

Evaluation de la technique ScreenCell pour l'isolement et la caractérisation des cellules tumorales circulantes dans le cancer du colon

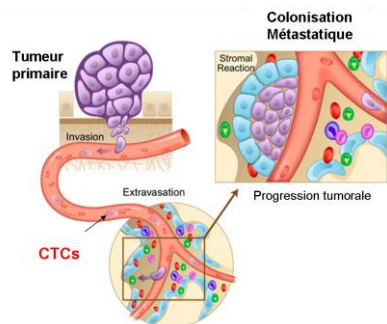
J.A. DENIS¹, A. PATRONI^{1,2}, D. PEPIN¹, N. BENALI-FURET³, J. WECHSLER³, M. BERNARD¹, M. KAROUI², J.M. LACORTE¹ DISCIPLINE BIOLOGIQUE

¹ Biochimie Endocrinienne et Oncologique, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Paris, France ; ² Chirurgie digestive et hépato-bilio-pancréatique, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière, Paris, France ; ³ ScreenCell SA, 10 avenue Charles Péguy, Sarcelles, France.

INTRODUCTION

Le cancer colorectal (CRC) est un problème de santé publique. Il représente, avec le cancer du poumon chez l'homme et le cancer du sein chez la femme, l'une des tumeurs malignes les plus fréquentes. Cependant, ces chiffres, le CRC est un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce : la survie relative à 5 ans est de 91 % pour les stades localisés et de 70 % pour les stades avec envahissement locorégional et ganglionnaire. En revanche, la survie à 5 ans est seulement d'environ 11 % en situations métastatiques.

Ces données expliquent que la mortalité imputable à ce cancer est principalement due à la diffusion de la tumeur primitive vers des localisations secondaires, principalement hépatiques ou pulmonaires.



Dans de nombreux cancers solides épithéliaux, dont le CRC, ces cellules traversent les tissus environnants autour du site tumoral primaire pour se retrouver dans la circulation sanguine et/ou lymphatique. Certaines de ces cellules sont potentiellement dangereuses car elles auraient la possibilité de générer des métastases.

La recherche sur les CTCs, notamment dans le CRC, est actuellement en plein développement. Il est maintenant admis que

❖ la numération des CTCs est un marqueur pronostique (indépendant du dosage en routine de l'ACE), avant et au cours du traitement des patients métastatiques.

❖ la caractérisation moléculaire des CTCs ouvre la possibilité de caractériser chaque tumeur permettant d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de la médecine personnalisée.

➔ Exemple du statut mutationnel du gène KRAS a été suggéré avant le traitement des patients par des thérapies ciblées anti-EGFR (cetuximab et panitumumab). A l'heure actuelle, cette détermination est faite sur l'ADN extrait du tissu tumoral mais il a été montré que cette détermination était possible sur les CTCs.

Avantages des CTCs :

Effectuer des « biopsies liquides » permettant un recueil facile, peu invasif, d'une sécurité maximale pour le patient et répétable afin de suivre la progression métastatique.

❖ **Problématique** : Les CTCs sont des cellules rares rendant l'étude des cellules CTCs dans le sang des patients atteints de CRC techniquement difficile.

- ➔ Nécessité d'une étape incontournable d'enrichissement des fractions cellulaires.
- ➔ Nombreuses technologies disponibles, la plupart sont en cours de validation.

Objectifs de ce travail

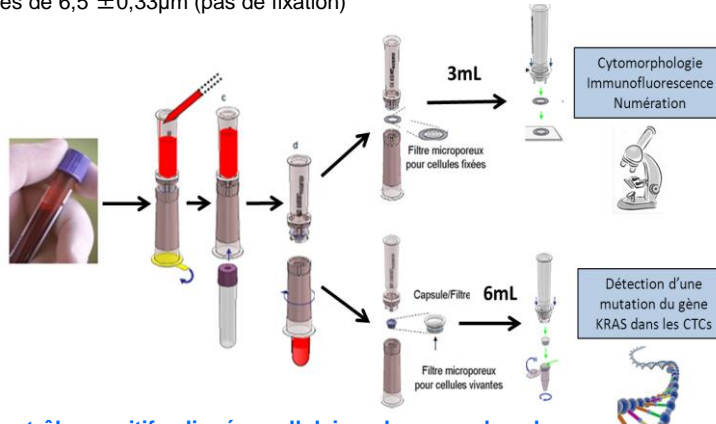
- 1) Evaluation des performances et de la praticité d'une technique d'enrichissement en CTCs grâce à un dispositif de filtration basée sur la taille des cellules (ScreenCell) pour un usage dans le cadre d'un laboratoire de biologie médicale hospitalier.
- 2) Validation du dispositif dans le cadre de la détection et la caractérisation moléculaire de CTCs chez des patients atteints de cancer colorectal.

MATERIEL ET METHODES

❖ **Enrichissement des CTCs : filtration par le dispositif ScreenCell®**

➔ Kit ScreenCell® Cyto pour coloration et marquage par immunofluorescence : pores de $7,5 \pm 0,16 \mu\text{m}$ (le tampon permet de fixer les cellules)

➔ Kit ScreenCell® MB pour les analyses de biologie moléculaire pores de $6,5 \pm 0,33 \mu\text{m}$ (pas de fixation)



❖ **Contrôles positifs : lignées cellulaires de cancer du colon**

L'évaluation des performances de détection du dispositif ScreenCellCyto® a été réalisée en utilisant 2 lignées de cellules tumorales humaines de colon (Caco-2 et HT29) qui ont été comptées puis mélangées dans un volume de 3mL de sang total.

❖ **Coloration et marquage par immunofluorescence**

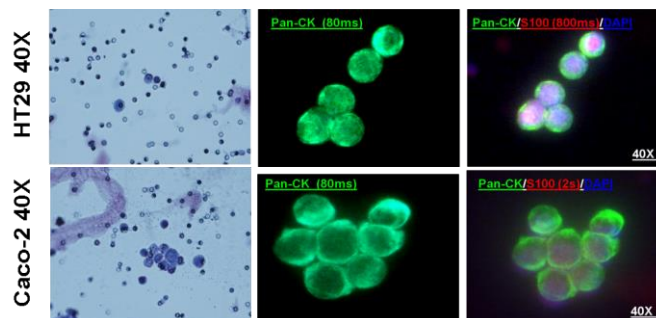
Les filtres sont colorés par un mélange d'hématoxyline/éosine pour l'étude morphologique ou marqués par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre un marqueur cytosolique Pan-Cytokératine (clone AE1/AE3) ou le marqueur nucléaire S100β.

❖ **Détermination du statut mutationnel du gène KRAS dans les CTCs**

3 ml de sang de patient atteint d'un CRC ont été dilués avec le tampon de filtration et filtrés avec le dispositif ScreenCell® MB de façon à préserver les cellules vivantes pendant la filtration. Les CTCs isolées sur le filtre ont été lysées. Les ARNs totaux ont été extraits et purifiés. Le gène cible d'intérêt (séquence mutée k-ras et séquence sauvage) dans le cDNA a été ensuite préamplifié par PCR pendant 14 cycles. Les gènes cibles ont été amplifiés en duplex par PCR en temps réel (Life Technologies).

RESULTATS

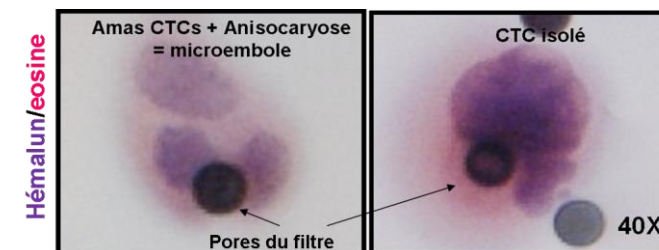
1) **Détection de cellules de lignées cellulaires tumorales (Caco2 et HT29)**



Morphologie et phénotypage des cellules détectées sur le filtre ScreenCell® Cyto après filtration de 100 cellules de 2 lignées cellulaires de cancer du colon

RESULTATS (SUITE)

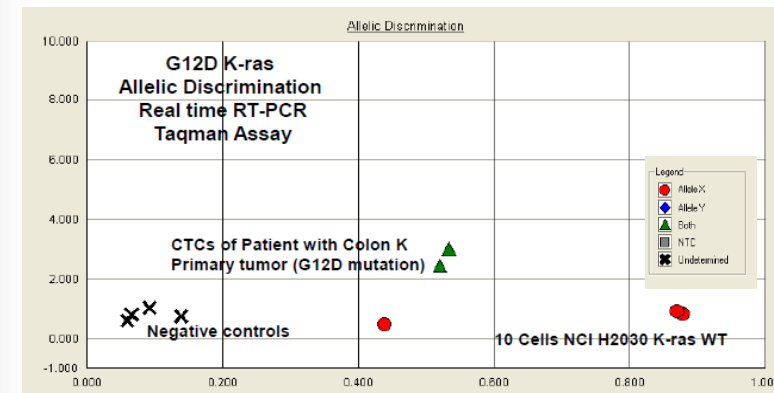
2) **Analyse morphologique de CTCs d'un patient atteint d'un adénocarcinome colique 1 jour avant l'opération chirurgicale**



Nos résultats montrent qu'il est possible de détecter et de quantifier les CTCs par une coloration hemalum/eosine.

Dans l'exemple ci-dessus, 10 CTCs ont été détectées chez ce patient : ➔ 8 CTCs classées certaines et 2 incertaines sur les bases de critères morphologiques (dont la taille, le rapport nucléocytoplasmique et l'hyperchromie)

3) **Détection dans les CTCs de la mutation KRAS G12D par discrimination allélique**



Cette détermination a été testée sur plusieurs patients atteints de cancer du colon. Pour l'un d'entre eux, la tumeur primaire a été analysée par pyroséquençage révélant une mutation somatique G12D dans le gène KRAS. La détection et la caractérisation moléculaire des CTCs ont pu être réalisées sur ce patient grâce à une technique de discrimination allélique.

Nos résultats montrent qu'il est possible de détecter la mutation G12D K-ras par discrimination allélique après amplification du cDNA des CTCs isolées du sang de patient avec le dispositif ScreenCell®. Cette mutation est identique à celle retrouvée dans le tissu de la tumeur primaire du même patient.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le système ScreenCell® d'enrichissement des CTCs permet :

- 1) de détecter des cellules CTCs après une phase de filtration rapide compatible avec une utilisation dans un laboratoire de biologie médicale.
- 2) de détecter des mutations KRAS dans les CTCs afin de suivre la dissémination de ces cellules après la colectomie.
- 3) d'analyser le profil moléculaire et phénotypique des CTCs et d'étudier l'hétérogénéité tumorale dans le cancer colorectal.