



HAL
open science

Identification des cellules tumorales circulantes dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) de stade avancé : un facteur pronostique (étude CIRCUBRONCH) ?

Maéva Zysman

► To cite this version:

Maéva Zysman. Identification des cellules tumorales circulantes dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) de stade avancé : un facteur pronostique (étude CIRCUBRONCH) ?. Sciences du Vivant [q-bio]. 2013. hal-01770829

HAL Id: hal-01770829

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01770829>

Submitted on 28 Mar 2023

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement dans le cadre du
troisième cycle de Médecine Spécialisée
par

Maéva ZYSMAN

Le 4 Octobre 2013

**Identification des cellules tumorales circulantes dans
le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) de stade
avancé : un facteur pronostique (étude CIRCUBRONCH) ?**

Examineurs de la thèse :

Monsieur le Professeur Yves Martinet

Président du Jury

Monsieur le Professeur Gilbert Faure

Juge

Monsieur le Professeur Jean-Michel Vignaud

Juge

Madame le Docteur Christelle Clément-Duchêne

Juge



Président de l'Université de Lorraine :
Professeur Pierre MUTZENHARDT

Doyen de la Faculté de Médecine :
Professeur Henry COUDANE

Vice-Doyen « Pédagogie » : **Mme la Professeure Karine ANGIOI**
Vice-Doyen Mission « Sillon lorrain » : **Mme la Professeure Annick BARBAUD**
Vice-Doyen Mission « Finances » : **Professeur Marc BRAUN**

Assesseurs

- 1 ^{er} Cycle :	Professeur Bruno CHENUÉL
- 2 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 ^{ème} Cycle :	Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
• « <i>DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques</i> »	
• « <i>DES Spécialité Médecine Générale</i> »	Professeur Paolo DI PATRIZIO
- Commission de Prospective Universitaire :	Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE KORWIN
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Relations Internationales :	Professeur Jacques HUBERT
- Universitarisation des études paramédicales et gestion des mono-appartenants :	M. Christophe NEMOS
- Vie Étudiante :	Docteur Stéphane ZUILY
- Vie Facultaire :	Mme la Docteure Frédérique CLAUDOT
- Étudiants :	M. Xavier LEMARIE

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGÉ - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY
Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL – Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE
Jean-Louis BOUTROY - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT - François CHERRIER
Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS
Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH
Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ
Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET - Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE
Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN
Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX - Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE
Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN
Gilbert PERCEBOIS - Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL
Jean PREVOT - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER – Denis REGENT - Michel RENARD - Jacques ROLAND
René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Claude SIMON - Danièle SOMMELET
Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT- Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT
Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Gérard BARROCHE Professeur Pierre BEY - Professeur Patrick BOISSEL
Professeur Michel BOULANGE – Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Jean-Pierre CRANCE
Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeure Simone GILGENKRANTZ
Professeure Michèle KESSLER - Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD
Professeur Michel PIERSON - Professeur Michel SCHMITT - Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel
STRICKER Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeure Colette VIDAILHET - Professeur Michel
VIDAILHET Professeur Michel WAYOFF

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET – Professeur Christo CHRISTOV

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et Mycologie)

Professeure Marie MACHOUART

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeure Eliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT

Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT

Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN

Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT – Professeur Thierry FOLLIGUET

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY - Professeur Athanase BENETOS

Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET

Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO – Professeure Rachel VIEUX

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Olivier MOREL

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)
Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteure Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteure Aude MARCHAL – Docteur Guillaume GAUCHOTTE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Mathias POUSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET

3^{ème} sous-section : (Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales)

Docteure Sandrine HENARD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN

2^{ème} sous-section (Médecine et Santé au Travail)

Docteure Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ère} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))

Docteure Lina BOLOTINE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteure Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Docteure Anne-Claire BURSZTEJN

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)

Docteur Fabrice VANHUYSE

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Docteur Stéphane ZUILY

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Docteure Laure JOLY

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteure Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE

Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)

Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)

Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)

Professeure Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)

Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)

Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)

Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)

Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)

Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)

Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)

Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

REMERCIEMENTS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE JURY DE THESE,

Monsieur le Professeur Yves Martinet,

Chevalier de l'ordre de la légion d'honneur et Professeur de Pneumologie

Vous nous faites le grand honneur de juger et de présider cette thèse.

Nous vous sommes reconnaissantes de nous avoir accueillies dans votre spécialité avec la plus grande bienveillance et de nous avoir permises de bénéficier de votre expérience professionnelle pour ainsi appréhender avec enthousiasme ce travail de thèse.

Veillez trouver ici l'expression de nos plus vifs remerciements pour vos conseils, votre disponibilité et vos encouragements à la réalisation de nos projets tout au long de notre cursus.

Permettez-nous à travers ce travail de vous témoigner notre profond respect et notre très haute considération.

A NOTRE MAITRE ET JUGE,

Monsieur le Professeur Gilbert Faure,

Professeur d'Immunologie

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Votre participation active à ce projet a permis son aboutissement et je l'espère sa continuité future.

Nous souhaitons exprimer à travers votre présence, l'importance de la collaboration entre nos disciplines.

Soyez certain de notre profond respect, de notre considération et de notre sincère reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET JUGE,

Monsieur le Professeur Jean-Michel Vignaud,

Professeur d'Anatomie et cytologie pathologiques

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Recevez nos sincères remerciements pour votre intérêt pour cette thèse et votre enthousiasme pour la collaboration entre nos disciplines.

Veillez trouver en ce travail un modeste témoignage de notre reconnaissance pour votre disponibilité, votre expérience et votre savoir.

Soyez assuré de notre haute considération et de notre profond respect.

A NOTRE JUGE,

Madame le Docteur Christelle Clément-Duchêne

Docteur en pneumologie

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse.

Ce travail est bien entendu aussi le vôtre et n'aurait pas été possible sans votre investissement personnel pour l'avènement de ce projet.

Nous avons eu la chance de bénéficier de la richesse de votre expérience et nous vous remercions pour votre disponibilité, vos compétences et votre dynamisme.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre profond respect, de notre admiration et de notre sincère reconnaissance.

A MES MAITRES :

Monsieur le Professeur Chabot,

Je tiens à vous remercier sincèrement pour l'étendue de vos connaissances sans cesse transmises, votre encadrement constant, ainsi que pour la bienveillance que vous avez portée sur mon parcours d'interne tant en Lorraine qu'ailleurs. Grâce à vous, j'ai essayé d'apprendre la rigueur, la précision et la subtilité de cette spécialité. Avec toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Chaouat,

Merci pour votre enseignement qui souvent nous rappelle l'importance de la recherche clinique et fondamentale, permettant d'appréhender avec un enthousiasme constamment renouvelé notre belle discipline pneumologique.

Je remercie également Chen à l'origine de toute la partie technique, sans qui rien n'aurait été possible.

Je tiens à remercier également les différents praticiens hospitaliers qui, par leur présence et leur encadrement m'ont permis d'avancer pas à pas : les docteurs Billon, Corhut, Cornette, Gomez, Guillaumot, Kheir, Ménard, Vaillant.

Je tiens aussi à remercier le docteur Elizabeth Luporsi pour ses connaissances et ses conseils avisés, notamment méthodologiques, dans le vaste domaine des cellules tumorales circulantes.

A MA FAMILLE :

Papa et Maman : Vous m'avez tant donné. Même si une pudeur quelque peu familiale, m'empêche parfois de vous le dire, j'espère vous rendre un peu de cette gentillesse, de cette présence, bref de cet amour constant et indispensable dans ma vie, chaque jour.

Papi et Mamirène : votre discrétion ne manque jamais d'amour et de tendresse. (Papi, je suis heureuse de t'avoir en partie motivé pour arrêter de fumer ; ce n'est peut-être pas pour rien que je deviens aujourd'hui pneumologue).

Pépé Raymond : J'aurais tant aimé que tu sois là (« à moi de jouer ! »), et Mémé Edith : j'espère qu'il y a un tout petit peu de ta bonté légendaire en moi.

Tata Irène : j'espère que tu seras encore longtemps auprès de nous et Tonton Mouni : pour ta sagesse mythique.

Gilles : à toi mon oncle, signée ta cuisine et Marie-Pierre : pour tant de courage.

Marion : à toi ma cuisine chérie, le soleil brille dans tes yeux, merci. Micmac : qui fait briller encore un peu plus cet éclat.

Claudine : pour ton sourire, ma deuxième maman et Carlo, Sandrine et Elisa la jolie famille bordelaise.

Ginette et Jacky : merci d'être là. Bluma, merci d'être venue de si loin...

Gérard, Jocelyne, Alexandra, Jacquot pour votre présence.

Arnaud, Roseline, Céline, Delphine des amis de toujours.

Maeg, Claude et Michel pour votre sourire, votre amitié et tant de rires.

Huguette et Lionel, merci pour votre gentillesse et surtout pour me confier votre fils !

Mémé Rose, Pépé Léon mes racines.

A MES AMIS

Mes amis d'enfance : Caro, caca mon amie de toujours et POUR toujours. Loulou et Milou (et mini Lou), vous êtes dans mon cœur.

A mes nénettes : Elo, si courageuse et si solide, Béné si généreuse, Soso, si disponible, depuis toujours un soutien indéfectible dans toutes les situations que je tairais ici... puis à Eric (je pense à mes tiroirs !) et Olivier, puis, Tyty, Nono, Kyky et Christèle.

A mes sous-colleuses (Alix, Claire La Rousse, MInes) : Si j'en suis là, c'est forcément grâce à vous. Merci de m'avoir permis de ne pas craquer pendant ces « années ECN » ou l'écriture de cette thèse. Même si nous avons été réparties aux 4 coins de la France, je ne me sens que plus proche de vous.

Camille, un retour en force après une courte absence, c'est agréable !

A mes collocs : ChaCha, une fille formidable, Dédé, madame bonne humeur, malgré TOUT. J'espère que votre retour à la capitale ne vous éloignera pas. Constance, l'œil vif, forcément... Au moins tu restes en Lorraine, même si tu as choisi la Moselle.

A mes amis de Nancy :

Clo et Simon, dit les S'Go, (et à la Baltringue) un lien fort est né que j'espère cultiver au soleil des îles ou au coin d'une cheminée. Aicha, la pétillante, l'intelligente, la chaleureuse ... Cécile et Aurélien, votre dynamisme nous motive souvent. Thibaud, le vié, mon premier co-interne, ton accent me réchauffe le cœur et me manque et Bibi, tout pareil. Alain et Hélène toujours pleins de bonne humeur et d'entrain. Florent, de grands débats en attente. Aymeric, merci

pour ces bons moments. Romain, merci d'être présent. Micki, l'unique. Florence RENOLO, mon éternelle co-interne et amie. Alex, l'oisillon si rare, si fort et si fragile. Cyril merci pour la bonne humeur en radiothérapie. Catherine, petite externe devenue grande.

A mes collègues :

De Nancy : Ahmed, Antoine, Arnaud, Aurélie, Aurélien, Bérangère, Bertrand, Clarisse, Clémence, Dimitri, Elena, Fanny, François, Hélène (hdlb), Iuliana, Julie C, Julie P, Katia, Laura, Laure-Aléa, Magalie, Margot, Morgane, Raphaëlle, Riazate, Serge, Xavier.

Les infirmières de la TD2 à l'USIR (le meilleur semestre de mon internat, grâce aussi à vous !), du BPC4 à l'hôpital de jour (un dernier semestre chargé mais agréable grâce à vous !), les AS et ASH, les kinés : Merci !! Sans vous, rien ne va droit...

De Bobigny : Aude, Elodie à Créteil : Jorge Boczkowski, Laurent Boyer, Caroline, Marion, Mélissa, Philippe, Sandra, Sophie.

Docteur Simon, merci pour votre présence lors de mes premiers pas ainsi que pour mon premier stéthoscope qui m'accompagne encore, et une pensée pour le docteur Taieb et ses encouragements toujours gais et sincères.

A Xavier : l'amour de ma vie depuis 13 ans, depuis toujours en fait ET POUR TOUJOURS... toutes ces années du bac au concours de première année, en passant par le début de l'internat jusqu'à l'écriture de cette thèse, sont de plus en plus agréables, jour après jour, auprès de toi !

SERMENT

"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".

TABLE DES MATIERES

1.	INTRODUCTION	21
1.1.	JUSTIFICATION DE L'ETUDE	21
1.1.1.	Epidémiologie du cancer bronchique.....	21
1.1.2.	Facteurs de risque	21
1.1.3.	Histologie des cancers bronchiques	22
1.1.4.	Facteurs pronostiques	22
1.1.5.	Mode évolutif des cancers	23
1.2.	LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES (CTC).....	24
1.2.1.	Historique	24
1.2.2.	Spécificité des CTC.....	25
1.2.3.	CTC : facteurs pronostique et prédictif dans de nombreux cancers	26
1.2.3.1.	Carcinome mammaire	27
1.2.3.2.	Carcinome prostatique.....	27
1.2.3.3.	Carcinome colorectal.....	28
1.2.4.	Carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC).....	30
1.3.	OBJECTIFS	34
1.3.1.	Principal	34
1.3.2.	Secondaires	34
1.4.	CRITERES DE JUGEMENT	34
1.5.	RETOMBEES ATTENDUES.....	35
2.	METHODES	36
2.1.	LA POPULATION ETUDIEE	36
2.1.1.	Critères d'inclusion des sujets.....	36
2.1.2.	Critères de non inclusion.....	36
2.1.3.	Respect des bonnes pratiques cliniques	37
2.2.	PROCEDURES	38
2.2.1.	Méthode de détection des CTC par <i>CellSearch</i> , <i>Veridex</i> ®	38
2.2.1.1.	Préparation de l'échantillon	39
2.2.1.2.	Le système de détection <i>Cellsearch</i> , <i>Veridex</i> ®	40
2.2.2.	Evaluation de la sécurité	43
2.3.	AUTRES INFORMATIONS RECUEILLIES.....	44
2.4.	ANALYSE STATISTIQUE	45
2.4.1.	Méthodes statistiques prévues	45

2.4.2.	Nombre prévu de patients à inclure	45
2.5.	FINANCEMENT ET ASSURANCE	46
3.	RESULTATS.....	47
3.1.	DESCRIPTION DES RESULTATS	47
3.1.1.	Description de la cohorte de patients inclus.....	47
3.1.2.	Description des résultats après trois cures de chimiothérapie.....	50
3.1.3.	Illustration des résultats obtenus par <i>CellSearch</i>	51
3.2.	PREVALENCE ET VALEUR PRONOSTIQUE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES AVANT TRAITEMENT.....	53
3.2.1.	CTC et caractéristiques cliniques des patients	53
3.2.2.	CTC et caractéristiques tumorales.....	53
3.3.	VALEUR PRONOSTIQUE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES APRES TROIS CURES DE CHIMIOETHERAPIE OU THERAPEUTIQUE CIBLEE	55
3.3.1.	Description des résultats	55
3.3.2.	Seuil de positivité à 2 CTC/7,5ml de sang.....	57
3.3.2.1.	CTC et caractéristiques cliniques.....	59
3.3.2.2.	CTC et caractéristiques tumorales.....	60
3.3.2.3.	CTC et survie	61
4.	DISCUSSION	62
4.1.	SYNTHESE DES RESULTATS	62
4.2.	DISCUSSION METHODOLOGIQUE.....	63
4.2.1.	Généralités : discussion de la technique de détection immunomagnétique.....	63
4.2.1.1.	Principes généraux	63
4.2.1.2.	Marqueurs utilisés.....	64
4.2.1.3.	Immunofluorescence.....	66
4.2.1.4.	Autres techniques utilisables	66
4.2.2.	Discussion du choix du seuil	67
4.2.3.	Cas particulier du cancer bronchique.....	68
4.3.	DISCUSSION DES RESULTATS.....	69
4.3.1.	Nombre de CTC.....	69
4.3.2.	Principales avancées potentielles à l'utilisation des CTC dans la prise en charge des cancers broncho-pulmonaires.....	69
4.3.2.1.	Lien probable entre nombre de CTC et agressivité de la pathologie	69
4.3.2.2.	Utilité de cette nouvelle technique dans l'arsenal du suivi des cancers bronchiques..	71

4.3.3.	Points à clarifier avant son utilisation en routine	71
4.4.	PERSPECTIVES.....	72
4.4.1.	Poursuite des inclusions	72
4.4.2.	Etude ultérieure de biomarqueurs d'intérêt.....	72
5.	CONCLUSION	73
6.	ANNEXE	75
6.1.	Indice de performance de l'Organisation Médicale de la Santé (OMS) ou Performans Status	75
6.2.	Classification TNM du cancer bronchique	76
6.3.	Rythme des inclusions dans l'étude CIRCUBRONCH pour les cinquante premiers patients.	77
6.4.	Exemple de rendu de résultats pour patient n°40 après 3 cures, avec <i>Celltracks</i> ®	78
7.	BIBLIOGRAPHIE.....	79

1. INTRODUCTION

1.1. JUSTIFICATION DE L'ETUDE

1.1.1. Epidémiologie du cancer bronchique

Le cancer bronchique primitif est de longue date la première cause de mortalité par cancer, à la fois dans les pays dits développés et dans le monde en voie de développement. Son incidence mondiale est supérieure à 1 millions de cas [1], avec en 2008, 1,61 millions de cas et 1,38 millions de décès soit 18,2 % du total des décès par cancer [2]. En Europe, l'incidence du cancer bronchique est au troisième rang, derrière le cancer colorectal et le cancer du sein, avec 391 000 cas soit 12,2 % du total des cancers. Il reste la première cause de mortalité par cancer avec un total de 342 000 décès soit 19,9 % du total des décès par cancer [3]. En France, le cancer bronchique primitif a été responsable de 26 624 décès pour 30 651 nouveaux cas, en 2005 [4]. Son pronostic reste désastreux avec une survie à 5 ans estimée à moins de 15 % tout type confondu [5], dépendant largement du stade de la maladie : 49 % pour une maladie locale, 16 % lors d'une extension régionale et 2 % au stade métastatique [6]. Seulement 16,7 % de ces cancers bronchiques sont localisés au diagnostic ; et, même dans ces stades localisés : I et II, 20 à 40 % des patients vont rechuter et décéder de leur maladie [5, 6].

1.1.2. Facteurs de risque

Les facteurs de risque classiques sont le tabagisme actif démontré lors d'une des premières études épidémiologiques des années 1950 [7]. Plus tard, ont été découverts d'autres facteurs de risque environnementaux comme le tabagisme passif [8], ou l'exposition professionnelle : 2,5 % chez l'homme et 0,3 % chez les femmes de l'ensemble des cancers en France sont d'origine professionnelle. Les cancers bronchiques représenteraient 75 % de

l'ensemble des décès par cancer imputable à l'exposition professionnelle [9]. Les principaux agents incriminés sont : l'amiante [10], la silice [11], plusieurs métaux lourds (nickel, chrome, cadmium) [12], les peintures [13]... Il existe également des carcinogènes domestiques à l'origine de pollution intérieure aux premiers rangs desquels le radon, en Europe [14]. Enfin, il existe certains patients chez qui on ne retrouve pas de facteur de risque environnemental, mais des « particularités biologiques » (mutation activatrice de l'EGF-R (*epidermal growth factor receptor*), réarrangement EML4-ALK (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase*), mutation B-RAF...).

1.1.3. Histologie des cancers bronchiques

Le cancer bronchique se divise en deux groupes histologiques principaux : le carcinome bronchique à petites cellules (CPC, environ 20 % des cas) et le carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC), lui-même réparti en 2 grands types histologiques : adénocarcinome et carcinome épidermoïde, puis plus rarement carcinome à grandes cellules, carcinome indifférencié...

1.1.4. Facteurs pronostiques

Plusieurs facteurs de mauvais pronostic sont connus : des éléments clinico-radiologiques : sexe masculin, âge avancé, performans status (PS, Annexe n°1.1) supérieur ou égal à 2, perte de poids supérieure à 10 %, stade TNM (tumor node metastase, Annexe n°1.2) élevé [6, 15], et biologiques : diminution du taux d'hémoglobine, d'albumine ou de protéines, thrombocytose, hypercalcémie ou élévation du taux de LDH [15, 16]. Pourtant, il n'existe pas de marqueurs biologiques prédictifs, spécifiques de la maladie.

Il est actuellement impossible de discerner de manière fiable les patients présentant un mauvais pronostic de ceux potentiellement curables. En effet, les techniques d'imagerie

sont insuffisantes pour diagnostiquer des micrométastases [17] et, de ce fait, l'identification précoce de cibles diagnostiques et thérapeutiques, avant qu'elles ne présentent un retentissement clinique est en enjeu majeur pour améliorer le pronostic de ces patients.

1.1.5. Mode évolutif des cancers

L'apparition de métastases correspond au franchissement par des cellules tumorales des étapes successives du processus de dissémination : invasion locale, passage des cellules tumorales circulantes (CTC) dans la circulation sanguine, arrêt des CTC et extravasation, dormance des cellules tumorales disséminées (ou micrométastases) et prolifération cellulaire conduisant à la formation de métastases (fig. 1) [18].

POINTS CLES :

- Le cancer bronchique reste de **mauvais pronostic**.
- Une **évaluation précoce** à l'aide d'un marqueur facilement accessible, **pronostique et prédictif**, pourrait modifier la prise en charge des patients.

1.2. LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES (CTC).

Les CTC sont, vraisemblablement, des cellules issues de la tumeur primitive, circulant dans le sang (fig. 1). En effet, des études cytogénétiques ont identifié un patrimoine génétique similaire entre les deux [19].

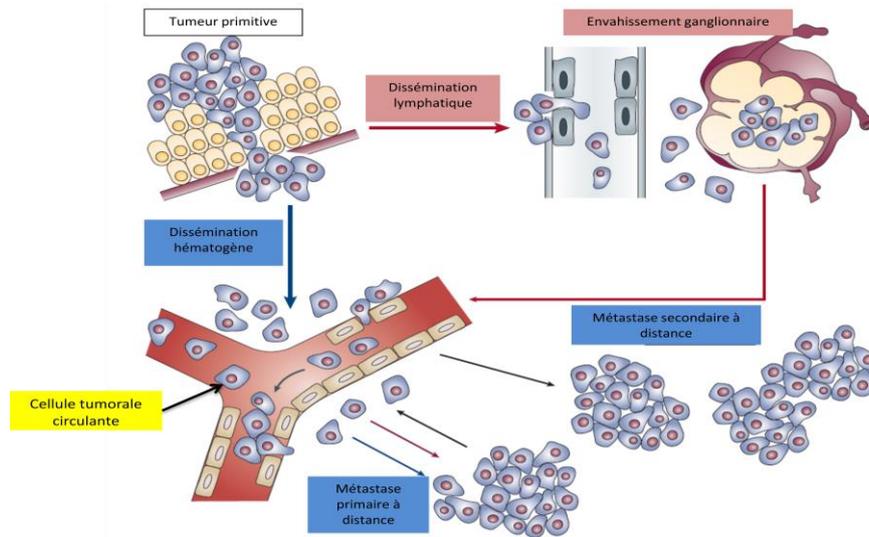


Figure 1 : Mécanismes de développement des métastases, d'après Pantel *et al.*, *Nature* 2004 [17]

De ce fait, les CTC pourraient représenter un biomarqueur pharmacodynamique pronostique et prédictif de l'évolution de la réponse thérapeutique. La numération de CTC serait alors un moyen de suivre l'efficacité des traitements quasiment en temps réel, de guider le pronostic, de mesurer la réponse thérapeutique, de sélectionner des patients pour un traitement plus agressif (ex. : chimiothérapie adjuvante), de détecter plus précocement une rechute, etc. ...

1.2.1. Historique

La détection des CTC a intéressé les chercheurs depuis plus d'un siècle, notamment dès 1869, date à laquelle Ashworth décrivait pour la première fois des cellules présentes dans le sang, similaires aux cellules de la tumeur d'un patient, à l'autopsie [20]. Puis, en 1955, Engell décrivait l'existence de CTC dans plusieurs carcinomes différents [21]. Par la suite,

nombres d'équipes ont travaillé sur l'exploration de ces CTC via plusieurs techniques différentes. L'étude cytologique par simple microscopie permettait alors de détecter des CTC avec une sensibilité et une spécificité très faible de l'ordre de 1 % [22], d'où la nécessité d'attendre le développement de techniques modernes plus précises comme l'immunocytochimie ou la PCR (*polymerase chain reaction*) vers le milieu des années 80.

1.2.2. Spécificité des CTC

Une des difficultés majeures rencontrées est la rareté des CTC par rapport aux cellules sanguines : environ 1 CTC pour 10^9 cellules sanguines totales, concentration très inférieure au seuil de détection des techniques usuelles (comme la cytométrie en flux) ; d'où la nécessité de développer des techniques de plus en plus sophistiquées. La détection des CTC doit donc faire appel à des techniques hautement sensibles (peu de CTC) et encore plus hautement spécifiques (beaucoup de cellules sanguines).

Nous avons décidé, ici, d'utiliser une méthode immunomagnétique puis reconnaissance par fluorescence, appelée *CellSearch System*, développée par Veridex® qui présente une très grande spécificité et a déjà été validée dans de nombreuses études. Avec cette technique, Allard *et al.* décrivaient que, sur 145 donneurs sains et 199 patients atteints de pathologies non malignes, seul un patient présentait un taux de cellules détectées supérieur à 2 par 7,5 ml de sang [23] (Tableau 1) ; même constatation par l'équipe de Nagrath retrouvant une spécificité de 100 % sur 20 donneurs sains testés [24].

Nombre de CTC dans 7,5ml de sang de donneurs sains, de patients atteints de pathologies non malignes ou de différents carcinomes

Subject	No. of patients	No. of specimens	Mean \pm SD	Median with ≥ 2	No. (%) ≥ 2	No. (%) ≥ 5	No. (%) ≥ 10	No. (%) ≥ 50
Healthy	145	145	0.1 \pm 0.2	N/A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Nonmalignant	199	199	0.1 \pm 0.3	3	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Metastatic cancer type								
Prostate cancer	123	188	75 \pm 333	13	107 (57)	77 (41)	61 (32)	27 (14)
Unknown cancer	11	27	16 \pm 35	13	14 (52)	13 (48)	8 (30)	2 (7)
Ovarian cancer	29	53	6 \pm 16	9	20 (38)	12 (23)	9 (17)	1 (2)
Breast cancer	422	1316	84 \pm 885	10	489 (37)	340 (26)	256 (19)	129 (10)
Gastric cancer	9	13	24 \pm 83	3	4 (31)	1 (8)	1 (8)	1 (8)
Colorectal cancer	196	333	4 \pm 11	5	99 (30)	56 (17)	30 (9)	5 (2)
Bladder cancer	7	7	42 \pm 107	146	2 (29)	2 (29)	1 (14)	1 (14)
Renal cancer	11	12	1 \pm 1	2	3 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<u>Lung cancer</u>	99	168	30 \pm 178	9	<u>34 (20)</u>	<u>24 (14)</u>	<u>16 (10)</u>	<u>10 (6)</u>

Tableau 1 : Nombre de CTC chez des donneurs sains, des patients atteints de pathologies non malignes ou de différents types de carcinomes (prostatique, ovarien, mammaire, gastrique, colorectal, vésical, rénal, pulmonaire, origine inconnue), d'après Allard *et al.* [23]

1.2.3. CTC : facteurs pronostique et prédictif dans de nombreux cancers (Tableau 2)

Plusieurs études antérieures dans les cancers du sein, de la prostate et du côlon ont démontré la signification pronostique des CTC. De plus, l'évolution du nombre de celles-ci au cours des traitements met en lumière le potentiel des CTC en tant que biomarqueur prédictif. On détecte au moins 2 CTC dans 7,5ml de sang dans, en moyenne, 36 % des prélèvements issus de patients atteints de cancers métastatiques avec une moyenne de 60 CTC/7,5ml, mais ces chiffres semblent très disparates d'un type de cancer à un autre [23] : 57 % des cancers prostatiques, 37 % des cancers du sein, 37 % des cancers ovariens, 30 % des cancers colo-rectaux, 20 % des cancers bronchiques (Tableau 1).

Par ailleurs, le nombre de CTC représente un facteur pronostique dans de nombreux cancers [25, 26]. En effet, l'implication des CTC dans la formation de métastases à distance est souvent évoquée (fig. 1) [17, 27]. Ainsi, plusieurs études ont envisagées une corrélation entre l'évolution du nombre de CTC et :

- l'évolution du volume tumoral (coefficient de corrélation 0,68 ; $p=0,03$, fig. 2) [24],
- la survie sans progression ou de la survie globale [28, 29, 30, 31, 32],
- la réponse à la chimiothérapie.

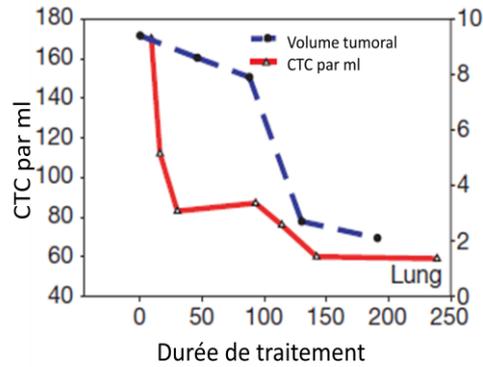


Figure 2 : Exemple d'évolution en fonction du temps, des CTC/ml et du volume tumoral, selon les critères RECIST, dans le cancer broncho-pulmonaire, selon Nagrath *et al.* [24]

1.2.3.1. Carcinome mammaire

Dans une étude de Cristofanilli *et al.* [30] réalisée chez 177 femmes atteintes de cancer du sein métastatique, les patientes présentant au moins 5 CTC/7,5ml de sang avaient une survie sans progression et une survie globale diminuée : respectivement 2,7 [2,1 ; 4,4] contre 7 mois [5,8 ; 8,9] ($p < 0,0001$) et 10,1 [6,3 ; 14,6] contre 18 mois [14,6 ; >18] ($p < 0,0001$), indépendamment du temps jusqu'à progression, du site métastatique ou du statut hormonal. De plus, ils confirmaient la bonne spécificité de la technique en montrant que des femmes sans pathologie tumorale présentaient en moyenne 0,1 +/- 0,2 cellules détectées/7,5ml, soit une présence d'événements chez 1 % des 345 femmes testées (dont aucune avec >3 cellules/7,5ml). Les femmes atteintes d'une pathologie mammaire bénigne présentaient des résultats similaires (en moyenne 0,1 +/- 0,9 cellules/7,5ml).

1.2.3.2. Carcinome prostatique

Sur 37 patients atteints de cancer prostatique métastatique, traités ou non par hormonothérapie, la survie était significativement plus longue 21,7 contre 11,5 mois ($p = 0,002$) quand le nombre de CTC détectées était inférieur à 5 [33]. De même, dans une

autre étude portant sur 63 patients atteints de cancer de la prostate en progression et hormono-résistants (et 17 témoins), 65 % des patients avaient plus de 5 CTC/7,5ml.

1.2.3.3. Carcinome colorectal

Par ailleurs, dans une étude de Cohen *et al.*, sur 430 cancers colorectaux métastatiques, quelque soit la ligne thérapeutique, un nombre de CTC supérieur à 3/7,5ml de sang faisait passer la survie sans progression de 7,9 à 4,5 mois ($p=0,0002$) et la survie globale de 18,5 à 9,4 mois ($p<0,0001$). La discrimination pronostique était encore meilleure en prenant en compte la variation des CTC entre deux prélèvements et non la valeur absolue [³⁴], même après exclusion des facteurs pronostiques cliniques intriqués [³⁵].

La capacité à détecter les CTC présente donc un grand intérêt dans différentes tumeurs (cancers mammaires, prostatiques et colorectaux) permettant de classer les patients selon leur pronostic et leur potentielle réponse aux différentes chimiothérapies.

POINTS CLES :

- Les CTC seraient un moyen de **suivre** l'efficacité des traitements, de guider le pronostic, de mesurer la réponse thérapeutique, de sélectionner des patients pour un traitement plus agressif, de détecter plus précocement une rechute...
- L'intérêt des CTC a été **démonstré dans les carcinomes mammaires, prostatiques et colo-rectaux.**

Tableau 2 : Récapitulatif des études concernant les CTC dans les cancers du sein, de la prostate et du côlon, citées dans le texte
 CCR : cancer colorectal, CK : cytokeratines, CTC : cellules tumorales circulantes, PCR : *polymerase chain reaction*, SSP : survie sans progression, SG : survie globale, ttt: traitement

	Etudes	Références dans le texte	Type de cancer	Nombre de patients inclus	Seuil	Technique	Résultats	Survie globale (SG)	p	Survie sans progression (SSP)	p	Remarques
Carcinomes mammaires	Cristofanilli et al., <i>NEJM</i> 2004	[30]	cancers du sein métastatiques	177, PS = 0 à 2	5	Veridex		10,1 [6,3;14,6] contre 18 mois [14,6;18]	p<0,0001	2,7 [2,1;4,4] contre 7 mois [5,8;8,9]	p<0,0001	facteur prédictif de SSP et SG
	Allard et al., <i>Clin Cancer Res</i> 2004	[23]	cancers du sein métastatiques	422		Veridex	CTC>2:37 %, CTC>5:26 %, CTC>10:19 %					
	Cristofanilli et al., <i>JCO</i> 2005		cancers du sein métastatiques	177 dont 83 en 1ère ligne	5	Veridex		AVANT TTT : 14,2 contre >18 mois / à 1 mois du début du TTT ; 2,1 contre 8,9 mois	p=0,0048/ p=0,007	AVANT TTT : 4,9 contre 8,9 mois / à 1 mois du début du TTT ; 11,1 contre >18 mois	p=0,0014	facteur prédictif de SSP et SG, surtout en l'absence de récepteurs hormonaux
	Hayes et al., <i>Clin Cancer Res</i> 2006	[31]	cancers du sein métastatiques	177	5	Veridex						facteur prédictif de SSP et SG, que le dosage soit fait avant ttt ou après 1 cure de chimiothérapie
Carcinomes prostatiques	Moreno et al., <i>Urology</i> 2005	[33]	cancer prostatique métastatiques	37	5	Veridex	CTC>2:95 %, CTC>5:62 %, CTC>10:27 %	0,7 contre 4 ans	p=0,002	11,5 contre 21,7 mois	p=0,002	
	Allard et al., <i>Clin Cancer Res</i> 2004	[23]	cancer prostatique métastatiques	123		Veridex	CTC>2:57 %, CTC>5:41 %, CTC>10:32 %					
carcinomes colorectaux (CCR)	Denis et al., <i>Int J Cancer</i> 1997	[25]	CCR tout stade	23		PCR CK 8, 19, 20 et séparation immunomagnétique	2 stades A : 0CTC+ 8 stades B : 2CTC+ 8 stades C : 6CTC+ 5 stades D : 4CTC+					
	Hardingham et al., <i>Int J Cancer</i> 2000	[26]	CCR opérables	94		RT PCR CK 19, 20, MUC1, MUC 2	19/94 : CTC+ soit 20% des patients	Stade Dukes C : HR=2,8 [1,169;6,716]	p=0,02			
	Allard et al., <i>Clin Cancer Res</i> 2004	[23]	CCR métastatiques	196		Veridex	CTC>2:30 %, CTC>5:17 %, CTC>10:9 %					
	Cohen et al., <i>Clin colorectal cancer</i> 2006		CCR métastatiques	50		séparation immunomagnétique, cytométrie en flux/microscopie fluorescenceCK+CD45-	nb médian de CTC=2, corrélation intensité moyenne de fluorescence et progression tumorale					seuil de 5 pour distinguer différence de SSP et SG
	Cohen et al., <i>JCO</i> 2008	[34]	CCR métastatiques	430	3			9,4 à 18,5 mois	p<0,0001	4,5 à 7,9 mois	p=0,0002	facteur prédictif indépendant de SSP et SG

1.2.4. Carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC) (Tableau 4)

Dans les CBNPC, il existe moins de données dans la littérature concernant l'impact des CTC sur le pronostic et la prise en charge. La recherche des CTC dans le cancer bronchique pourrait s'appliquer aux stades précoces (I et II) afin d'identifier des patients à haut risque de récurrence et donc moduler la prise en charge thérapeutique et la surveillance. Concernant les stades plus avancés (III et IV), la recherche de CTC et le suivi de leur cinétique pourraient permettre d'évaluer plus précocement le pronostic et la réponse aux traitements (valeur prédictive) ou l'échappement thérapeutique.

Une des premières études sur le sujet avait inclus en 1998, 86 patients atteints de cancer bronchique (47 adénocarcinomes, 24 carcinomes épidermoïdes, 15 carcinomes à petites cellules) et montrait d'une part, que l'identification de CTC, par PCR, était possible dans 41 % des adénocarcinomes, 41 % des carcinomes épidermoïdes et 27 % des CPC et, d'autre part qu'il existait une corrélation entre la quantité de CTC en RT-PCR et le pronostic d'une part, et d'autre part, la réponse aux traitements [36]. D'autres études ont confirmé que le nombre de CTC détectées était corrélé au stade de la maladie (AUC ROC = 0,783 ; $p < 0,001$) [37], voire au volume tumoral [38]. En effet, sur 47 échantillons de patients atteints de cancer bronchique, des CTC étaient détectées chez 67 % des patients avec un stade I/II, 72 % stade III et 83 % des patients en rechute. De plus, Krebs *et al.* ont montré, sur 101 patients porteurs de CBNPC stades III et IV, en première ligne de chimiothérapie, avant et après un cycle de chimiothérapie, qu'il existait 21/101 (21 %) prélèvements avec ≥ 2 CTC/7,5ml dont 19/60 (32 %) stade IV, 2/27 (7 %) stade IIIB et 0 stade IIIA. Il existait un nombre plus important de CTC lors d'atteintes hépatique ou osseuse par rapport aux autres métastases. De plus, en analyse multivariée, un nombre de CTC $\geq 5/7,5$ ml de sang était un facteur prédictif indépendant de survie globale avec un risque relatif de 7,92 [2,85 - 22,01 ;

$p < 0,001$]; et ce d'autant plus que le prélèvement retrouvait toujours ≥ 5 CTC/7,5ml après un cycle de chimiothérapie (RR=15,65 [3,63 - 67,53 ; $p < 0,001$]). La probabilité post-test de décès à 6 mois lorsque le taux de CTC était supérieur ou égal à 5, était de 93 % contre 29 % si ce taux était inférieur à 5. Enfin, un changement dans le nombre CTC avant et après le premier cycle de chimiothérapie était hautement prédictif de la survie sans progression et de la survie globale [39]. Enfin, il a été démontré que, sur 55 prélèvements de patients atteints de CBNPC, la détection de CTC présentait une valeur prédictive de réponse aux traitements en utilisant les critères RECIST d'évaluation scanographique de la réponse, avec un coefficient de corrélation de 0,68 ($p = 0,03$) [40].

Cependant, un des facteurs limitant l'utilisation des CTC en routine dans l'évaluation du cancer broncho-pulmonaire est sa grande variabilité entre les différentes études, selon les critères de recrutement, les techniques utilisées (PCR, *CellSearch*...), le seuil choisi, la population étudiée... On retrouve une fréquence de positivité de CTC dans le cancer bronchique très variable d'une étude à l'autre : de 20 à 52 % avec un seuil de 2 CTC/7,5ml (Tableaux 1 et 3) [24], selon les études.

Cohort	Total no. of samples	Range of CTCs per mL				Samples with >5 CTC per ml (%)
		5-20	20-50	50-100	>100	
		No. of samples (%)				
Healthy subjects	20	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
Lung cancer	55	11 (20)	11 (20)	11 (20)	22 (40)	100

Tableau 3 : Nombre de 1) sujets sains et de 2) patients atteints de cancer broncho-pulmonaire présentant un prélèvement de CTC positif, selon différents seuils. Nagrath *et al.* [24]

Nous avons décidé d'étudier, ici, de manière prospective, si la présence de CTC dans le sang de patients atteints de CBNPC à un stade localement avancé (IIIB) ou métastatique (IV), par la technique *CellSearch*, validée précédemment, présentait un intérêt pour le suivi des patients et la réponse aux traitements. Les perspectives seraient de savoir si la présence de ces CTC doit influencer la prise en charge thérapeutique du patient. La prise en charge

doit-elle être plus agressive (chimiothérapie adjuvante ?) ou le suivi plus exhaustif en fonction du nombre de CTC dépisté ?

POINTS CLES :

- L'énumération des CTC dans le cancer bronchique pourrait avoir une **valeur pronostique et prédictive** de réponses aux traitements.
- La détection des CTC pourrait avoir un impact dans la prise en charge des patients atteints de cancer bronchique.

Etudes	Références dans le texte	Type de cancer	Nombre de patients inclus	Seuil	Technique	Résultats	Survie globale (SG)	p	Survie sans progression (SSP)	p	Remarques
Peck et al., <i>Can Res</i> 1998	[36]	CBP	86 patients (47 adénocarcinomes, 24 carcinomes épidermoïdes, 15 carcinomes à petites cellules)	1	PCR, CK19	41 % des adénocarcinomes, 40 % des carcinomes épidermoïdes et 27 % des CPC		non disponible			Augmentation du nombre de CTC avec stade de la maladie
Allard et al., <i>Clin Cancer Res</i> 2004	[23]	tout type de cancers	99 patients avec CBP	2	Veridex	CTC>2: 20 %, CTC>5: 14 %, CTC>10: 10 %		non disponible			
Nagrath et al., <i>Nature</i> 2007	[24]	tout type de cancers	116 échantillons		CTC-chip	CTC entre 5 et 20 : 20 %, CTC entre 20 et 50 : 20 %, CTC entre 50 et 100 : 20 %, CTC>100 : 40 %		non disponible			
Maheswaran et al., <i>NEJM</i> 2008	[32]	CBNPC métastatiques	27 CBNPC dont 20 avec mutation EGFR		CTC-chip	nombre de CTC médian :74/ml [5-771], détection EGFR muté sur CTC 19/20		non disponible			
Tanaka et al., <i>Clin Cancer Res</i> 2009	[37]	CBP	125 CBP dont 94 métastatiques		Veridex	CTC +: 30,6 % des CBP, CTC>2 : 16,8 % tout stade confondi. Si stade IV, CTC>2: 41,4%		non disponible			CTC + dans 12 % des pathologies non malignes, mauvais marqueur diagnostic (ROC=0,598). Corrélation au stade de la maladie (r=0,783)
Wu et al., <i>J Thorac Oncol.</i> 2009	[38]	CBP	47 patients (dont 6 récidives) : 3 stade I-II, 22 stade III, 22 stade IV et 27 adénocarcinomes, 7 épidermoïdes, 13 CPC	2	IF : CK18 et 19 après déplétion cellules sanguines	67 % des patients avec un stade I/II, 72 % stade III 83 % des patients en rechute		non disponible			Corrélation au volume tumoral, diminution de la sensibilité si augmentation du seuil à 5
Krebs et al., <i>J Clin Oncol</i> 2011	[39]	CBNPC, stades III et IV, en première ligne de chimiothérapie	101 patients	2	Veridex	21 % dont stade IV : 32 %, stade IIIB : 7 % et stade IIIA : 0 %					Association avec atteinte hépatique et osseuse
				5	Veridex		AVANT TTT : 4,3 contre 8,1 mois, risque relatif =7,92 [2,85-22,01] / APRES 1 CURE : 3,9 contre 8,8 mois	p<0,001/ p<0,001	AVANT TTT : 2,4 contre 6,8 mois/ APRES 1 CURE : 2,4 contre 6,9 mois	p<0,001 / p=0,005	Facteur prédictif indépendant de SG le plus fort (HR=7,92[2,85;22,01] ; p<0,001). Probabilité post-test de décès à 6 mois : 93 % si CTC >5/ 29% si CTC<5
Sequist et al., <i>J Thorac Oncol</i> 2009	[40]	CBNPC	55 patients		CTC-chip	CTC+ : 20 % des patients, > 6CTC: 6 % des patients		non disponible			Prédictif de réponse aux ttt (r=0,68)
Hofman et al., <i>Clin Can Res</i> 2011		CBNPC opérables	208 patients / 247 échantillons		ISET	CTC + : 49 %					Association avec diminution SG et SSP
Krebs et al., <i>J Thorac Oncol</i> 2012	[49]	CBNPC, stade III et IV, en première ligne	40	2	Veridex	CTC +: 23 %					CTM +: 53 % dont stade IV : 10/23, IIIB : 5/12, IIIA : 0/5
				1/ml	ISET	CTC + : 80 %		non disponible			
Hou et al., <i>J Clin Oncol</i> 2012		CPC	97	50	EpCAM, CK8, 18,19+ et CD45	CTC + : 85%	5,4 contre 11,5 mois	p=0,002			
Naito et al., <i>J Thorac Oncol</i> 2012		CPC	51	2	Veridex	CTC>2: 68,6 %					CTC = élevées si métastases

1.3. OBJECTIFS

1.3.1. Principal

L'objectif principal a été de décrire le profil évolutif de la cinétique des CTC, mesurées par la technique *CellSearch* de Veridex®, au cours de l'évolution des CBNPC de stades localement avancé ou métastatique (IIIB, IV), au diagnostic et après trois cures de chimiothérapie ou thérapies ciblées. Il s'agit d'une étude préliminaire après inclusion des cinquante premiers patients.

1.3.2. Secondaires

Nous avons également cherché à évaluer si :

- les caractéristiques épidémiologiques individuelles de chaque patient étaient associées à la présence de CTC,
- les différentes caractéristiques tumorales (stade, taille, nombre et localisation métastatique) étaient liées au nombre de CTC
- si la présence ou le nombre de CTC présentaient une valeur pronostique au diagnostic.
- Si la cinétique du taux de CTC présentait une valeur prédictive de réponse aux traitements par chimiothérapie ou thérapie ciblée.

1.4. CRITERES DE JUGEMENT

Le critère principal de jugement a été la détection de CTC dans le sang de patients atteints de CBNPC localement avancé ou métastatique et l'évolution de la cinétique des CTC après trois cures de traitement. Le seuil de positivité du test, établi selon la littérature, a été fixé à au moins 2 CTC/7,5ml de sang prélevé.

Les critères d'évaluation secondaires ont été l'identification d'un profil des CTC en fonction de la clinique : sexe, âge, et des caractéristiques tumorales : histologie, nombre de métastases et localisation métastatique...

1.5. RETOMBÉES ATTENDUES

Grâce à cette technique, nous espérons réaliser d'une part, un diagnostic plus précoce des récives tumorales, et personnaliser la prise en charge thérapeutique selon le pronostic attendu de la maladie cancéreuse d'autre part. Enfin, ce nouvel outil pourrait apporter une précision supplémentaire dans la classification pronostique des patients.

2. METHODES

Il s'agit de l'analyse intermédiaire après 50 patients inclus, d'un essai prospectif, monocentrique au centre hospitalo-universitaire de Nancy, dans le service de pneumologie, biologique, non randomisé, en ouvert portant sur la détection de CTC dans le sang circulant de patients atteints de CBNPC récemment diagnostiqués, localement avancés (stade IIIB) ou métastatiques (stade IV), au moment du diagnostic (à l'inclusion), et à l'issue de 3 cures de chimiothérapie ou thérapies ciblées (entre le 21^{ème} et le 35^{ème} jour après la 3^{ème} cure de chimiothérapie).

2.1. LA POPULATION ETUDIEE

Les patients ont été recrutés à partir des nouveaux cas de cancers bronchiques diagnostiqués dans le service de pneumologie du CHU de Nancy. La durée des inclusions sera de 18 mois et la durée totale de l'étude de 30 mois. La durée de participation de chaque patient sera de 12 mois. Les patients ont été traités par les protocoles thérapeutiques habituels, recommandés et validés par les sociétés savantes.

2.1.1. Critères d'inclusion des sujets

Les patients devaient être majeurs et présentés un CBNPC confirmé histologiquement, de stade IIIB ou IV, au moment du diagnostic. Les lésions devaient être mesurables par les critères RECIST [⁴¹]. Un consentement écrit était nécessaire après avoir reçu une information écrite, claire et intelligible.

2.1.2. Critères de non inclusion

Les patients n'ont pas été inclus lorsqu'ils présentaient un antécédent de cancer de moins de 5 ans, à l'exception des cancers de la peau (autres que mélanomes) et du cancer *in*

situ du col de l'utérus ; de même, lors d'antécédents de traitements par chimiothérapie, radiothérapie ou chirurgie pour un cancer bronchique. Par ailleurs, ils n'étaient pas inclus non plus lorsqu'ils étaient dans l'incapacité de signer un consentement écrit, qu'ils ne possédaient pas de couverture sociale ou qu'ils étaient sous tutelle ou curatelle.

2.1.3. Respect des bonnes pratiques cliniques

La recherche a été conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques cliniques (ICH version 4 du 1^{er} mai 1996 et décision du 24 novembre 2006) et aux dispositions législatives règlementaires en vigueur, en conformité avec la loi n°2004-806 du 9 août 2004 et à la déclaration d'Helsinki (principes éthiques applicables aux recherches médicales sur des sujets humains, Séoul 2008). Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de référence » (MR-001) en application des dispositions de l'article 54, alinéa 5 de la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. Chaque patient a pu, à tout moment arrêter l'étude s'il le désirait ou sur décision de l'investigateur.

De plus, ce protocole a reçu un avis favorable du CPP Est III le 8/03/12, et une autorisation AFSSAPS le 26/03/12 (n°IDRCB : 2012-A00135-38). Les différentes personnes morales ou physiques impliquées étaient les suivantes :

- promoteur du protocole de recherche clinique : CHU Nancy
- Investigateur principal/coordonnateur : Christelle Clément-Duchêne
- Partenariat avec CIC-P INSERM

2.2. PROCEDURES

Les éléments cliniques biologiques, radiologiques ainsi que les prélèvements pour le dosage de CTC ont été réalisés à l'inclusion et après les 3 premières cures de chimiothérapie. Une visite à un an de l'inclusion lorsqu'elle sera possible, est également prévue (recueil des éléments cliniques biologiques et radiologiques habituels). Pour les patients décédés ou perdus de vue, les informations seront collectées à partir du dossier médical ou du courrier du médecin traitant.

Bien que de nombreuses méthodes existent pour la détection de CTC : cytométrie en flux, RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), hybridation par fluorescence in situ [38], il semblait encore nécessaire d'améliorer la performance des tests utilisés. En effet, leur sensibilité et spécificité demeuraient insuffisantes [24]. La méthode immunomagnétique décrite par Allan *et al.* [42] et Allard *et al.* [23] est plus récente et semi-automatisée donc largement reproductible.

2.2.1. Méthode de détection des CTC par *CellSearch*, Veridex®

Dans notre étude, la détection des CTC était réalisée à l'aide de la technique développée par Immunicon® et distribuée par *CellSearch* system : Veridex®, sur des tubes de 7,5 ml de sang. Il combine l'analyse d'un flux cellulaire et l'imagerie photonique automatisée. Cette technique repose sur l'expression différentielle d'un antigène de membrane entre CTC et cellules sanguines ; on réalise ainsi une numération de cellules épithéliales, séparées du sang par des billes magnétiques recouvertes d'anticorps et identifiées à l'aide d'un marquage fluorescent des cytokératines (: séparation immunomagnétique). Il existe ensuite une validation morphologique et visuelle des événements recueillis. Cette technique permet de repérer rapidement, sur la base de caractéristiques

moins diversifiées qu'en cytométrie de flux, mais sur un bien plus grand nombre de cellules, la présence d'événements très peu représentés. La sensibilité selon le constructeur est d'une cellule dans un échantillon de 7,5ml de sang soit 1 cellule sur 10 à 15 millions. L'intérêt de cet équipement a déjà été validé par l'*US Food and Drug Administration* notamment pour détecter des CTC résiduelles après chirurgie et/ou chimiothérapie dans le cancer du sein [30], et en recherche clinique oncologique dans des cohortes de patients, pour des études pronostiques et d'évaluation d'efficacité de protocoles thérapeutiques.

Le seuil de positivité a été fixé à **2 cellules/7,5 ml** de sang dans notre étude. En effet, selon l'étude de Allard *et al.*, on remarque que 8 témoins sur 145 (5,5 %) présentaient 1 CTC/7,5 ml de sang, en revanche, aucun n'en comptaient 2 ou plus [23]. Par la suite de nombreuses études ont utilisé ce seuil dans le cancer broncho-pulmonaire [39,43]. Par ailleurs, il est aussi possible d'isoler ces cellules rares en vue d'études complémentaires, par exemple en biologie moléculaire. Cet équipement est disponible à Nancy sur la plate-forme NANCYTOMIQUE.

Le principal intérêt de la détection de CTC dans les échantillons sanguins est l'innocuité, la faisabilité et la facilité du prélèvement. Les seuls risques sont au moment de la réalisation des prélèvements sanguins : hématome au point de ponction et malaise vagal.

2.2.1.1. Préparation de l'échantillon

Le prélèvement sanguin était conditionné dans deux tubes EDTA (éthylène diamine tétraacétique) de 7,5 ml, à -4°C, ce qui permettait de maintenir la morphologie des cellules ainsi que leur marquage membranaire intact. Un tube a servi à l'identification des CTC et l'autre a été purifié puis congelé pour une étude ultérieure sur le dosage des biomarqueurs d'intérêt dans le cancer bronchique.

Une fois le prélèvement acheminé au laboratoire d'immunologie, il était transféré dans un tube conique de 15 ml *CellSave* (réf. 7900005, *CellSave preservative Tube*, Immunocon®), contenant un milieu de conservation spécifique, permettant l'optimisation des analyses avec possibilité de conservation des échantillons jusqu'à 96 heures. On utilisait la totalité du prélèvement sanguin soit 7,5 ml complété par 6,5 ml de tampon. Le tube était ensuite agité délicatement pour homogénéiser l'échantillon. Puis, on réalisait une centrifugation à 800g pendant 10 minutes à température ambiante, permettant de séparer le culot cellulaire du plasma.

2.2.1.2. Le système de détection *Cellsearch*, Veridex® (fig.3)

Le système de détection Veridex® se compose de deux appareils : *CellTracks Autoprep system* pour le marquage des cellules, pour l'analyse des événements et la visualisation de cellules détectées. La détection est semi-automatisée [44].



Figure 3 : Système *Cell search*, développé par Veridex® avec *Cell Tracks Autoprep* et *Cell Analyser*

- *CellTracks Autoprep system*

Avant toute utilisation, il est nécessaire de faire un nettoyage de l'appareil *Autoprep* d'environ 55 minutes, grâce à une solution de nettoyage contenant 10 % d'eau de javel, et de l'eau ionisée. L'appareil est ensuite configuré pour la détection des CTC bronchiques.

Les étapes de détection cellulaire, réalisées grâce au kit spécifique « *Circulating Tumor Cell Kit* » (réf. 7900001, Veridex®), dans l'automate de préparation (*CellTracks Autoprep system*), ont été les suivantes :

- Enrichissement cellulaire par capture immunomagnétique avec un réactif magnétique ou **ferrofluid** recouvert d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre **EpCAM**, exprimé par les cellules épithéliales, souvent surexprimés dans les carcinomes [⁴⁵]. Les cellules sont incubées dans un tube avec les anticorps conjugués à des microbilles ferromagnétiques : l'application d'un champ magnétique permet de retenir ces anticorps (et les CTC) à la paroi du tube le temps des lavages qui éliminent les cellules sanguines non reconnues par l'anticorps.
- Amplification : elle permet d'amplifier le signal et donc d'obtenir ultérieurement une meilleure purification
- Perméabilisation des cellules
- Tampon
- Marquage fluorescent multiple réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre plusieurs **cytokératines CK 8, 18 et 19** (marqueurs des cellules tumorales d'origine épithéliale), couplés au fluorochrome phycoérythrine (PE) et contre le marqueur panleucocytaire : CD45, couplé au fluorochrome allophycocyanine (APC).
- Marquage des noyaux cellulaires avec le colorant DAPI (4,2-diamidino- 2-phenylindole dihydrochloride) : marquant l'ADN
- Fixation : permet de stabiliser les antigènes de surface

Les images fluorescentes sont ensuite analysées une à une et un logiciel de reconnaissance d'image (**CellTracks Analyser II**) permet d'isoler les CTC selon une association de plusieurs critères : morphologie ronde, taille adaptée et noyau (DAPI) entouré

par du cytoplasme CK+ sans exprimer l'antigène CD45. Un quatrième canal de fluorescence est utilisable, permettant de détecter l'expression de certaines protéines d'intérêt (ex. EGF-R). Une CTC présente donc un phénotype **EpCAM+, CK+, DAPI+ et CD45-**. Il est possible de traiter jusqu'à huit prélèvements par série de façon standardisée en environ 4 heures.

- *CellTracks Analyser*

Les événements notables sont sélectionnés automatiquement par l'appareil grâce à 175 cadres de lecture (1µl de sang/cadre). Le microscope scanner *CellTracks* possède quatre filtres et est couplé à un logiciel dédié. Il scanne la surface entière de la cartouche, acquiert les images et présente à l'utilisateur les événements présentant un marquage CK-PE et DAPI colocalisés (fig.4). L'analyse automatique dure environ 10 minutes.

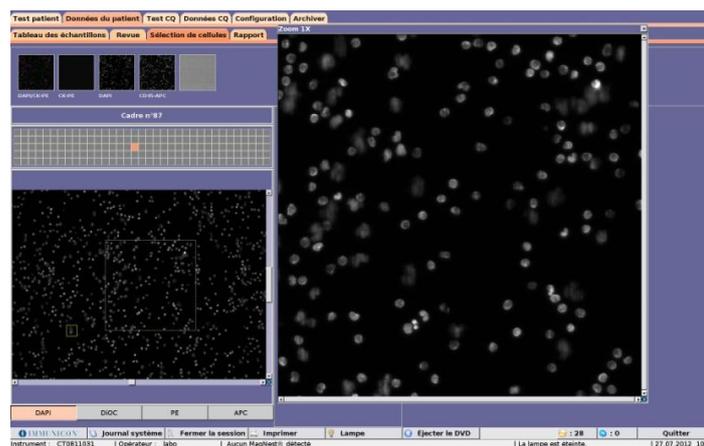


Figure 4 : Les événements notables sont sélectionnés automatiquement par l'appareil grâce à 175 cadres de lecture (1µl de sang/cadre). Le microscope scanner *CellTracks* possède quatre filtres et est couplé à un logiciel dédié. Il scanne la surface de la cartouche, acquiert les images et présente à l'utilisateur les événements présentant un marquage CK-PE et DAPI colocalisés

Ces événements doivent satisfaire des critères de qualité précis [46] (fig.5) :

- Forme arrondie ou ovale, avec un contour net, homogène
- Noyau (DAPI+) à l'intérieur du cytoplasme (CK+)
- Taille supérieure ou égale à 4µm de diamètre
- CD45 négatif
- Canal blanc négatif : afin d'exclure les artefacts.

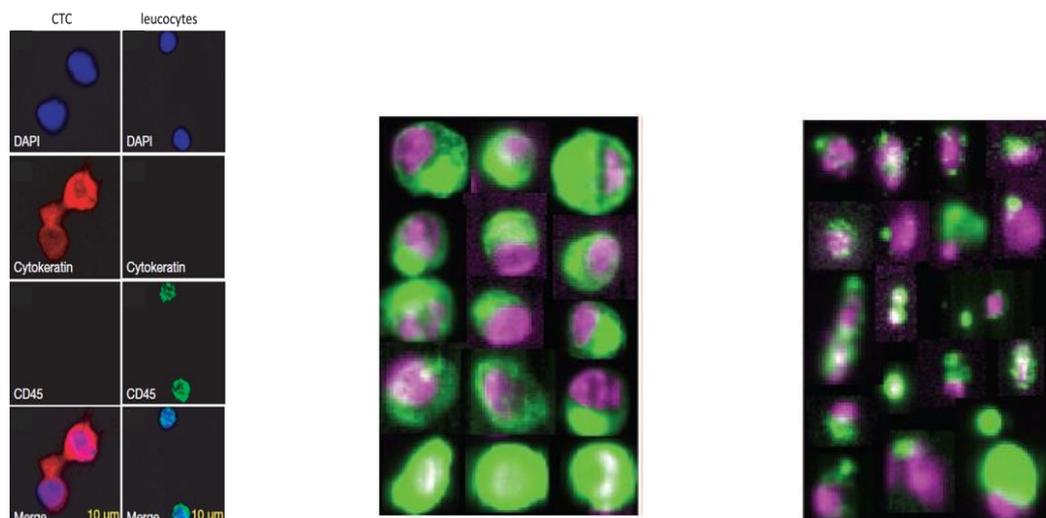


Figure 5 : a) exemple typique de résultats obtenus : à gauche : CTC: DAPI positif (bleu), cytokératine positif (rouge), CD 45 négatif (vert) et image de fusion DAPI et cytokératine colocalisés, à droite : leucocytes : DAPI positif, cytokératine négatif, CD 45 positif et image de fusion DAPI et CD45 colocalisés. b) Images typiques de CTC : avec co-marquage (DAPI en violet : marquage nucléaire et cytokératine en vert : cytoplasme des cellules tumorales), absence de marquage panleucocytaire : CD45. c) Exemple d'images de fragments cellulaires et de cellules tumorales circulantes probablement apoptotiques, d'après Allard *et al.* [23]

Etape	Matériel		Références
Préparation des CTC pour l'étude	<ul style="list-style-type: none"> - Tubes de prélèvement - Trousse immunomarquage - Automate de préparation - Analyseur d'images semi-automatisé 	<ul style="list-style-type: none"> - CellSave Preservative Tube Immunicon - Circulating Tumor Cell Kit - CellTracks Autoprep system - CellTracks Analyser II 	7900005 7900001
Purification et enrichissement en CTC en vue d'analyses extérieures au système	<ul style="list-style-type: none"> - Automate de préparation - Trousse - Réactif 	<ul style="list-style-type: none"> - CellTracks Autoprep system - CellSearch Profile kit RUO - RNA later 	7900004 (Veridex®) R0901 (Sigma®)

2.2.2. Evaluation de la sécurité

Une veille sanitaire portant sur le dispositif Veridex® et sur les réactifs utilisés a été effectuée par le promoteur. Les effets indésirables liés à la chimiothérapie et à la prise en charge habituelle du patient n'ont pas été pris en compte. Les effets indésirables graves ont été relevés à J0 et J+3 cures, lors du prélèvement veineux. Cette étude n'a pas justifié la mise en place d'un comité de surveillance indépendant mais le promoteur rédigera un rapport annuel de sécurité pour le transmettre à l'AFSSaPS, au comité de protection des personnes et à l'investigateur coordonnateur. L'investigateur coordonnateur transmettra au promoteur

toutes les données nécessaires à la rédaction de ce rapport. Un rapport final sera rédigé par le promoteur et l'investigateur coordonnateur dans un délai d'un an après la fin de l'étude et un résumé sera adressé à l'AFSSaPS par le promoteur.

2.3. AUTRES INFORMATIONS RECUEILLIES

Un recueil de données cliniques, biologiques et radiologiques a été effectué :

- Date de naissance
- Sexe
- Statut tabagique
- Antécédents cardiaques respiratoires et néoplasiques
- Examen physique : Poids, Taille, Performans status (PS)
- Date du diagnostic
- Examens biologiques : taux d'hémoglobine, nombre de polynucléaires neutrophiles, taux de plaquettes, taux de protéines, albuminémie, calcémie
- Histologie de la tumeur
- Scanner thoraco-abdomino-pelvien et cérébral analysé selon les critères RECIST
- Recueil des événements indésirables graves

	Inclusion J0	A l'issue de 3 cures de chimiothérapie (J+3 cures)	Visite de suivi (à 1 an)
Recueil du consentement écrit	X		
Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion	X		
Interrogatoire médical et recueil des traitements médicamenteux	O	O	O
Examen physique : poids, taille, IMC, performans status	O	O	O
Examen clinique (cardiaque, respiratoire)	O	O	O
Bilan biologique (NFS, protéines plasmatiques, albuminémie, LDH, calcémie)	O	O	O
Recueil des événements indésirables graves	X	X	
Prélèvement veineux Veridex	X	X	
Scanner thoraco-abdomino-pelvien et cérébral	O	O	O

X : Actes liés à la recherche ; O : Routine

2.4. ANALYSE STATISTIQUE

2.4.1. Méthodes statistiques prévues

Le taux de CTC a été exprimé en moyenne, avec les valeurs minimum et maximum. La survie des patients a été analysée par la méthode de Kaplan-Meier. La relation entre le taux de CTC et la survie a été analysée par le test de Cox. Nous avons effectué ici l'analyse intermédiaire après 50 patients inclus.

La description des données est présentée sous forme chiffrée avec les valeurs en pourcentages correspondantes entre parenthèses (pour des variables qualitatives) ou des moyennes avec écart-type (pour des variables quantitatives). Les comparaisons ont été effectuées en utilisant de façon appropriée les tests statistiques paramétriques et non-paramétriques : chi deux de Pearson ou test exact de Fisher pour les variables qualitatives, et « t » de Student ou de Kruskal-Wallis pour des variables quantitatives. Le seuil de significativité a été fixé à 5 %. Les données ont été saisies et enregistrées dans le fichier Excel. L'analyse des résultats était effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.00® (*Graphpad Prism Software Inc., San Diego, CA*).

2.4.2. Nombre prévu de patients à inclure

Il est rapporté dans la littérature un taux de détection de CTC dans 20 à 49 %, selon les études des cancers bronchiques de stade IIIB ou IV [^{23,47}] avec un seuil fixé à 2 CTC/7,5 ml de sang. Nous partons du nombre de cellules allant de 0 à 10, 10 à 20, 20 à 30, 30 à 40, plus de 40 avec 40 patients par classe, donc afin de pouvoir évaluer au moins 50 patients pour la cinétique des CTC il est nécessaire d'inclure au moins 200 patients dans l'étude avec un risque alpha de 5 % et un risque bêta de 10 %. Nous rapportons ici les résultats de l'analyse intermédiaire après l'inclusion de 50 patients.

2.5. FINANCEMENT ET ASSURANCE

Le promoteur a souscrit auprès de GERLING pour toute la durée de l'étude une assurance garantissant sa propre responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant impliqué dans la réalisation de l'étude. Les frais ont été estimés par l'investigateur et des financements extérieurs sont prévus.

Consommables :

- Tubes de prélèvements : 4 tubes/ patient soit 20€/patient soit $200 \times 20 = 4000\text{€}$ pour les 200 patients à inclure dans l'étude
- Prélèvements : 4,72€/ prélèvement soit $4,72 \times 200 = 1888\text{€}$
- Kit d'identification des CTC : 260€/ prélèvements soit $260 \times 200 = 52000\text{€}$ à J0 et 52000 à J+3 cures
- Kit de purification : 90€/analyse soit $90 \times 200 \times 2 = 36000\text{€}$
- RNA later : 500 ml à 265€

Ceci représentera au total un coût de 146153€ soit 730,74€ par patient et un coût de 36537€ à l'analyse intermédiaire comprenant 50 patients.

3. RESULTATS

3.1. DESCRIPTION DES RESULTATS

3.1.1. Description de la cohorte de patients inclus

Les cinquante premiers patients de cette étude ont été inclus dans le service de pneumologie du CHU de Nancy, du 22/06/2012 au 26/06/2013 (Rythme des inclusions, Annexe n° 6.3). L'âge moyen des patients était de 60,7 ans s'étalant de 32 à 80 ans. On comptait une majorité d'hommes (82 %). A l'inclusion, l'état général des patients était bon avec un performans status (PS) moyen à 1 et un index de masse corporelle (IMC) moyen 23,9 kg/m² [16,1 ; 31,6]. Le statut tabagique des patients était majoritairement un tabagisme actif (25 soit 50 %) et sevré (21 soit 42 %), contre 4 (soit 8%) de non fumeurs, avec une consommation moyenne de 37,5 paquets/année [0 ; 132] sur une durée moyenne de 31,4 ans [0 ; 57]. Des antécédents de néoplasie étaient retrouvés chez 8 de nos patients (soit 16 % d'entre eux).

Concernant les caractéristiques tumorales des patients inclus, il s'agissait de carcinome de stade IV en grande majorité (46 patients soit 92 % d'entre eux) par rapport au stade IIIB (4 soit 8 %). La répartition des types histologiques des tumeurs étudiées étaient la suivante : adénocarcinome (50 %), carcinome épidermoïde (24 %), carcinome non à petites cellules peu différenciés (18 %) et carcinomes à grandes cellules (8 %). Parmi les patients porteurs d'un adénocarcinome, une mutation du gène codant pour le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) lorsqu'elle avait pu être recherchée, était présente dans 9 % des échantillons prélevés. Les mutations des gènes K-Ras et B-Raf étaient respectivement retrouvées chez 9 et 4 % des patients et le réarrangement ALK chez 4 % d'entre eux. Le diagnostic était établi grâce à des biopsies bronchiques lors d'une endoscopie bronchique standard dans 40 % des cas, par une écho-endoscopie dans 32 % des cas, une ponction sous

scanner pour 12 % des patients, une biopsie de métastases (osseuse, ganglionnaire, envahissement pariétal) pour 14 % des cas, et, par thoracoscopie médicale pour 1 patient. La localisation de la tumeur primitive concernait : les lobes supérieurs gauche (26 %) et droit (22 %), les lobes inférieurs gauche (8 %) et droit (6 %), le lobe moyen (6 %), les hiles gauche et droit (respectivement 8 et 6 %). Les localisations métastatiques se répartissaient de la manière suivante : osseuses (31 %), cérébrales (25 %), hépatiques (18 %), surrénaliennes (18 %), pulmonaires (10 %), pleurales (8 %) et ganglionnaires (6 %).

Enfin, les traitements reçus par les patients, en première ligne, se composaient majoritairement de traitement à base de doublet de chimiothérapie classique : carboplatine et paclitaxel pour 28 % des patients, carboplatine et docétaxel pour 2 % des patients, carboplatine et pemetrexed pour 32 % des patients. Plus rarement, pour les patients en bon état général, des doublets à type de sel de platine : cisplatine et pemetrexed voire en association avec le bevacizumab pour 6 % des patients et cisplatine navelbine pour 1 patient. Les thérapeutiques ciblées, de type anti-EGFR gefitinib représentaient 4 % des prescriptions (soit l'ensemble des patients atteint d'adénocarcinome avec mutation du gène de l'EGFR). Une radiothérapie était réalisée chez 30 % des patients au décours de leur parcours de soin (surtout au niveau encéphalique). Les caractéristiques des patients inclus dans l'étude sont rapportées dans le tableau 5 et la figure 6.

CARACTERISTIQUES	PATIENTS INCLUS	
	N	%
Sexe		
Homme	41	82
Femme	9	18
Stade tumoral au diagnostic		
IIIB	4	8
IV	46	92
Histologie		
Adénocarcinome	25	50
Epidermoïde	12	24
Autres	13	26
PS à l'inclusion		
0	14	28
1	26	52
2 à 4	10	20
Traitements reçus		
douplet à base de platine	48	96
Monochimiothérapie	0	0
thérapeutiques ciblées	2	4
Tabagisme		
Actif	25	50
Sevré	21	42
Non fumeur	4	8

Tableau 5 : Caractéristiques épidémiologiques et oncologiques des patients inclus

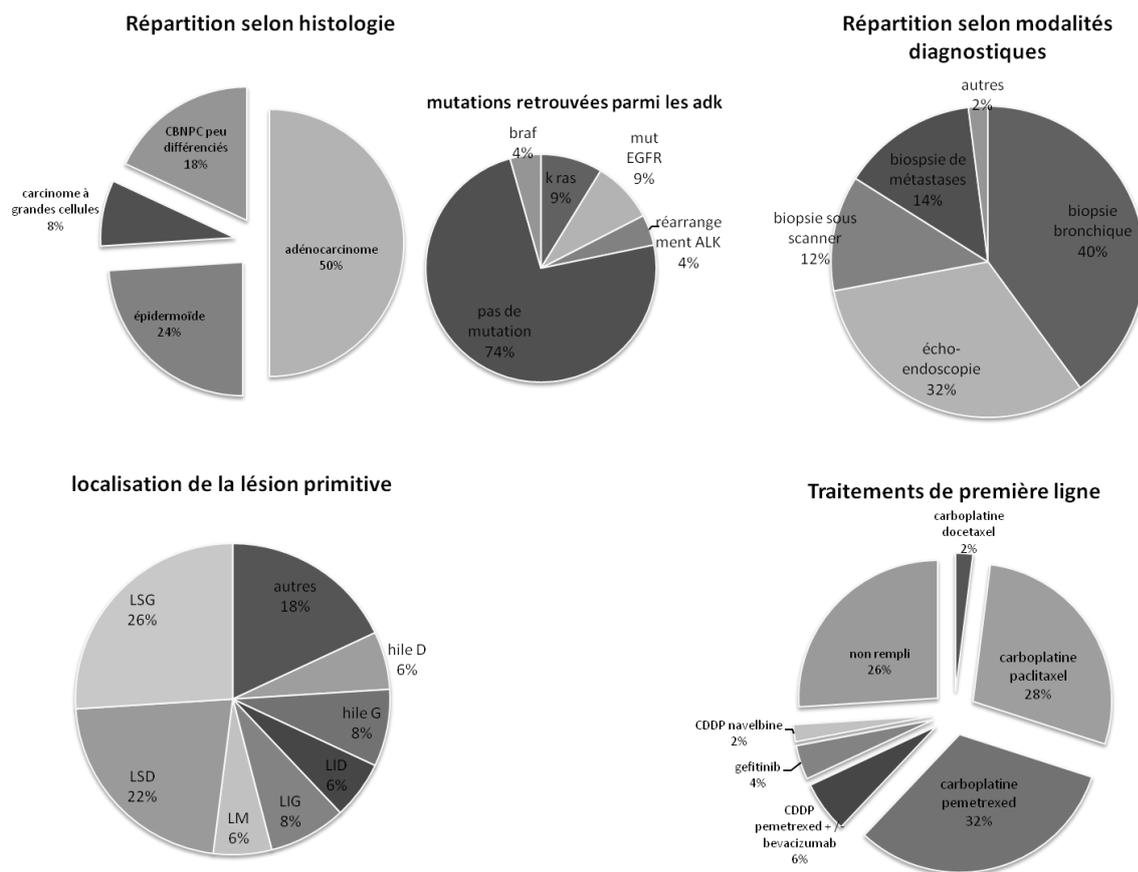


Figure 6 : Description des caractéristiques des tumeurs des patients inclus. Répartition selon a : l'histologie, a' : les anomalies de biologie moléculaire retrouvées, b : les modalités diagnostiques, c : la localisation de la lésion primitive, d : le traitement de première ligne reçu par le patient

3.1.2. Description des résultats après trois cures de chimiothérapie

Après trois cures de chimiothérapie, l'état général des patients était, en moyenne, conservé et stable par rapport à avant l'initiation du traitement, avec un PS moyen identique de 1 et un IMC moyen stable à 23,5 kg/m², représentant une perte de poids moyenne négligeable de 1,4 %.

La durée moyenne de suivi a été de 5,6 mois. Sur 50 patients inclus, 13 sont décédés au décours du suivi dont 5 avant la troisième cure, soit un taux de mortalité brut de 26 %. Selon les critères RECIST, 13 patients (soit 34 %) ont vu leur maladie progresser après trois cures, dont 5 sont décédés entre la troisième cure et la fin du suivi à un an. Le taux de

réponse, composé uniquement de réponse partielle était de 34 %, et 19 % des patients présentait une stabilité après 3 cures (fig. 7).

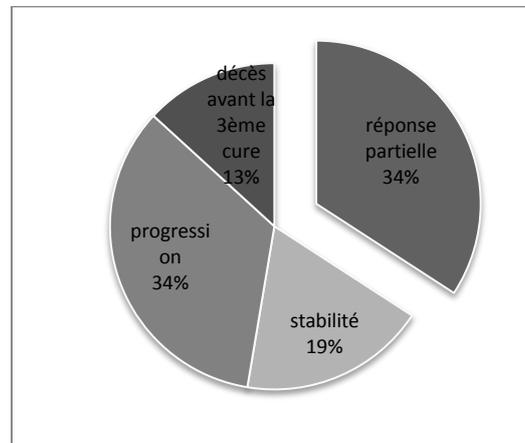


Figure 7 : Réponse aux traitements évaluée après 3 cures de chimiothérapie ou thérapie ciblée, selon les critères RECIST

3.1.3. Illustration des résultats obtenus par *CellSearch*

Nous avons représenté ici les résultats obtenus pour le patient n°4, respectant les critères de qualité listés précédemment : formes arrondies, noyau (DAPI) entouré de cytoplasme (CK+), CD45 négatif (fig. 8).

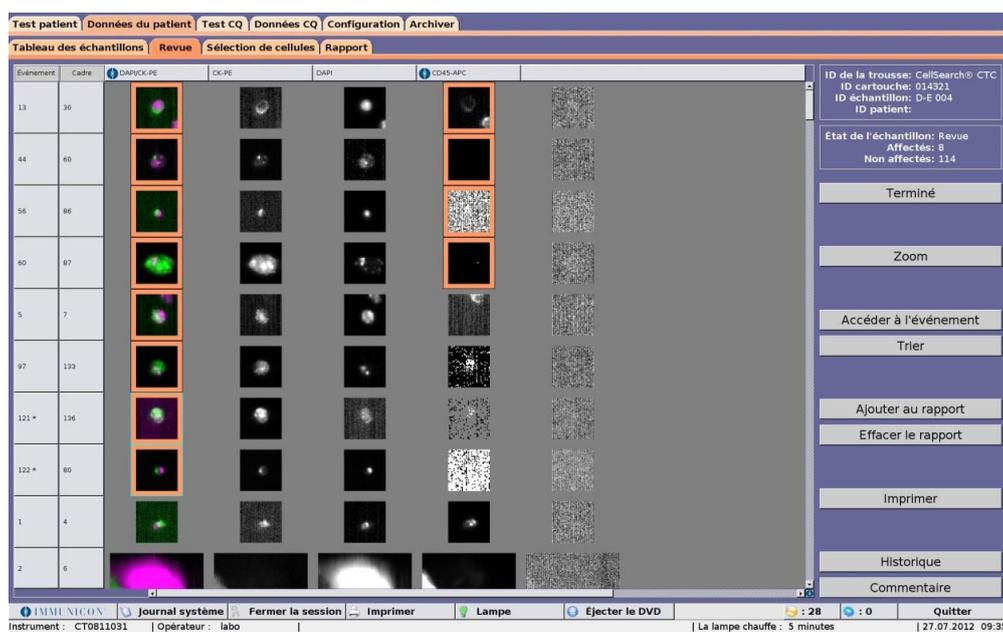


Figure 8 : Exemple d'images obtenues lors de la détection de CTC chez l'un de nos patients (n°4). Les événements sélectionnés sont positifs pour DAPI et CK, et négatifs pour CD45

Les résultats représentés ci-après concernent un autre patient (n°6) à un plus fort grossissement, analysés avec les mêmes critères de qualité, précédemment décrits (fig. 9).

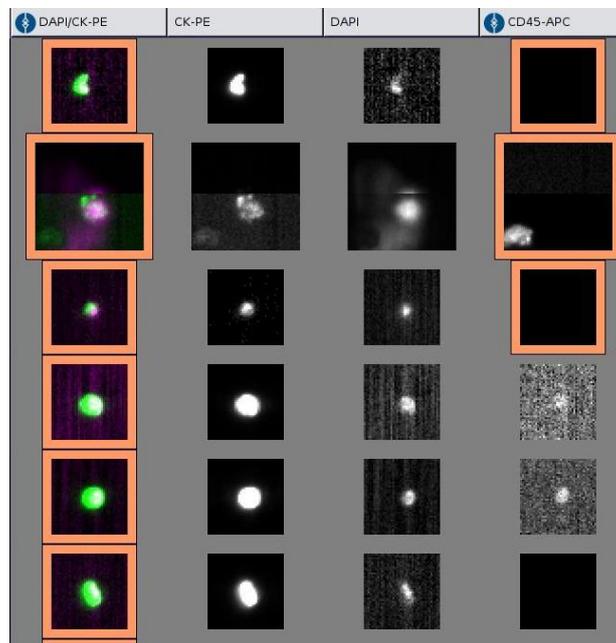


Figure 9 : Exemple d'images obtenues, à fort grossissement, lors de la détection de CTC chez un patient (n°6). Les événements sélectionnés sont positifs pour DAPI et CK, et négatifs pour CD45

Il s'agit bien d'une technique facile et reproductible. Seuls trois échantillons sur 50 (soit 6 %) au premier prélèvement, et 2 échantillons sur 40 (soit 5 %) au deuxième prélèvement (soit 5,8 % au total) n'ont pu être correctement analysés, en raison de l'absence de disponibilité des réactifs, au moment du prélèvement sanguin.

3.2. PREVALENCE ET VALEUR PRONOSTIQUE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES AVANT TRAITEMENT

3.2.1. CTC et caractéristiques cliniques des patients

Le nombre moyen de CTC détectées au diagnostic, était de 5,89/7,5ml de sang, avec une grande variabilité, de 0 à 75 (et 40 % des prélèvements avec au moins 2 CTC/7,5ml). Celui-ci est inversement corrélé à l'âge, de manière significative ($r=-0,37$, $p=0,012$, fig. 10A), et est significativement plus élevé chez les hommes que chez les femmes ($p=0,032$, fig. 10B).

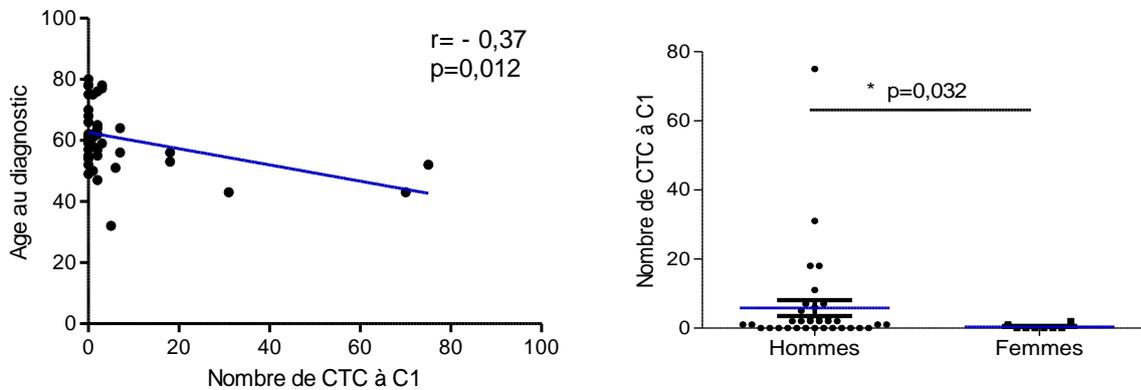


Figure 10 : A) Nombre de CTC, au diagnostic, en fonction de l'âge. B) Nombre de CTC initial chez les hommes et chez les femmes

3.2.2. CTC et caractéristiques tumorales

La variation de CTC semble être plus importante chez les patients porteurs de carcinomes bronchiques à grandes cellules ou indifférenciés ($p=0,14$, fig. 11).

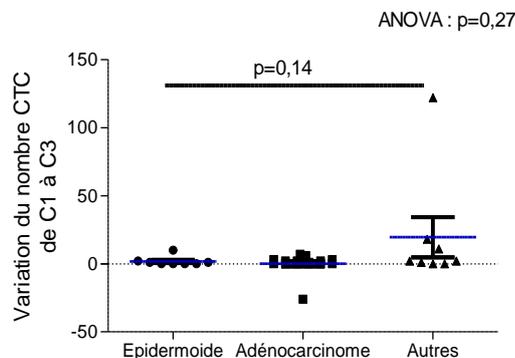


Figure 11 : Variation du nombre de CTC selon l'histologie de la tumeur : épidermoïde, adénocarcinome, autres.

D'autre part, le nombre initial de CTC est moins important lors de localisations pulmonaires isolées par rapport à d'autres localisations métastatiques (fig. 12).

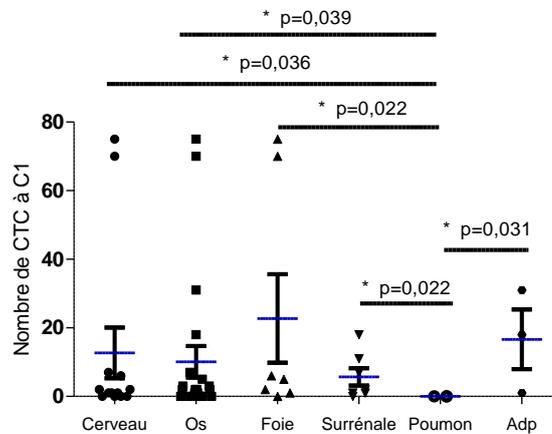


Figure 12 : Nombre de CTC au diagnostic selon les localisations métastatiques.
Adp : localisation ganglionnaire

Par ailleurs, avant tout traitement, comme au moment de la troisième cure de chimiothérapie, le nombre de CTC est plus important chez les patients présentant plusieurs sites métastatiques par rapport à un site métastatique ($p=0,004$ et ANOVA $p=0,014$) à C1, et à C3 ($p=0,004$ et ANOVA $p=0,004$, fig. 13).

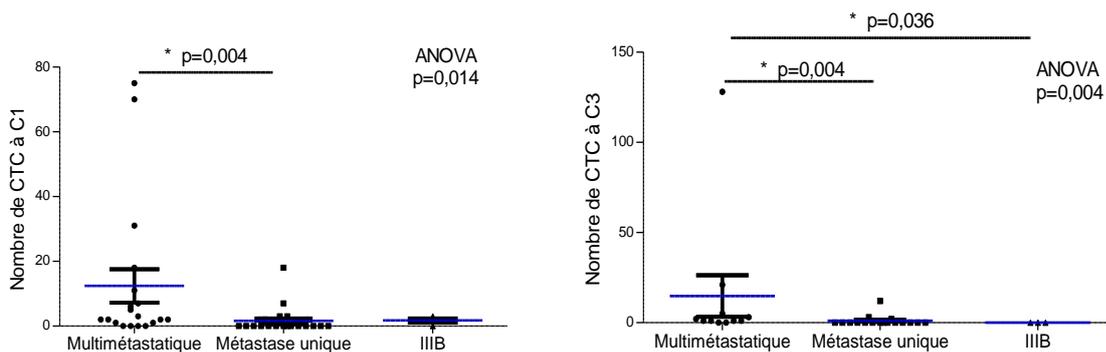


Figure 13 : Nombre de CTC en fonction du nombre de localisation métastatique au diagnostic et après trois cures de chimiothérapie ou de thérapéutiques ciblées

3.3. VALEUR PRONOSTIQUE DES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES APRES TROIS CURES DE CHIMIOTHERAPIE OU THERAPEUTIQUE CIBLEE

3.3.1. Description des résultats

Après trois cures, le nombre moyen de CTC était 5,48/7,5 ml de sang [0 ; 128]. En revanche, le taux de positivité (≥ 2 CTC/7,5ml) n'était plus que de 20,5 % après les 3 premières cures de chimiothérapie. L'évolution du nombre de CTC après 3 cures de chimiothérapie ou de thérapie ciblée montre une diminution globale mais non significative du nombre de CTC détectées, avec un taux de détection plus faible (fig. 14, $p=0,13$).

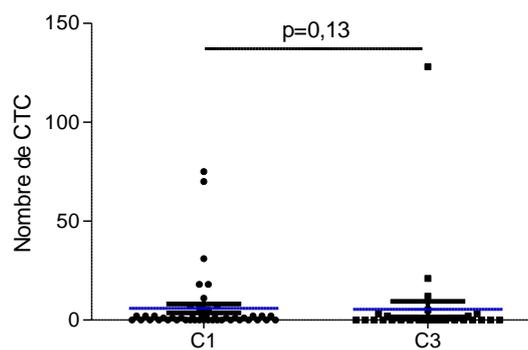


Figure 14 : Nombre de CTC avant traitement et après 3 cures : différence non significative ($p=0,13$)

Cependant, il existe une corrélation positive significative entre la variation du nombre de CTC et la variation des dimensions tumorales selon les critères de RECIST avant traitement et après trois cures ($r=0,42$, $p=0,028$, fig. 15A). Le nombre de CTC est également corrélé positivement, au nombre de lésions tumorales et à la taille tumorale après trois cures de chimiothérapie ($r=0,39$, $p=0,039$, fig. 15 B et $r=0,36$, $p=0,038$ fig. 15 C).

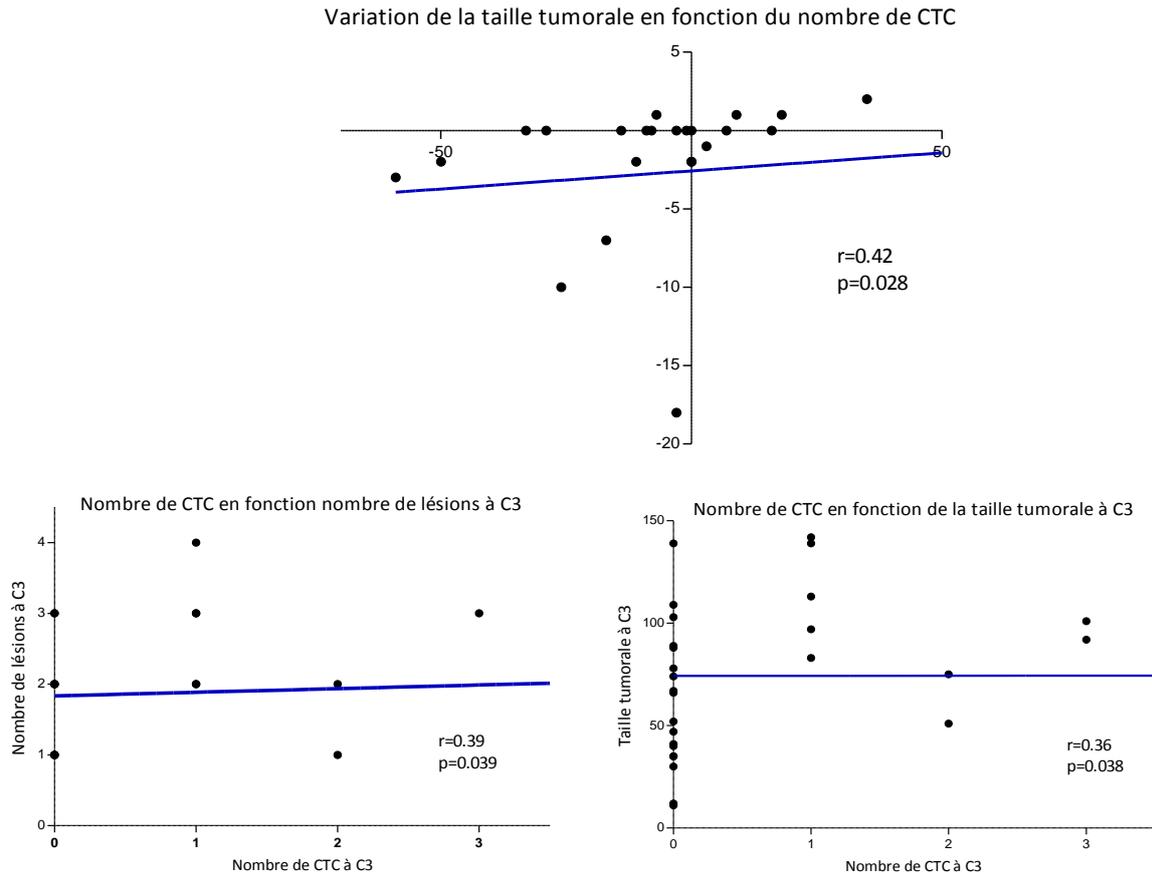


Figure 15 : Corrélation entre le nombre de CTC et A) la taille tumorale des cibles avant traitement, B) le nombre de lésions tumorales cibles après trois cures, C) la taille tumorale des cibles après 3 cures

Par ailleurs, le nombre de CTC avant traitement est significativement plus important si le patient décède entre le début de la prise en charge et la troisième cure de chimiothérapie, par rapport aux patients stables ($p=0,045$, fig. 16A). De plus, il existe une tendance similaire si l'on compare les patients ayant une réponse partielle par rapport aux patients qui vont décéder ($p=0,09$, fig. 16A). Ces résultats se confirment à la troisième cure de chimiothérapie (ANOVA : $p=0,015$), avec une différence significative entre les patients progressant à 3 cures et les patients en réponse partielle ($p=0,018$) et ceux progressant par rapport à ceux qui sont stables ($p=0,028$) (fig. 16B).

	PATIENTS AVEC AU MOINS 2 CTC /7,5ml de sang		PATIENTS AVEC MOINS de 2 CTC /7,5ml de sang	
	N	%	N	%
<u>CARACTERISTIQUES CLINIQUES</u>				
<u>SEXE</u>				
Homme/Femme	18/2	90/10	20/7	74/26
<u>STADE TUMORAL</u>				
IIIB	2	10	1	4
IV	18	90	26	96
<u>PS</u>				
0	4	20	8	29
1	9	45	14	52,5
2 à 4	7	35	5	18,5
<u>HISTOLOGIE</u>				
Adénocarcinome	10	50	14	52
Epidermoïde	6	30	5	18,5
Autres	4	20	8	29,5
<u>TABAGISME</u>				
Actif	9	45	13	48,5
Sevré	9	45	12	44,5
Non fumeur	2	10	2	7
<u>NOMBRE DE METASTASES</u>				
0	2	10	1	3,5
1	8	40	15	55,5
2	5	25	7	26
>2	5	25	4	15
<u>CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES</u>				
Taux d'hémoglobine (g/dL)	13.22		13.17	
Taux de polynucléaires neutrophiles (/mm ³)	9630		7708	
Plaquettes (/mm ³)	343000		357956	
Calcémie (mmol/L)	96.7		91.26	

Tableau 6 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients, avant tout traitement selon qu'ils présentent ≥ 2 ou < 2 CTC/7,5ml de sang. PS : *performans status*.

En revanche, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes concernant l'âge, l'index de masse corporelle, le tabagisme, la taille et le nombre de lésions au diagnostic. De plus, le taux de mortalité semble identique dans les deux groupes de patients, respectivement 25,9 et 26 %.

3.3.2.2. CTC et caractéristiques tumorales

Dans le groupe de patient présentant, au diagnostic, moins de 2 CTC/7,5ml de sang, la variation de taille des cibles tumorales est plus importante que dans le groupe avec au moins 2 CTC/7,5ml ($p=0,046$, fig. 19A). Ceci nous laisse penser qu'il existe une moins bonne réponse aux traitements. Par ailleurs, la variation du nombre de CTC entre le diagnostic et l'évaluation après 3 cures est moins importante chez les patients avec au départ beaucoup de CTC ($p<0,0001$, fig. 19B).

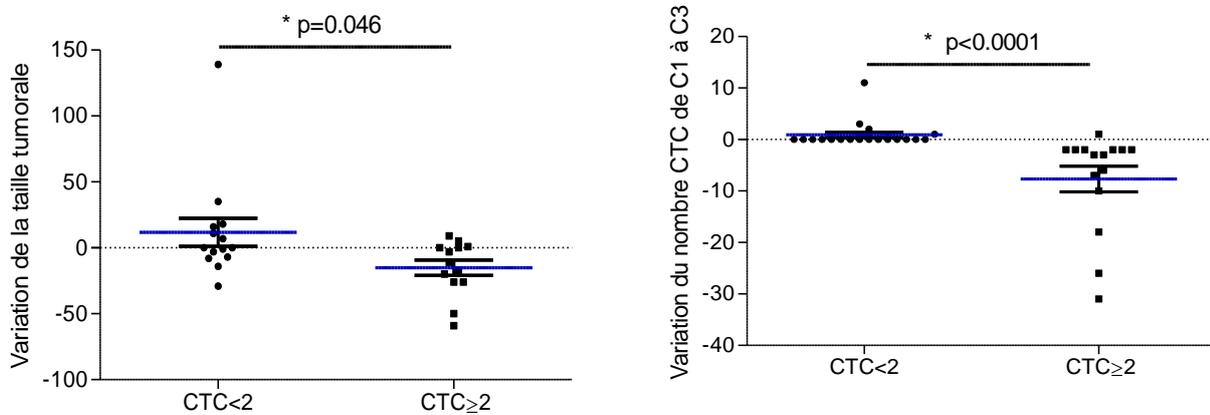


Figure 19 : A) Variation de la taille tumorale selon que les patients présentent < 2, ou, ≥ 2 CTC/7,5ml au diagnostic. B) Variation du nombre de CTC selon que les patients présentent < 2, ou, ≥ 2 CTC/7,5ml au diagnostic.

3.3.2.3. CTC et survie

Il existe une tendance à une différence de survie entre les groupes selon que les patients présentent moins de 2 CTC/7,5 ml ou au moins 2 CTC/7,5ml. (fig. 20). Ce résultat n'est cependant pas significatif ($p=0,53$, $\chi^2=1,27$), probablement en raison d'un effectif trop faible.

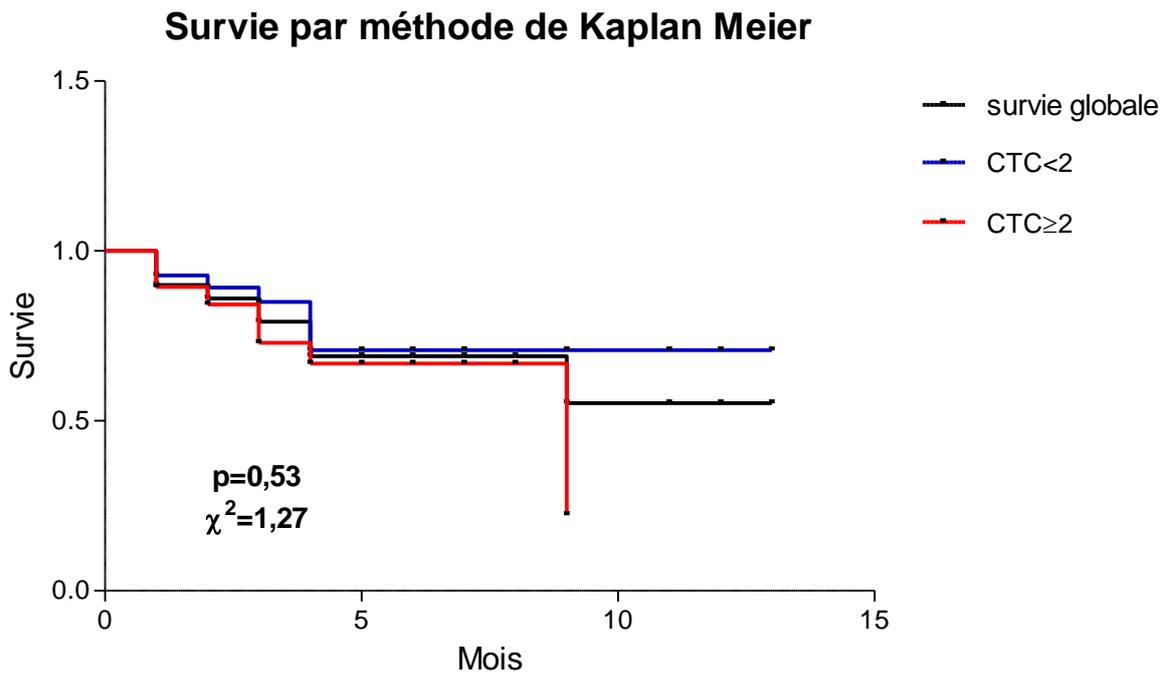


Figure 20 : Survie globale (noir), pour le sous-groupe avec moins de 2 CTC/7,5ml (bleu) et le sous-groupe avec au moins 2 CTC/7,5ml (rouge)

4. DISCUSSION

4.1. SYNTHÈSE DES RESULTATS

Il s'agit de l'étude des cinquante premiers patients inclus dans CIRCUBRONCH, une étude prospective réalisée au sein du service de pneumologie du CHU de Nancy, ayant pour objectif d'évaluer l'intérêt de la détection des cellules tumorales circulantes, par la méthode immunomagnétique développée par Veridex®, dans la prise en charge du cancer bronchique non à petites cellules de stades IIIB et IV.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- Cette technique est bien maîtrisée avec un nombre et une proportion de cellules identiques à ceux rapportés dans la littérature,
- Concernant les données cliniques, le nombre de CTC est inversement corrélé à l'âge et, est plus élevé chez les hommes que chez les femmes,
- Concernant les données tumorales, les CTC semblent plus nombreuses chez les patients atteints de cancers autres qu'épidermoïdes ou adénocarcinomes. Il existe également moins de CTC lorsque la maladie est localisée aux poumons. De plus, le nombre de CTC est plus important chez les patients avec plusieurs métastases par rapport à ceux présentant une seule métastase ou un cancer localement avancé, au diagnostic comme à la troisième cure.
- Concernant l'évolution de la maladie, le nombre de CTC semble présenter un intérêt pronostique. Ainsi, le nombre de CTC, au diagnostic, est supérieur chez les patients qui vont décéder (par rapport aux patients stables). Les résultats sont identiques après la troisième cure, avec un nombre de CTC plus élevé chez les patients qui progressent par rapport à ceux qui sont stables ou en réponse partielle. D'autre part, il existe une

corrélation entre la variation de la taille de la tumeur et la variation du nombre de CTC ; de même à 3 cures, concernant le nombre de lésions et le nombre de CTC, et, la taille tumorale et le nombre de CTC.

- Enfin, le seuil de 2 CTC/7,5ml semble intéressant pour séparer la population en deux catégories : groupes à faible versus haut risque. En effet, les patients présentant au moins 2 CTC/7,5ml ont un performans status significativement plus élevé au diagnostic, et, sont plus souvent de sexe masculin. En outre, la variation de la taille tumorale est significativement plus faible lorsqu'il y a au moins 2 CTC/7,5ml, ce qui laisse supposer d'une moins bonne réponse aux traitements
- Pour finir, il existe une tendance vers une différence de survie selon que les patients présentent moins de 2 CTC/7,5ml ou au moins 2 CTC/7,5ml, sans que cette observation atteigne la significativité, du fait d'un effectif probablement encore trop faible.

4.2. DISCUSSION METHODOLOGIQUE

4.2.1. Généralités : discussion de la technique de détection immunomagnétique

La détection de CTC par la technique *CellSearch* développée par Veridex® semble spécifique, avec très peu de faux positifs retrouvés dans la littérature. Cependant, il existe des limites à cette méthode que nous allons décrire ici.

4.2.1.1. Principes généraux

Tout d'abord, il s'agit d'une technique semi-automatique où il persiste une subjectivité du technicien lors de l'interprétation des événements sélectionnés par l'appareil. Pour minimiser ces variabilités, le personnel utilisant cette technique doit être

formé et travailler en aveugle des données cliniques. Des témoins négatifs doivent probablement être inclus pour établir la contribution de marquages non spécifiques.

4.2.1.2. Marqueurs utilisés

De surcroît, le choix des antigènes utilisés présente des limites puisqu'aucun marqueur ne possède une spécificité ou une sensibilité parfaite.

- EpCAM

EpCAM (*epithelial cellular adhesion molecule*) ou EGP40 (*epithelial glycoprotein 40*) ou antigène 17-1a est une molécule d'adhésion intercellulaire homotypique spécifique aux épithéliums, exprimée à la surface basolatérale des épithéliums columnaires simples, pseudostratifiés ou transitionnels. Son expression serait liée à une augmentation de la prolifération et à une diminution de l'adhérence classique par le système des cadhérines [45]. EpCAM qui est l'un des marqueurs les plus utilisés, varie en fonction des types histologiques de cancer ; il varie aussi très probablement entre patients présentant un même type histologique de cancer et varie enfin potentiellement au cours de l'évolution de la maladie tumorale chez un même patient. Il est ainsi exprimé par environ 90 % des cancers du sein, 80 % des cancers du pancréas, du côlon et des cancers prostatiques hormonorésistants, mais n'est exprimé par aucun type de sarcome ou de lymphome (sur une cohorte de 3900 échantillons de 134 tumeurs de différentes histologies) [45]. Concernant le cancer bronchique, même si son expression est d'intensité plutôt faible, EpCAM est présent dans 83 à 98 % des cancers broncho-pulmonaires selon le type histologique [45, 48] (Tableau 8).

Tumor entity	n	EpCam immunostaining			Total positive cases (%)
		Weak (n)	Moderate (n)	Intense (n)	
Upper aerodigestive and respiratory tract					
Larynx, SCC	47	19	7	9	74
Lung, adenocarcinoma	48	13	15	13	85
Lung, large cell carcinoma	49	7	10	31	98
Lung, small cell carcinoma	48	2	18	20	83
Lung, SCC	49	8	11	27	94

Tableau 8 : Fréquence de l'expression d'EpCAM sur des tumeurs d'origine bronchique (194 échantillons), selon Went *et al.* [⁴⁵].

Cependant, la seule expression d'une molécule de surface de cellules épithéliales ne suffit pas à affirmer le caractère malin d'une cellule circulante car des cellules non tumorales peuvent exprimer ces molécules. De plus, l'utilisation de marqueurs épithéliaux pour l'isolement des CTC peut s'avérer inadaptée puisque certains leucocytes activés expriment ce marqueur et, que les cellules tumorales qui ont subi une transition épithélio-mésenchymateuse perdent, en partie, l'expression de ces marqueurs [⁴⁹].

- Cytokératines

Les cytokératines sont présentes dans le cytoplasme de cellules épithéliales, alors que le CD45 est un marqueur dit pan-leucocytaire. Or, nous avons remarqué la présence d'un co-marquage de certaines cellules par les cytokératines et le CD45. Une des explications pourrait être donnée par l'étude de Fehm *et al.* qui rapporte la présence de cytokératines à la surface de certaines cellules hématopoïétiques (0 à 20 % des témoins), en particulier les macrophages ou les précurseurs hématopoïétiques circulants [⁴⁶]. De même, certaines cellules en cours de transition épithélio-mésenchymateuse perdent l'expression de certains marqueurs de surface comme les cytokératines [^{47, 50}].

4.2.1.3. Immunofluorescence

Enfin, la technique d'immunofluorescence présente en elle-même des limites notamment lorsque les cellules expriment fortement un antigène de surface. La fluorescence est alors si intense qu'elle entraîne une fluorescence dans les autres canaux, compliquant l'analyse.

4.2.1.4. Autres techniques utilisables

- ISET (: *isolation by size of epithelial tumor*)

Pour résoudre ces difficultés, d'autres techniques ont été envisagées. En effet, un mécanisme important de l'invasion métastatique semble être la transition épithélio-mésenchymateux où les cellules n'expriment plus les marqueurs épithéliaux à leur surface ; ceux-ci étant progressivement remplacés par les marqueurs mésenchymateux. L'ISET (: *isolation by size of epithelial tumor, Rare Cell Diagnostics®*, Paris, France) utilise un premier tri des cellules potentiellement tumorales par leur taille (habituellement supérieure à 12 µm, permettant ainsi d'éliminer les cellules hématopoïétiques), indépendamment des marqueurs de surface. Krebs *et al.* ont montré sur 40 CBNPC chimio-naïfs de stade IIIA à IV, une plus grande sensibilité de la technique ISET par rapport à la technique de référence *CellSearch* soit 32/40 (80 %) prélèvements positifs contre 9/40 (23 %) avec, en plus, la possibilité de détecter des amas de cellules tumorales appelés « *circulating tumor microemboli* » (43 % versus 0 % pour la technique Veridex®) présents en grand nombre dans les prélèvements de patients avec cancer broncho-pulmonaire de stades avancés 10/23 stade IV versus 5/17 dans les stades III [43]. Les résultats d'un essai multicentrique (dit CNHC) sont en attente (inclusion clôturée en juillet 2011). Celui-ci permettra d'évaluer la prévalence de la quantité de cellules non hématologiques circulantes par les techniques Veridex® par rapport à ISET, chez des

patients ayant un cancer du poumon localement avancé (stade IIIB) ou métastatique (stade IV), en cours de traitement par chimiothérapie ou radiothérapie, en comparant avec des patients ayant une broncho-pneumopathie chronique obstructive (GOLD III ou IV).

- Analyse de l'ADN tumoral circulant

Cette technique récente est encore mal connue et a surtout été étudiée dans le cancer du sein, notamment dans une étude parue en 2013 [51], montrant une très bonne sensibilité de cette technique (97 %) contre 87 % pour les CTC dans cet échantillon de petite taille (30 femmes avec un cancer du sein métastatique). De plus, ce marqueur serait mieux corrélé à l'évolution tumorale. Cette étude est incontestablement intéressante mais ne repose que sur un faible échantillon. D'autre part, cette technique est encore peu étudiée dans le cancer bronchique et doit encore être validée dans cette pathologie. Enfin, elle est encore peu disponible en pratique.

4.2.2. Discussion du choix du seuil

Le choix du seuil est discutable. En effet, ce seuil est différent selon les études déjà réalisées (2 [23, 38] ou 5 [39]). Un seuil différent pourrait également être employé en fonction du rôle que l'on souhaite attribuer à l'énumération des CTC :

- Seuil bas pour favoriser la sensibilité aux dépends de la spécificité, dans le cadre d'un dépistage ou du suivi évolutif.
- Seuil plus élevé lorsque l'on évalue le pronostic ou la valeur prédictive de ces mesures.

4.2.3. Cas particulier du cancer bronchique

Le nombre de CTC détectées est beaucoup plus faible dans le cancer bronchique par rapport aux autres tumeurs ou cette technique a déjà été validée : cancers du sein, prostate... (fig. 21).

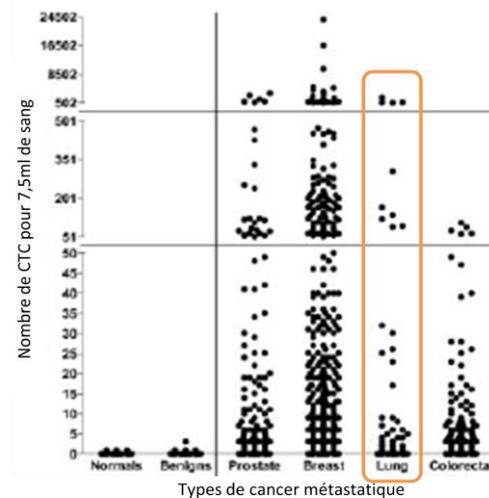


Figure 111 : Prévalence des CTC dans 7,5ml de sang chez 145 femmes donneuses saines, 199 femmes avec pathologies non malignes, et chez des patients atteints de divers carcinomes dont 188 échantillons de 123 cancers de prostate, 1316 échantillons de 422 cancers du sein, 168 échantillons de 99 cancers bronchiques, 333 échantillons de 196 cancer colorectal, d'après Allard *et al.* [23]

Par ailleurs, il semblerait qu'il existe beaucoup d'artéfacts spécifiques au cancer broncho-pulmonaire. Les cellules ont une morphologie modifiée avec des signes de souffrance cellulaire, de ce fait, sont difficiles à compter. Ces constatations pourraient être en rapport avec un grand nombre de cellules apoptotiques, surtout lors des prélèvements réalisés après les premières cures de chimiothérapie [44].

Un autre élément qui semble particulier au cancer broncho-pulmonaire est la présence de CTM (*circulating tumor microemboli*) en grande quantité. Il s'agit d'amas de CTC dans le sang périphérique. Certaines études décrivent que ces regroupements cellulaires présentent un avantage pour la survie avec une plus grande tendance à métastaser, étude animale murine dans le mélanome ou l'hépatocarcinome [52, 53]. Les marqueurs classiques

utilisés dans la technique *CellSearch* sont alors pris en défaut en raison de l'hétérogénéité d'expression des cytokératines, marqueurs de surface épithéliaux des CTC [50].

En conclusion, malgré toutes ces remarques, la détection immunomagnétique reste la meilleure option pour la détection des CTC. En effet, même si d'autres techniques sont en cours d'exploration, il existe pour l'instant un recul trop faible pour les utiliser en pratique courante. Rappelons, de plus, que seule la technique *CellSearch* de Veridex® a obtenu une autorisation d'utilisation par la *Food and drug administration* américaine, dans le suivi des cancers mammaires métastatiques. Cette technique est, de plus, bien maîtrisée par notre service d'immunologie, avec un taux de détection semblable à celui décrit jusque là dans la littérature.

4.3. DISCUSSION DES RESULTATS

4.3.1. Nombre de CTC

Après revue de la littérature, les résultats obtenus lors de cette analyse intermédiaire retrouvent des chiffres similaires à ceux évoqués dans des études préalables utilisant la même technique de détection immunomagnétique des CTC chez des patients atteints de cancers bronchiques métastatiques : 40 % soit entre 20 % [23] et 49 % [47] de prélèvements avec au moins 2 CTC/7,5 ml de sang.

4.3.2. Principales avancées potentielles à l'utilisation des CTC dans la prise en charge des cancers broncho-pulmonaires.

4.3.2.1. Un lien probable entre nombre de CTC et agressivité de la pathologie

Concernant les données cliniques des patients étudiés, nous avons retrouvé une corrélation négative entre le nombre de CTC et l'âge, or, on sait que les cancers chez les

patients jeunes sont souvent plus agressifs. De même, il existe un nombre de CTC plus élevé chez les hommes, or ce sont souvent les patients atteints également de tumeurs plus agressives [15]. A propos des caractéristiques tumorales, on réalise le même constat : les cancers plus agressifs (indifférenciés, multimétastatiques ou non localisées aux poumons) présentent, également, un plus grand nombre de CTC.

En outre, il existe une corrélation entre la variation de la taille tumorale et la variation du nombre de CTC, entre le nombre de lésions et le nombre de CTC, et, entre la taille tumorale et le nombre de CTC. En effet, tous ces facteurs sont des facteurs pronostiques connus de longue date. Le nombre de CTC semble donc présenter une valeur pronostique évidente, précocement disponible lors de la prise en charge des patients. Il reste à explorer sur une cohorte de plus grande importance les données de survie globale et survie sans progression afin d'obtenir une idée exacte de la valeur pronostique de ce marqueur.

De plus, il existe un lien avec la réponse tumorale selon les critères RECIST. Ceci confirme donc la possibilité d'utiliser les CTC comme facteurs prédictifs de réponse aux traitements et donc ainsi d'adapter la stratégie thérapeutique.

Enfin, le seuil de 2 CTC/7,5ml semble discriminant pour déterminer des groupes à risque, puisque liés à certains paramètres déjà connus comme étant de pronostic péjoratif : caractéristiques cliniques (: PS plus élevé et prédominance masculine) et caractéristiques tumorales (: variation de taille moins importante si le nombre de CTC est ≥ 2 , donc moins bonne réponse thérapeutique probable).

4.3.2.2. Utilité de cette nouvelle technique dans l'arsenal du suivi des cancers bronchiques

La détection de CTC pourrait donc servir de classification complémentaire à celles déjà utilisées : TNM (*taille node metastase*) ou RECIST (*response evaluation criteria in solid tumors*) ; cela ayant pour objectif un traitement ciblé des patients, d'autant plus qu'il s'agit un prélèvement facile, non invasif, de faible coût. A terme, on peut espérer une amélioration de la prise en charge globale, ciblée, plus précoce.

4.3.3. Points à clarifier avant son utilisation en routine

Il existe vraisemblablement des dérives à éviter avec l'utilisation de ce test. En aucun cas, il ne peut être envisagé comme un test diagnostique pour le moment, l'histologie restant le gold standard [54].

Il reste aussi à comprendre pourquoi il peut exister de si grandes variations d'un patient à l'autre. Les différences de vascularisation des tumeurs, le site de la tumeur primitive ou des métastases, l'agressivité de la tumeur (Ki67) sont des facteurs pouvant expliquer les différences de nombre de CTC détectées, qu'il faudra également étudier.

Nous pouvons également envisager un deuxième dosage de CTC avant la troisième cure de chimiothérapie ou thérapeutique ciblée, permettant ainsi d'ajuster au plus vite la prise en charge des malades avant d'attendre l'évaluation par imagerie.

4.4. PERSPECTIVES

4.4.1. Poursuite des inclusions

Dans notre étude, 200 patients doivent être inclus au total. Actuellement, l'étude se poursuit, et 53 patients ont été inclus à la date d'impression de cette thèse.

4.4.2. Etude ultérieure de biomarqueurs d'intérêt

L'intérêt est également croissant sur les informations que les CTC peuvent fournir sur les caractéristiques biologiques de la tumeur. Ainsi, il est prévu de réaliser une étude complémentaire concernant certains biomarqueurs d'intérêt dans le cancer bronchique comme ERCC1, EGFR, thymidilate synthétase, Ki67, sur les cellules tumorales circulantes. Dans ce but, le système *CellSearch* permet également la purification et l'enrichissement en CTC d'un échantillon sanguin, en vue d'analyses extérieures au système Veridex® (biologie moléculaire, microscopie... grâce au *CellSearch Profile* kit-RUO, réf. 7900004, Veridex®).

La caractérisation moléculaire des CTC pourrait donc permettre :

- De remplacer les biopsies, technique invasive, pour un suivi en temps réel de l'évolution histologique de la tumeur,
- De détecter un profil de résistance en temps réel par la caractérisation moléculaire (concordance 19/20 entre biopsie standard et dosage sur CTC et dépistage de résistance acquise aux anti-EGFR par la mutation T790M) [³²],
- D'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques expliquant la pathogenèse des métastases,
- De découvrir et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques évitant la propagation de la tumeur à distance.

5. CONCLUSION

Chez des patients atteints de cancer pulmonaire de stades IIIB et IV, le nombre de CTC est associé à différentes caractéristiques cliniques (âge, sexe masculin), tumorales (taille, nombre de lésions, localisations métastatiques), tous connus comme facteurs pronostiques péjoratifs. Cette étude suggère donc que les CTC pourraient devenir un **biomarqueur pronostique**. En effet, notre étude tend à démontrer que la détection d'un grand nombre de CTC constituerait un **facteur pronostique péjoratif**, au moins en situation métastatique. Ainsi, en cours de traitement des cancers bronchiques métastatiques, **le suivi numérique des CTC pourrait être un marqueur biologique précoce de réponse tumorale** qui permettrait, par exemple, d'adapter déjà après un cycle la chimiothérapie sans attendre l'évaluation radiologique habituellement faite après 3 ou 4 cycles de chimiothérapie.

Notre étude a permis d'envisager plusieurs perspectives d'utilisation des CTC dans le cancer bronchique. D'un point de vue diagnostique, il s'agirait de distinguer des patients à **haut risque versus à faible risque**. Plus simplement, il peut s'agir d'**affirmer d'une rechute métastatique** lors du suivi, face à une potentielle localisation secondaire difficile à biopsier.

Les CTC pourraient ensuite permettre une **caractérisation des cibles thérapeutiques et/ ou des mutations** dans les cellules tumorales, les CTC étant le reflet de la tumeur initiale, notamment le suivi des mutations EGFR (résistance secondaire aux traitements spécifiques anti-EGFR). Outre éviter une biopsie parfois invasive, les CTC auraient aussi l'avantage de permettre un **suivi répété** de ces paramètres tumoraux au long de la maladie ; ce type de suivi est important, compte tenu des changements moléculaires survenant entre une tumeur primitive et ses métastases, ainsi qu'au cours de l'acquisition de résistances aux traitements reçus. Cela permettrait idéalement de réaliser, un traitement « à la carte » des tumeurs, quel que soit le nombre de traitements antérieurement reçus.

Toutefois, des essais randomisés intégrant cet outil dans la stratégie de prise en charge du cancer bronchique restent à mettre en place avant d'utiliser cet outil en routine.

6. ANNEXE

6.1. Indice de performance de l'Organisation Médicale de la Santé (OMS) ou Performans

Status

INDICE	SIGNIFICATION
0	Capable d'une activité identique à celle précédant la maladie sans aucune restriction
1	Activité physique diminuée mais ambulatoire et capable de mener un travail
2	Ambulatoire et capable de prendre soin de soi incapable de travailler. Alité moins de 50% de son temps
3	Capable de seulement quelques soins personnels. Alité ou en chaise plus de 50% du temps
4	Incapable de prendre soin de lui-même, alité ou en chaise en permanence

6.2. Classification TNM du cancer bronchique [55]

T (Primary Tumor)	
TX	Primary tumor cannot be assessed, or tumor proven by the presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm in greatest dimension, surrounded by lung or visceral pleura, without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (i.e., not in the main bronchus) ^a
T1a	Tumor ≤ 2 cm in greatest dimension
T1b	Tumor > 2 cm but ≤ 3 cm in greatest dimension
T2	Tumor > 3 cm but ≤ 7 cm or tumor with any of the following features (T2 tumors with these features are classified T2a if ≤ 5 cm) Involves main bronchus, ≥ 2 cm distal to the carina Invades visceral pleura Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung
T2a	Tumor > 3 cm but ≤ 5 cm in greatest dimension
T2b	Tumor > 5 cm but ≤ 7 cm in greatest dimension
T3	Tumor > 7 cm or one that directly invades any of the following: chest wall (including superior sulcus tumors), diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, parietal pericardium; or tumor in the main bronchus < 2 cm distal to the carina ^a but without involvement of the carina; or associated atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung or separate tumor nodule(s) in the same lobe
T4	Tumor of any size that invades any of the following: mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, carina; separate tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe

N (Regional Lymph Nodes)

NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node(s)

M (Distant Metastasis)

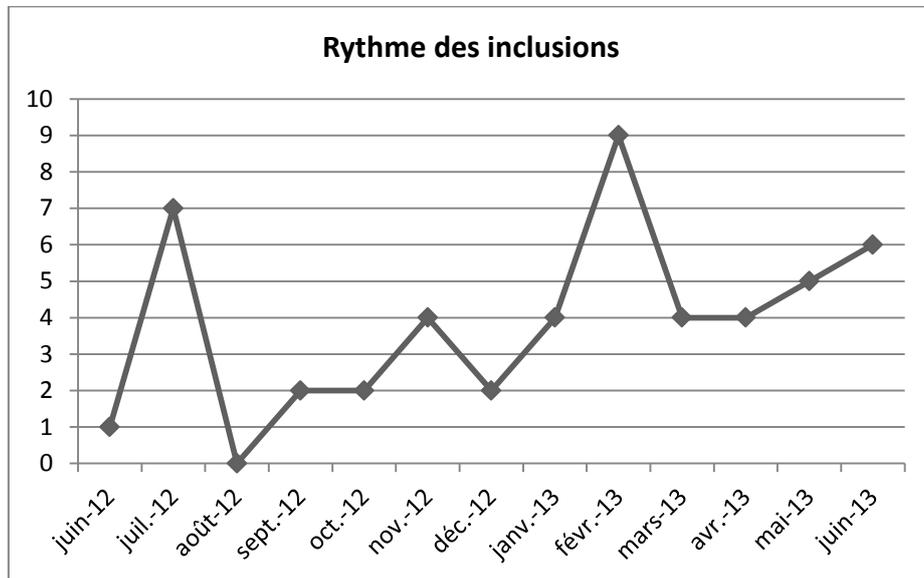
MX	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
M1a	Separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe; tumor with pleural nodules or malignant pleural (or pericardial) effusion ^b
M1b	Distant metastasis

^a The uncommon superficial spreading tumor of any size with its invasive component limited to the bronchial wall, which may extend proximally to the main bronchus, is also classified as T1.

^b Most pleural (and pericardial) effusions with lung cancer are due to tumor. In a few patients, however, multiple cytopathologic examinations of pleural (pericardial) fluid are negative for tumor, and the fluid is nonbloody and is not an exudate. Where these elements and clinical judgment dictate that the effusion is not related to the tumor, the effusion should be excluded as a staging element and the patient should be classified as T1, T2, T3, or T4.

Sixth Edition T/M Descriptor	Proposed T/M	N0	N1	N2	N3
T1 (≤ 2 cm)	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1 ($> 2-3$ cm)	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 (≤ 5 cm)	T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2 ($> 5-7$ cm)	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2 (> 7 cm)	T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3 invasion		IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (same lobe nodules)		IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (extension)	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1 (ipsilateral lung)		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
T4 (pleural effusion)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (contralateral lung)		IV	IV	IV	IV
M1 (distant)	M1b	IV	IV	IV	IV

6.3. Rythme des inclusions dans l'étude CIRCUBRONCH pour les cinquante premiers patients



6.4. Exemple de rendu de résultats pour patient n°40 après 3 cures, avec *Celltracks*®



IMPRIMER REVUE DU PATIENT

ID échantillon : M-J 040+3 ID cartouche : 01105060 Date d'impression : 11.07.2013 11:05
 ID patient :

Événement	Cadre	DAPI/CK-PE	CK-PE	DAPI	CD45-APC	
2	10					
6	15					
9	17					
10	20					
12	24					
15	33					
23	44					
24	45					
25	48					
26	48					
29	51					
40	80					

7. BIBLIOGRAPHIE

¹ American UK society web page. www.cancer.org

² Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;17

³ Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2007. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81

⁴ Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Trétarre B, Blinder-Foucard F, Colonna F, Daubisse L, Hédelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadié M, Monnereau A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schwartz C, Bovet M, Chérié-Challine L, Estève J, Remontet L, Velten M. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008;56:159-75

⁵ Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J and Thun MJ. cancer statistics 2006. *CA Cancer J Clin* 2006 ;56 :106-130

⁶ Alberg AJ, Ford JG and Samet JM. Epidemiology of lung cancer, ACCP Evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132:29S-55S

⁷ Doll R, Hill A. A study of the aetiology of carcinoma of the lung. *Br Med J* 1950;2:740-8

⁸ Hirayama T; Non smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *Br Med J* 1981;282:183-5

⁹ Boffetta P, Autier P, Boniol M, Boyle P, Hill C, Aurenco A, Masse R, Thé G, Valleron AJ, Monier R, Tubiana M. *J Occup Environ Med* 2010;52:399-406

¹⁰ Lemen RA, Dement JM, Wagoner JK. Epidemiology of asbestos-related diseases. *Environ Health Perspect* 1980; 34:1-11

¹¹ Vida S, Pintos J, Parent ME, Lavoué J, Siemiatycki J. Occupational exposure to silica and lung cancer: pooled analysis of two case-control studies in Montreal, Canada. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1602;19:1602-11

¹² Beveridge R, Pintos J, Parent ME, Asselin J, Siemiatycki J. Lung cancer risk associated with occupational exposure to nickel, chromium VI, and cadmium in two population-based case-control studies in Montreal. *Am J Ind Med* 2010;53:476-85

¹³ Guha N, Merletti F, Steenland NK, Altieri A, Coglianov V, Straif K. Lung cancer risk in painters : a meta-analysis. *Environ Health Perspect* 2010;118:303-12

¹⁴ Melloni B, Vergnenegre A, Lagrange P, Bonnaud F. Radon and domestic exposure. *Rev Mal Respir* 2000 ;17 :1061-71

¹⁵ Paesmans M, Sculier JP, Lecomte J, Thiriaux J, Libert P, Sergysels R, Bureau G, Dabouis G, Van Cutsem O, Mommen P, Ninane V and Klatersky J. Prognostic factors for survival in advanced non-small –cell lung cancer : univariate and multivariate analyses including recursive partitioning and amalgamation algorithms in 1,052 patients. The European Lung Cancer Working Party. *J Clin Oncol* 1995 ;13 :1221-30

¹⁶ Watine J, Rouzaud P and Charet JC. Bibliographic analysis of the use of laboratory blood parameters for the prognosis of primary lung cancer. *Ann Biol Clin* 1999 ;57 :57-68

¹⁷ Pantel K and Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 :448-456

-
- ¹⁸ Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A, Poupon MF. A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:5-10
- ¹⁹ Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C and Uhr J. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2073– 84.
- ²⁰ Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumor were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146.
- ²¹ Engell HC. Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumor area at operation. *Acta Chir Scand Suppl* 1955;201:1-70
- ²² Christopherson W. Cancer cells in peripheral blood: a second look. *Acta cytol* 1965;9:169-74
- ²³ Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AGJ, Uhr JW and Terstappen LWMM. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6897–6904.
- ²⁴ Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA and Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450:1235–1239
- ²⁵ Denis MG, Lipart C, Leborgne J, Lehur PA, Galmiche JP, Denis M, Ruud E, Truchaud A and Lustenberger P. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 1997; 74, 540–544
- ²⁶ Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D and Dobrovic A. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease; *Int. J. Cancer* 2000; 89, 8–13
- ²⁷ Braun S and Naume B. Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 :1623-26
- ²⁸ Sher YP, Shih JY, Yang PC, Roffler SR, Chu YW, Wu CW, Yu CL and Peck K. Prognosis of non-small cell lung cancer patients by detecting circulating cancer cells in the peripheral blood with multiple marker genes. *Clin Cancer Res* 2005; 11 :173-9
- ²⁹ Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW and Hayes DF. Circulating tumor cells versus imaging—predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:6403– 6409.
- ³⁰ Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM and Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:781–791.
- ³¹ Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis ML, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV and Terstappen LMMW. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4218–4224.
- ³² Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Iafrate AJ, Bell DW, Digumarthy S, Muzikansky A, Irimia D, Settleman J, Tompkins RG, Lynch TJ, Toner M and Haber DA. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359:366–377.
- ³³ Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG and Terstappen LWMM. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005; 65:713-18.

-
- ³⁴ Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW and Meropol NJ. Relationship of circulating tumor cells of tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213-21
- ³⁵ Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW and Meropol NJ. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009; 20:1223-29
- ³⁶ Peck K, Sher YP, Shih JY, Roffler SR, Wu CW and Yang PC. Detection and quantification of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res* 1998; 5: 2761-5
- ³⁷ Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura T, Rahman S, Tsubota N, Tsujimura T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T and Hasegawa S. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6980-6
- ³⁸ Wu C, Ha H, Li L, Zhou X, Guo Z, Zhang L, Zhang X, Zhong W, Guo H, Bremner RM, and Lin P. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients. *J Thorac Oncol.* 2009; 4: 30–36
- ³⁹ Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C and Blackhall FH. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1556-1563.
- ⁴⁰ Sequist LV, Nagrath S, Toner M, Haber DA and Lynch TJ. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells enriched from lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2009 ;4 :281-3
- ⁴¹ Eisenhauer EA, Therasse PN, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D and Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J cancer* 2009; 45:228-47
- ⁴² Allan AL and Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Clin Oncol* 2010: 2010:426218
- ⁴³ Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, Ward TH, Backen A, Clack G, Hughes A, Ranson M, Blackhall FH and Caroline Dive. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 306–315
- ⁴⁴ Food and drug administration 510 (k) Premarket notification database: prosthesis, hip, semi-constrained, metal/polymer, porous uncemented. (Accessed July 26,2004, at www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpMN/pmn.cfm)
- ⁴⁵ Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G and Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinoma. *Hum. Pathol.* 2004; 35: 122-128
- ⁴⁶ Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J and Gebauer G. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005; 7:171-85
- ⁴⁷ Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, Vénissac N, Mouroux J, Vielh P and 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, 1651–60
- ⁴⁸ Piyathilake CJ, Frost AR, Weiss H, Manne U, Heimburger DC and Grizzle WE. The expression of ep-cam (17-1a) in squamous cell cancers of the lung. *Hum Pathol* 2000 ;31:482-487.

-
- ⁴⁹ Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998;78:1194-8.
- ⁵⁰ Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F and Dive C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* 2011; 178:989-96
- ⁵¹ Dawson SJ, Tsui D, Murtaza M, Biggs H, Rueda O, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368:1199-209
- ⁵² Fidler IJ, Gersten DM and Riggs CW. Relationship of host immune status to tumor cell arrest, distribution and survival in experimental metastasis. *Cancer* 1997; 40:46-55
- ⁵³ Vona G, Estepa L, Bérout C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, Mineur A, Franco D, Lacour B, Pol S, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology* 2004; 39(3): 792-797.
- ⁵⁴ Srivastava R. What's the alternative? The worldwide web of integrative medicine. *N Engl J Med*. 2012; 366:783-5.
- ⁵⁵ Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V and Sobin L. The IASLC lung Cancer Staging Project: Proposals for The Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2: 706–714.

VU

NANCY, le **8 août 2013**

Le Président de Thèse

Professeur Y. MARTINET

NANCY, le **5 septembre 2013**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE N°6567

NANCY, le 13/09/2013

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Professeur P. MUTZENHARDT

RESUME

INTRODUCTION. Lors de la prise en charge des carcinomes broncho-pulmonaires métastatiques, un marqueur sanguin, aux valeurs pronostique et prédictive, pourrait guider le traitement. Or, grâce à des progrès techniques récents, les Cellules Tumorales Circulantes (CTC) font l'objet d'une recherche importante en oncologie thoracique pour définir leur intérêt diagnostique, pronostique et prédictif dans la réponse aux traitements. Nous avons cherché à savoir si les CTC pouvaient représenter de bons candidats concernant le suivi évolutif des cancers broncho-pulmonaires métastatiques.

PATIENTS ET METHODES. Dans cet essai prospectif, monocentrique au CHU de Nancy, nous avons analysé la détection et le profil évolutif des CTC dans le sang périphérique de cinquante patients atteints de carcinome bronchique métastatique, en première ligne de traitement, juste avant l'initiation d'un traitement spécifique et après trois cures. Les CTC ont été mesurées après séparation immunomagnétique, grâce à l'utilisation de marqueurs de surface (EpCam et cytokératines positifs, et CD45 négatif) par la technique *CellSearch* de Veridex®.

RESULTATS et DISCUSSION. Le nombre de CTC est inversement corrélé à l'âge et est plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Celui-ci est également plus important lorsque la pathologie est multimétastatique, surtout lors de localisations extra-thoraciques. De plus, le nombre de CTC, au diagnostic, est supérieur chez les patients qui vont décéder ou progresser par rapport à ceux qui sont stables ou en réponse partielle (selon les critères RECIST). De même, il existe une corrélation entre la variation de la taille tumorale et la variation du nombre de CTC. Enfin, le seuil de 2 CTC/7,5ml semble intéressant pour séparer la population en deux groupes à risques faible versus fort. En effet, les patients présentant au moins 2 CTC/7,5ml ont un performans status significativement plus élevé au diagnostic, et, sont plus souvent de sexe masculin. En outre, la variation de la taille tumorale est significativement plus faible lorsqu'il y a au moins 2 CTC/7,5ml, ce qui laisse supposer d'une moins bonne réponse aux traitements. Pour finir, il existe une tendance vers une différence de survie selon que les patients présentent moins de 2 CTC/7,5ml ou au moins 2 CTC/7,5ml.

CONCLUSION. Chez des patients atteints de cancer pulmonaire de stades IIIB et IV, un nombre élevé de CTC est associé à des caractéristiques cliniques (âge jeune, sexe masculin), tumorales (taille, nombre de lésions, localisations métastatiques). Ainsi, il semble présenter un intérêt pronostique dans le cancer bronchique, et pourrait devenir un élément supplémentaire dans le suivi des patients.

TITRE EN ANGLAIS

Circulating tumor cells in advanced lung tumors, preliminary study (CIRCUBRONCH)

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2013

MOTS-CLES : Cellules tumorales circulantes, Carcinome broncho-pulmonaire métastatique ou localement avancé, Facteur pronostique, Facteur prédictif.

INTITULE ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
