. la mise en évidence d'une mutation (activatrice ou de résistance) du gène de l'EGFR. L'avantage avec les CTC c'est que **ça évite de faire des biopsies de tissus et donc de faire des actes invasifs**, effectivement avec les CTC on fait juste une **prise de sang** ! Permet notamment de *suivre l'évolution du patient* dans le temps sous traitement, le patient pouvant devenir résistant à tout moment alors que sa mutation permettait la mise en place d'une thérapie ciblée.

On va faire une **microdissection par capture laser sur filtre ISET** : on détache les cellules les unes des autres et on récupère l'ADN. Puis on amplifie par PCR et on analyse par CGH arrays (Comparative Génomique Hybridation sur puce à ADN).

- ➔ par CGH on voit qu'elles ont le même profil qu'une cellule cancéreuse : il y a des pertes ou des gains de segments chromosomiques.

On peut aussi **détecter les CTC apoptotiques** : Si on voit une cellule en apoptose on sait qu'elle ne va pas donner de métastases car elles sont mortes (mise en évidence avec **l'anticorps anti M 30**) donc pas agressive.

On peut directement mettre en évidence avec la cytokératine.

ADK ca fait des glandes, contrairement aux épidermoïdes. Pour les CTC pas d'orientation.

#### V. Les Cellules endothéliales circulantes

Il est paradoxal d'avoir des cellules endothéliales qui circulent dans le sang.

On regarde une tumeur du poumon et on fait un marquage de ce cancer avec un anticorps spécifiques des cellules endothéliales (**Ac CD31**) : on voit ainsi la richesse en cellule endothéliale lorsqu'on a une tumeur, la vascularisation d'un cancer est considérable.

On voit donc beaucoup de cellules endothéliales dans la **lumière des vaisseaux**, ce qui n'est pas habituel (normalement c'est uniquement dans la paroi des vaisseaux).

En médecine personnalisée, on a des **anti-angiogéniques** (médicaments qui ciblent les vaisseaux pour les empêcher de proliférer).

On pose en fait le dogme suivant : **si on bloque la vascularisation d'un cancer, on bloque sa progression**.

On va quantifier le nombre de cellules endothéliales circulantes chez les patients sous traitement et donc **si leur nombre diminue, ça veut dire que le traitement anti-angiogénique est efficace**.

La forme des cellules **endothéliales**- et **épithéliales**- circulantes est différente : respectivement **faucilles (ou bananes)** et **rondes**. Lorsqu'on fait un effort on a une augmentation du nombre de cellules endothéliales circulantes, et aussi (entre autre) une ↗ de 1 % des PNN.

## VI. Impact clinique : à la croisée des promesses et des déceptions

Les limites actuelles :

- multiplicité des méthodes et **absence de consensus** sur la méthode optimale.
- toutes les publications n'ont pas été faites de façon comparative sur des populations homogènes, on a du **mal à reproduire les résultats**.
- le **coût** des techniques, et à multiplier avec le nombre de fois où l'on pique le patient.
- les **faux positifs** et les **faux négatifs**.

On est encore à la lisière entre la recherche translationnelle et l'offre de soin.

## VII. Perspectives

Classiquement on considère le schéma : une *tumeur primitive grossit, il y a les cellules tumorales circulantes puis les métastases*.

En 2009 on a eu l'apparition du **dogme** suivant : **les cellules tumorales circulantes reviennent sur le lieu du crime, c'est-à-dire reviennent sur la tumeur primitive pour la faire grossir.**

Lorsqu'un chirurgien croit enlever un cancer en totalité, et qu'on a récurrence, ceci peut être expliqué par ces CTC car si des CTC sont présentes avant l'intervention elles reviennent sur le lit d'exercice chirurgical et elles repoussent.

On a isolé les CTC et on les a mis en culture : donc on a fait des petites tumeurs à partir des CTC. On a même injecté des CTC humaines chez la souris ce qui a donné des tumeurs chez ces souris, cela permet de mieux caractériser ces CTC.

On utilise les CTC par ex. dans le traitement personnalisé du cancer de la prostate (il n'y a pas que le poumon et le colon en fait pour l'intérêt des CTC).

D'autres équipes isolent les CTC pour regarder leur profil génomique pour savoir si ces CTC proviennent d'un cancer du sein ou du colon, etc.

La question que l'on peut se poser est la suivante : peut-on aller vers **une reclassification des stades pTNM ?** Dans cette classification le compartiment liquidien n'est pas représenté, donc on peut très bien envisager un stade T1 + CTC ou un stade T1 – CTC. Donc faire des stades **pTNM + ou – CTC.**

Les CTC ont donc un intérêt **diagnostic, pronostic** et **théranostic** (augmentation croissante des thérapies ciblées et personnalisées).

La biopathologie c'est l'intégration des connaissances sur les tissus mais aussi des connaissances sur les fluides.

Raison de détecter les CTC dans le cancer du poumon : on pourrait le détecter très précocement.

Lorsque l'on cherche la mutation du récepteur à l'EGF elle ne se détectera pas selon les zones de biopsie : c'est l'hétérogénéité tumorale.

Les cellules qui vont passer dans le sang auront toutes été **pré sélectionnées pour leur agressivité et c'est elles qui auront la mutation** : avec une prise de sang on peut contourner cette hétérogénéité tumorale (et aussi détecter lors du suivi régulier les mutations de résistances secondaires).

5% des patients avec KC du poumon ont un réarrangement ALK et **ça se détecte avec les CTC.**

A taille tumorale égale, si on a des CTC avant l'intervention chirurgicale, le pronostic est moins bon.

Est-ce que toutes les cellules que l'on détecte sont agressives et est-ce que les cellules les plus agressives sont celles que l'on ne détecte pas ?

*« Les choses les plus importantes sont souvent invisibles »*

### **VIII. Questions posées par le professeur en fin de cours :**

1. **Différence entre CTC et métastase ?** La cellule métastatique elle provient aussi de la tumeur primitive, elle circule dans le sang et va créer un foyer métastatique dans un autre organe alors que pour la CTC on n'est pas sûr du potentiel métastatique.
2. **Intérêt de détecter les cellules endothéliales ?** On suppose qu'il y a une augmentation des cellules endothéliales dans le sang lorsqu'il y a une tumeur, permet d'apprécier l'efficacité du traitement anti-angiogénique.
3. **Quel est l'intérêt de rechercher les mutations dans les CTC ?**
  - Quelqu'un qui a 75 ans, qui a une insuffisance respiratoire, qui a une tumeur qui repousse ne peut pas être anesthésié pour qu'on puisse aller lui chercher un morceau de tissu par endoscopie...
  - Quelqu'un qui fait une métastase dans un organe inaccessible à la ponction...
  - ... le fait de prendre un prélèvement sanguin pour aller chercher une mutation possible dans le sang évite donc de faire un geste invasif. Le bénéfice/risque est donc bien plus intéressant même si attention ça n'est pas encore validé en clinique.
4. **Phénomène de cell sealing :** c'est la réalimentation de la tumeur primitive par les cellules tumorales circulantes qui reviennent sur le lieu du crime.